

Mémoire de Maîtrise en médecine No 190

Traitement de l'information sensorielle chez la souris HeCo

Treatment of the sensorial information in the HeCo Mouse

Etudiante

Aude Richard

Tuteur

PD Dr Alexandre Croquelois, MER
Dpt des Neurosciences Cliniques, CHUV

Expert

Prof. Egbert Welker
Dpt des Neurosciences Fondamentales, UNIL

Lausanne, janvier 2012

Abstract

Contexte : L'hétérotopie sous-corticale en bandes ou double-cortex est une malformation cérébrale causée par une interruption de la migration des neurones du néocortex pendant sa formation. La souris HeCo est un modèle murin de cette affection, caractérisée par un amas de neurones corticaux dans la substance blanche sous-corticale. Les signes cliniques de cette maladie sont le plus souvent une épilepsie réfractaire, un retard développemental et mental. Chez l'homme, l'hétérotopie se trouve en partie en profondeur du cortex somatotopique moteur et sensitif et semble participer à leurs fonctions. L'IRM fonctionnelle a montré lors d'une tâche motrice (taper des doigts), l'activation en plus du cortex moteur controlatéral du cortex hétérotopique sous-jacent.

La pathogenèse des malformations corticales est toujours mal comprise, c'est pourquoi il est important d'avoir plusieurs modèles animaux. Jusqu'il a peu, il n'existait que le rat TISH, découvert en 1997, dont la génétique n'est pas connue à ce jour.

La souris HeCo est un nouveau modèle animal de malformation corticale dont le gène muté impliquant une protéine associée aux microtubules a été découvert récemment. Elle partage avec les cas humains un seuil épileptique abaissé et un certain retard développemental.

Objectif : Déterminer si le cortex hétérotopique de la souris HeCo est activé lors d'une tâche sensitive (exploration de l'environnement à l'aide des vibrisses du museau).

Méthode : Chez la souris, les vibrisses sont des organes sensitifs essentiels dans l'exploration de l'environnement. Pour déterminer si le cortex hétérotopique est actif lors d'une tâche sensitive, on utilisera donc un exercice de découverte d'une cage enrichie en stimulus. Afin de visualiser les régions du cerveau actives, on utilisera plusieurs méthodes : l'autoradiographie ([¹⁴C]2-deoxyglucose, 2-DG) et l'immunohistochimie c-Fos. Le 2-DG est un analogue du glucose qui se fixe dans les régions cérébrales métaboliquement actives, ici impliquées dans la sensibilité. Il est injecté dans le péritoine de la souris à jeun avant l'exploration. Le contrôle négatif se fera en coupant les vibrisses d'un côté avant la tâche sensitive. A la fin de la tâche, on prélève des coupes du cerveau pour mesurer l'autoradioactivité. L'immunohistochimie c-Fos est réalisée sur les cerveaux de souris ayant effectué la même tâche sensitive et détecte une protéine d'activation neuronale. Afin de détecter une activation de l'hétérotopie à plus long terme, on utilisera la cytochrome oxydase, une enzyme qui met en évidence les régions contenant beaucoup de mitochondries, donc métaboliquement très actives.

Résultats : La cytochrome oxydase a marqué de façon égale le cortex homotopique de la souris HeCo et le cortex des souris contrôle. Par ailleurs, chez le mutant, elle a montré un faible marquage dans la partie médiale de l'hétérotopie et des zones de marquage plus intenses dans sa partie latérale.

L'autoradiographie 2-DG a montré un pattern classique d'activation du cortex homotopique du côté stimulé, avec une intensité plus marquée dans la couche IV. Du même côté, l'hétérotopie latérale montre une intensité similaire à celui de la couche IV. Du côté non stimulé, on note une intensité faible, tant dans le cortex homotopique que dans le cortex hétérotopique.

L'immunohistochimie c-Fos a montré une nette différence entre l'hémisphère stimulé et l'hémisphère non stimulé dans la couche IV comme dans l'hétérotopie. Il existe, tant du côté stimulé que du côté non stimulé, un gradient dans l'hétérotopie, le marquage latéral étant du même ordre que dans la couche IV alors qu'il est moins intense médialement.

Conclusion : l'hétérotopie corticale latérale, située en particulier sous le cortex somatosensoriel, semble traiter l'information périphérique controlatérale dans le même ordre que le cortex homotopique.

