

Université de Montréal

Impact du genre et du modèle sur les mécanismes
d'épileptogénèse dans le cerveau immature

Par
Berline Foadjo Awoumé

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade
de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences neurologie

Avril 2009

© Berline Foadjo Awoumé, 2009

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Impact du genre et du modèle sur les mécanismes
d'épileptogénèse dans le cerveau immature.

Présenté par :

Berline Foadjo Awoumé

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Richard Robitaille (PhD)
Président-rapporteur

Dr Lionel Carmant (M.D)
Directeur de recherche

Dr Vincent Castellucci (PhD)
Membre de jury

RÉSUMÉ

Les modèles kainate et pentylènetétrazole représentent deux modèles d'épilepsie du lobe temporal dont les conséquences à long terme sont différentes. Le premier est un modèle classique d'épileptogénèse avec crises récurrentes spontanées tandis que le second se limite aux crises aiguës. Nous avons d'abord caractérisé les différents changements survenant dans les circuits excitateurs et inhibiteurs de l'hippocampe adulte de rats ayant subi des crises à l'âge immature. Ensuite, ayant observé dans le modèle fébrile une différence de pronostic liée au genre, nous avons voulu savoir si cette différence était aussi présente dans des modèles utilisant des neurotoxines.

L'étude électrophysiologique a démontré que les rats KA et PTZ, mâles comme femelles, présentaient une hyperactivité des récepteurs NMDA au niveau des cellules pyramidales du CA1, CA3 et DG. Les modifications anatomiques sous-tendant cette hyperexcitabilité ont été étudiées et les résultats ont montré une perte sélective des interneurons GABAergiques contenant la parvalbumine dans les couches O/A du CA1 des mâles KA et PTZ. Chez les femelles, seul le DG était légèrement affecté pour les PTZ tandis que les KA présentaient, en plus du DG, des pertes importantes au niveau de la couche O/A. Les évaluations cognitives ont démontré que seuls les rats PTZ accusaient un déficit spatial puisque les rats KA présentaient un apprentissage comparable aux rats normaux. Cependant, encore une fois, cette différence n'était présente que chez les mâles. Ainsi, nos résultats confirment qu'il y a des différences liées au genre dans les conséquences des convulsions lorsqu'elles surviennent chez l'animal immature.

Mots-clés : kainate · pentylènetétrazole · épilepsie · hippocampe · système excitateur · système inhibiteur · séquelles cognitives · hyperexcitabilité · cellules pyramidales · interneurons GABAergiques.

SUMMARY

Kainate and pentylenetetrazole models represent two animal models of temporal lobe epilepsy in which long-term consequences differ. The first model is a classical model of epileptogenesis with spontaneous recurrent seizures while the second one is limited to acute seizures. We wanted to characterize the difference in changes which occur in excitatory and inhibitory systems of the hippocampus of adult males and females having suffered an episode of status epilepticus during the immature stage of life. Besides having noticed a difference between genders in the febrile model, our second objective was to see if this difference was also present in models using neurotoxins.

Electrophysiology recordings indicated that KA and PTZ rats (both male and female) showed a hyperactivity of NMDA receptors in CA1, CA3 and DG pyramidal cells. Anatomical modifications causing hyperactivity were studied and results show a selective loss of specific GABA interneurons PV in the O/A layer of CA1 region of the hippocampus in KA and PTZ male rats. However in female rats, only the DG layer was slightly affected in PTZ while female KA presented losses in both DG and O/A layers.

Cognitive evaluation indicated that only PTZ rats showed a spatial impairment since KA rats had a similar learning pattern as controls. However, once again, that difference was observed only in males and not in females.

In summary, our results confirmed that there is a difference between genders regarding brain damages after having suffered an episode of status epilepticus during the immature stage.

Key words: kainate · pentylenetetrazole · epilepsy · hippocampus · excitatory system · inhibitory system · cognitive consequences · hyperexcitability · pyramidal cells · GABA interneuron

TABLE DES MATÈRES

TITRE.....	i
IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
RÉSUMÉ	iii
SUMMARY	iv
TABLE DES MATÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES FIGURES ET GRAPHIQUES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xiv
I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS.....	1
1. Introduction.....	2
1.1 Définition de l'épilepsie.....	2
1.1.1 Épilepsie du lobe temporal	5
1.1.2 Modèles d'épilepsie du lobe temporal	6
1.1.2.1 <i>Le modèle Kainate</i>	6
1.1.2.2 <i>Le modèle pentylènetétrazole</i>	7
1.2 Hippocampe d'un rat contrôle.....	7
1.2.1 La structure et l'organisation interne.....	8
1.2.2 Les neurotransmetteurs et leurs récepteurs.....	11
1.2.2.1 <i>Le glutamate et ses récepteurs</i>	11
1.2.2.1.1 <i>Les récepteurs NMDA</i>	12
1.2.2.1.2 <i>Les récepteurs kainate</i>	14
1.2.2.2 <i>Le GABA et ses récepteurs</i>	15
1.3 Hypothèse et objectifs.....	16
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	18
2. Matériels et méthodes	19
2.1 Traitements in Vivo.....	19
2.1.1 Induction des crises épileptiques.....	19
2.1.2 Test d'apprentissage de Morris Water Maze.....	20
2.1.3 Perfusion des rats	22
2.1.4 Prélèvements vaginaux.....	23

2.2 Traitements in Vitro	24
2.2.1 Électrophysiologie	24
2.2.1.1 Préparation des tranches fraîches d'hippocampe	24
2.2.1.2 Enregistrements de l'activité spontanée	25
2.2.2 Immunohistochimie	28
2.2.2.1 Préparation des coupes d'hippocampe	28
2.2.2.2 Détection Immunohistochimique	29
2.2.2.3 Analyse des résultats	30
III. RÉSULTATS	31
3. Résultats	32
3.1 Les crises récurrentes spontanées	32
3.2 Les résultats d'électrophysiologie	32
3.3 Le test d'apprentissage	42
3.4 Évaluation de la perte sélective de cellules	48
IV. DISCUSSION	57
4. Discussion	58
4.1 L'évaluation des crises récurrentes spontanées	58
4.2 Les modifications subies par les récepteurs NMDA	58
4.3 Le déficit spatial	60
4.4 La perte de cellules neuronales	62
V. CONCLUSION	65
5. Conclusion	66
VI. RÉFÉRENCES	67
6. Références	68

LISTE DES TABLEAUX

III. RÉSULTATS

Tableau I : Caractéristiques des interneurons de l'hippocampe.10

Tableau II : Valeurs significatives représentant la différence entre les rats traités et contrôles mâles dans toutes les aires.....35

Tableau III : Valeurs significatives représentant la différence entre les rats traités et contrôles femelles dans toutes les aires.....35

Tableau IV : Valeurs significatives représentant la différence entre les rats mâles et femelles dans toutes les aires.....36

LISTE DES FIGURES ET GRAPHIQUES

I. INTRODUCTION

Figure 1 : Mécanisme de l'excitotoxicité.....	5
Figure 2 : Les structures internes de l'hippocampe.....	10
Figure 3 : Neurone pyramidale du CA1 et les différentes couches de l'hippocampe.....	11
Figure 4 : Rôle des récepteurs NMDA dans la coordination de l'activité pré et postsynaptique.....	13
Figure 5 : Schéma du récepteur canal GABA _A	16

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Figure 6 : Schéma représentant les subdivisions et les cadrans de la piscine.....	21
Figure 7 : Positionnement des électrodes dans une tranche d'hippocampe.....	27

III. RÉSULTATS

Figure 8 : Exemple de tracé de l'activité spontanée obtenue dans les trois groupes de rat.....	33
Figure 9 : Exemple du marquage immunohistochimique dans la région CA3 d'un rat contrôle.....	49
Figure 10 : Images représentant les noyaux des cellules immunopositives au NeuN.....	50

Figure 11 : Images représentant les interneurones immunopositives à la PV chez les mâles.....52

Figure 12 : Images représentant les interneurones immunopositives à la PV chez les femelles.....54

III. RÉSULTATS

Graphique 1 : Moyenne des fréquences de l'activité spontanée au niveau de l'aire CA3 des trois groupes de rats (Ctrl, PTZ, KA).....34

Graphique 2 : Comparaison des moyennes de fréquences de l'activité spontanée entre sexe des trois groupes de rats.34

Graphique 3 : Moyenne des fréquences de l'activité spontanée chez les rats mâles et femelles au niveau des trois aires de l'hippocampe.....37

Graphique 4: Différence de l'activité spontanée entre mâles et femelles au niveau des trois aires des trois groupes de rats.....38

Graphique 5: Comparaison des moyennes des fréquences de l'activité spontanée dans les trois aires de tous les groupes de rats.39

Graphique 6: Comparaison des moyennes des fréquences de l'activité spontanée des rats femelles selon leur cycle hormonal.....39

Graphique 7: Comparaison des moyennes des fréquences de l'activité spontanée chez les femelles en proestrus/metestrus et les mâles des groupes contrôle et PTZ.....41

Graphique 8: Schéma du test d'apprentissage chez les mâles des trois groupes pendant 5 jours consécutifs.....43

Graphique 9: Schéma du test d'apprentissage chez les femelles des trois groupes pendant 5 jours consécutifs.....	43
Graphique 10 : Comparaison des moyennes du temps de latence entre mâles et femelles contrôles.....	44
Graphique 11: Comparaison des moyennes du temps de latence entre mâles et femelles traités.....	45
Graphique 12: Probe trial chez tous les groupes de rats.....	47
Graphique 13: Comparaison entre mâles et femelles de tous les groupes dans le test de probe trial.....	47
Graphique 14 : Test visuel chez tous les groupes de rats.....	48
Graphique 15: Histogramme sommaire de cellules immunopositives à la PV chez les rats mâles des trois groupes.....	53
Graphique 16 : Histogramme sommaire de cellules immunopositives à la PV chez les rats femelles des trois groupes.....	55
Graphique 17 : Comparaison du nombre d'interneurones PV entre mâles et femelles contrôles.....	55
Graphique 18 : Comparaison entre les pertes d'interneurones PV des mâles et femelles traités.....	56

LISTE DES ABRÉVIATIONS

PTZ: Pentylènetétrazole

KA: Kainate

NMDA: N- Methyl-D-Aspartate

Mg²⁺: Ion magnesium

Ctrl: Contrôle

Ca²⁺ : Ion calcium

Na⁺ : Ion sodium

K⁺ : Ion potassium

GABA : Acide- γ -amino-butérique

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate

CA1 : Corne d'ammon 1

CA3 : Corne d'ammon 3

DG : Dentate Gyrus

O/A : Oriens/Alvéus

R/LM : Radiatum / Lacunosum-moleculare

PV : Parvalbumine

NeuN : Neuronal Nucleus

SOM : somatostatine

NR1 : Sous-type 1 du récepteur NMDA

NR2 : Sous-type 2 du récepteur NMDA

PKC: Protéine kinase C

PKA: Protéine kinase A

RACK1: Receptor for Activated C Kinase 1

Cak β : Cell adhesion kinase β

PyK2: Proline rich tyrosine kinase 2

Src: Famille de protéine tyrosine Kinase

Csk: C-terminal Src Kinase

Fyn: Famille de protéine tyrosine Kinase

GluR : Sous type du récepteur kainate avec faible affinité pour le kainate

KA1: Sous-type 1 du récepteur kainate avec forte affinité pour le kainate

KA2: Sous-type 2 du récepteur kainate avec forte affinité pour le kainate

GAD: Glutamic Acid Decarboxylase

GABA_A: Sous-type A du récepteur GABA

GABA_B: Sous-type B du récepteur GABA

GABA_C: Sous-type C du récepteur GABA

mg/kg : Milligramme par Kilogramme

mn : Minutes

mm : Millimètres

mM : Millimolaires

μM : Micromolaires

°C : Degré Celsius

Cm : Centimètres

Hz : Hertz

U/ml : Unité par millilitre

% : Pourcentage

PBS: Phosphate buffered saline

PFA: Paraformaldéhyde

NGS: Normal Goat Serum

LCSA: Liquide céphalo-spinal artificiel

NaCl: Chlorure de sodium

KCl: Chlorure de potassium

MgSO₄: Sulfate de Magnésium

CaCl₂: Chlorure de Calcium

KH₂PO₄: Potassium diphosphate

NaHCO₃: Bicarbonate de soude

OCT: Tissue Tek compound

Anti-PV: Anticorps anti parvalbumine

Anti-NeuN: Anticorps anti Neuronal Neuclei

LTP : Long Terme Potentialisation

*Je dédie ce mémoire à ma chère famille
pour le soutien inconditionnel et inestimable
qu'elle m'a apporté chaque jour*

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de recherche Dr Lionel Carmant de m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'avoir cru à mes capacités à mener ce projet jusqu'au bout. J'ai apprécié son support, sa patience, sa confiance et ses conseils.

Je remercie le Dr Caterina Psarropoulou de m'avoir enseigné les techniques d'électrophysiologie, de m'avoir aidé à développer les aptitudes nécessaires au laboratoire mais surtout d'avoir initié ce projet.

Je remercie le Dr John Kalaska de m'avoir donné cette chance de compléter mes études à temps partiel. J'ai apprécié son support et ses conseils.

Je remercie ma famille spécialement ma mère et mon époux qui m'ont encouragé et supporté dans les moments difficiles, ainsi que ma collègue Mme Martine Emond qui m'a encouragée à terminer mes travaux.

Je remercie M. Pablo Lema pour son aide dans les protocoles et le test de mémoire, Dr Graziella Di Cristo qui m'a aidé dans les techniques d'immunohistochimie et ma collègue et amie Maylissa Ollivier pour les enregistrements des crises spontanées récurrentes.

Je remercie les Instituts de Recherches de Santé du Canada (IRSC) pour leur soutien financier sans lequel ces travaux n'auraient pu être réalisés.

Je remercie tous les membres de Jury d'avoir accepté de prendre un moment dans leur précieux temps pour évaluer ce mémoire.

I. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

1. Introduction

Le terme épilepsie vient d'un mot grec «epilêpsia» qui signifie «prendre possession de». Les Grecs croyaient que des démons étaient à l'origine des crises épileptiques, qu'ils considéraient comme un phénomène surnaturel (Épilepsie Canada). Cependant, Hippocrate ne croyait pas à cela et a émis l'hypothèse selon laquelle l'épilepsie n'était pas sacrée, mais provenait d'un trouble du cerveau. Autour du 18^e siècle, son point de vue a commencé à être accepté et au 19^e siècle, la conception de l'épilepsie en tant que trouble du cerveau est devenue de plus en plus évidente (Épilepsie Canada). En 1873, Hughlings Jackson, un neurologue londonien, établit alors que les crises résultaient de brèves décharges électrochimiques d'énergie dans le cerveau, la nature des crises variant selon le siège des décharges et la fonction cérébrale en jeu. Au cours du 20^e siècle, la biologie a fait des progrès remarquables grâce au développement et au perfectionnement de différentes techniques et a alors permis de mieux comprendre certains désordres affectant le système nerveux central tels que l'épilepsie.

1.1 Définition de l'épilepsie

L'épilepsie est une maladie neurologique causée par le fonctionnement anormal de cellules nerveuses cérébrales (neurones). Ce fonctionnement anormal, résultent d'une hyperexcitabilité et d'une hyper synchronie d'une population de neurones qui se traduit électriquement et cliniquement par des crises épileptiques (Baldy-Moulinier M., 1997). Ces crises peuvent être partielles simples sans perte de conscience, partielles complexes avec perte de conscience ou généralisées. Dans les épilepsies partielles, les crises sont focales et limitées à une région cérébrale tandis que dans les épilepsies générales, les crises s'étendent

aux deux hémisphères cérébraux (Baldy-Moulinier M., 1997). Il existe différentes classifications des épilepsies dont selon le type de crise (partielles ou généralisées), ou selon la cause de la crise (lésionnel ou symptomatique, génétique ou idiopathique). L'épileptogénèse est plurifactorielle et peut faire intervenir des facteurs acquis (épilepsies symptomatiques où la cause peut être déterminée) ou des facteurs génétiques (épilepsies idiopathiques dont la cause est difficile à déterminer car ils combinent souvent les facteurs génétiques et environnementaux) (Baldy-Moulinier M., 1997). Ces facteurs épileptogéniques sont multiples, se combinent et peuvent toucher :

* *Les propriétés intrinsèques des membranes neuronales* essentiellement les canaux ioniques voltage-dépendant, les canaux sodiques, les canaux calciques, les canaux potassiques dont la distribution et la constitution peuvent être soumises à des variations physiologiques et pathologiques

* *La transmission synaptique* associant les systèmes excitateurs dont le neurotransmetteur est le glutamate et les systèmes inhibiteurs dont le neurotransmetteur est le GABA (Acide- γ -amino-butyrique)

* *Les systèmes neuromodulateurs* qui interviennent sur les systèmes excitateurs et inhibiteurs (l'acétylcholine, les monoamines, les neuropeptides, l'adénosine) (Baldy-Moulinier M., 1997).

Le dysfonctionnement d'un ou plusieurs de ces éléments entraîne un déséquilibre entre les systèmes excitateurs et inhibiteurs qui aboutit aux crises épileptiques. Et selon le cas, les crises peuvent résulter :

* *D'une diminution de l'inhibition GABAergique* par altération des composantes du système GABAergique (défaut de synthèse et/ou de libération du GABA, dysfonctionnement du récepteur) ou par absence d'activation des interneurons GABAergique.

* *D'une augmentation de l'inhibition GABAergique* (facteur d'hyper synchronie)

* *D'un renforcement de la transmission excitatrice* (libération excessive de glutamate, modification de ses récepteurs) ou *d'un développement de circuits récurrents excitateurs* (Baldy-Moulinier M., 1997).

Lorsque les crises convulsives initiales durent longtemps, elles entraînent des conséquences cérébrales telles que des lésions cellulaires (perte neuronale, réaction gliale) capable de provoquer des déficits immédiats plus ou moins réversibles mais aussi d'entraîner les changements ci-haut mentionnés déclenchant ainsi une épileptogénèse secondaire. Ces lésions cellulaires qui résultent des crises seraient liées au phénomène d'excitotoxicité déclenché par une activation excessive des récepteurs glutamatergiques qui crée une accumulation intracellulaire accrue d'ions calcium qui va provoquer une cascade de réactions physiologiques aboutissant au processus d'apoptose ou de mort cellulaire (figure 1) (Patel et al, 1996; Marrison RS et al, 1996). La perte neuronale qui accompagne les crises d'épileptiques présente des patrons différents d'un type à l'autre. Dans le cas des épilepsies partielles du lobe temporal, cette perte cellulaire est associée à un patron d'atrophie appelé sclérose hippocampique.

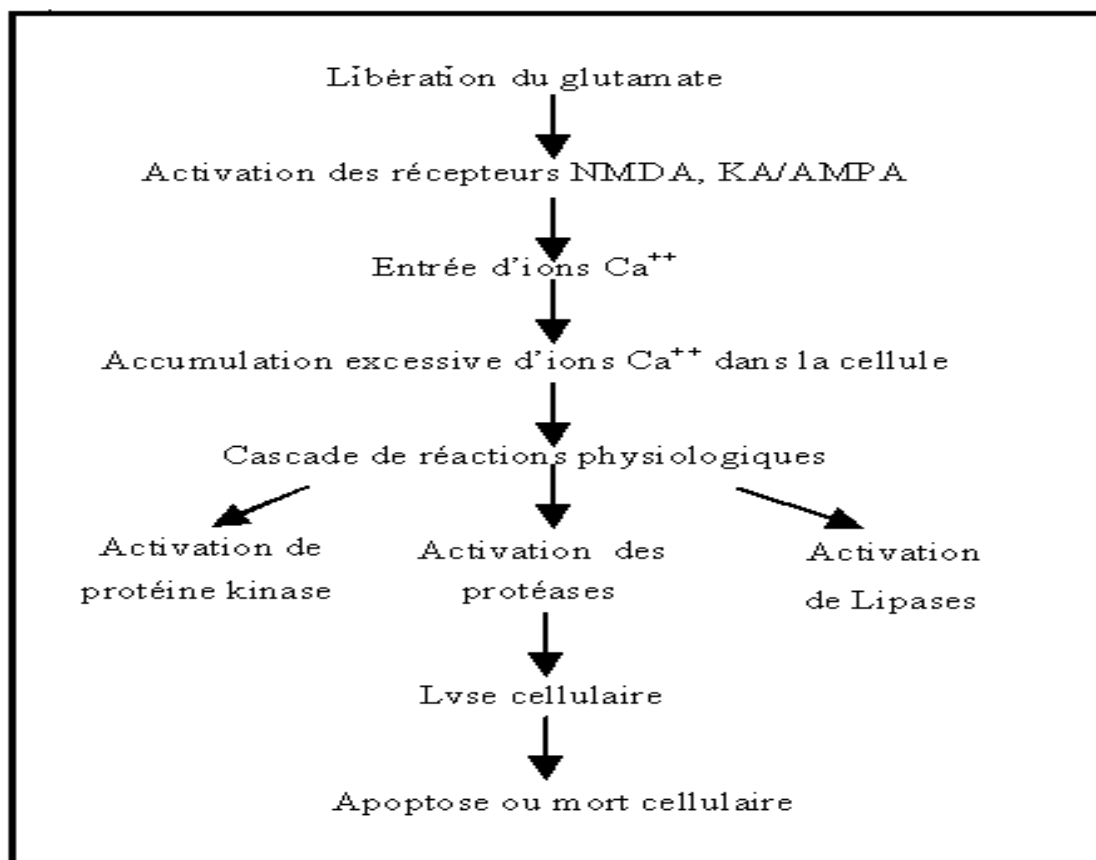


Figure 1 : Mécanisme de l'excitotoxicité

L'accumulation excessive des ions calcium entraîne des cascades de réactions intracellulaires qui causent la mort cellulaire ou apoptose.