Mots-clés : subcortical band heterotopia; HeCo mouse ; somatosensory ; immunohistochemistry ; 2-Deoxyglucose

Table des matières

1.	INTRODUCTION	4
1.1	L'appareil sensitif de la souris	4
1.2	L'hétérotopie sous-corticale en bandes chez l'humain.....	6
1.3	Modèles animaux	7
1.4	Le rat TISH.....	7
1.5	La Souris HeCo [heterotopic cortex]	8
1.6	Objectifs de ce travail	9
1.7	Techniques utilisées :	10
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODE	13
2.1	Activation chronique: Cytochrome oxydase	13
2.2	Activation aiguë: Autoradiographie [14C]2-DG.....	14
2.3	Activation aiguë : Immunohistochimie c-Fos	15
3.	RÉSULTATS.....	16
3.1	Activation chronique: Cytochrome oxydase	16
3.2	Activation aiguë: [14C]2-DG	18
3.3	Activation aiguë: c-Fos	19
4.	DISCUSSION	21
4.1	L'hétérotopie sous-corticale en bandes.....	21
4.2	La Souris HeCo [heterotopic cortex]	21
4.3	Rappel des objectifs	22
4.4	Discussion des résultats	22
5.	CONCLUSION	24
6.	REMERCIEMENTS.....	25
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	26

1. INTRODUCTION

1.1 L'appareil sensitif de la souris

Les vibrisses

Contrairement à l'homme, qui utilise principalement le sens de la vue pour s'orienter dans l'espace, la souris se sert pour explorer son environnement principalement de l'odorat et du toucher, ceci grâce à ses vibrisses ou moustaches qui sont chez les rongeurs l'organe sensitif principal (1). A la base de chaque vibrisse se trouve un follicule et dans chaque follicule des mécanorécepteurs et des muscles folliculaires qui, respectivement, sentent le mouvement et font bouger la vibrisse. Les rongeurs utilisent leurs vibrisses pour repérer la position des sols, des murs et des objets, surtout dans le noir. Ils peuvent également collecter des informations sur la taille, la forme et la texture d'un objet en le palpant avec leurs vibrisses grâce à des mouvements de la tête et du museau (2).

Les macrovibrisses situées sur le côté du museau sont arrangées selon une grille constituée de cinq rangées nommées A à E et quatre colonnes nommées arcs et numérotés de 1 à 4. On peut donc désigner chaque vibrisse par ses coordonnées (par exemple A5) (Fig. 1A). Plus antérieurement se trouvent les microvibrisses qui sont plus petites et moins innervées (1).

Cortex somato-sensoriel primaire chez la souris

Comme chez l'humain, le cortex somatosensoriel (SI) de la souris est situé dans la partie la plus antérieure du cortex pariétal. Dans la couche IV, qui est la couche du cortex la plus dense en cellules, la représentation corporelle est organisée de façon similaire à celle de l'homme, sous forme de « sourculus » avec la représentation des parties les plus caudales du corps le plus médialement dans l'hémisphère (3)(Fig. 2). Au niveau le plus latéral de SI se trouve ce qu'on appelle le champ de tonneaux, qui contient des cellules granulaires groupées en structures ovales tridimensionnelles ressemblant à des tonneaux (4) (5) (Fig. 1C). Un tonneau peut être décrit comme un groupe de neurones sensitifs organisés de façon circulaire autour d'un noyau composé de dendrites, d'axones et des cellules gliales. Chaque tonneau reçoit les afférences sensorielles d'une vibrisse et l'arrangement des tonneaux réplique l'arrangement des vibrisses sur le museau (5) (Fig. 1B). Le champ de tonneaux occupe environ un tiers de SI, car les vibrisses sont un organe sensitif très important chez la souris et car la dimension de la représentation d'une partie du corps dans SI dépend de la densité de ses récepteurs sensitifs (6).

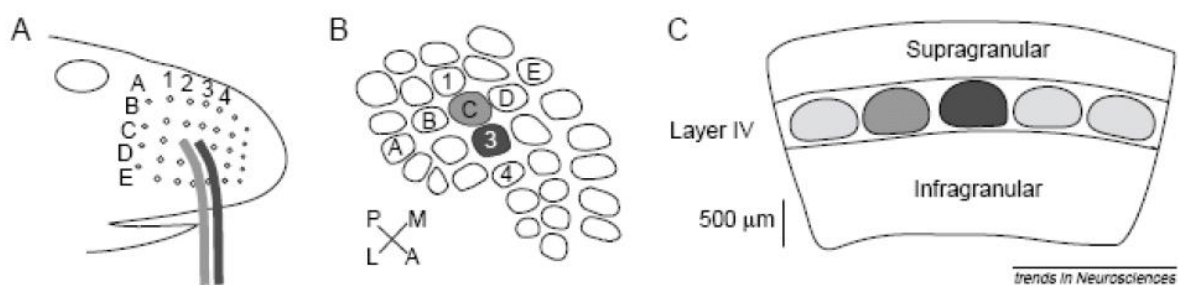


Figure 1. Source : http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Licence/physio/LV346/TD2.pdf

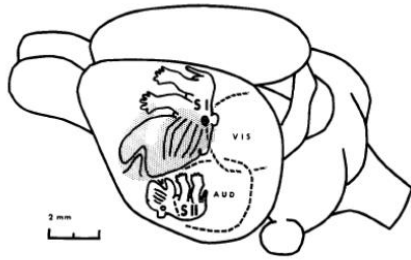


Figure 2

Source: http://www.edu.upmc.fr/sdv/docs_sdvbmc/Licence/physio/LV346/TD2.pdf

Voies afférentes des vibrisses au cortex somatosensitif primaire (S1)

L'influx nerveux en provenance des vibrisses débute dans les follicules de la base des vibrisses (1) qui captent leurs mouvements et les transmettent sous forme d'impulsions électriques via les fibres du nerf trijumeau (plus précisément par le nerf infra-orbitaire qui est une branche trigéminal). Le corps cellulaire de ces neurones se trouve dans le ganglion de Gasser ou ganglion Trijumeau et leur axone amène l'information vers les noyaux trigéminaux du tronc cérébral. Ensuite l'information transite par les voies lemniscales vers le noyau ventral postérieur médial du thalamus. Dans ces deux relais, l'information provenant de chaque vibrisse est représentée séparément et la somatotopie est conservée. Le deuxième relais neuronal dans le thalamus envoie des projections thalamo-corticales principalement vers la couche IV du cortex S1, là où se trouvent les tonneaux. Chez la souris, il semble qu'on puisse trouver également des terminaisons neuronales dans la couche II, V et VI (3).

Il est intéressant de noter que l'information de chaque vibrisse est transmise individuellement jusqu'au cortex, c'est-à-dire qu'à une vibrisse correspond toujours un groupe de cellules bien défini, dans les noyaux trigéminaux et thalamiques comme dans le cortex S1 (3) (Fig. 3A), ce qui n'est pas le cas pour d'autres parties du corps. Par exemple, les doigts et la paume de la patte avant sont représentés de façon plus globale au niveau du cortex, dans une zone correspondant au membre supérieur (5,6). Il existe également des voies extra-lemnisciales et para-lemnisciales qui convoient l'information des vibrisses vers d'autres régions du cortex (3).

Une fois que l'information a été transmise à la couche IV de S1, elle est renvoyée vers les couches II et III, qui la renvoient à leur tour vers les couches V et VI. Cet ensemble de connexions entre les couches d'une même zone de S1 définit une unité fonctionnelle nommée colonne corticale (7).

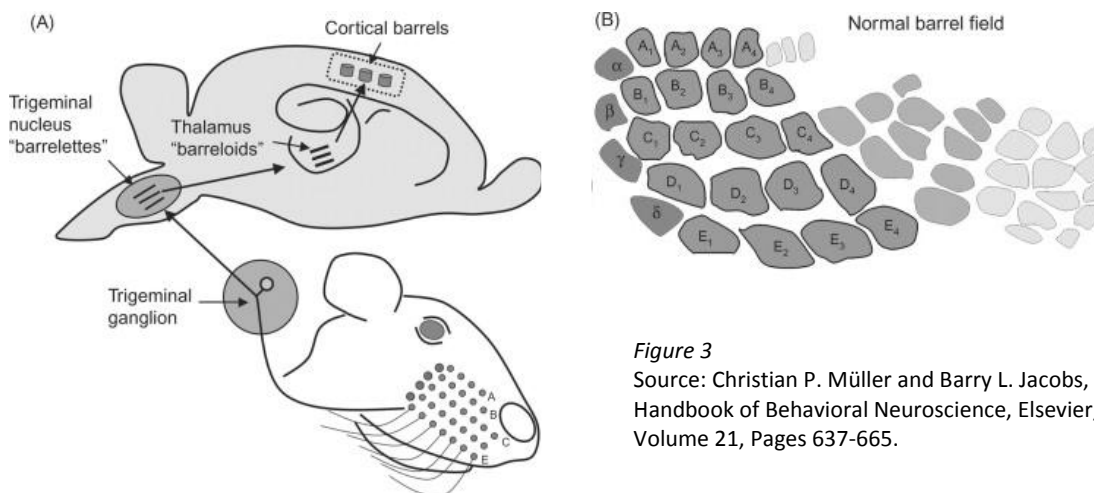


Figure 3

Source: Christian P. Müller and Barry L. Jacobs, Editor(s), Handbook of Behavioral Neuroscience, Elsevier, 2010, Volume 21, Pages 637-665.

1.2 L'hétérotopie sous-corticale en bandes chez l'humain

L'hétérotopie sous-corticale en bandes ou double-cortex est une forme sévère d'hétérotopie corticale dans laquelle se constitue une deuxième couche de neurones, séparée du cortex normal par une partie de la substance blanche sous-corticale et des structures sous-jacentes par une couche plus épaisse de substance blanche (8).