1.1.1 Épilepsie du lobe temporal

Les épilepsies du lobe temporal entraînent des crises de type partielles complexes qui impliquent principalement les structures du système limbique (hippocampe et amygdale). Ces épilepsies sont le plus souvent pharmacorésistantes et la chirurgie est souvent la principale solution thérapeutique définitive. Elles sont associées à une perte neuronale avec gliose (sclérose) ainsi qu'à un réarrangement axonal au niveau de l'hippocampe. Chez l'humain et dans les modèles animaux, cette perte neuronale a été décrite aux niveaux des cellules pyramidales de la corne d'Amon ainsi que dans les fibres moussues du hile

(Mathern et al, 1995; El Bahh et al, 1999). Ils s'accompagnent aussi d'un bourgeonnement (sprouting) de fibres moussues responsable de l'apparition de circuits excitateurs aberrants et d'une épileptogénèse secondaire (Baldy-Moulinier, 1997). Mais il a aussi été décrit une perte plus spécifique de deux types particuliers d'interneurones principalement dans le cerveau immature qui est plus résistant aux insultes: ceux exprimant la parvalbumine et la somatostatine (Gorter et al, 2001; Renaud et al, 2002; Sanon et al, 2005). Afin d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans ce phénomène d'épileptogénèse, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés. Ils sont soit in Vivo sur des modèles d'animaux d'épilepsie génétique ou d'épilepsie acquise (épilepsie par kindling, par administration d'agents convulsivants tels que l'acide Kainique, la pilocarpine, le pentylènetétrazole...) soit sur des modèles in Vitro sur des tranches de tissu ou de cultures de neurones (Baldy-Moulinier, 1997). Dans notre projet, nous nous sommes penchés sur deux de ces modèles animaux : celui de l'acide kainique et du pentylènetétrazole. Ce sont deux agents qui induisent des status prolongés mais seul l'acide kainique a été associé à l'occurrence de crises récurrentes spontanées, la confirmation clinique des mécanismes d'épileptogénèse.

1.1.2 Modèles d'épilepsie du lobe temporal

1.1.2.1 *Le modèle Kainate*

Dans le modèle KA, les crises initiales apparaissent de façon progressive dans les premières heures après l'administration intrapéritonéale du KA (agoniste des récepteurs glutamate), pour aboutir à un status epilepticus avec des convulsions prolongées et sévères. Ces crises ont été décrites comme étant des crises limbiques secondairement généralisées (Ben Ari et al, 1981). Suite à l'apparition du status epilepticus pendant plusieurs heures, ces animaux

présentent une période silencieuse de plusieurs semaines suivi de crises spontanées récurrentes d'origine limbique (Ben Ari, 1985). Ben Ari a décrit l'association de ces crises limbiques à un patron de mort neuronale dans l'hippocampe (sclérose hippocampique) comme ce qui est observé chez l'homme atteint d'épilepsie du lobe temporal.

1.1.2.2 Le modèle pentylènetétrazole

Dans le modèle PTZ, les crises initiales apparaissent rapidement et aboutissent immédiatement à un status epilepticus après l'administration intrapéritonéale du PTZ (bloqueur des récepteurs GABA_A). Contrairement au modèle KA, l'action du PTZ dans le mécanisme épileptogénique au niveau cellulaire reste encore non clarifié. Ce modèle ne présente pas de patron de sclérose hippocampique, ni de crises spontanées récurrentes (Huang et al, 2002). Cependant, il a été décrit qu'après une crise généralisée, les animaux injectés jeunes au PTZ présentaient des changements électrophysiologiques permanents au niveau des circuits hippocampique à l'âge adulte (Meilleur et al, 2000 ; Meilleur et al, 2003 ; Zhu LJ et al, 2004 ; Bo T et al, 2004).

Afin de mieux étudier et comprendre les mécanismes cellulaires reliés à l'activité épileptiforme de l'hippocampe de nos modèles, nous allons d'abord décrire la structure et les circuits de l'hippocampe d'un rat sain.

1.2 Hippocampe d'un rat contrôle

L'hippocampe est une petite structure sous-corticale enroulée sur elle-même situé dans la face médiane du lobe temporal. Connecté à l'amygdale, au septum et au thalamus,

l'hippocampe fait parti du système limbique et il joue un rôle fondamental dans l'apprentissage, la mémoire déclarative ou explicite et les émotions (Bear et al, 1998).

1.2.1 La structure et l'organisation interne

L'hippocampe est formé de deux structures repliées l'une sur l'autre en forme de U : le *gyrus dentelé* (GD), et la *corne d'Ammon* (Cajal, 1911; Lorente de NÓ, 1934). La corne d'Ammon est divisée en trois parties : CA1, CA2 et CA3 (Lorente de NÓ, 1934) (figure 2). Ces structures sont composées de cellules qui se répartissent en deux populations: les cellules principales (cellules pyramidales et cellules granulaires) et les cellules non principales (interneurones).

Les cellules principales du GD sont nommées cellules granulaires tandis que celles de la corne d'Ammon sont les cellules pyramidales. Ces cellules principales sont contenues dans cinq couches distinctes : Stratum Alveus, Stratum Oriens, Stratum Pyramidale, Stratum Radiatum et Stratum Lacunosum-moleculare (Ishizuka et al, 1995) (figure 3). Elles forment un circuit tri-synaptique excitateur où l'information circule du GD à la région CA1. En fait, l'information part du cortex entorhinal (voie perforante) vers les cellules granulaires du GD qui envoient ensuite leurs axones (fibres moussues) vers les cellules pyramidales de la région du CA3. Les cellules du CA3 projettent à leur tour leur axone (collatérales de Schaeffer) sur les cellules pyramidales de la région CA1 qui envoient leur projection hors de l'hippocampe vers le subiculum qui contacte en retour le cortex entorhinal formant ainsi une boucle anatomique. Ce transfert d'information se fait grâce aux contacts (synapses) établis entre les axones et les dendrites d'un neurone à un autre. Les dendrites possèdent des épines dendritiques sur lesquelles des synapses peuvent être établies. Un seul neurone

possède plusieurs dizaines de milliers d'épines dendritiques qui rendent possible une multitude de synapses.

Les interneurons (cellules non principales) sont quant à eux des neurones inhibiteurs qui forment une population plus hétérogène, contrairement aux cellules pyramidales qui sont plus homogènes, ce qui leur donne une classification plus variée. Ils sont ainsi classés selon la localisation de leur corps cellulaire, selon leur zone de projection axonale, selon la morphologie de leurs dendrites ou selon leur contenu neurochimique (Tableau I) (Freund et Buzsaki, 1996). Dans cette dernière classification, se trouvent les cellules exprimant des protéines chélatrices du calcium telles que la parvalbumine (PV), la calrétinine (CR) ou la calbindine (CB) ainsi que celles exprimant des neuropeptides tels que la cholécystokinine (CCK), la somatostatine (SOM) ou le peptide vasoactif intestinal (VIP) (Freund et Buzsaki, 1996). La classe selon le contenu chimique s'avère donc une classe très importante dans le modèle d'épilepsie du lobe temporal, car une diminution des interneurons exprimant la PV et la SOM dans la région du CA1 de l'hippocampe de rat KA a été démontrée (Best et al, 1993).

Dans l'hippocampe, les cellules principales représentent 90% des neurones et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur; tandis que les interneurons représentent 10% des neurones et utilise le GABA comme neurotransmetteur (Freund et Buzsaki, 1996). Les interneurons inhibiteurs régulent l'activité neuronale de l'hippocampe en inhibant les cellules pyramidales (Andersen et al, 1964).

Type de cellules	Afférences	Protéines liant le Ca^{2+}	Neuropeptides
Axo-axonique	CA3, CA1, CE	PV	CCK
Cellules à panier	CA3, CA1, CE	PV	CCK, PIV
Verticale	CA3, CA1, CE	CB	NPY
Horizontale	CA1	CB	SOM, NPY
Etoilé	CA3, CE	CB	-
Radiatum	CA3	CB	CCK
IS-1	CA3, CE	CR	PIV
IS-2	CE	CR	PIV
IS-3	CA3, CA1, CE	CR	PIV

CB : Calbindine **CCK** : Cholécystokinine **CE** : Cortex entorhinal **CR** : Calréétinine

NPY : Neuropeptide **PIV** : Polypeptide **PV** : Parvalbumine **SOM** : Somatostatine.

Tableau I : Caractéristiques des interneurons de l'hippocampe.

Tiré et adapté de Freund et Buzsaki, 1996.

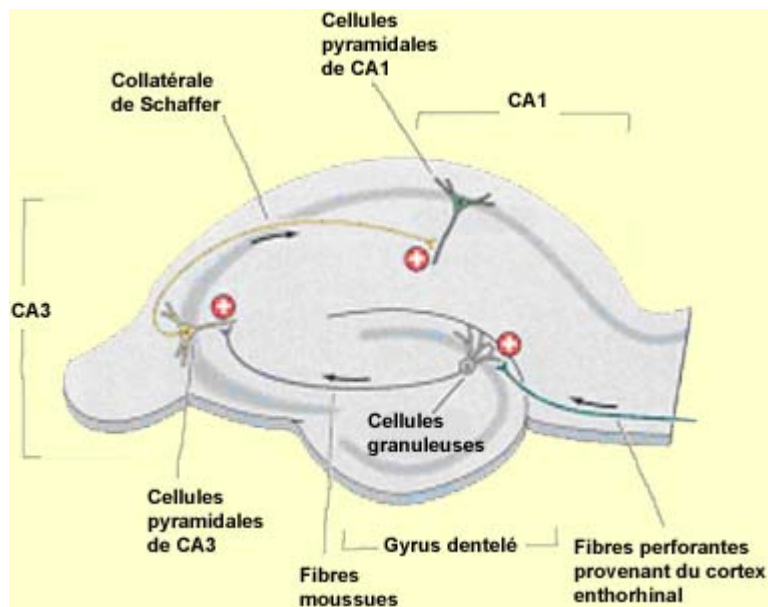


Figure 2 : Les structures internes de l'hippocampe.

CA1: corne d'Amon 1 CA3: corne d'Amon 3 *Figure tirée de <http://lecerveau.mcgill.ca>*

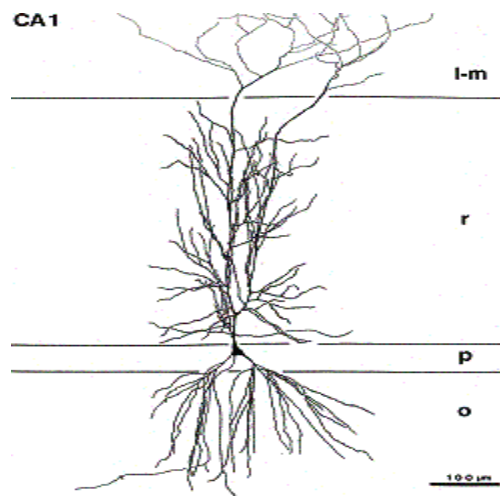


Figure 3 : Neurone pyramidale du CA1 et les différentes couches de l'hippocampe.

L-M : Stratum Lacunosum-moleculare, **R** : Stratum Radiatum, **P** : stratum pyramidale, **O** : stratum Oriens. *Tiré d'Ishizuka et al. 1995*

1.2.2 Les neurotransmetteurs et leurs récepteurs

1.2.2.1 Le glutamate et ses récepteurs

Le glutamate ou acide glutamique est le principal neurotransmetteur dans les cellules principales de l'hippocampe. Il est en général, synthétisé au niveau présynaptique à partir de la glutamine et libéré dans la fente synaptique où il se fixe à deux types de récepteurs : les récepteurs ionotropiques qui sont des canaux ioniques dont l'ouverture dépend de la liaison du ligand et les récepteurs métabotropiques, qui sont couplés aux protéines G et une cascade de messagers secondaires. Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont subdivisés en 3 classes : les récepteurs NMDA activés par le N-Methyl-D-Aspartate; les récepteurs AMPA activés par le α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate et les récepteurs KA activés par le kainate. Tous ces sous-types de récepteurs sont sensibles au glutamate et localisés sur les mêmes synapses.

1.2.2.1.1 Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs ionotropes formés de deux sous-unités : NR1 et NR2 qui forme leur canal central. Les sous-unités NR1 sont obligatoires pour le fonctionnement du récepteur tandis que les sous-unités NR2 spécifient les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NMDA (leur sensibilité au glutamate, leur perméabilité au Ca^{2+} , l'inhibition du Mg^{2+}). La sous-unité NR2 se présente sous quatre formes : NR2A, NR2B, NR2C et NR2D dont le rôle est important dans la fonction des récepteurs NMDA. Ce sont des récepteurs voltage dépendant car leur canal est bloqué par l'ion magnésium (Mg^{2+}). Lorsque le canal est ouvert, il est perméable aux ions calcium (Ca^{2+}), potassium (K^+) et sodium (Na^+) (Richard D. et al, 2001). Pour que ce canal s'ouvre, il faut une dépolarisation suffisante de la membrane capable de dégager l'ion Mg^{2+} qui bloque l'entrée du canal (les récepteurs AMPA dont on ne détaillera pas la fonction ici, sont ceux qui fournissent normalement cette dépolarisation car ils sont les premiers à être activés) (figure 4).

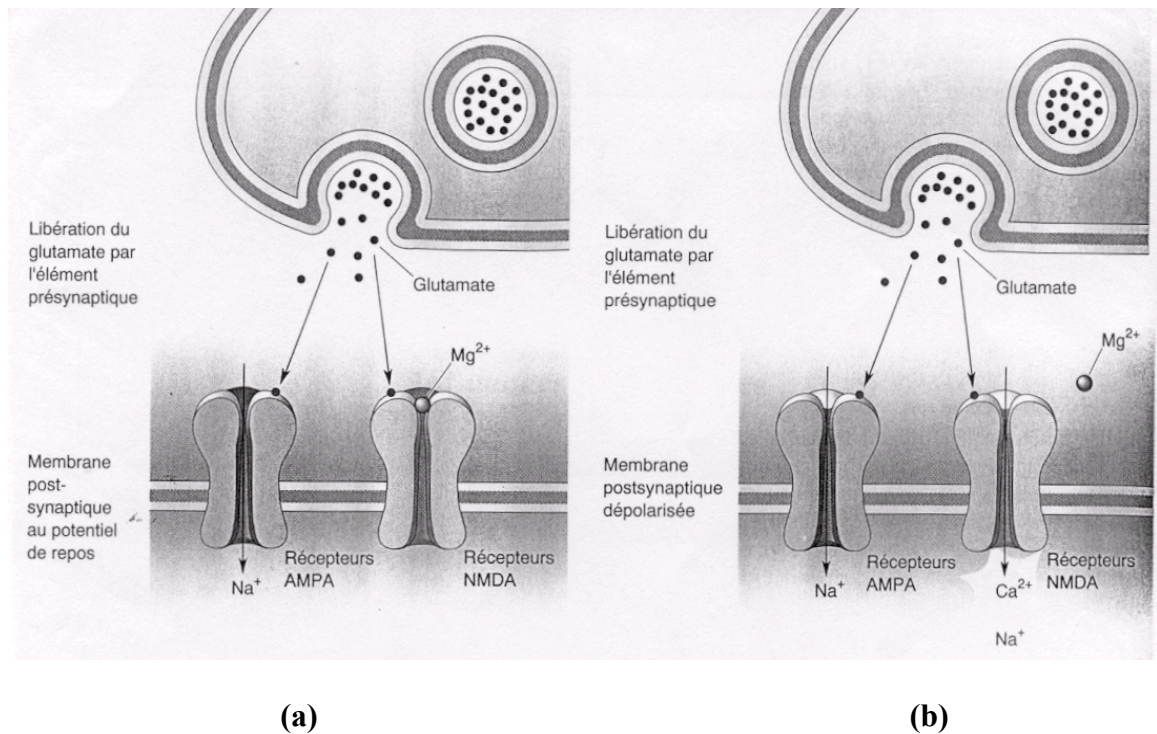


Figure 4 : Rôle des récepteurs NMDA dans la coordination de l'activité pré et postsynaptique. **(a)** L'activation des terminaisons nerveuses présynaptiques provoque la libération synaptique du glutamate qui agit à la fois sur les récepteurs AMPA et NMDA situés au niveau postsynaptique. Aux valeurs négatives du potentiel de membrane, les récepteurs NMDA ne présentent qu'une très faible conductance ionique du fait du blocage du canal par des ions Mg^{2+} . **(b)** Si la libération de glutamate coïncide avec une dépolérisation suffisante pour déplacer les ions Mg^{2+} , alors le Ca^{2+} entre dans la cellule via les récepteurs NMDA. *Figure tiré du cours PHL 1001, bases de pharmacologie moléculaire.*

Une fois ouvert, il laisse entrée abondamment du Ca^{2+} dans la cellule, ce qui sera à l'origine d'une dépolérisation plus puissante et soutenue qui donne lieu à la phase tardive du potentiel post synaptique excitateur (PPSE) : c'est le phénomène à la base de la

plasticité synaptique. Ce qui confère donc aux récepteurs NMDA un rôle important dans l'hippocampe : celui de la plasticité synaptique nécessaire à l'apprentissage et à la mémorisation. Cette propriété des récepteurs NMDA reposerait sur sa sous-unité NR2. Selon le ratio des formes NR2A/NR2B, l'activation des récepteurs NMDA mènerait soit à une potentialisation à long terme (LTP) lorsque NR2A domine soit à une dépression à long terme (LTD) lorsque NR2B domine (Wade Morishita et al, 2007). Cependant, l'activité des récepteurs NMDA peut aussi être liée à la mort neuronale puisqu'une activation prolongée des récepteurs NMDA cause une accumulation intracellulaire excessive des ions Ca^{2+} qui va entraîner une cascade d'activation enzymatique qui conduira à la mort cellulaire par excitotoxicité (Patel et al, 1996) (figure 1).

Enfin, ces récepteurs possèdent en plus du site de liaison principale des agonistes, un site allostérique qui lie la glycine dont le rôle est de potentialiser l'effet du glutamate (Forsythe et al, 1988). La liaison de la glycine à ce site est nécessaire au fonctionnement du récepteur.

1.2.2.1.2 Les récepteurs kainate

Les récepteurs kainate sont des récepteurs ionotropes sensibles physiologiquement au glutamate et au kainate qui est une drogue isolée de l'algue *Digenea Simplex* (Ben Ari, 1985). Ils sont associés à un canal perméable aux ions potassium (K^+), sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}). Ils contiennent deux sites de liaison au kaïnate d'affinité différente. Ils se composent de 5 sous-unités : trois d'entre eux ont une faible affinité pour le KA (GluR5-7) et les deux autres ont une forte affinité pour le KA (KA1 et KA2). Mais contrairement aux récepteurs NMDA, les récepteurs KA ont une fonction encore mal définie dans la transmission synaptique. Cependant, l'effet excitateur du KA sur les neurones découvert

dans les années 70 est utilisé pour léser sélectivement les neurones par excès d'excitation (excitotoxicité) (Olney et al, 1974). Ce qui a permis de mettre au point les premiers modèles d'animaux d'épileptogénèse (Ben Ari, 1985; Cavalheiro et al, 1982). Alors, même si leur rôle est encore mal défini, il est clair qu'ils sont impliqués dans le phénomène d'épileptogénèse.

1.2.2.2 Le GABA et ses récepteurs

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur présent au niveau des interneurons de l'hippocampe. Il est synthétisé à partir de l'acide glutamique par une enzyme appelée GAD (Glutamic Acid Decarboxylase). Il se fixe à 3 types de récepteurs : GABA_A et GABA_C qui sont un récepteur canal, GABA_B qui est un récepteur métabotrope qui module l'ouverture des canaux K⁺ grâce à des seconds messagers impliquant les protéines G. Le récepteur GABA_A est largement distribué dans le système nerveux central et est perméable au chlore (Richard D. et al, 2001) (figure 5). Il est d'une grande importance car il est le principal dans le cerveau où il laisse passer des ions chlorés chargés négativement pour éloigner les neurones de leur seuil d'excitabilité par hyperpolarisation. Les récepteurs GABA_A sont aussi la cible de plusieurs médicaments pharmacologiques comme les benzodiazépines, barbituriques, alcools contribuant aussi à diminuer la transmission du message nerveux.



Figure 5 : Schéma du récepteur canal GABA

Le récepteur GABA est un récepteur canal transmembranaire perméable aux ions chlore.