Pathogenèse

Chez les mammifères, un développement correct du cortex dépend d'un très grand nombre d'évènements, dont la formation de neurones et leur prolifération, la migration sur de grandes distances afin de se placer dans une zone restreinte, de se différencier, de s'orienter et d'établir des connexions afférentes et efférentes (9). Tous ces évènements doivent survenir dans un laps de temps défini et sont coordonnés de façon très précise (9). Au vu de la complexité de cette séquence d'enchaînements, il est peu étonnant que l'incidence cumulée de tous les types de mutations corticales dans la population soit d'environ 1% (10).

L'hétérotopie sous-corticale en bandes fait partie du groupe des malformations cérébrales dues à un défaut de migration neuronale (11). Chez les patients épileptiques, la proportion des défauts de migration neuronale se monte à 14% et à 40% lors d'épilepsie réfractaire (10).

La migration neuronale est rendue possible par la modification de molécules du cytosquelette selon des signaux moléculaires extracellulaires (12) et se manifeste par la variation de la morphologie des neurones pyramidaux nouvellement formés dans la zone ventriculaire (13). De bipolaires, ils deviennent multipolaires lorsqu'ils commencent à migrer dans la zone subventriculaire. Par la suite, ils passent dans la zone intermédiaire et redeviennent bipolaires jusqu'à arriver dans leur position finale. De là provient l'hypothèse de LoTurco et Bai que les déficits de migration neuronale seraient caractérisés par l'impossibilité de passer du stade multipolaire au stade bipolaire (13).

Chez l'humain, les déficits de migration neuronale sont le plus souvent causés par des mutations génétiques (14), bien que des lésions infectieuses, ischémiques ou toxiques pendant la grossesse puissent également être en cause. Le degré de sévérité est très variable et peut aller de quelques neurones ectopiques à des réarrangements très importants de la structure du cortex (10). L'hétérotopie sous-corticale en bandes est le plus souvent causée par la mutation du gène *Dcx* codant pour la protéine doublecortine et plus rarement du gène *LIS1* (15,16). Ces gènes favorisent la formation de faisceaux de microtubules nécessaire à une migration neuronale complète (17). La mutation *Dcx* se transmet sur un mode dominant lié à l'X et environ 90% des individus atteints sont de sexe féminin et hétérozygotes. Chez les sujets de sexe masculin, on observe le plus souvent une lissencéphalie incompatible avec la vie (11).

Clinique

Les signes cliniques de l'hétérotopie sous-corticale en bandes sont variables, mais on observe le plus souvent un retard de développement, un retard mental, des caractéristiques dysmorphiques, des troubles du sommeil et des crises d'épilepsie réfractaires au traitement (18).

Le cortex ectopique est situé entre les ventricules latéraux et le cortex sus-jacent, dans un axe fronto-pariétal. Il se trouve donc en profondeur de la région corticale somatotopique motrice et sensitive.

De fait, les neurones ectopiques semblent participer aux fonctions somatosensorielles et motrices simples. Des examens en IRM fonctionnelle chez des sujets atteints ont montré que, lors d'une tâche motrice peu complexe (taper des doigts), il y a activation, en plus du cortex moteur controlatéral, du cortex ectopique sous-jacent (19).

1.3 Modèles animaux

Les mécanismes sous-jacents à la pathogenèse de l'hétérotopie sous-corticale en bandes sont toujours mal compris, c'est pourquoi il est important d'avoir plusieurs modèles animaux. Cependant, jusqu'il y a peu, il n'en existait qu'un : le rat TISH, chez qui le mode de formation du cortex hétérotopique n'est pas le même que dans l'hétérotopie sous-corticale en bandes (20).

Il existe d'autres types d'hétérotopies corticales chez l'humain et des modèles animaux différents de HeCo et TISH, parmi lesquels on peut citer la souris reeler et la souris Lis1 knockout (21).

1.4 Le rat TISH

Depuis 1997, il existe un modèle d'hétérotopie sous-corticale en bandes chez le rat. Il s'agit du rat TISH (Telencephalic Internal Structural Heterotopia) (20). La formation du cortex hétérotopique chez ce rat est due à la présence, dans les stades précoces de la corticogenèse (E15), de mitoses neuronales éloignées de la surface ventriculaire dans ce qui ressemble à une zone germinale supplémentaire (22). Cette neurogenèse ectopique donne lieu à un deuxième cortex placé sous le cortex normotopique.

Il existe de nombreuses similitudes entre le cerveau de TISH et l'hétérotopie sous corticale en bandes, comme par exemple une grande région de substance grise hétérotopique située bilatéralement sous le néocortex frontal et pariétal et séparée de ce dernier par une fine couche de substance blanche sous-corticale et des structures profondes par une deuxième couche de substance blanche plus épaisse. Les ventricules peuvent être élargis et l'épaisseur du cortex normotopique sus-jacent est diminuée avec une lamination conservée, alors qu'elle est perdue dans l'hétérotopie. Chez TISH les cellules de l'hétérotopie sont de morphologie semblable à celles du néocortex mais sont orientées de façon incorrecte. Les connexions afférentes et efférentes de l'hétérotopie sont semblables à celles de la couche IV du cortex sus-jacent (23,11).