Figure tiré de <http://lecerveau.mcgill.ca>

1.3 Hypothèse et objectifs

L'hippocampe est une structure importante dans l'étude des mécanismes de l'épileptogénèse car il est particulièrement vulnérable à la suite d'une crise épileptique. En plus, la nature de son architecture et de son organisation en font une structure idéale pour étudier la transmission synaptique dans le cerveau des mammifères (Bear et al, 1998). L'hippocampe se compose de plusieurs types de cellules neuronales qui font circuler l'information nerveuse à travers des synapses (zone de contact) qu'elles forment entre elles. Cette information nerveuse est créée par un mouvement d'ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule en réponse à la liaison de neurotransmetteurs à leurs récepteurs membranaires spécifiques. Cette réponse physiologique est appelée potentiel postsynaptique et elle peut être excitatrice ou inhibitrice. Pour un fonctionnement normal du système nerveux, il faut qu'il y ait un équilibre entre les systèmes excitateurs et inhibiteurs car un léger déséquilibre entre eux cause des conséquences telles qu'une crise d'épilepsie. Alors, avec un renforcement de l'excitabilité, une diminution ou un blocage de

l'inhibition par des agents pharmacologiques, des modèles animaux d'épilepsie tels que pilocarpine, kainate, pentylènetétrazole... ont pu être créés. Ici, nous portons notre intérêt sur deux de ces modèles : celui du PTZ et celui du KA chez le rat immature. Il a été rapporté dans d'autres études qu'une crise généralisée induite avec le PTZ chez le rat immature et mature entraînait des changements physiologiques permanents dans l'hippocampe du rat adulte sans perte neuronale (Meilleur et al, 2003; Meilleur et al, 2000, Huang et al, 2002; Zhu et al, 2004). Cependant, ces changements ne s'accompagnent pas de crises spontanées récurrentes (Meilleur et al, 2003; Meilleur et al, 2000, Huang et al, 2002; Zhu et al, 2004). Tandis qu'une crise induite par le KA chez le rat immature ne produisait pas le même genre de dommage hippocampal que chez l'adulte (Haas et al, 2001; Sarkisian et al, 1997). En effet, les dommages de l'animal mature se limite aux interneurons et il semble que ces dommages sont suffisants pour induire les mécanismes d'épileptogénèse tous les animaux présentant des crises spontanées récurrentes indépendamment de l'âge à la crise initiale.

Notre hypothèse de travail est donc que contrairement au modèle KA, l'injection de PTZ chez l'animal immature n'entraînera pas de perte d'interneurones ce qui expliquerait l'absence de crise récurrente dans ce modèle. De plus, nous voulions évaluer l'impact du genre sur l'épileptogénèse.

Dans mon travail de maîtrise, nous avons investigué chez nos deux modèles de convulsions KA et PTZ les séquelles physiologiques, cognitives et cellulaires permanentes pouvant persister jusqu'à l'âge adulte.

Au niveau physiologique, nous avons cherché à savoir si les changements impliqueraient les récepteurs NMDA qui font parti du système exciteur et dont les données expérimentales ont indiqué qu'ils participaient à l'initiation des crises et à la propagation des décharges épileptiques (Meilleur et al, 2003; Meilleur et al, 2000; Huang et al, 2002;

Zhu et al, 2004). Ainsi, nous avons soumis nos tranches d'hippocampe à une solution particulière de LCSA sans Mg^{2+} dans le but d'activer le plus de récepteurs NMDA possible et étudier à l'aide d'enregistrements électrophysiologiques les conséquences de cette activation excessive des récepteurs NMDA dans les neurones des trois groupes de rats (Ctrl, KA, PTZ).

Ensuite, sachant que les récepteurs NMDA sont d'une grande importance dans l'hippocampe puisqu'ils ont la capacité de créer une dépolarisation soutenue et efficace, et que cette dépolarisation est à la base du processus de plasticité synaptique nécessaire pour l'apprentissage et la mémoire, nous avons soumis nos groupes de rats à un test d'apprentissage (Morris Water Maze) afin d'évaluer les séquelles cognitives.

Et finalement, l'influx cellulaire de Ca^{2+} apporté par la crise et l'activité des récepteurs NMDA étant potentiellement nocif (excitotoxicité), nous avons évalué la présence de pertes cellulaires dans toutes les aires de l'hippocampe de tous les groupes de rats, en nous intéressant principalement aux interneurons inhibiteurs GABAergiques contenant de la parvalbumine.

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2. Matériels et méthodes

2.1 Traitements in Vivo

2.1.1 Induction des crises épileptiques

Les crises épileptiques ont été induites par deux agents pharmacologiques : l'acide kainique (KA) et le pentylènetétrazole (PTZ). Cent quatre rats Sprague-Dawleys ont été injectés entre 18 et 20 jours postnataux (P18-20) dont quarante trois mâles et soixante et une femelles. Trente huit rats (18 mâles et 20 femelles) ont reçu deux doses intrapéritoniales de KA (4mg/kg/dose) en intervalle d'une heure; tandis que soixante six rats (25 mâles et 41 femelles) ont reçu une dose intrapéritoniale de PTZ (90 mg/kg).

Les rats KA ont développé le status épilepticus après la 2^e dose de KA et il a duré en moyenne 80mn. Le développement du status épilepticus était progressif et suivant cet ordre : Wet Dog Shake (WDS), clonies des pattes antérieures, salivation, perte de la posture et crise généralisée.

Les rats PTZ quant à eux ont développé le status epilepticus plus rapidement après l'injection (5mn) avec une durée moyenne de 30mn. Les rats passaient par des mouvements cloniques des quatre membres, l'extension des membres, salivation, perte de la posture et crise généralisée. Seuls les rats ayant rempli les critères de convulsions étaient sélectionnés : ce qui représentait 65% chez les rats PTZ et 55% chez les rats KA. Cinquante six contrôles (24mâles et 32 femelles) ont reçu la solution de saline au moment d'injection des rats.

2.1.2 Test d'apprentissage de Morris Water Maze

À la fin de la période de latence, nous avons testé dans le labyrinthe aquatique (test du labyrinthe aquatique de Morris) la mémoire spatiale des rats. Ce test consiste à faire mémoriser aux rats la position d'une plate-forme immergée dans une piscine d'eau. Le rat doit se servir des indices présents dans son environnement pour repérer l'emplacement de la plateforme.

Le test se déroule dans une piscine circulaire de 180 cm de large X 50 cm de profondeur qui est remplie d'eau tiède (23-26⁰C) à une profondeur de 25 cm. De la peinture à doigts blanche non-toxique est ajoutée à l'eau afin de la rendre opaque et empêcher la plateforme d'être visible. Le périmètre de la piscine est divisé en quatre points cardinaux Nord (N), Sud (S), Est (E) et Ouest (O) donnant ainsi 4 cadrans (figure 6). La plateforme est en plexiglas d'une dimension de 10X10 cm est placée dans le cadran Nord de la piscine à 1cm sous l'eau (figure 6). La salle d'expérimentation était bien éclairée et différents matériels dans la salle (robinets, fournitures) servaient d'indices de repère et étaient au même endroit durant tout le test.

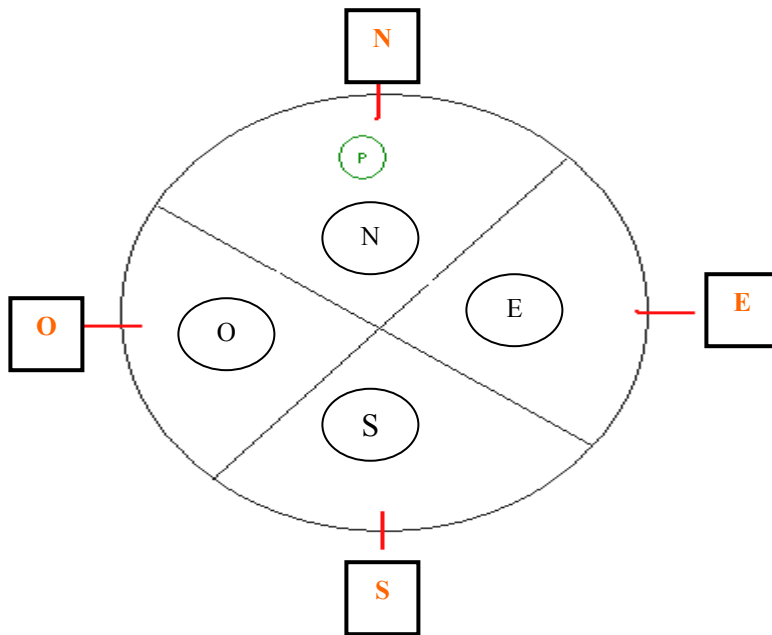


Figure 6 : Schéma représentant les subdivisions et les cadrans de la piscine.

N, S, E, O : Cadrans Nord, Sud, Est, Ouest

N, S, E, O : Points cardinaux Nord, Sud, Est, Ouest

P : Plateforme immergée

Le test dure 8 jours : le premier jour (J1), les rats sont simplement conviés à un bain libre de deux périodes de 60 secondes chacune sans plateforme afin de s'habituer aux conditions expérimentales. Le 2^e jour (J2), la séance d'apprentissage commence et la plateforme est mise au centre du cadran Nord. Pendant cette séance, chaque rat est mis dans l'eau le museau face au rebord de la piscine à partir d'un des 4 points cardinaux choisi de façon aléatoire. Un essai correspond à un point cardinal, et chaque rat effectue 4 essais. Chaque essai dure 60 secondes, le temps alloué au rat pour trouver la plateforme immergée. Si au bout des 60 secondes, le rat n'a pas pu trouver la plateforme, l'expérimentateur le place dessus et lui alloue 20 secondes pour étudier l'environnement. Entre deux essais, un temps de 60 secondes était alloué aux rats pour se reposer hors de l'eau dans une serviette sèche afin d'éviter qu'ils aient froid. Cette séance d'apprentissage se déroule du 2^e au 6^e jour (J2-J6).

Le 7^e jour (J7), la plateforme est enlevée de la piscine et chaque rat effectue un seul essai de nage libre de 60 secondes à partir du point Sud (S) de la piscine. Cette séance appelée Probe trial est filmée par une caméra (Mini DV Digital Handycam) placée au dessus de la piscine. A la fin de la séance, l'enregistrement est regardé sur une télévision, et à l'aide d'un chronomètre on détermine le temps passé par chaque rat dans chaque cadran (N, S, E, O) de la piscine. Puis, on calcule la moyenne de la différence de recherche à l'aide de la formule : $MDS \text{ (Mean search difference)} = [(N-E) + (N-S) + (N-O)]/3$. Les rats ayant mémorisé la position de la plateforme passeront plus de temps dans le cadran Nord de la piscine et auront alors une moyenne élevée.

Le 8^e jour (J8), la séance d'apprentissage du J2-J5 est répétée mais cette fois-ci avec une plateforme visible à 1cm au dessus de l'eau placée dans le cadran E afin d'évaluer la capacité visuomotrice des rats : c'est le test visuel.

La période du test où la plateforme est invisible sert à mesurer la capacité du rat à utiliser sa mémoire spatiale pour repérer l'emplacement de la plateforme tandis que le probe trial sert à mesurer la consolidation de l'apprentissage spatial (Huang et al, *epilepsia* 2002).

2.1.3 Perfusion des rats

Après le test d'apprentissage, les rats sont perfusés. Le système de perfusion est composé de deux bouteilles en verre transparente posées en hauteur sur une tablette; l'une contenant une solution de 4% de paraformaldéhyde (PFA) dans du PBS 7.4, et l'autre une solution de PBS 7.4 additionnée d'héparine (1U/ml) afin d'éviter toute coagulation. Ces solutions circulent à travers de petits tuyaux en plastique individuels qui passent par une pompe qui contrôle la sortie et le débit du liquide. À la sortie de la pompe, les tuyaux deviennent un seul avec à son bout une aiguille de 25^{5/8} de grosseur. Les rats destinés à

l'immunohistochimie (10 KA, 12 PTZ, 10 CTRL) ont été anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (90mg/kg), de xylazine (10mg/kg) et d'acépromazine (1mg/kg). Une fois les rats profondément endormis, le thorax est ouvert et l'aiguille de 25^{5/8} placée au bout de l'appareillage de perfusion est enfoncée dans le ventricule gauche du cœur. La solution d'héparine est ensuite ouverte en premier puis celle de PFA tandis qu'une petite incision est faite sur l'oreillette droite pour faire sortir le sang. La circulation de la solution d'héparine est ensuite arrêtée et les rats sont alors perfusés pendant une quinzaine de minutes avec la solution de PFA. À la fin, les rats sont décapités à l'aide d'une guillotine et les cerveaux sont prélevés.

2.1.4 Prélèvements vaginaux

Les prélèvements vaginaux ont été effectués chez 20 rats femelles (9 PTZ et 11 CTRL) sur une période de 16 jours consécutifs afin d'établir et de se familiariser avec les 4 phases (Proestrus, Estrus, Metestrus, Diestrus) du cycle hormonale des femelles. Une fois familiarisée avec le cycle des femelles, un prélèvement était fait chaque jour avant la décapitation de la ratte afin de noter le stade du cycle où elle se situait. A la fin, les données étaient compilées par phase du cycle.

Ces prélèvements se faisaient grâce à une pipette en verre avec une extrémité effilée et mince, une autre ronde et large. Dans l'extrémité large, était placé un bouchon en caoutchouc qui servait d'aspirateur. Avec le pouce et l'index sur le bouchon, on aspire environ 0.5ml de saline, on met la ratte dans un gant en serviette (pour éviter les mouvements) et on lève sa queue et introduit délicatement la pipette remplie de saline dans son vagin du côté effilé, après 3 aspirations, la pipette est retirée et le prélèvement est étalé sur une lame (VWR microslides superfrost plus 25X75X1mm) puis examiné au microscope

pour s'assurer d'avoir assez de matériels. Ensuite la lame est laissée à l'air libre pour sécher, puis colorer à l'aide du système de coloration manuel "Hema 3" pour mieux confirmer le stade du cycle.

2.2 Traitements in Vitro

2.2.1 Électrophysiologie

2.2.1.1 *Préparation des tranches fraîches d'hippocampe*

Les tranches ont été réalisées sur des rats Sprague-Dawley (SD) adultes dont 38 contrôles (16 mâles, 22 femelles), 46 PTZ (15 mâles, 31 femelles) et 20 KA (10 mâles, 10 femelles) : Les proportions disparates entre les mâles et les femelles sont dues au fait que les rats arrivaient en portée avec leur mère vers 10 jours de vie et par conséquent le sexe des animaux n'étant pas sélectionné, il y avait plus de femelles que de mâles. Les rats sont décapités après anesthésie sous isoflurane USP, le cerveau est ensuite enlevé et placé dans du LCSA de pH 7.4 préalablement oxygéné (95% O₂ et 5% de CO₂) et placé dans de la glace à 4°C. Ce LCSA est composé de (en mM) : NaCl 124, KCl 2, MgSO₄ 2, CaCl₂, KH₂PO₄1.25, NaHCO₃26, Glucose10. On y ajoute du phénol rouge (0.003mM) qui sert d'indicateur lors de l'oxygénation.

On procède ensuite à la dissection du cerveau, et pour cela on isole les deux hémisphères contenant chacun l'hippocampe entouré du néocortex. On isole alors le bloc hippocampe-cortex et ensuite, à l'aide d'une colle (Instant Krazy Glue), on colle l'ensemble par le cortex sur un bloc d'agar, qu'on fait adhérer, avec la même colle, dans une plaque placée dans le *vibratome*. On remplit ensuite la plaque avec du LCSA oxygéné au point où notre

bloc hippocampe-cortex soit tout trempé. À l'aide du *vibratome*, on effectue des tranches de 500 μ M d'épaisseur. On isole après l'hippocampe du cortex.

Cette opération est très délicate car l'hippocampe ne doit subir aucun dommage avec nos instruments de dissection, la colle ne doit pas le toucher car elle est toxique et la manœuvre doit être rapide parce que l'hippocampe est très sensible à l'anoxie.

On transfère ensuite nos tranches d'hippocampe dans les deux canaux de la chambre du bain thermostaté. Le principe de ce système consiste à faire circuler de manière continue du LCSA oxygéné, dans les canaux dont le fond est recouvert de morceaux de gaze sur lesquels les tranches sont disposées et grâce auxquels les tranches restent au fond. En plus, grâce au thermostat qui chauffe l'eau de la chambre, les tranches d'hippocampe dans les canaux peuvent rester dans une température constante de 35°C.

2.2.1.2 Enregistrements de l'activité spontanée

Une fois les tranches d'hippocampe dans les canaux, on les laisse reposer pendant une vingtaine de minutes afin qu'elles s'équilibrent et s'adaptent à la température du bain; ensuite on peut commencer les enregistrements. Pour enregistrer l'activité au niveau de la tranche, nous avons besoin de deux types d'électrodes : l'électrode de stimulation et l'électrode d'enregistrement.

- Pour obtenir l'électrode d'enregistrement extracellulaire, on utilise de petites pipettes en verre et avec une étireuse *NARISHIGE PN-3*, on réalise des électrodes d'enregistrement que l'on remplit ensuite de 4M de NaCl pour permettre la conduction du courant. La chose la plus importante à ce niveau est la résistance de l'électrode qui doit être la plus faible possible afin de ne pas nuire à la détection du signal biologique. Et pour diminuer cette

résistance, il faut tenir compte de certains paramètres comme : la longueur et l'épaisseur de la pointe de l'électrode, de la présence de bulle d'air lors du remplissage de l'électrode.

- L'électrode de stimulation quant à elle, est fabriquée à partir de deux filaments d'acier recouvert de téflon et enroulés entre eux.

Pour enregistrer, la position des électrodes est très importante. Par exemple, l'électrode d'enregistrement était placée au niveau de la couche pyramidale (CA1/CA3) ou de la couche granulaire (DG), et celui de stimulation au niveau des fibres afférentes du Stratum Radiatum ou du hile (Figure 7). Le positionnement de ces électrodes demande beaucoup de délicatesse. Pour cela on utilise de petits manipulateurs auxquels sont suspendues nos électrodes et qui nous aident à les diriger précisément. En plus, on utilise un stéréo microscope pour les positionner avec exactitude mais aussi pour l'emplacement des morceaux de gaze dans les canaux. Cette électrode de stimulation est reliée à des stimulateurs (*STIMULUS ISOLATOR A360* et *MASTER-8 PULSE GENERATOR*), grâce auquel, on fait varier l'intensité, le délai, le taux et la durée de la série de stimulation.

L'électrode d'enregistrement permettant d'enregistrer l'activité présente au sein de la tranche est reliée à un préamplificateur (*HEADSTAGE HS-2A*) qui est à son tour connecté à un amplificateur (*AXOCLAMP2B*) qui amplifie de 10 fois le signal reçu puisque l'amplitude venant du préamplificateur est très faible. Ce signal est ensuite visualisé sur un ordinateur (*AXOTAPE 2.0*) connecté à l'amplificateur et sur lequel on peut également *moyenner* les réponses obtenues. Mais, il y a en plus un filtre AC monté en série qui permet non seulement d'obtenir un tracé plus stable mais aussi d'éliminer l'influence du bruit de fond.

Une fois que les tranches d'hippocampe sont bien perfusées par le LCSA oxygéné, les électrodes sont positionnées et par l'électrode de stimulation, la tranche est stimulée et l'activité qui en découle est captée par l'électrode d'enregistrement : c'est l'activité

évoquée. Nous avons utilisé cette activité évoquée comme preuve de l'état physiologique de la tranche. Cette preuve faite, le LCSA oxygéné est remplacé par le LCSA sans Mg^{++} oxygéné. La stimulation est arrêtée, et après une perfusion d'une quinzaine de minutes, il y a apparition d'une activité spontanée de type épileptiforme due à une augmentation de l'activité des récepteurs NMDA. Cette activité spontanée est recueillie sur un enregistreur à papier (*CHART RECORDER*), connecté à un filtre. L'activité spontanée apparaît sur le papier en fonction du temps et nous permet ainsi de calculer la fréquence d'apparition des décharges en Hz.

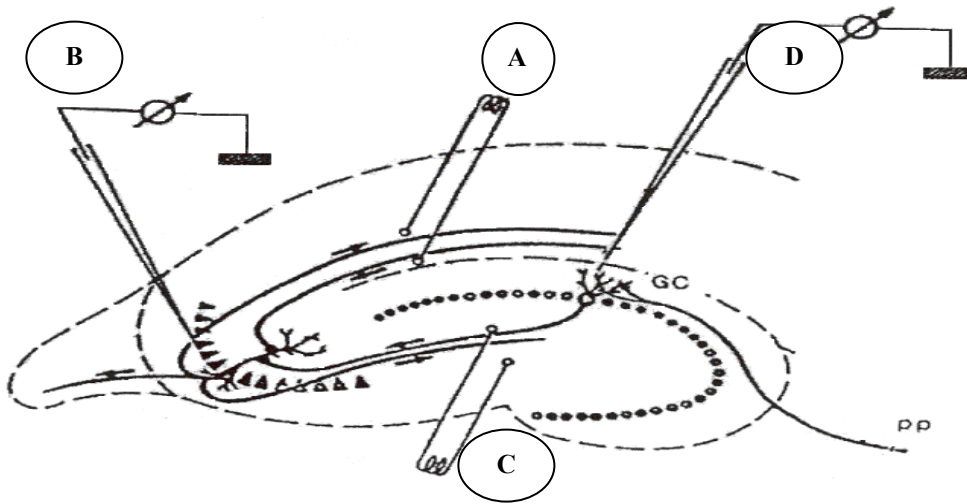


Figure 7 : Positionnement des électrodes dans une tranche d'hippocampe.

- A. Stimulation des fibres afférentes du Stratum Radiatum
- B. Enregistrement de l'activité au niveau des cellules pyramidales du CA3.
- C. Stimulation des fibres afférentes du hile
- D. Enregistrement de l'activité au niveau des cellules granulaires du DG

Figure tiré de Stanton et al, 2005.

2.2.2 Immunohistochimie

2.2.2.1 Préparation des coupes d'hippocampe

Après la perfusion des rats, les cerveaux sont prélevés dans des cassettes et placés 24h dans du PFA 4%. Ensuite ils sont transférés dans des tubes de 50ml contenant une solution de sucrose 30% pour 24 à 48h ou jusqu'à ce que les cerveaux coulent dans le fond du tube. Ils sont enfin transférés dans de petits contenants carrés en plastique contenant de l'OCT (Tissue Tek O.C.T. compound) et gardés dans un congélateur à -80°C . Une fois les cerveaux bien congelés, ils sont transférés dans un cryostat (Leica CM 3050 S) où la température est toujours froide (-20 à -21°C). Avec une lame (Accu-Edge Low Profile Microtome Blades), le bloc cerveau-OCT est dégagé du contenant plastique et l'excédent d'OCT retiré. Ensuite, le bloc est placé sur un support rond froid avec un peu d'OCT. La température froide du cryostat permet au bloc d'adhérer au support. Le support est fixé ensuite à la tête du cryostat, et grâce à des manettes autour de ce dernier, le bloc est placé dans l'angle voulu. En avant du bloc se trouve un support à lame horizontal qui est perpendiculaire au bloc de cerveau. À l'extérieur du cryostat sur la droite, se trouve une manette qui est reliée à la tête du cryostat à l'intérieur grâce auquel il est possible d'induire la rotation du bloc lorsqu'on tourne la manette à l'extérieur. Une fois tout réglé, on tourne la manette et le bloc de cerveau avance vers la lame et la coupe est faite. Chaque coupe a une épaisseur de 30 microns et trois coupes sont montées sur des lames chargées (VWR microslides superfrost plus 25X75X1mm) identifiées de la façon suivante : date, titre du projet, No du rat, épaisseur de la coupe, nom de l'anticorps à utiliser et No de la lame. Les lames sont ensuite transférées dans une boîte et conservées dans un congélateur à -20°C .

2.2.2.2 *Détection Immunohistochimique*

Les lames sont retirées du congélateur et laissées environ 15 minutes sur le comptoir afin qu'elles sèchent. Le contour des lames est marqué ensuite avec un stylo spécial (Liquide Blocker Super Pap Pen) qui empêchera le liquide de s'échapper. Les lames sont ensuite lavées une à deux fois avec du PBS pH 7.4. Puis elles sont incubées pendant deux heures dans une solution de blocage (10% NGS, 0.3% triton, 100% PBS pH 7.4) à la température de la pièce. Cette solution de blocage permet d'éliminer tous les sites non spécifiques à notre anticorps. Après le blocage, les lames sont incubées dans une solution d'anticorps contenant 5% de NGS, 0.1% Triton, 100% PBS pH 7.4 et soit l'anti-PV, soit l'anti-NeuN pendant 24h à -4°C . L'anti-PV était le monoclonal anti Parvalbumine de Sigma dilué à 1/1000 qui marque tous les interneurons Gabaergiques positifs au PV tandis que l'anti-NeuN était un monoclonal anti-Neuronal Nuclei de Chemicon dilué 1/400 qui marque les noyaux de toutes les cellules. Le lendemain, les lames sont lavées 3 fois au PBS pH 7.4, puis incubées une heure dans une solution d'anticorps secondaire contenant 5% de NGS, 0.1% Triton, 100% PBS pH 7.4 à la température de la pièce. L'anticorps secondaire utilisé dilué à 1/400 était le goat anti mouse couplé au fluorophore Alexa Fluor qui émet à 594nm observé grâce au filtre Cy3.5. Après l'incubation, les lames sont lavées 3 fois au PBS, puis couvertes de quelques gouttes du milieu de montage (Vectashield) et en fin de façon délicate d'une lamelle (VWR microscope Cover Glasses 22X60mm) en évitant les bulles d'air. Le contour de la lame est ensuite scellé par une fine couche de vernis à ongle. Les lames sont conservées à -4°C dans une boîte à lame en carton jusqu'à l'acquisition des images. Le compte des interneurons dans les différentes couches de l'hippocampe est fait grâce à un microscope (Leica DC 300F) au grossissement 20X (évaluation de la perte globale des neurones) et 40X (évaluation de la perte d'interneurones). Une caméra intégrée au

microscope permet de faire l'acquisition des images des coupes (3 par rats) dans chaque région, sur lesquelles les interneurons sont comptés un à un sur ordinateur.

2.2.2.3 Analyse des résultats

Les résultats des enregistrements sont obtenus en calculant les fréquences d'apparition de l'activité spontanée grâce à la formule $F(\text{Hz}) = \text{Nombre de décharge} / \text{temps d'apparition (s)}$. Ensuite les analyses statistiques et les graphiques sont effectués dans Graph Pad Prism. Les comparaisons sont faites par ANOVA analyse de variance univariée suivie du post-test de Tukey pour les comparaisons de plus de deux groupes et le test t non-pairé (non-paramétrique) pour les comparaisons entre deux groupes. Les valeurs sont rapportées en moyenne \pm S.E.M. et la valeur significative est définie par le $p < 0.05$ pour tous les tests.

III. RÉSULTATS

3. Résultats

3.1 Les crises récurrentes spontanées

Deux semaines après l'induction des crises initiales, nous avons filmé 24 rats (4 mâles et 4 femelles ctrl; 4 mâles et 4 femelles KA; 4 mâles et 4 femelles PTZ) 4 à 5 heures par jour, cinq jours par semaine pendant cinq semaines. Les rats étaient âgés entre P30-P70. Ces enregistrements ont ensuite été visionnés une cassette à la fois sur une télévision 27 pouce en mode rapide. Trois rats KA (mâles seulement) sur les huit rats filmés ont présenté des crises dites limbiques. Ce faible taux de crises récurrentes peut s'expliquer par la durée limitée de monitoring et l'absence d'enregistrement EEG concomitant. De plus, les rats KA ont reçu une dose cumulative relativement faible de KA pour limiter la mortalité.

3.2 Les résultats d'électrophysiologie

Nous avons fait des enregistrements extracellulaires sur des tranches d'hippocampe provenant de 38 rats contrôles et 66 rats traités (46 PTZ et 20 KA). La figure 8 représente un exemple d'enregistrement à partir duquel les fréquences d'apparition de l'activité spontanée de type intériel induite par le milieu LCSA sans Mg^{2+} sont calculées. Le graphique 1 représente la moyenne des fréquences de l'activité spontanée des trois groupes de rats dans l'aire CA3 uniquement chez les mâles et les femelles. Ce graphique 1 nous indique que l'activité spontanée au sein des tranches de rats traités est plus élevée que celle des rats contrôles chez les mâles (PTZ→ $p=0.0003$, KA→ $p<0.0001$) comme chez les femelles (PTZ→ $p=0.0006$, KA→ $p<0.0001$). De plus, entre les rats traités, les KA auraient un niveau d'excitabilité plus élevé que les PTZ chez les mâles ($p=0.0021$), comme chez les femelles ($p<0.0001$). Entre sexe de chaque groupe, les femelles présentent une activité

spontanée plus élevées que celles des mâles (Ctrl→p= 0.0205, PTZ→p= 0.0320, KA→p=0.0162) (graphique 2). Donc, la différence vue entre les contrôles est maintenue lorsque les rats sont traités. Les différences observées entre les rats contrôles et les rats traités se confirment dans tous les aires de l'hippocampe des mâles (Tableau I, graphique 3) et des femelles (Tableau II, graphique 3). Mais plus encore, la différence entre mâles et femelles représentée dans le graphique 2 est aussi maintenue dans tous les aires des trois groupes (Tableau III, graphique 4). Cependant, l'activité dans les trois aires d'hippocampe est semblable indépendamment du groupe de rat ($p>0.05$) (graphique 5).

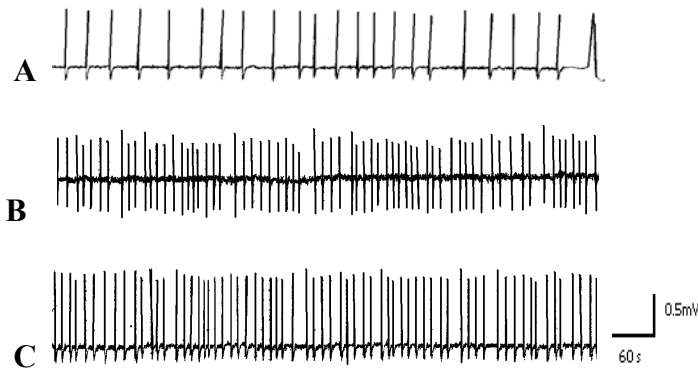
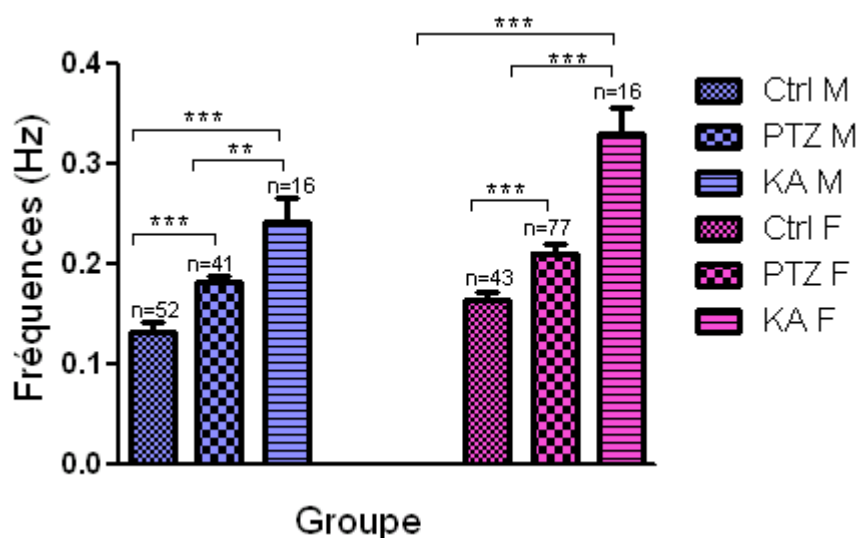


Figure 8 : Exemple de tracé de l'activité spontanée obtenue dans les trois groupes de rat.

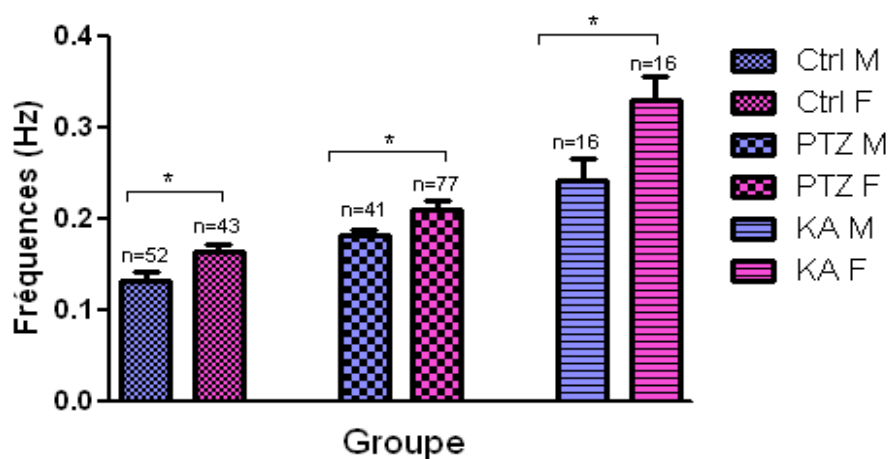
A : Exemple d'enregistrement obtenu sur une tranche de rat contrôle.

B : Exemple d'enregistrement obtenu sur une tranche de rat PTZ.

C : Exemple d'enregistrement obtenu sur une tranche de rat KA



Graphique 1 : Moyenne des fréquences de l'activité spontanée au niveau de l'aire CA3 des trois groupes de rats (Ctrl, PTZ, KA). La comparaison des mâles et des femelles des 3 groupes entre eux montrent que les rats traités (PTZ et KA) présentent une activité spontanée significativement élevée par rapport aux contrôles. De plus entre traités, les KA sont les plus affectés peu importe le sexe. (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par test t non-pairé (non-paramétrique)).



Graphique 2 : Comparaison des moyennes de fréquences de l'activité spontanée entre sexe des trois groupes de rats. L'activité spontanée chez les femelles est plus élevée que chez les mâles dans chaque groupe. (* $p < 0.05$ par test t non-pairé (non-paramétrique)).

Mâles		
Aires	PTZ	Kainate
CA1	p<0.0001 n=35	p<0.0001 n=16
CA3	p=0.0016 n=41	p=0.0002 n=16
DG	p=0.0235 n=21	p=0.0009 n=14

Tableau II : Valeurs significatives représentant la différence entre les rats traités et contrôles mâles dans toutes les aires.

p : valeur qui indique si la différence est significative ou non. *Test t non-pairé (non-paramétrique)*

n : nombre de tranches d'hippocampe.

Femelles		
Aires	PTZ	Kainate
CA1	P=0.0071 n=35	p<0.0001 n=16
CA3	p=0.0005 n=77	p<0.0001 n=16
DG	p>0.05 n=29	p=0.0251 n=16

Tableau III : Valeurs significatives représentant la différence entre les rats traités et contrôles femelles dans toutes les aires.

p : valeur qui indique si la différence est significative ou non. *Test t non-pairé (non-paramétrique)*

n : nombre de tranches d'hippocampe.

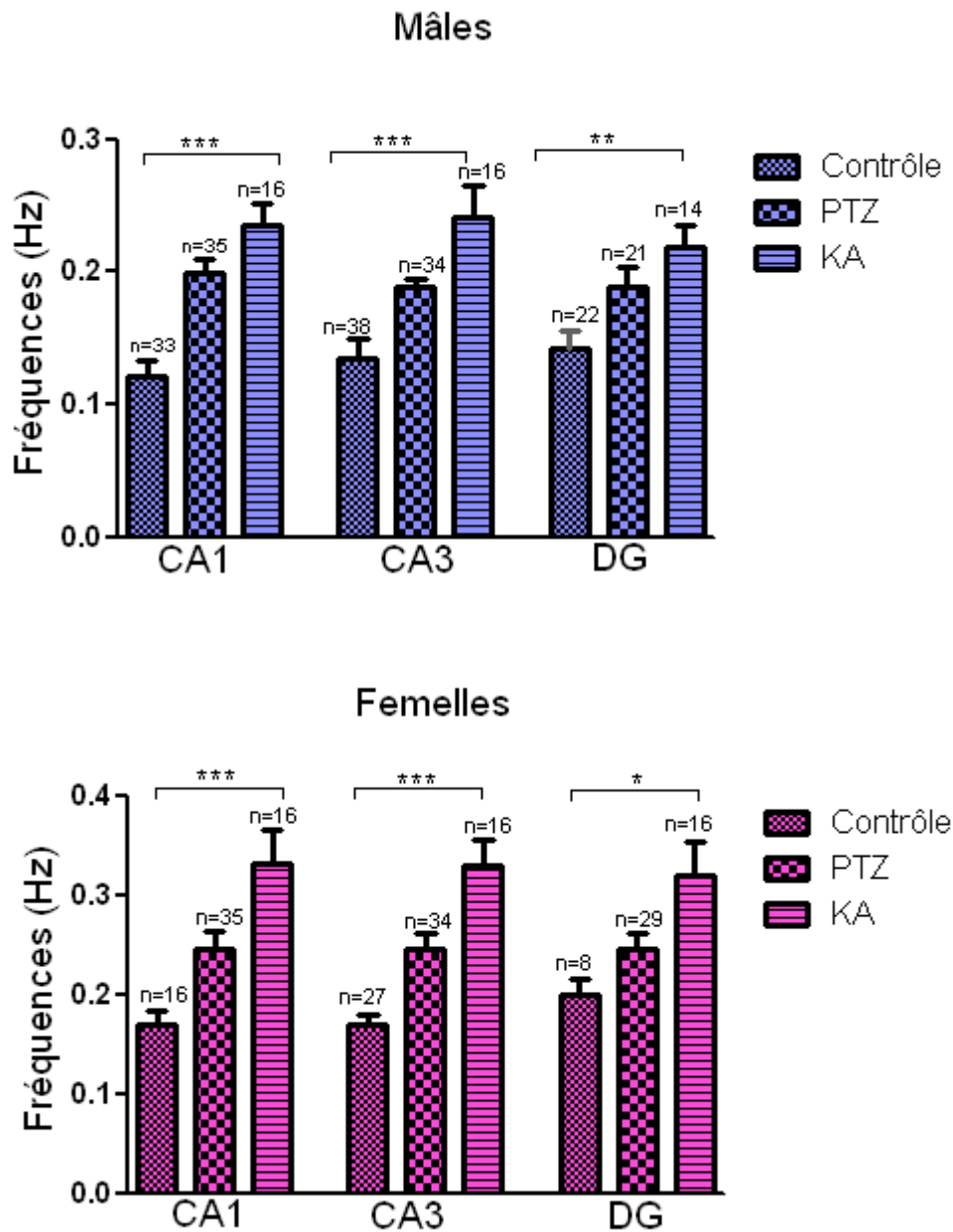
Groupes			
Aires	Contrôles	PTZ	Kainate
CA1	p= 0.0178 n= 33 (M) n=16 (F)	p=0.0227 n=35 (M) n=35 (F)	p=0.0145 n=16 n=35 (M) n=16 (F)
CA3	p=0.0326 n=38 (M) n=27 (F)	p=0.0018 n=34 (M) n=34 (F)	p=0.0162 n=16 n=35 (M) n=16 (F)
DG	p=0.0235 n=22 (M) n=8 (F)	p=0.0172 n=21 (M) n=29 (F)	p=0.0166 n=14 n=35 (M) n=16 (F)

Tableau IV: Valeurs significatives représentant la différence entre les rats mâles et femelles dans toutes les aires.

p : valeur qui indique si la différence est significative ou non *Test t non-pairé (non-paramétrique)*

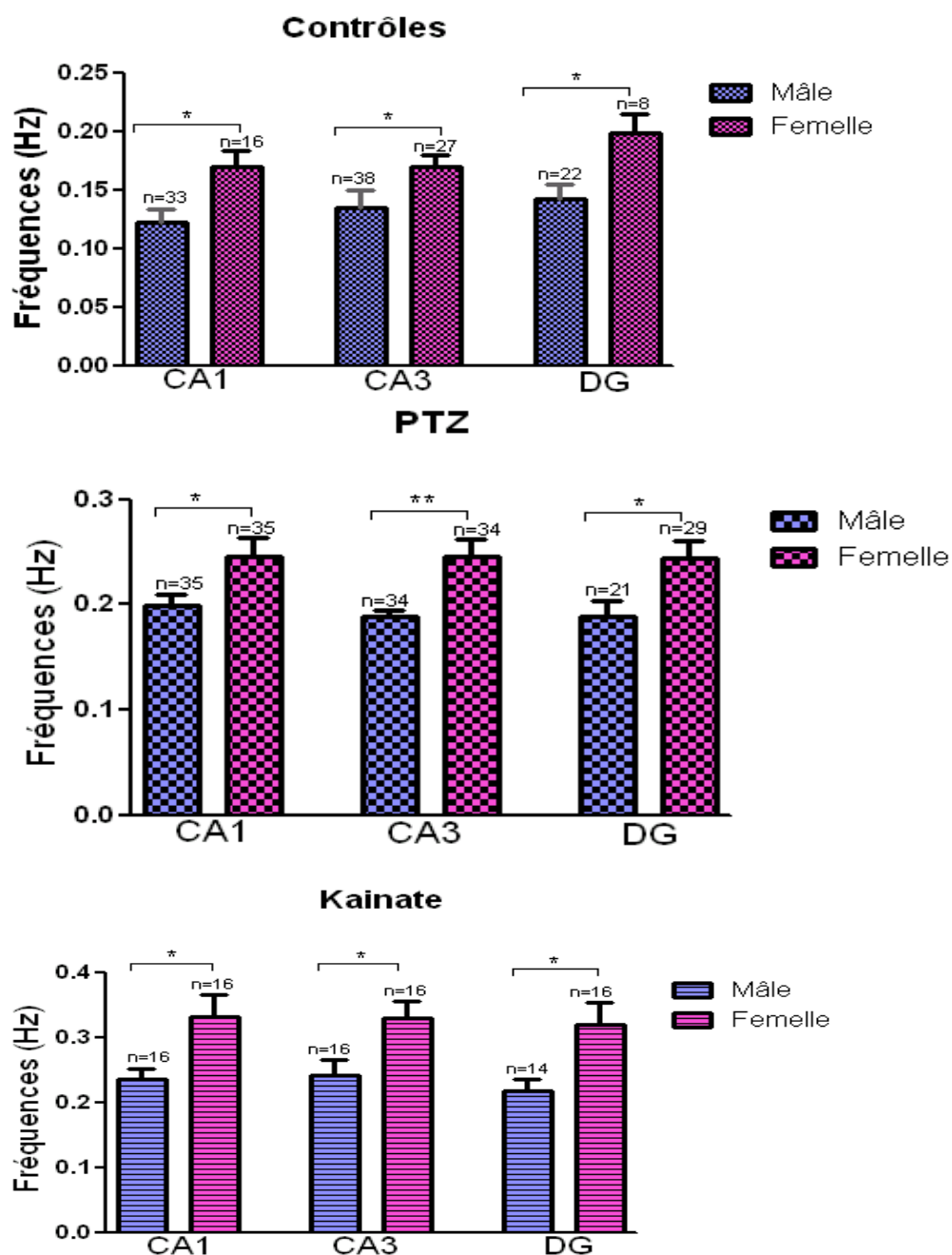
n : nombre de tranches d'hippocampe.