Néanmoins, le mode d'acquisition héréditaire du phénotype TISH diffère de celui de la pathologie humaine. Chez TISH, même si la mutation n'a pas été clairement identifiée, la maladie semble être due à un déficit monogénique transmis sur un mode récessif, alors que dans le double-cortex il s'agit d'une mutation liée à l'X (11,20).

1.5 La Souris HeCo [heterotopic cortex]

Découverte en 2009, la souris HeCo est un nouveau modèle animal de malformation corticale. Le mode de transmission du phénotype HeCo est autosomique récessif, alors qu'il est dominant lié à l'X chez l'humain (24).

Caractéristiques structurelles

Chez HeCo comme chez TISH et dans le double-cortex (23,11), l'hétérotopie est située dans la substance blanche sous-jacente au cortex homotopique (HoCo) et séparée de ce dernier par une fine lame de substance blanche, alors qu'au dessous se trouve une couche plus épaisse. Contrairement à TISH, chez qui l'hétérotopie ne se trouve qu'au niveau des lobes frontaux et pariétaux, elle s'étend chez HeCo jusqu'au lobe occipital. Comme chez TISH et dans le double-cortex (23,11), il y a une certaine variation de la taille de l'hétérotopie entre les sujets et entre les hémisphères d'un même sujet, mais son apparence générale reste constante. Les autres structures cérébrales sont d'aspect normal, excepté les ventricules qui présentent un discret élargissement. Un petit pourcentage de ces souris présente une malformation plus sévère avec une atrophie corticale latérale et une importante ventriculomégalie secondaire. Chez les individus atteints de malformation modérée, il y a également un certain degré de réduction de l'épaisseur du cortex homotopique, en particulier des couches II et III, ainsi que de la densité cellulaire de ces dernières (24).

La détection de marqueurs des couches granulaires et supragranulaires (Cux-2) versus infragranulaires (Tbr-1) ont montré que l'hétérotopie est constituée de cellules du premier type. La taille des cellules de l'hétérotopie correspond également aux couches supragranulaires. Similairement à TISH, les connexions afférentes du cortex hétérotopique ont été mises en évidence par des traceurs et sont comparables à celles du cortex homotopique (24).

Formation du cortex hétérotopique

Le processus de formation de l'hétérotopie chez HeCo semble être un problème de distribution anormale des précurseurs neuronaux dans la zone intermédiaire. Ceci a été montré par l'analyse de la date de formation des neurones hétérotopiques et par l'augmentation de l'épaisseur de la zone intermédiaire qui contient elle-même une zone de forte densité cellulaire. Des études par immunohistochimie n'ont pas montré d'atteinte de la glie radiale ni du gène Dcx. Les neurones de l'hétérotopie sont générés à un âge embryonnaire tardif (E18) et, à la naissance, la taille de l'hétérotopie est similaire à l'âge adulte (24).

Clinique

La morphologie des souris HeCo diffère peu de celle des souris wild type, hormis dans les cas sévères caractérisés par une insuffisance staturo-pondérale et parfois une malformation crâniale avec brady- et hypokinésie. De façon générale, la croissance est normale mais on note un retard de développement montré par un délai dans la pousse des poils et l'ouverture de l'œil. Elles ont tendance à développer spontanément des crises d'épilepsie et ont un seuil diminué lors de l'induction de crises par la pilocarpine. Au niveau comportemental, les souris HeCo ont une activité générale diminuée et un développement plus tardif de la marche (24).

Ces caractéristiques coïncident bien avec celles observées lors de tests neuropsychologiques chez des enfants atteints de double-cortex dû à la mutation *Dcx*. On dénote chez ces enfants un handicap mental dans tous les domaines cognitifs (diminution de la vitesse de traitement de l'information et des capacités de langage, visuo-motrices et motrices fines) sauf dans la mémoire épisodique verbale et visuelle (18). En conclusion, la souris HeCo est un très bon modèle d'hétérotopie sous-corticale en bandes car elle présente des caractéristiques cliniques et morphologiques très semblables à cette maladie.

Intérêt de la souris HeCo

Si l'on compare les deux modèles actuels de double-cortex que sont TISH et HeCo, on constate de nombreuses caractéristiques morphologiques et physiologiques communes. Pourtant, les mécanismes de formation de l'hétérotopie pourraient être différents et il s'agit probablement de mutations génétiques différentes.

La morphologie du cerveau de HeCo présente de grandes ressemblances avec le cerveau humain atteint (élargissement des ventricules, localisation du cortex hétérotopique dans la substance blanche sous-corticale, présence de cellules GABA dans l'hétérotopie (25). Au niveau clinique, les souris sont atteintes d'épilepsie tout comme les patients souffrant d'hétérotopie sous-corticale en bandes (11) et, sur le plan comportemental, la souris HeCo présente des caractéristiques similaires au double-cortex : délai développemental, mauvaises performances dans les tâches d'apprentissage et effet positif de la répétition (24). Pour toutes ces raisons, la souris HeCo est un vrai modèle animal d'hétérotopie sous-corticale en bandes.