M : mâle **F** : femelle



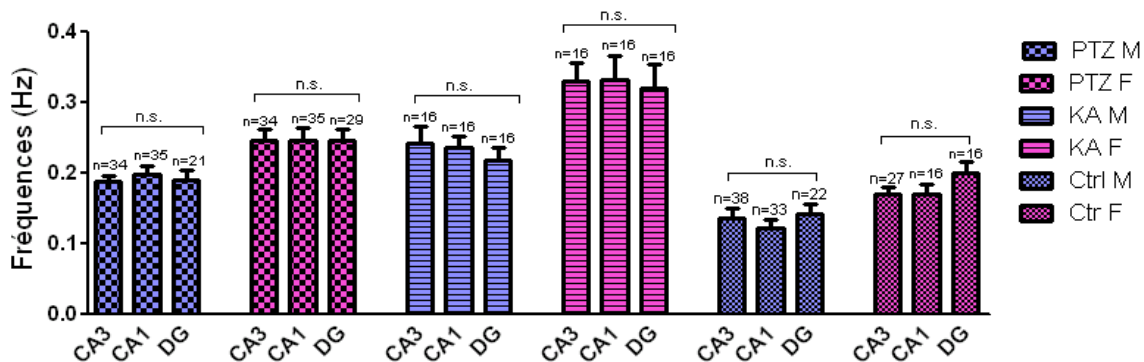
Graphique 3 : Moyenne des fréquences de l'activité spontanée chez les rats mâles et femelles au niveau des trois aires de l'hippocampe. La différence des moyennes des fréquences de l'activité spontanée reste significative dans toutes les aires de l'hippocampe des rats mâles et femelles des trois groupes. Cette différence est marquée par des Astérix (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$) ANOVA (post-test Tukey).

n = nombre de tranches d'hippocampe.



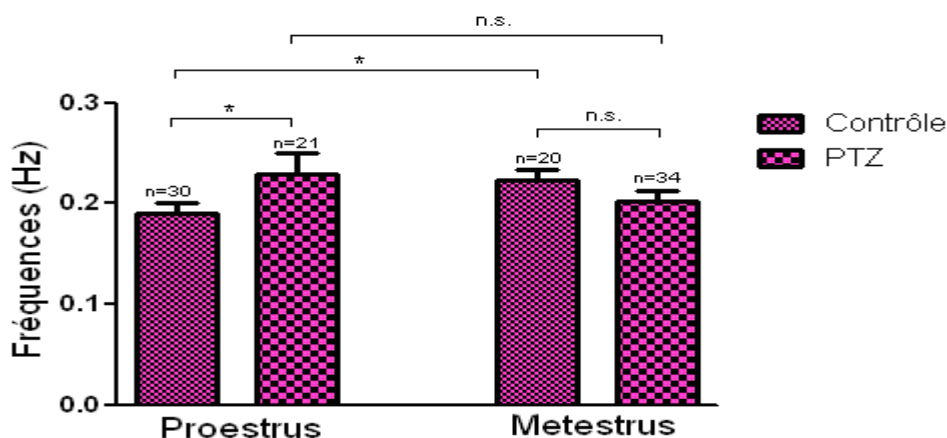
Graphique 4: Différence de l'activité spontanée entre mâles et femelles au niveau des trois aires des trois groupes de rats. La différence dans l'activité spontanée des mâles et femelles est maintenue dans toutes les aires de l'hippocampe (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). *Test t non-pairé (non-paramétrique)*

n = nombre de tranches d'hippocampe



Graphique 5: Comparaison des moyennes des fréquences de l'activité spontanée dans les trois aires de tous les groupes de rats. Il n'y a pas de différence au niveau de l'activité spontanée des trois aires quelque soit le groupe de rats (n.s. $p > 0.05$). ANOVA (post-test Tukey).

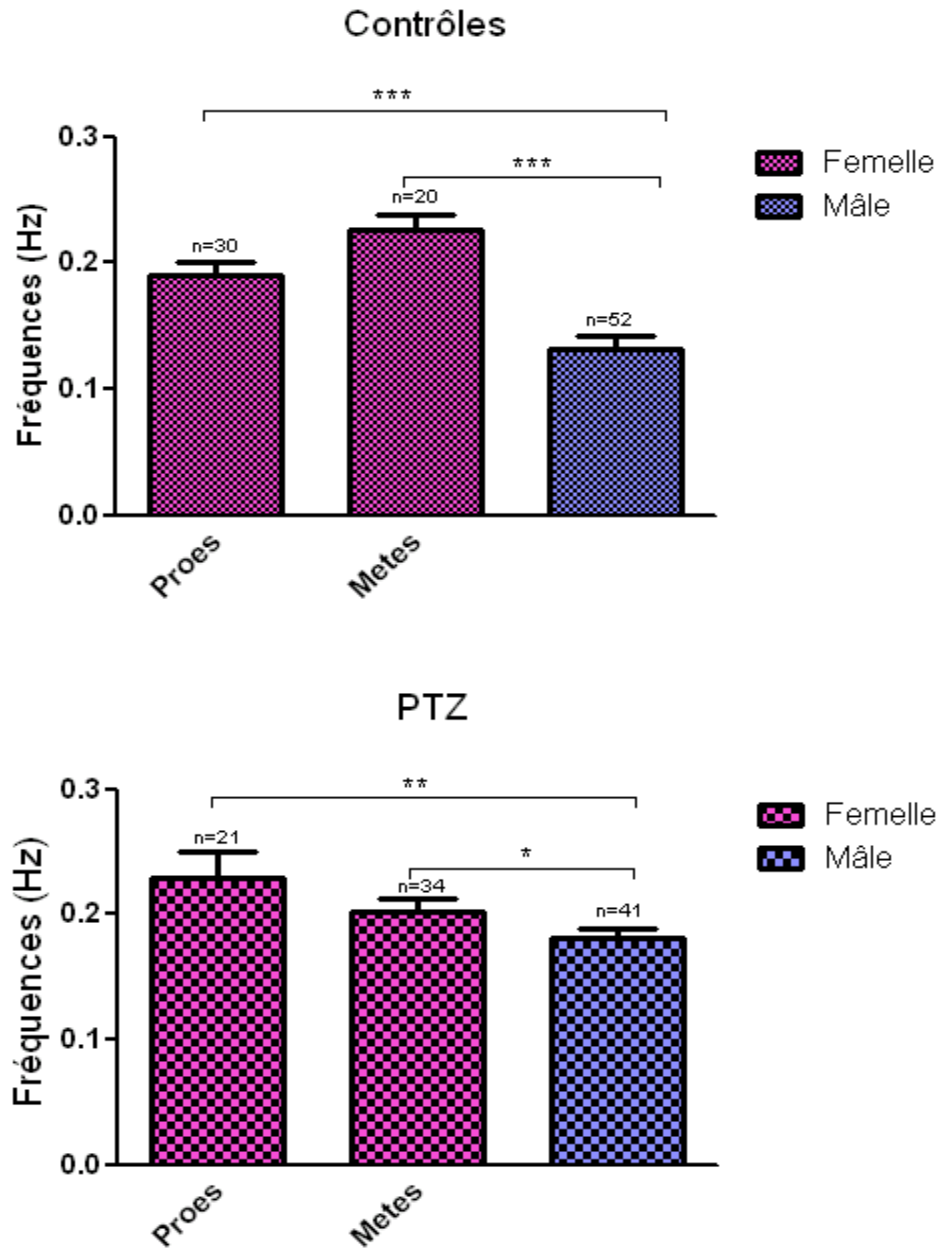
n = nombre de tranches d'hippocampe.



Graphique 6: Comparaison des moyennes des fréquences de l'activité spontanée des rats femelles selon leur cycle hormonal. Les femelles contrôles montrent une activité spontanée moins élevée que celle des femelles PTZ uniquement en phase Proestrus (période où le taux d'œstradiol est le plus élevé). Et les femelles PTZ quant à elles ne présentent aucune différence entre les deux phases du cycle (* $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). Test *t non-pairé* (non-paramétrique)

n = nombre de tranches d'hippocampe.

Les résultats présentés dans les graphiques 2 et 4 montrent que les femelles ont des fréquences d'activité plus élevées que les mâles indépendamment de l'aire ou du groupe. Nous avons alors investigué une cause possible de ces hautes fréquences en effectuant une autre série d'enregistrement chez les femelles en tenant compte du stade de leur cycle sexuel. Ensuite, les enregistrements obtenus ont été regroupés en deux stades du cycle (Proestrus et Metestrus), deux stades où l'œstradiol est respectivement élevé et bas. Cependant, cette manipulation n'a pu être effectuée que sur les femelles contrôles et PTZ. Le graphique 6 nous indique que les femelles PTZ ont une activité intérictale plus élevée que les femelles contrôles durant la phase Proestrus (œstradiol élevé) ($p=0.0407$), et non en phase Metestrus (œstradiol bas) ($p>0.05$). Mais, lorsqu'elles sont comparées aux rats mâles, la moyenne de leur fréquence reste élevée autant en proestrus qu'en metestrus ceci chez les contrôles comme chez les PTZ (graphique 7).



Graphique 7: Comparaison des moyennes des fréquences de l'activité spontanée chez les femelles en proestrus/metestrus et les mâles des groupes contrôle et PTZ. L'activité spontanée chez les rats femelles en proestrus ou en metestrus est significativement plus élevée que celle des mâles de même âge quelque soit le groupe (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$). *Test t non-pairé (non-paramétrique)*

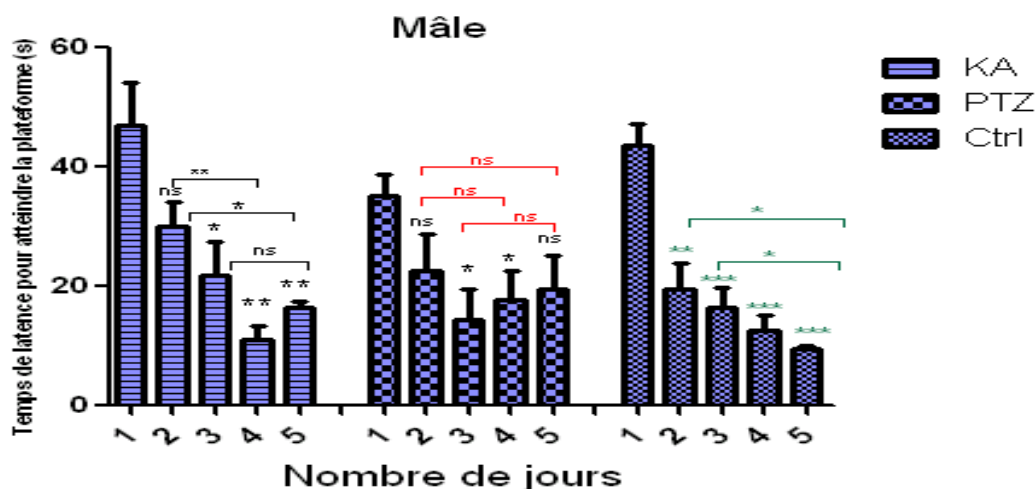
n = nombre de tranches d'hippocampe.

3.3 Le test d'apprentissage

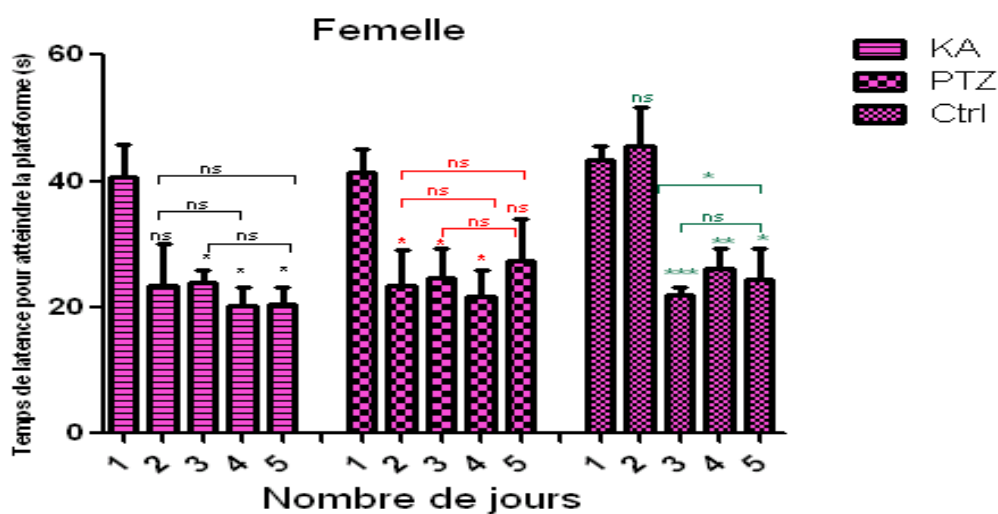
Nous avons évalué la mémoire spatiale des rats avec le test de Morris Water Maze (labyrinthe aquatique). L'apprentissage s'est déroulé sur 5 jours et les résultats présentés dans les graphiques représentent la moyenne du temps nécessaire au rat pour atteindre la plateforme immergée à chaque jour.

Ainsi, le graphique 8 nous indique que chez les mâles, le temps de latence pour trouver la plateforme diminue graduellement du J1 au J4 dans presque tous les groupes à l'exception des PTZ qui augmentent un peu leur temps au J4. Mais que rendu au jour 5, les rats traités mettent encore plus de temps à trouver la plateforme (KA→ 16.38 ± 1.008 , PTZ→ 19.63 ± 5.516) par rapport aux rats contrôles (9.450 ± 0.644). D'ailleurs l'écart de temps entre les rats contrôles et traités devient significatif (KA→ $p=0.0003$ et PTZ→ $p=0.0382$) ce jour 5. Le graphique 8 nous présente d'ailleurs le schéma d'apprentissage de chaque groupe de rat sur les 5 jours consécutifs.

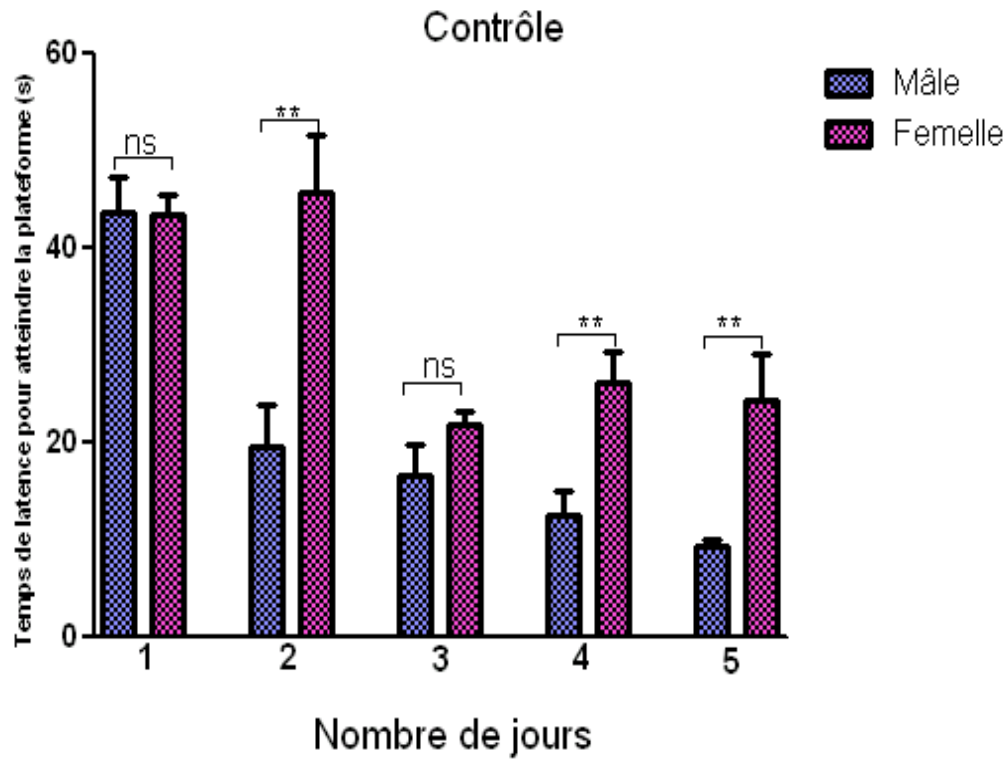
Les femelles quant à elles, présentent une diminution du temps de latence entre le J1 et les autres mais, cette diminution n'est pas ni graduelle, ni constante peu importe le groupe (graphique 9). Elles semblent plutôt stagner à partir du J2 pour les traités et du J3 pour les contrôles, avec une moyenne de temps toujours >20 sec pour tous les groupes. Le graphique 9 nous montre leur patron d'apprentissage sur les 5 jours consécutifs. Toutefois, lorsqu'on compare les mâles et les femelles entre eux, seuls le groupe contrôle montre une différence significative entre les deux sexes dès le J2 (graphique 10) contrairement aux rats traités KA et PTZ qui ne présentent pas de différence significative entre mâles et femelles (graphique 11).



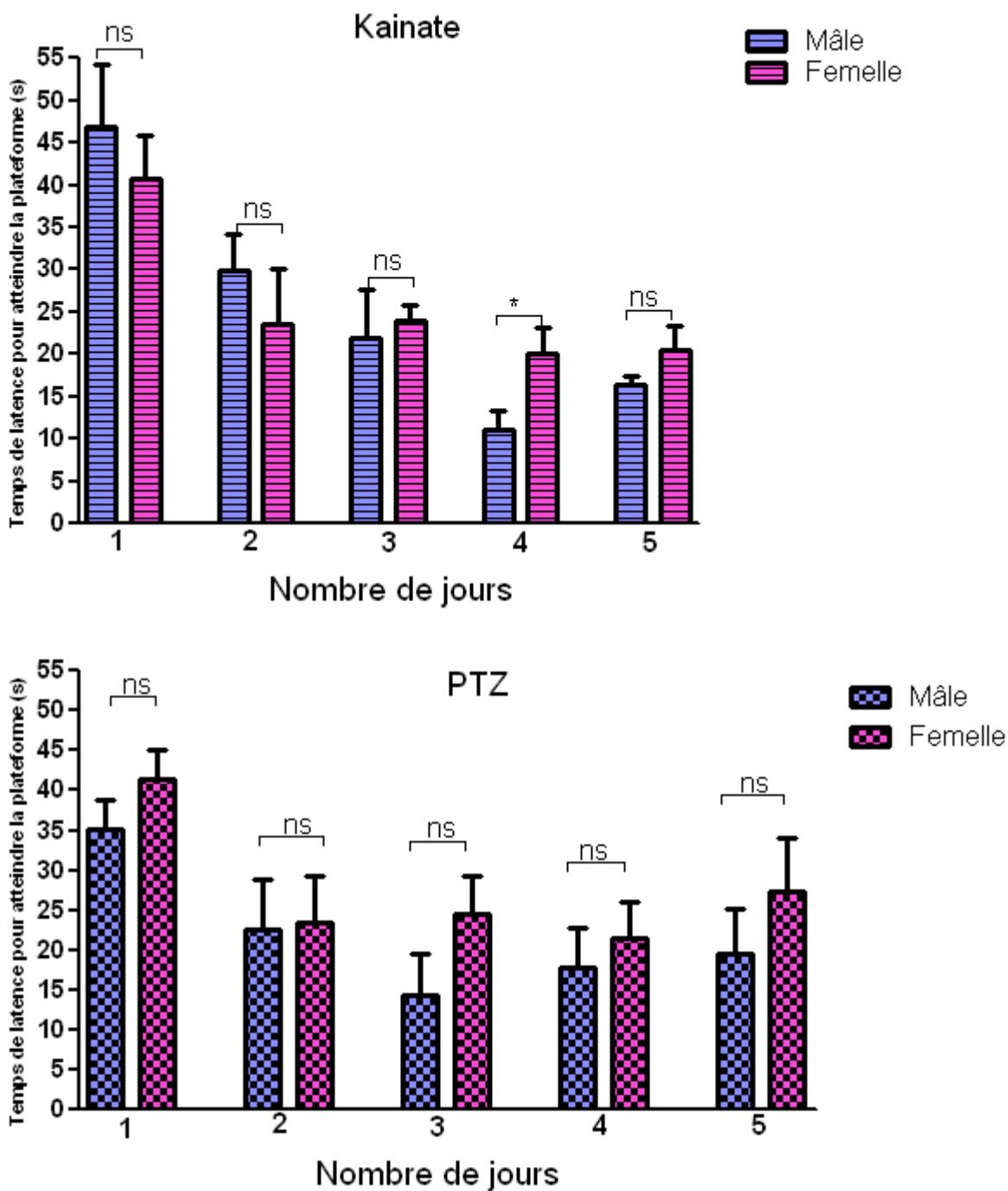
Graphique 8: Schéma du test d'apprentissage chez les mâles des trois groupes pendant 5 jours consécutifs. L'apprentissage chez les rats contrôles est progressif et la différence d'un jour à l'autre significative. Les rats Kainate présentent comme les contrôles un apprentissage progressif les 4 premiers jours avec des différences aussi significatives à partir du jour 3. Les rats PTZ ne semblent pas consolider leur apprentissage car il n'y a pas vraiment de différence significative d'une journée à l'autre. (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). Test *t* non-pairé (non-paramétrique). Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).