1.6 Objectifs de ce travail

Il a été démontré par IRM fonctionnelle chez des sujets atteints d'hétérotopie sous-corticale en bandes que, lors d'une tâche motrice ou sensitive, le cortex hétérotopique adjacent à MI ou SI s'activait également (19). Similairement, ce travail a pour but de déterminer si le cortex hétérotopique de la souris HeCo est actif lors d'une tâche sensitive (exploration de l'environnement à l'aide des vibrisses). Si tel est le cas, cela signifie que les connexions des neurones de l'hétérotopie sont préservées, au moins en partie, malgré leur malposition et, dans un cadre plus large, que pendant le développement l'axone afférent trouve le neurone-cible non pas par sa position mais par son identité (à l'aide d'indices chimiotactiques par exemple).

Dans un deuxième temps se pose la question de savoir si l'organisation somatotopique des vibrisses dans le champ de tonneaux est également présente dans l'hétérotopie. Dans le cadre de ce travail, il sera peut-être possible d'observer dans l'hétérotopie un regroupement des neurones ressemblant à celui que l'on trouve dans SI. Chez TISH, on a observé dans l'hétérotopie latérale des patches de cellules ressemblant à des neurones et ayant une activité métabolique semblable aux neurones de la couche IV (26).

1.7 Techniques utilisées :

Cytochrome oxydase et Nissl : activation chronique

La cytochrome oxydase est une enzyme présente dans la membrane des mitochondries. Il s'agit de la dernière enzyme de la chaîne de transport d'électrons qui, via le cycle de Krebs, permet de produire de l'énergie sous forme d'ATP à partir d'hydrates de carbones, d'acides aminés ou d'acides gras (27).

Lorsqu'une cellule est très active métaboliquement, elle s'adapte en augmentant son nombre de mitochondries et donc sa quantité totale de cytochrome oxydase. Ce processus n'est pas instantané car il faut un certain temps pour fabriquer de nouvelles mitochondries. C'est pourquoi la cytochrome oxydase est un marqueur de l'activation chronique.

Dans le cortex somatosensoriel primaire, les afférences sensibles aboutissent en grande partie à la couche IV qui redistribue ensuite l'information dans les autres couches. En conséquence, cette couche contient de nombreuses et grandes synapses possédant beaucoup de mitochondries et capte le marquage en plus grande partie (28).

La coloration de la cytochrome oxydase devrait permettre de répondre aux deux questions posées dans le cadre de ce travail :

1. L'hétérotopie participe-t-elle au traitement de l'information sensitive ? Si oui, elle aura une activité métabolique semblable à celle des tonneaux de la couche IV et sera innervée par le même type d'axones et de synapses, ce qui devrait être visualisé grâce à la coloration de la cytochrome oxydase. Chez TISH, des patchs de forte intensité en cytochrome oxydase ont été vus dans l'hétérotopie latérale (26). Si notre hypothèse se confirme, il devrait être possible d'observer soit le même genre de patchs, soit une augmentation diffuse de l'intensité de l'hétérotopie.
2. La somatotopie est-elle conservée, au moins en partie, dans l'hétérotopie? Si oui, il sera possible de voir des zones à plus grande densité de neurones constituant des « pseudo-tonneaux ».

La coloration de Nissl constitue une référence de l'architecture cortex. Elle met en évidence les corps cellulaires et permet donc de repérer les différentes couches et structures, alors que la cytochrome oxydase ne permet de voir que les niveaux d'activité métabolique.

[14C]2-Déoxyglucose, 2-NBDG et c-Fos : activation aiguë

Chez la souris, les vibrisses sont des organes sensitifs essentiels dans l'exploration de l'environnement (1). Pour déterminer si le cortex hétérotopique est actif lors d'une tâche sensitive, on utilisera donc une cage enrichie, c'est-à-dire contenant des objets de formes et de textures différentes stimulant la souris à explorer cet environnement à l'aide de ses vibrisses.

Afin de visualiser les régions du cerveau actives à ce moment précis, on mettra en évidence le métabolisme neuronal par plusieurs méthodes différentes. Contrairement à la cytochrome oxydase, le [14C]2-déoxyglucose et le c-Fos sont des marqueurs d'activation aiguë, car ils sont visibles à court terme lors d'une activation neuronale.