Graphique 9: Schéma du test d'apprentissage chez les femelles des trois groupes pendant 5 jours consécutifs. Chez les rats contrôles, la différence dans l'apprentissage se voit à partir du jour 3 mais reste stable ensuite. Les rats traités quant à eux restent stable du jour 2 au jour 5. (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). Test *t* non-pairé (non-paramétrique). Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).



Graphique 10 : Comparaison des moyennes du temps de latence entre mâles et femelles contrôles. Les femelles mettent significativement plus de temps tous les jours à atteindre la plateforme (** $p < 0.01$, n.s. $p > 0.05$). *Test t non-pairé (non-paramétrique)*
 Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).

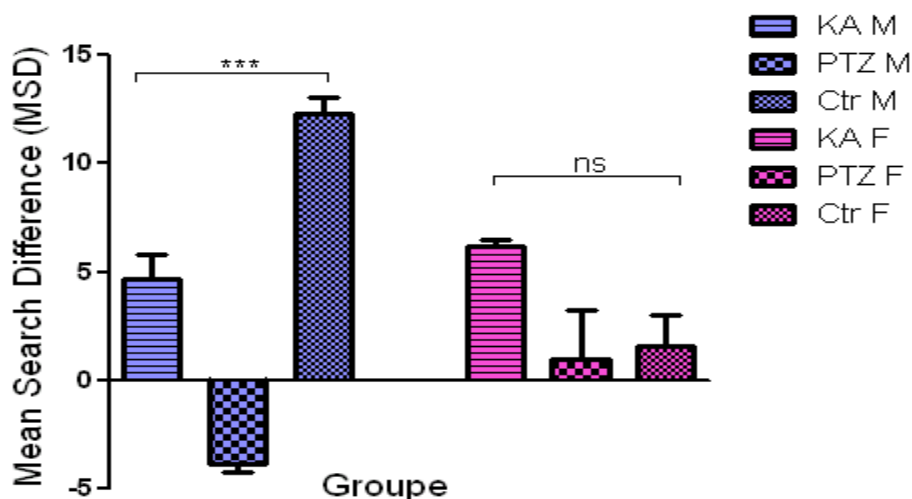


Graphique 11: Comparaison des moyennes du temps de latence entre mâles et femelles traités. Chez les rats traités, bien que les mâles mettent moins de temps à atteindre la plateforme, la différence avec les femelles n'est pas significative.

(n.s. $p > 0.05$, * $p < 0.05$). Test *t* non-pairé (non-paramétrique)

Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).

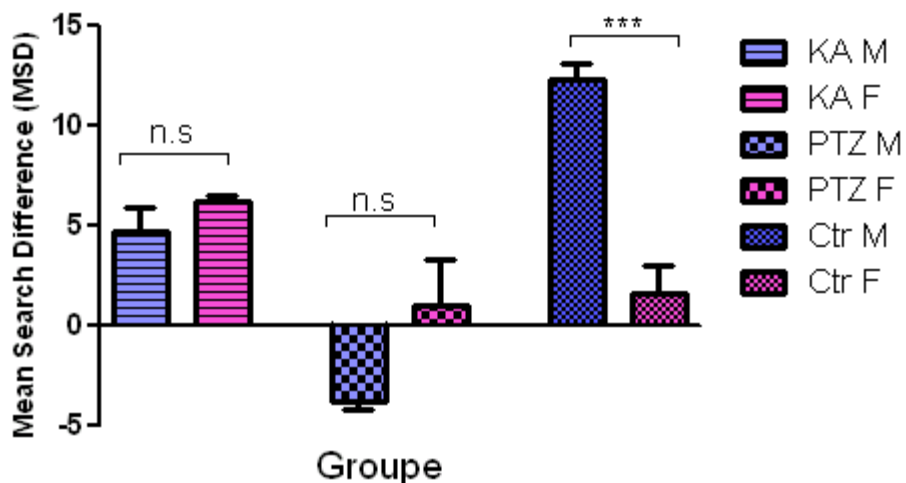
Le test de probe trial effectué le J7 évalue le temps passé par le rat dans le cadran N où se trouvait la plateforme pendant les 5 jours d'apprentissage (figure 6). Les résultats de ce test nous indique premièrement que, chez les mâles (graphique 12), les rats traités ont passé moins de temps dans le bon cadran par rapport aux contrôles (KA→ $p=0.0008$, PTZ→ $p<0.0001$) et qu'il y a une différence significative entre les trois groupes ($p<0.0001$). Cependant, entre les rats KA et PTZ, les PTZ sont ceux qui ont passé le moins de temps dans le cadran N ($p=0.0005$). Deuxièmement, ce test nous indique que, chez les femelles (graphique 12), malgré le fait que les KA paraissent avoir mis plus de temps dans le bon cadran que les autres, la différence entre les groupes n'est pas significative ($p>0.05$). La comparaison entre mâles et femelles (graphique 13), indique encore que seuls le groupe contrôle présente une différence significative entre les deux sexes ($p=0.0004$). Pour éliminer la possibilité d'un problème de vision, nous avons effectué le J7 un test visuel au cours duquel la plateforme est visible aux rats et placée dans un cadran différent de celui des 5 premiers jours. Les résultats de ce test sont présentés dans le graphique 14 et ils confirment que tous les rats étaient capable de voir les objets présents dans leur environnement puisqu'il n'y a aucune différence entre les groupes ($p>0.05$) ou les sexes ($p>0.05$).



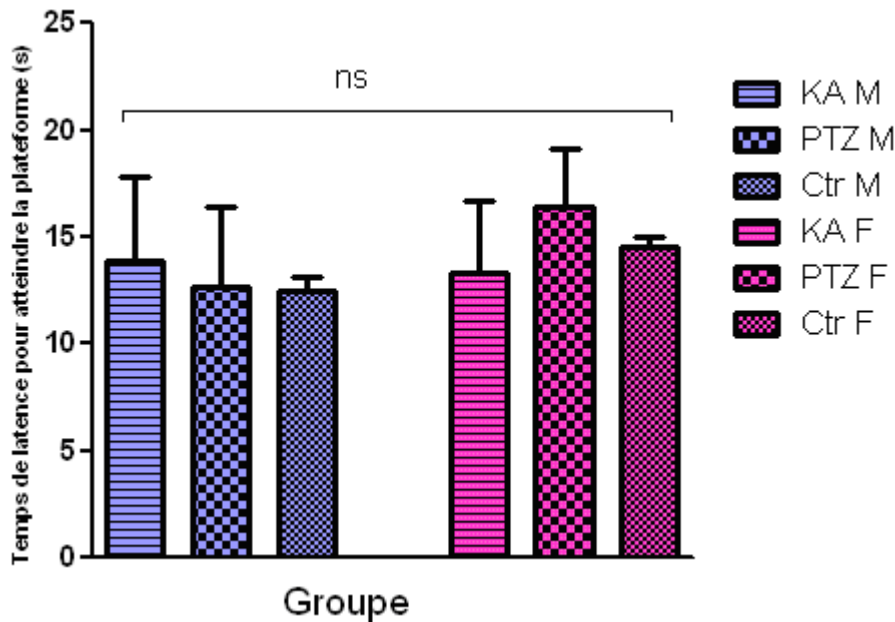
Graphique 12: Probe trial chez tous les groupes de rats.

Le probe trial effectué le J6 consiste à enlever la plateforme et d'évaluer le temps que le rat met dans le bon cadran. La comparaison des mâles entre eux indique qu'il y a une différence significative entre les contrôles et les rats traités. Tandis que chez les femelles, la différence n'est pas significative. (***) $p < 0.001$, n.s. $p > 0.05$). ANOVA (post-test Tukey).

Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).



Graphique 13: Comparaison entre mâles et femelles de tous les groupes dans le test de probe trial. La différence entre mâle et femelle contrôle est significative tandis qu'entre mâles et femelles traités il ne semble pas avoir de différence significative tout comme lors de l'apprentissage. (***) $p < 0.001$, n.s. $p > 0.05$). Test *t* non-pairé (non-paramétrique). Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).



Graphique 14 : Test visuel chez tous les groupes de rats.

Le test visuel est effectué le J7 au cours duquel la plateforme est visible et placée dans un cadran différent de celui du test d'apprentissage. Ce test confirme la capacité visuelle de tous les rats indépendamment du groupe. La comparaison des mâles entre eux, des femelles entre elles ou encore des mâles et des femelles entre eux indique qu'il n'y a pas de différence dans la moyenne du temps de latence pour atteindre la plateforme. (n.s. $p > 0.05$). ANOVA (post-test Tukey). Le nombre de rats par groupe est de 4 ($N=4$).

3.4 Évaluation de la perte sélective de cellules

Les crises épileptiques entraînent des mécanismes d'excitotoxicité capable d'induire une perte neuronale. Nos études précédentes suggèrent que les interneurons de la couche oriens-alveus de CA1 sont particulièrement vulnérables même chez l'animal immature. Afin d'évaluer cette perte neuronale, nous avons procédé à deux différents marquages : celui des interneurons PV dont la perte a été associée au modèle KA, et celui des noyaux de toutes les cellules de l'hippocampe (figure 9). Ensuite, nous avons quantifié dans les aires CA1, CA3, DG, O/A, R/LM et hile de l'hippocampe les interneurons immunopositifs

pour le PV et de façon qualitative, nous avons évalué la perte de cellules dans les aires CA1, CA3, DG et hile de l'hippocampe dans nos trois groupes de rats.

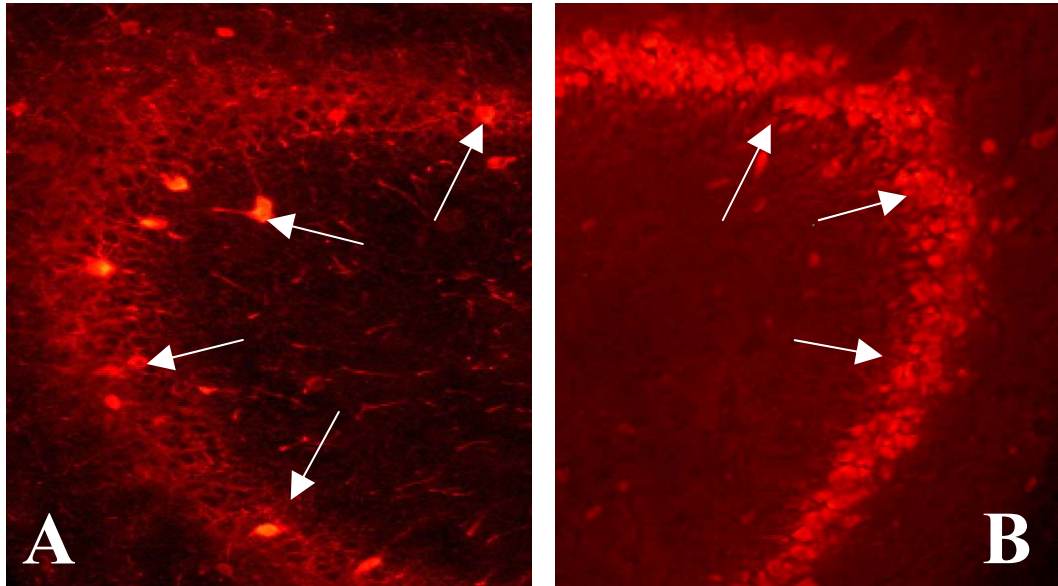


Figure 9: Exemple du marquage immunohistochimique dans la région CA3 d'un rat contrôlé. (40X)

A : Interneurones immunopositifs à la PV

B : Marquage des noyaux cellulaires au NeuN

L'hippocampe des rats traités et des rats contrôles ne montre aucune déformation visible. (Figure 10). L'analyse qualitative des photos de coupes d'hippocampe de rats traités, mâles comme femelles, n'indique pas une perte de cellules apparente distinguable à l'œil par rapport aux contrôles (Figure 10).

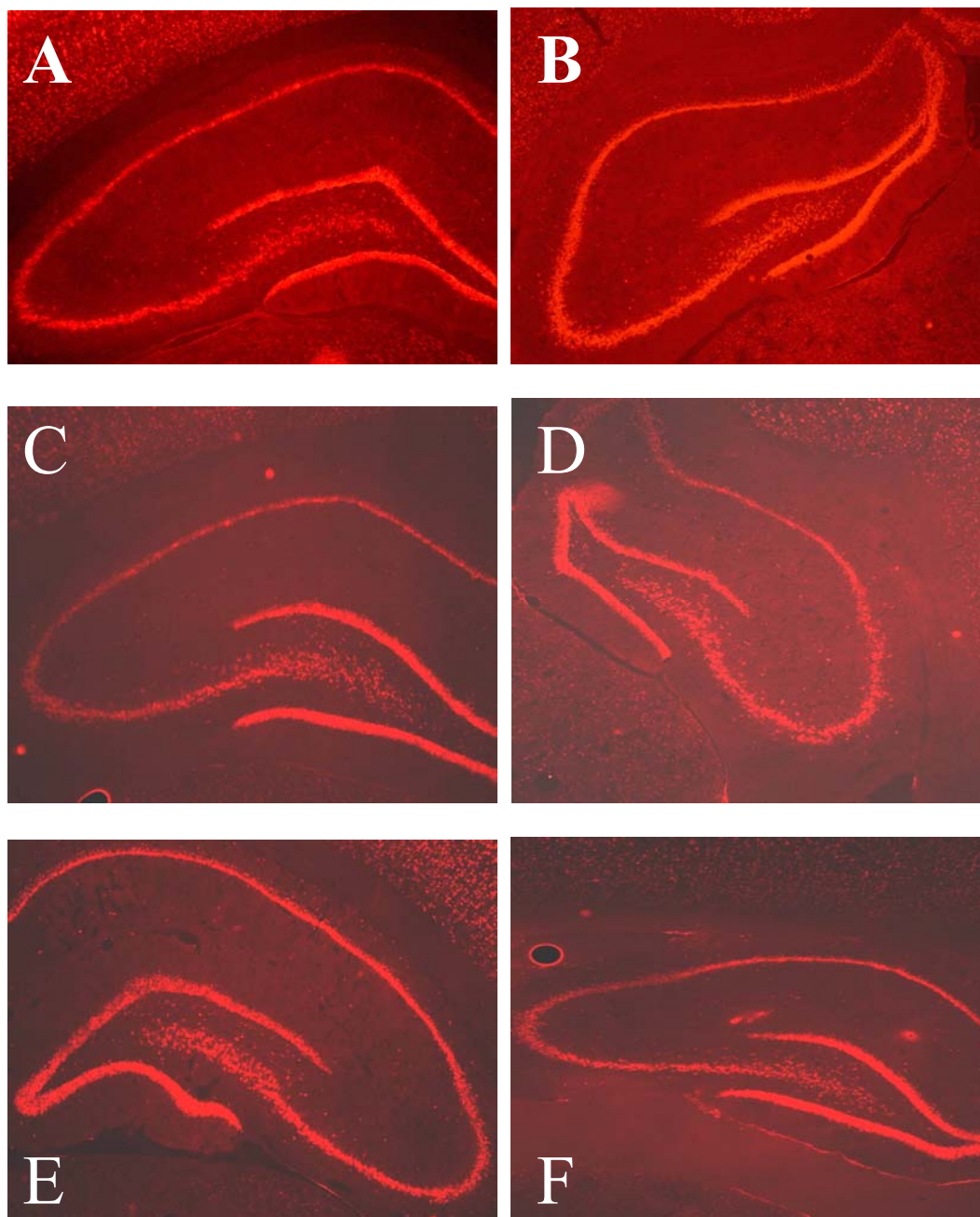


Figure 10 : Images représentant les noyaux des cellules immunopositives au NeuN (20X).

A, B : Coupe provenant respectivement d'un rat contrôle mâle et femelle.

C, D : Coupe provenant respectivement d'un rat KA mâle et femelle.

E, F : Coupe provenant respectivement d'un rat PTZ mâle et femelle.

Cependant, la quantification des cellules immunopositives à la palvabumine montrent un dessin différent. Nos résultats indiquent que chez les mâles, l'aire CA1 et la couche O/A sont les plus affectées autant chez les rats KA que chez les rats PTZ (figure 11). Ils présentent ainsi une diminution significative d'interneurones PV par rapport aux rats contrôles (KA→p= 0.0010, n=4; PTZ→p= 0.0029, n=5) dans ces deux aires de l'hippocampe (graphique 15). Par contre, bien que les rats KA et PTZ subissent tous les deux une perte d'interneurones PV, les rats KA sont plus affectés que les rats PTZ (p= 0.0094) (graphique 15). Les aires CA3, DG, R/LM et hile ne semblent pas avoir subi de perte ou du moins pas important (comme dans le cas du CA3).

Les résultats chez les femelles montrent un scénario différent puisque contrairement aux rats mâles (figure 12), les rats traités ne semblent vulnérables que de façon légère au niveau de l'aire DG (KA→p=0.0244, n=6; PTZ→p=0.0211, n=6) (graphique 16) et seules les femelles KA présentent aussi une vulnérabilité au niveau de la couche O/A par rapport aux contrôles (p=0.0062) et au PTZ (p=0.0097) (graphique 16). Les femelles PTZ ne présentent donc pas de perte d'interneurones au niveau de la couche O/A comme les femelles KA.

La comparaison entre les mâles et les femelles indiquent premièrement que les mâles et femelles contrôles n'ont pas la même quantité d'interneurones PV au niveau de l'aire CA1 et de la couche O/A (graphique 17). Et cette différence entre les deux est significative dans les deux aires (CA1→p=0.0027; O/A→p=0.0232). Deuxièmement, les rats traités quant à eux ne présentent pas de différence entre sexe (à l'exception des rats PTZ qui ont une légère différence au niveau de leur DG) dans toutes les aires de l'hippocampe (graphique 18).

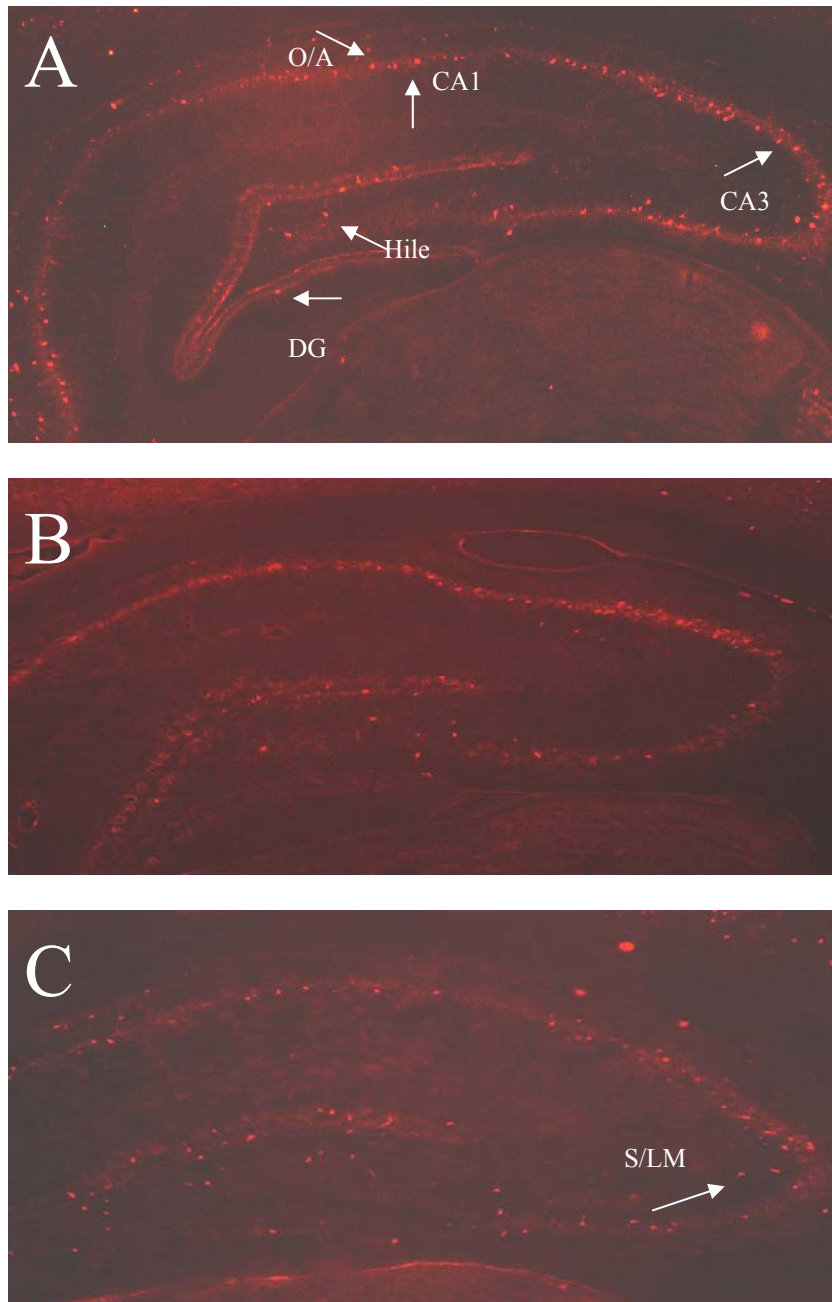
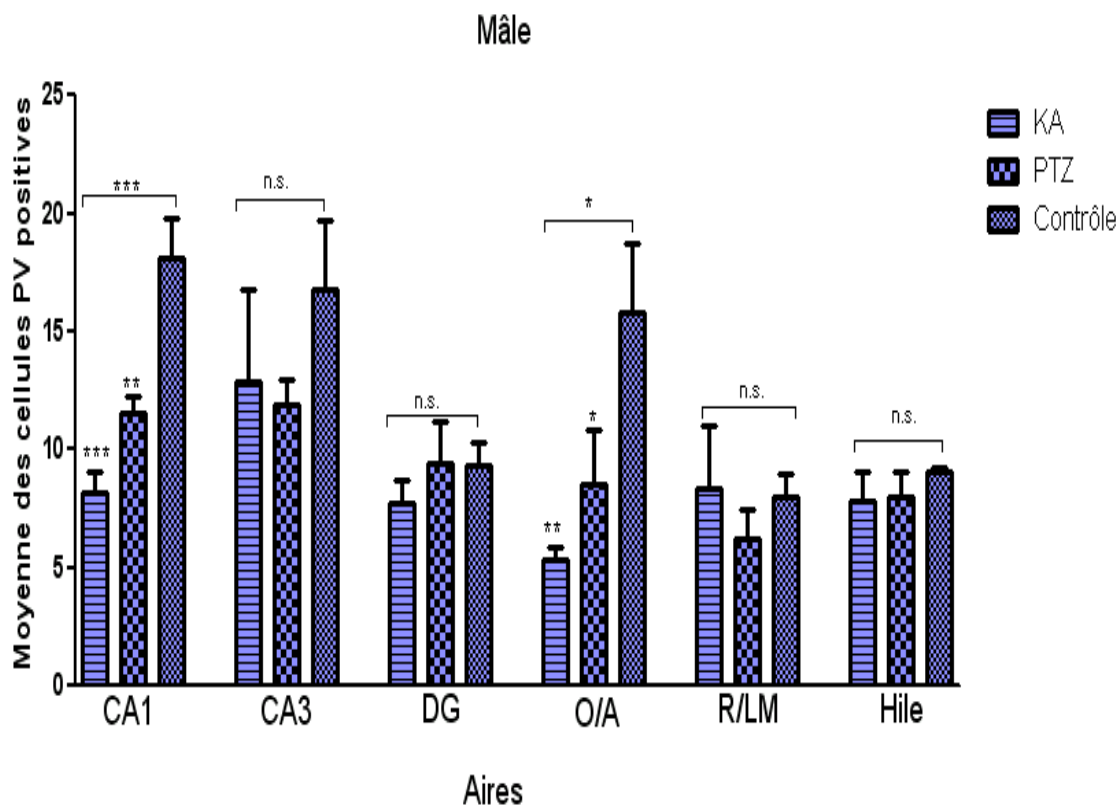


Figure 11 : Images représentant les interneurons immunopositives à la PV chez les mâles. (20X).

A: Coupe d'un rat contrôle **B:** Coupe d'un rat KA **C:** Coupe d'un rat PTZ.

L'immunofluorescence montre des pertes au niveau du CA1 (corne d'Amon) et O/A (Oriens Alvéus) chez les rats KA et PTZ; beaucoup plus marqué chez les KA. Ainsi qu'une légère diminution au niveau du CA3 pendant que le DG (gyrus denté), le S/LM (Stratum Lacunosum-moleculare) et le hile semble intact.



Graphique 15: Histogramme sommaire de cellules immunopositives à la PV chez les rats mâles des trois groupes. Il existe une différence significative au niveau de l'aire CA1 et de la couche O/A entre les rats traités et contrôles : ce qui indique qu'il y a perte de cellules immunopositives à la PV chez les rats KA et PTZ. Cette perte est plus marquée chez les rats KA. Bien qu'il semble avoir une perte légère au niveau de l'aire CA3 des rats traités, la différence entre les groupes n'est pas significative. (***) $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). *Test t non-pairé (non-paramétrique) et ANOVA (post-test Tukey).*

Le nombre de rats par groupe est de 5 et l'évaluation a été effectuée sur 3 coupes pour chaque rat dans les trois aires (donc $N=15$ par aire). La moyenne des cellules PV positives = (la somme totale de cellules immunopositives au PV par coupe de chaque rat) / le nombre total de coupe.

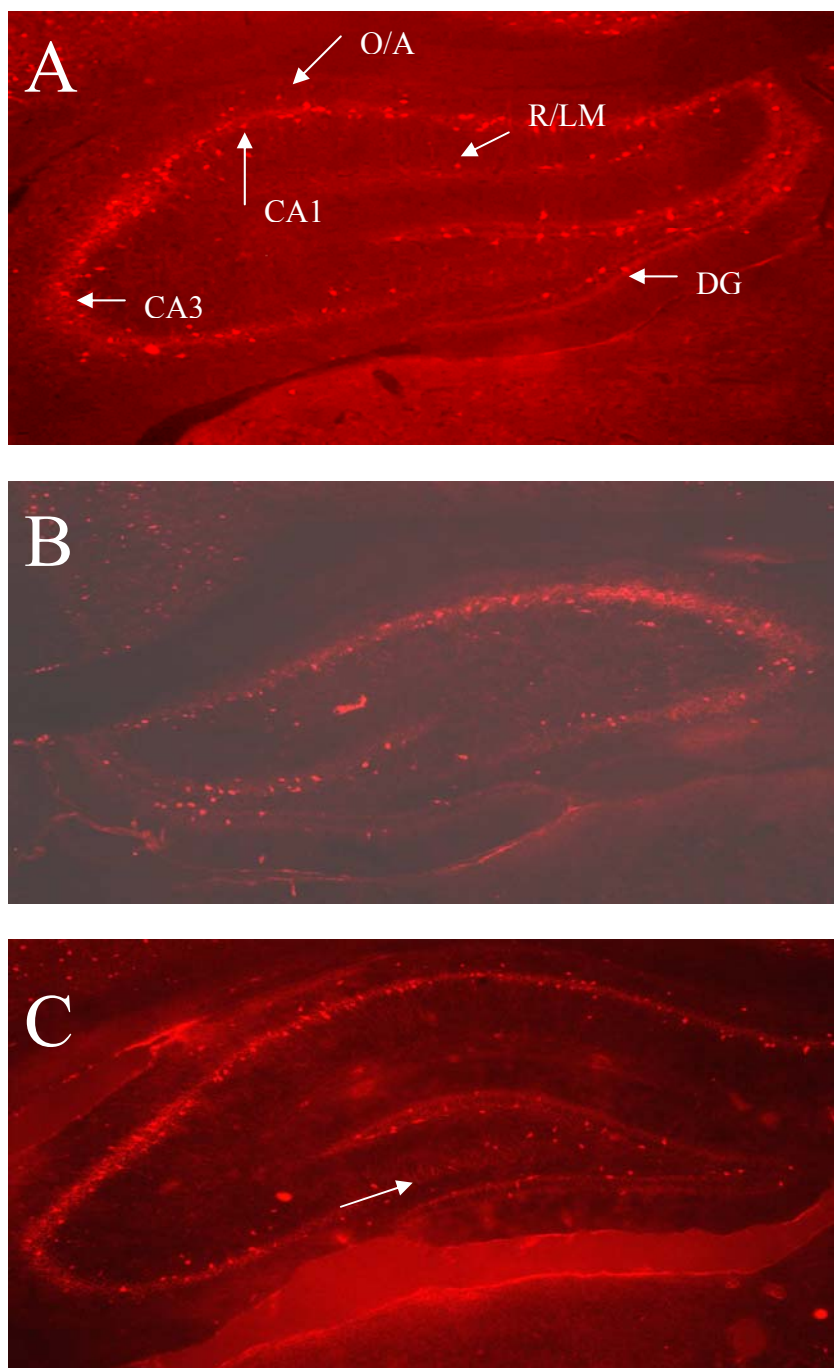
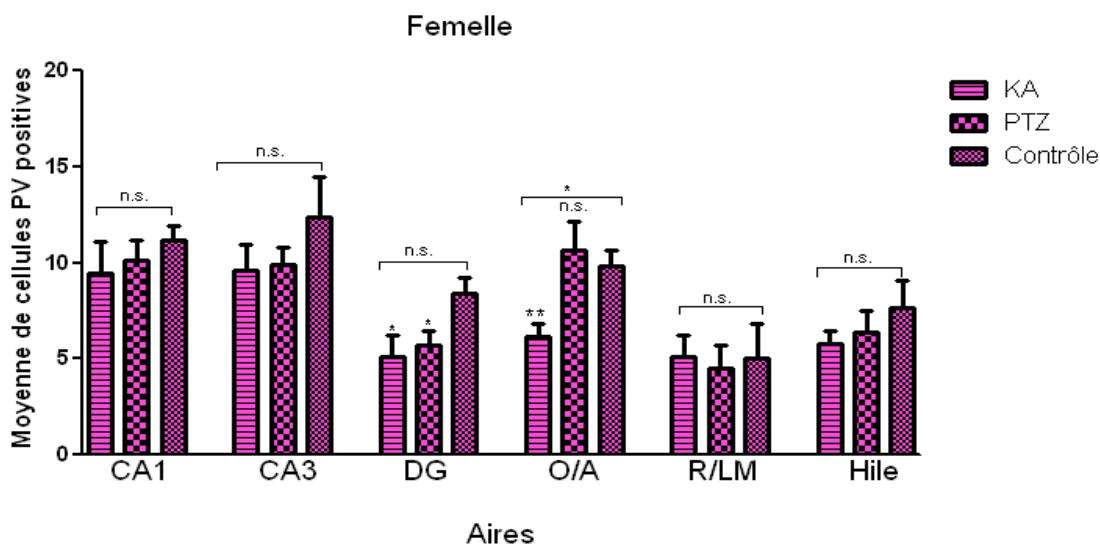
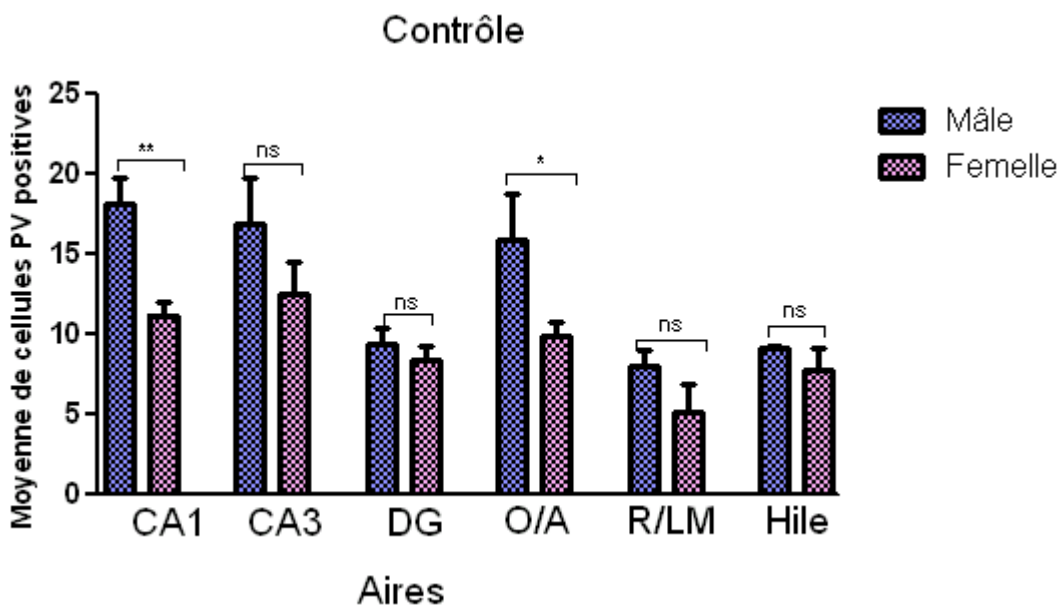


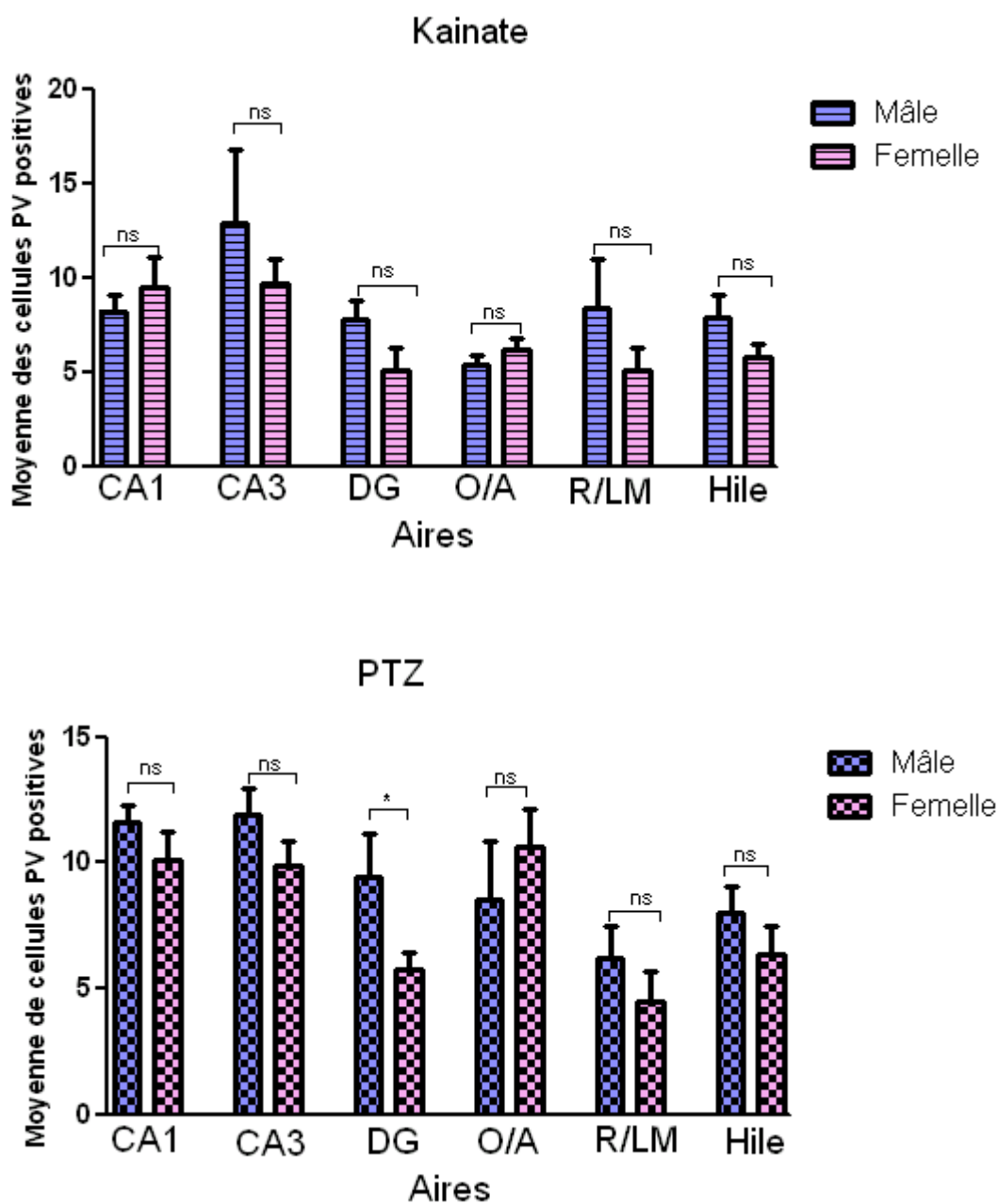
Figure 12 : Images représentant les interneurons immunopositives à la PV chez les femelles (20X). **A**: Coupe d'un rat contrôle **B**: Coupe d'un rat KA **C**: Coupe d'un rat PTZ. L'immunofluorescence montre de légères pertes au niveau du DG (gyrus denté), et de la couche O/A (Oriens Alvéus) chez les rats KA et PTZ. Pas de perte apparente au niveau du CA1 et CA3 (corne d'Amon), du R/LM (Radiatum/ Lacunosum-moleculare) et du hile semble.



Graphique 16 : Histogramme sommaire de cellules immunopositives à la PV chez les rats femelles des trois groupes. Les rats KA présentent une perte au niveau de la couche O/A. Au niveau du DG, il y a une légère différence entre les groupes traités et les contrôles. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). Test *t non-pairé* (non-paramétrique) et ANOVA (post-test Tukey). Le nombre de rats par groupe est de 6 et l'évaluation a été effectuée sur 3 coupes pour chaque rat dans chaque aire ($N=24$ par aire).



Graphique 17 : Comparaison du nombre d'interneurones PV entre mâles et femelles contrôles. Les femelles présentent une perte d'interneurones uniquement au niveau de l'aire CA1 et de la couche O/A. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). Test *t non-pairé* (non-paramétrique). La moyenne des cellules PV positives = (la somme totale de cellules immunopositives au PV par coupe de chaque rat) / le nombre total de coupe.



Graphique 18 : Comparaison entre les pertes d'interneurones PV des mâles et femelles traités. Les rats ne présentent pas de perte d'interneurones dans presque toutes les aires, à l'exception du DG chez les PTZ où il y aurait une légère différence. (* $p < 0.05$, n.s. $p > 0.05$). Test *t* non-pairé (non-paramétrique).

La moyenne des cellules PV positives = (la somme totale de cellules immunopositives au PV par coupe de chaque rat) / le nombre total de coupe.

IV. DISCUSSION

4. Discussion

4.1 L'évaluation des crises récurrentes spontanées

Nos travaux montrent que comme précédemment décrits les deux modèles d'épilepsie diffèrent dans la présence de crises récurrentes que l'on retrouve chez environ 35% de rats KA. De plus, comme dans le modèle de double pathologie, les crises spontanées ne sont observées uniquement que chez les mâles. Pourtant, à la crise initiale les rats PTZ avaient présenté des crises plus rapides et sévères. Cependant la durée totale fut plus courte. Alors que chez les rats KA les crises se sont développées et arrêtées de façon progressive. Il semblerait donc que les modifications observées chez les rats KA corrélaient avec la durée de la crise et non la sévérité plus grande chez les rats PTZ.

4.2 Les modifications subies par les récepteurs NMDA

Une crise peut-être le résultat d'une hyperexcitabilité de cellules nerveuses suite à une activation excessive des récepteurs du glutamate. Alors un changement à long terme sur les récepteurs NMDA du aux crises initiales pourrait entraîner des changements au niveau du système excitateur comme il l'a été démontré dans le cas du système cholinergique-muscarinique (Meilleur et al, 2003; Meilleur et al, 2000).