- [14C]2-déoxyglucose (2-DG)

Le 2-déoxyglucose est une molécule de glucose dont les deux groupements hydroxyl ont été remplacés par deux atomes d'hydrogène. Tout comme le glucose normal, il est capté par la cellule via les transporteurs de glucose membranaires et commence la glycolyse en étant phosphorylé par l'hexokinase en 2-DG-P. Cette molécule ne peut pas être métabolisée par la phosphoglucose isomérase et s'accumule dans la cellule. Le taux de déoxyglucose accumulé dans une cellule correspond à son activité métabolique (29).

Lors d'une tâche d'exploration spatiale, le 2-DG marque ainsi les parties du cerveau impliquées dans la sensibilité.

Ici, nous utilisons du [14C]2-DG, c'est-à-dire du 2-DG couplé à une molécule de carbone 14 radioactif. Le [14C]2-DG est injecté dans le péritoine de la souris à jeun avant l'exploration et, à la fin de la tâche, on prélève des coupes du cerveau pour en mesurer le marquage grâce à la technique de l'autoradiographie. Cette technique consiste à apposer l'échantillon contre un film radiographique qui va être marqué par les rayons émis par le tissu. L'autoradiographie se distingue de la radiographie standard par le fait que la source de rayons n'est pas extrinsèque mais se trouve dans l'échantillon lui-même.

Cette technique se rapproche de l'IRM fonctionnelle utilisée chez l'humain et qui met en évidence l'augmentation du métabolisme neuronal par l'augmentation du flux sanguin, alors que le [14C]2-DG montre l'augmentation de la captation du glucose. Ces deux mécanismes sont étroitement liés car les neurones consomment principalement du glucose, donc l'augmentation de l'afflux sanguin aux régions de forte activité a pour but de leur apporter plus de glucose.

- Immunohistochimie (c-Fos) :

C-Fos est une protéine encodée par le gène FOS. Il s'agit du facteur de transcription le plus fréquemment synthétisé suite à un signal activateur. C-Fos est un homologue cellulaire de v-Fos qui est d'origine virale, d'où le préfixe c. La dimérisation des deux facteurs de transcription fos et jun forme le complexe transcriptionnel AP-1 qui se lie à la séquence d'ADNTGACTC.

L'activité de c-Fos est très faible dans la plupart des tissus adultes non stimulés, mais elle augmente considérablement en présence de nombreux stimuli comme le stress et les facteurs de croissance. Induisant entre autre la prolifération cellulaire, c'est également un proto-oncogène.

La protéine c-Fos est très utilisée pour détecter l'activité neuronale en immunohistochimie car elle est exprimée lors de la génération de potentiels d'action et est donc un marqueur indirect de l'activation d'un neurone (30).

L'immunohistochimie consiste à utiliser des anticorps (immuno-) pour localiser spécifiquement des protéines dans une coupe de tissu (-histochimie). Pour rendre visible cette liaison anticorps-antigène, on utilise soit une enzyme (par exemple la peroxydase dont le substrat Diaminobenzidine (DAB) passe de transparent à brun quand elle l'oxyde), soit un fluorophore (par exemple la Green Fluorescent Protein). Dans ce travail, nous avons utilisé la peroxydase.

Le contrôle négatif se fera en coupant les vibrisses du côté gauche du museau avant la tâche sensitive, ce qui diminuera de manière très importante les influx nerveux à destination du cortex sensitif droit et devrait donner à droite l'image d'un champ de tonneaux et d'une hétérotopie non stimulés.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Toutes les manipulations sur des animaux ont été préalablement approuvées par l'Office Vétérinaire Cantonal (Lausanne, Suisse) conformément aux lois fédérales suisses.

2.1 Activation chronique: Cytochrome oxydase

Préparation du tissu

Quatre mâles NOR wild type âgés de 3 mois et quatre mâles HeCo, dont deux âgés de 4 mois et deux de 3 mois, ont été profondément anesthésiés grâce à une injection intrapéritonéale de 250µl de pentobarbital puis sacrifiés par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PAF) 4% dans du PB (Phosphate Buffer 0.06 M, pH 7.35), 300ml en 20 minutes par le ventricule gauche en ouvrant l'oreillette droite simultanément afin de laisser le sang et la PAF s'écouler. Après prélèvement des cerveaux, ces derniers ont été postfixés pendant 20 heures dans le même fixateur puis, après 3 lavages dans du PBS (Phosphate-Buffered Saline 0.01 M PB, 0.09% NaCl), cryoprotégés pendant la nuit dans du sucrose 30% (70% PB 0.06 M, pH 7.35) jusqu'à ce qu'ils coulent dans le liquide. Des sections coronales de 40µm d'épaisseur ont été coupées avec un cryotome et déposées dans du PBS. Les coupes ont ensuite été montées sur des lames enrobées de chrome-alun 4% (SuperFrost, Menzel, Braunschweig, Germany) et colorées alternativement en Nissl, en cytochrome oxydase (Cytochrome C Sigma c2506, DAB Sigma 32741 FLUKA), ou en contrôle négatif, c'est-à-dire en coloration cytochrome oxydase sans le réactif cytochrome c.