Nos données physiologiques montrent qu'en activant les récepteurs NMDA, les rats traités (PTZ et KA) présentent une augmentation marquée de l'activité spontanée, qui est plus importante chez les rats KA peu importe le sexe. Nos données suggèrent donc que, dans les deux modèles d'épilepsie, les récepteurs NMDA subissent des changements à long terme chez les mâles comme chez les femelles et ce dans les trois aires de l'hippocampe. Ces résultats physiologiques viennent ajouter un aspect à d'autres travaux où les récepteurs

NMDA subiraient un changement dans leurs sous-unités NR2A qui sont remplacées par la forme immature NR2B après un traitement au PTZ (Zhu et al, 2004). Cependant, entre mâles et femelles, les femelles montrent des moyennes de fréquences d'activité plus élevées et paraissent donc plus sensibles pourtant elles ne convulsent pas spontanément. De plus, cette différence entre sexe est présente chez les contrôles comme chez les traités, ce qui signifie que la sensibilité élevée des récepteurs femelles ne serait pas due au traitement mais peut être à une différence dans leur physiologie de base. Néanmoins, nos résultats physiologiques obtenus en tenant compte de la phase du cycle suggèrent que la différence observée entre mâles et femelles ne seraient pas due au changement d'hormone sexuelle puisqu'en présence (proestrus) ou en absence d'œstradiol (metestrus) cette différence semble exister. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précautions car étant donné que le changement d'une phase du cycle à l'autre se fait en 24h chez les rats, il est donc difficile de dire avec précision si la distinction entre le stade proestrus et metestrus était exacte au moment de la manipulation comme dans d'autres travaux où en plus des prélèvements vaginaux, le dosage de l'hormone dans le sang était aussi effectué (Scharfman et al, 2003, Shors et al, 2001; Shors, 2002). Alors, même si nous n'avons pu prouver sans doute l'implication des hormones sexuelles (vu le peu de femelles utilisé), cet aspect reste important car il représente la première différence physiologique entre les deux sexes. Ainsi, cette piste devrait être investiguée en profondeur en utilisant plus d'une technique d'évaluation d'hormones (prélèvements vaginaux, dosage d'hormone, castration, injection d'hormone sexuelle masculine aux femelles). Cependant, mis en ensemble, nos travaux suggèrent qu'un changement se produit dans le système exciteur des mâles comme des femelles après le traitement, et puisque les récepteurs NMDA sont impliqués, le système de plasticité synaptique pourrait aussi en subir les conséquences.

4.3 Le déficit spatial

Pour tester la plasticité neuronale, nous avons effectué le test du Morris Water Maze (labyrinthe aquatique) où la mémoire de nos rats a été testée. Ces résultats démontrent que chez les mâles, ceux qui ont été traités au KA présentent un apprentissage très semblable à celui des contrôles tandis que ceux traités au PTZ ne semblent pas consolider leur mémoire et présente un patron d'apprentissage différent. Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par le test du probe trial qui représente le temps passé par chaque rat dans le cadran N de la piscine où se trouvait la plateforme. Les rats PTZ sont ceux qui ont passé le moins de temps dans ce cadran. Cependant chez les femelles, il n'y a pas de différence entre les contrôles et les traitées puisque dès le deuxième jour elles stagnent dans leur temps. Et tout comme les mâles, le test de probe trial vient confirmer ces résultats. Par contre, lorsqu'on compare les mâles aux femelles, seuls les contrôles mâles démontrent une différence dans l'apprentissage par rapport aux femelles. Et une fois de plus, ces résultats sont confirmés par le test du probe trial. Le test visuel effectué le dernier jour vient appuyer le fait qu'aucun de ses rats n'avait un problème de vision, puisqu'ils ont été tous capable de trouver la plateforme lorsque celle-ci était visible indépendamment du groupe ou du sexe. Ces résultats nous disent que les rats PTZ auraient un déficit cognitif aussi important (principalement les mâles) que les rats KA. Ce qui d'une part confirme d'autres travaux (Huang et al, 2002) pour les PTZ et (Sarkisian et al, 1997) pour les KA. On peut donc conclure que les changements ne sont pas secondaires aux crises récurrentes mais bien à la crise initiale. Il apparaît alors qu'il y a eu une sorte de réarrangement au niveau de ces récepteurs qui conduit donc à cette hyperactivité observée chez les rats traités. Ceci démontre donc que le fonctionnement de ces récepteurs est plus complexe et implique certainement beaucoup d'autres mécanismes que notre test ne peut mettre en évidence,

mais qu'en plus, les changements perçus au niveau de ces récepteurs dans nos deux modèles ne découleraient peut être pas des mêmes mécanismes. Il serait donc plus utile de considérer un ensemble de travaux sur les mécanismes des récepteurs NMDA comme : les changements subis dans leur sous-unité NR2A après le traitement au PTZ (Zhu et al, 2004), la diminution de la densité de leur sous-unité NR2A qui entraîne un déficit spatial chez les rats traités au flurothyl (Bo et al, 2004), ou encore des mécanismes sous-jacents et complexes qui entreraient en jeu pour potentialiser leur activité : PKC, PKA, RACK1, Cak β /PyK2, Src/Csk, Fyn (Huang et al, 2001; Macdonald et al, 2005) pour espérer trouver la clé de l'énigme. Tous ceci mis ensemble avec nos résultats indiquent l'importance des récepteurs NMDA dans la plasticité synaptique car une simple modification dans la densité d'une de ses sous-unités s'avère cruciale; en particulier la sous-unité NR2A indispensable dans la LTP comme il a été prouvé par d'autres (Wade Morishita et al, 2007, Salter et Kalia, 2004; Macdonald et al, 2005).

Chez les femelles, il est difficile de démontrer l'effet des crises car les animaux contrôles ne montrent pas d'apprentissage significatif au Water Maze. De plus, nos résultats n'ont pas démontré une corrélation entre le cycle hormonale et la fréquence élevée de leur activité spontanée. Cependant, le test dure 5 jours et le cycle des femelles 4-5 jours, changeant en 24h. Alors si une fois de plus on se penche sur leur cycle hormonal qui les expose à une variation d'état continue pouvant aller de la vulnérabilité au perfectionnement, des changements hormonaux pourraient expliquer le manque de consistance de leurs résultats. Malheureusement, nous ne pouvons affirmer avec certitude l'impact de leur cycle dans nos travaux car ceux-ci avaient des limites. Le nombre de rats femelles était restreint (4Ctrl, 4KA, 4PTZ) et le stade du cycle n'était pas connu. Le test demanderait donc un plus grand nombre de rats; mais surtout de les classer par stade du cycle, en prenant soin de prendre à la fois les prélèvements vaginaux et sanguins car ce

serait la seule manière d'ôter tout doute aux résultats. Cependant, en considérant les travaux des autres effectués au sujet des femelles sur ce test, on constate que les femelles performant mieux quand elles sont en proestrus car à ce stade, elles auraient une augmentation de la densité de leurs épines dendritiques permettant de faire de multiples connections (Shors et al, 2001; Wooley et al, 1992), mais qu'elles seraient en même temps plus sensibles au stress dans cette phase de proestrus et verraient même la densité de ses dendrites diminuer et par conséquent performeraient moins (Shors et al, 2001). Alors il faudrait aussi considérer l'environnement où le test se déroulera afin d'éliminer le facteur stress qui pourrait affecter les résultats.

4.4 La perte de cellules neuronales

Une conséquence aux crises et à une activation importante des récepteurs NMDA est la production d'une excitotoxicité pouvant causer la mort cellulaire. Pourtant nos résultats NeuN d'immunohistochimie (évaluation qualitative) indiquent qu'il n'y a pas de perte cellulaire observable dans l'hippocampe de tous ces rats indépendamment du groupe et du sexe. Donc, malgré les crises et l'activité élevée vue chez les récepteurs NMDA, nos travaux indiquent que l'hippocampe des rats présente une résistance durant le développement qui les protège de la perte cellulaire induite par les convulsions prolongées. Ce qui rejoint d'autres travaux où les rats KA injectés immature présentaient une légère perte comparés aux rats injectés adultes (Hass et al, 2001; Sarkisian et al, 1997) ou encore l'absence de perte cellulaire chez les rats PTZ (Huang et al, 2002). Il a d'ailleurs été évoqué que le rat KA immature soit associé à une sous régulation des récepteurs du glutamate en réponse au relâchement excessif du glutamate qui entraîne une diminution de la réponse du récepteur et par conséquent prévient l'excitotoxicité et donc la perte

neuronale (Tandon et al, 2002), et que les changements subis par les rats PTZ surviendraient sans perte neuronale parce qu'ils seraient reliés à un changement dans l'arborisation et l'organisation synaptique final de leur cerveau en développement (Nehlig et al, 1996) .

S'il n'y a pas de perte importante visible de cellules pyramidales, il en est différent des interneurons contenant de la parvalbumine (protéine liant le Ca^{2+}) qui montrent une perte au niveau de l'aire CA1 et de la couche O/A chez les rats traités KA et PTZ mâles ce qui a déjà été rapporté chez les KA (Renaud et al., 2002; Sanon et al, 2005) tandis que chez les femelles la perte se situe au niveau du DG pour les deux modèles mais uniquement au niveau de la couche O/A pour les KA. Nos résultats indiquent qu'un changement se produit au niveau d'au moins un type de cellules inhibitrices de l'hippocampe (PV) chez tous nos groupes de rats. Et que, les rats KA présentent encore une plus grande perte de ces cellules que les rats PTZ ceci chez les mâles comme chez les femelles tout comme dans les résultats d'électrophysiologie. Les interneurons qui contiennent la parvalbumine (protéine liant le Ca^{2+}) sont des cellules inhibitrices GABAergiques dont le rôle est de réduire l'excitabilité des cellules pyramidales. Alors, la perte de ces cellules pourrait contribuer à l'hyperexcitabilité des cellules pyramidales. Dans notre cas, ceci pourrait justifier le fait que les rats KA présentent une fréquence d'activité spontanée plus élevée que les rats PTZ, vu qu'en comparant la perte d'interneurons PV, ils ont aussi moins de pertes que les rats KA.

Cependant, nous avons vu que chez les femelles seul le DG semble légèrement affecté par la perte d'interneurons PV pour les PTZ tandis que les KA présentent en plus du DG, des pertes plus importantes au niveau de la couches O/A. Ces résultats viennent soutenir en quelque sorte notre hypothèse émise précédemment à propos de la différence entre mâles et femelles selon laquelle la différence dans la sensibilité des récepteurs mâles et femelles ne

serait pas due au traitement mais possiblement à une différence dans leur anatomie ou physiologie. Car nous démontrons ici qu'avant le traitement, les femelles présentaient déjà un nombre plus bas d'interneurones PV dans l'aire CA1 et la couche O/A, mais qu'une fois les rats traités, la vulnérabilité des couches n'est plus pareille. Alors, les réarrangements qui se produisent après le traitement seraient différents entre sexe puisque les résultats entre mâles et femelles traités montrent que le nombre des interneurones PV est semblable dans toutes les aires des groupes traités. Ces résultats semblent contradictoires si on considère le fait que les femelles sont celles qui présentaient l'activité des récepteurs NMDA la plus élevée, donc devraient présenter une perte d'interneurones plus accentuée que les mâles. Cependant, ces résultats pourraient expliquer la différence observée entre les femelles KA et PTZ puisque selon ces données, les femelles KA présentent plus de pertes (aire DG et O/A) que les PTZ (DG), ce qui justifierait bien l'hyperexcitabilité plus élevée des cellules pyramidales des femelles KA.

V. CONCLUSION

5. Conclusion

Les deux modèles étudiés ici présentent des caractéristiques de crises initiales différentes qui pourraient bien conduire à l'absence totale de crises récurrentes spontanées dans le modèle PTZ. Les rats traités (KA et PTZ) montrent une fréquence d'activité spontanée en activant les récepteurs NMDA plus élevée que les contrôles, mais les KA sont les plus sensibles, ceci chez les mâles comme les femelles. Paradoxalement, les PTZ mâles accusent un certain déficit spatial plus sévère, ne démontrant aucun apprentissage. Les rats ne présentent pas de pertes de cellules principales apparentes quel que soit le groupe ou le sexe, mais présentent des pertes de cellules non-principales dont les interneurons contenant de la parvalbumine. Chez les mâles KA comme PTZ les mêmes aires sont atteintes (CA1 et O/A) tandis que les femelles PTZ sont atteintes au DG uniquement et les femelles KA au DG et O/A. Ici encore, les femelles marquent une différence avec les mâles (aire et vulnérabilité différentes).

Nos travaux démontrent donc qu'après un épisode de crise épileptique subi lorsque immature, le système exciteur des rats traités aux KA et PTZ subit des changements qui persistent à l'âge adulte. Ces changements affecteraient le système de plasticité synaptique mais de façon différente selon le sexe et le modèle. L'hyperexcitabilité des cellules du système exciteur découlerait d'une perte de cellules inhibitrices (interneurones à la parvalbumine) chez les mâles comme les femelles, mais dans des aires et des proportions différentes. En conclusion, les traitements au KA et PTZ entraînent des modifications au niveau des circuits excitateurs et inhibiteurs chez les rats mâles et femelles mais ceux-ci sont affectés différemment car ils ne sont pas toujours atteints au niveau des mêmes structures et ne présentent pas non plus le même degré de vulnérabilité.

VI. RÉFÉRENCES

6. Références

- 1- Andersen P., Eccles J.C. and Loyning, Y. Location of synaptic inhibitory synapses on hippocampal pyramids. *J. Neurophysiol.* 1964, 27: 592-607
- 2- Baldy-Moulinier M. *Épilepsies en question.* Édition John Libbey Eurotex. 1997 p115-125.
- 3- Bear M.F., Connors B.W. & Paradiso M.A. *Neurosciences à la découverte du cerveau.* Édition Pradel Paris 1998 p4-12.
- 4- Ben Ari Y, Tremblay E, Riche D, Ghilini G, Naquet R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculline or pentetrazole: metabolic mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. *Neuroscience* 1981, 6: 1361-1391.
- 5- Ben Ari Y. Limbic Seizure and Brain-Damage Produced by Kainic Acid – Mechanisms and Relevance to Human Temporal-Lobe Epilepsy. *Neuroscience* 1985, 14: 375-403.
- 6- Best N., Mitchell J., Baimbridge K. G. and Wheal H. V. Changes in parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat hippocampus following a kainic acid lesion. *Neurosci. Lett.* 1993, 155: 1-6
- 7- Bo T, Jiang Y, Cao H, Wang J, Wu X. Long-term effects of seizures in neonatal rats on spatial learning ability and N-methyl-D-aspartate receptor expression in the brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004, 152 (2):137-42.

- 8- Cajal, S.R. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. Paris: Maloine, 1911.
- 9- Cavalheiro EA, Riche DA, Le Gal LS. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1982, 53: 581-589.
- 10- El Bahh B, Lespinet V, Lurton D, Coussemacq M, Le Gal LS, Rougier A. Correlations between granule cell dispersion, mossy fiber sprouting, and hippocampal cell loss in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1999, 40: 1393-1401.
- 11- Freund TF, Buzsaki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996, 6: 347-470.
- 12- Forsythe, I.D., G.L. Westbrook, and M.L. Mayer. Modulation of excitatory synaptic transmission by glycine and zinc in cultures of mouse hippocampal neurons. *J.Neurosci.* 1988, 8:3733-3741.
- 13- Gorter JA, van Vliet EA, Aronica E, Lopes da Silva FH. Progression of spontaneous seizures after status epilepticus is associated with mossy fibre sprouting and extensive bilateral loss of hilar parvalbumin and somatostatin-immunoreactive neurons. *Eur J Neurosciences* 2001, 13: 657-669.
- 14- Haas Kurt Z., Sperber Ellen F., Opanashuk Lisa A., Stanton Patric K and Moshe Solomon L. Resistance of Immature Hippocampus to Morphologic and Physiologic Alterations Following Status Epilepticus or Kindling. *Hippocampus* 2001, 11:615-625.

- 15- Huang Li-Tung, Yang San Nan, liou Chia-Wei, Hung Pi-Lien, Lai Ming-Chi, Wang Chih-Lu and Wang Tzu-Jou. Pentylenetetrazol-induced Recurrent Seizures in Rat Pups: Time Course on Spatial Learning and Long-term Effects. *Epilepsia* 2002, 43 (6): 567-73.
- 16- Huang Yue-Qiao, Lu Wei-Yang, Ali Declan W., Pelkey Kenneth A., Pitcher Graham M., Lu You Ming, Aoto Hiroshi, Roder John C., Sasaki Terukatsu, Salter Michael W., MacDonald John F. CAKb/Pyk2 Kinase Is a Signaling Link for Induction of Long-Term Potentiation in CA1 Hippocampus. *Neuron* 2001, 29:485–496.
- 17- Hughlings Jackson J. On the anatomical & physiological localisation of movements in the brain. *Lancet* 1873;101:84-85, 162-164, 232-234.
- 18- Ishizuka, N., W.M. Cowan, and D.G. Amaral. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J.Comp.Neurol.* 1995, 362:17-45.
- 19- Lorente de No. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J.Psychol.Neurol.* 1934, 46:113-177.
- 20- Macdonald D. S., Weerapura M., Beazely M. A., Martin L., Czerwinski W., Roder J. C., Orser B. A. and MacDonald J. F. Modulation of NMDA Receptors by Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide in CA1 Neurons Requires G_q, Protein Kinase C, and Activation of Src. *The Journal of Neuroscience* 2005, 25 (49):11374 –11384.

- 21- Marrison RS, Wenzel HJ, Kinoshita J, Robbins CA, Donehower L, Schwartzkrain PA. Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainite-induced cell death. *J Neurosciences* 1996, 16:1337- 45.
- 22- Mathern GW, Pretorius JK, Babb TL. Quantified patterns of mossy fiber sprouting and neuron densities in hippocampal and lesional seizures. *J Neurosurgery* 1995, 82 (2): 211-219.
- 23- Meilleur S, Carmant L, Psarropoulou C. Immature rat convulsions and long-term effects on hippocampal cholinergic neurotransmission. *Neuroreport* 2000, 11(3):521-24.
- 24- Meilleur S, Aznavour N, Descarries L, Carmant L, Mamer OA, Psarropoulou C. Pentylentetrazol-induced seizures in immature rats provoke long-term changes in adult hippocampal cholinergic excitability. *Epilepsia*. 2003, 44(4):507-17.
- 25- Nadler, J.V., Perry, B.W., Gentry, C. and Cotman C.W. Loss and reacquisition of hippocampal synapses after selective destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. *Brain Res*. 1980, 191: 387-403.
- 26- Nehlig Astrid, Anne Pereira de Vasconcelos. The model of pentylentetrazole-induced status epilepticus in the immature rat: short-and long-term effects. *Epilepsy Research* 1996, 26: 93- 103.
- 27- Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 1974, 77: 507-512.
- 28- Patel M, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I, Mc Namara JO. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* 1996: 345-55.

- 29- Renaud J, Emond M, Meilleur S, et Carmant L. AIDA, a class I metabotropic glutamate-receptor antagonist limits kainate-induced hippocampal dysfunction. *Epilepsia* 2002 ; 43 : 1306-17.
- 30- Richard D. et Orsal D. 2001. Neurophysiologie organisation et fonctionnement du système nerveux. Édition II Dunod Paris.p112-122.
- 31- Salter Michael W.and Kalia Lorraine V. Src Kinase : a Hub for NMDA receptor regulation. *Nature Reviews* 2004, 5:317-328.
- 32- Sanon N., Carmant L., Emond M., Congar P., and Lacaille J-C. Short-term effects of kainic acid on CA1 hippocampal interneurons differentially vulnerable to excitotoxicity. *Epilepsia* 2005, 46 (6): 837-848.
- 33- Sarkisian Matthew R., Tandon Pushpa, Liu Zhao, Yang Yili, Hori Ariyuki,Holmes Gregory L., and Stafstrom Carl E. Multiple Kainic Acid Seizures in the Immature and Adult Brain: Ictal Manifestations and Long-Term Effects on Learning and Memory. *Epilepsia* 1997, 38 (11): 1157-1166.
- 34- Scharfman Helen E., Mercurio Thomas C., Goodman Jeffrey H., Wilson Marlene A., and MacLusky Neil J. Hippocampal Excitability Increases during the Estrous Cycle in the Rat: A Potential Role for Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J Neurosci.* 2003, 23 (37): 11641–11652.
- 35- Shors Tracey J., Chua Chadrick, and Falduto Jacqueline. Sex Differences and Opposite Effects of Stress on Dendritic Spine Density in the Male versus Female Hippocampus. *The Journal of Neuroscience* 2001, 21(16):6292–6297.

- 36- Shors Tracey J. Opposite effects of stressful experience on memory formation in males versus females. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2002, 4(2): 139-147.
- 37- Stanton P. K., Bramham C., Scharfman H. E. 2005. *Synaptic Plasticity and Transsynaptic Signaling*. Édition Springer. p92
- 38- Tandon Pushpa, Yang Yili, Stafstrom Carl E, Holmes Gregory L. Downregulation of kainate receptors in the hippocampus following repeated seizures in immature rats. *Developmental Brain Research* 2002, 136:145–150.
- 39- Wade Morisha, Wei Lu, Gordon B. Smith, Roger A. Nicoll, Mark F. Bear, Robert C. Malenka. Activation of NR2B-containing NMDA receptors is not required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Neuropharmacology* 2007, 52: 71-76.
- 40- Wooley CS., McEwen BS. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neuroscience* 1992, 12:2549-2554.
- 41- Zhu LJ, Wang MZ, Wu XH, Xu SJ, Luo JH, Chen Z. Effects of pentylenetetrazol at subconvulsant and convulsant dose on NMDA receptor subunits in rats. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2004, 33(3):213-5, 224.
- 42- www.epilepsy.ca/fran/mainSetFR.html
- 43- <http://lecerveau.mcgill.ca>