Quantification

Les images des coupes ont été prises en plusieurs parties avec un microscope couplé à une caméra et au logiciel Axiovision, au grossissement 20x, puis réassemblées grâce au logiciel Autostitch.

L'analyse des images a été effectuée avec le logiciel ImageJ. L'image en couleur a tout d'abord été convertie en niveaux de gris (8 bits) et la substance blanche se trouvant en-dessous de l'hétérotopie a été utilisée comme valeur de référence pour la balance des blancs. Puis de petites zones ont été délimitées à la main en évitant les vaisseaux dans les couches I-II-III, IV, V et VI, l'hétérotopie médiale et les zones plus foncées de l'hétérotopie latérale. La valeur moyenne des niveaux de gris dans chaque zone a été mesurée.

Statistiques

Une ANOVA à facteur multiple (souches x couches) a été utilisée pour comparer les intensités mesurées dans les différentes couches du cortex homotopique des souris HeCo et du cortex des souris contrôles. Une analyse post-hoc univariée basée sur l'estimation des moyennes marginales a été utilisée pour comparer chaque couche entre les couches.

Une ANOVA a ensuite été utilisée pour comparer les couches du cortex homotopique des souris HeCo avec les parties médiale et latérale de l'hétérotopie. Une analyse post-hoc utilisant plusieurs méthodes (Tukey, LSD, Bonforreni) a été utilisée pour comparer toutes les couches et les parties médiale et latérale de l'hétérotopie.

2.2 Activation aiguë: Autoradiographie [¹⁴C]2-DG

Préparation du tissu

Trois souris femelles HeCo âgées de 2 mois et pesant environ 30 grammes ont été mises à jeun 24 heures avant stimulation. Le jour de la stimulation, les animaux ont été brièvement anesthésiés par isoflurane et toutes les moustaches du côté gauche clippées près de la peau. Après avoir laissé l'animal récupérer de l'anesthésie pendant environ une demi-heure, une injection de 0.165 μ Ci par gramme de poids corporel de [¹⁴C]2-DG (0.1 μ Ci/ml, 45-60 mCi/mmol, Hartmann-Analytic MC355S) 13.5% dans du Ringer-Lactate a été réalisée en intrapéritonéal et la souris placée 45 minutes dans l'environnement enrichi.

Les animaux ont ensuite été anesthésiés avec 200 à 250 μ l de pentobarbital intrapéritonéal et sacrifiés par décapitation. Après que leurs cerveaux aient été rapidement prélevés, congelés dans de la glace sèche et conservés à -80°C pendant une nuit, des coupes coronales de 20 μ m ont été réalisées grâce à un cryostat à -10°C avec une température de la chambre de -14°C (Cryostat CM3050 S, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) et montées sur des lames de verre (SuperFrost Ultra Plus, Menzel, Braunschweig, Germany) conservées à -80°C. Un film radiographique a été exposé aux lames et à une échelle de carbone 14 (American Radiolabeled Chemicals, Inc. ARC0146N) pendant 3 à 7 jours et développé. Les lames ont ensuite été colorées en Nissl.

Quantification

Les images ont été numérisées grâce à un scanner (Epson Perfection V750-M Pro flatbed scanner) réglé en mode professionnel avec résolution maximale. Puis, grâce au logiciel Photoshop, les images du Nissl et de l'autoradiographie ont été superposées, la zone d'intérêt coupée et tournée et les couches du cortex délimitées. Ensuite, grâce au logiciel ImageJ les images ont été converties en 8 bits, puis deux colonnes corticales ont été définies au-dessus des hétérotopies latérales gauche et droite et la valeur moyenne des niveaux de gris des hétérotopies et de chaque couche du cortex a été mesurée. Malheureusement, l'échelle de carbone 14 utilisée n'était pas adaptée aux quantités de 2-DG présentes dans le tissu et était rapidement saturée. Nous avons donc opté pour une mesure basée sur les valeurs absolues de ton de gris.

Statistiques

Une ANOVA à facteur multiple (côtés x couches) a été utilisée pour comparer les intensités mesurées dans l'hétérotopie latérale et dans les différentes couches du cortex homotopique des deux côtés (stimulé et non stimulé). Une analyse post-hoc univariée basée sur l'estimation des moyennes marginales a été utilisée pour comparer chaque couche entre les côtés.

2.3 Activation aiguë : Immunohistochimie c-Fos

Quatre femelles HeCo âgées de trois mois ont été brièvement anesthésiées par isoflurane et toutes les moustaches du côté gauche clippées près de la peau. Après avoir les laissés récupérer de l'anesthésie pendant deux heures et demie, les souris ont été placées pendant 2h30 dans l'environnement enrichi, puis directement et profondément anesthésiées par injection intrapéritonéale de 200µl de pentobarbital et sacrifiées par perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PAF) 4% dans du PB (0.06 M, pH 7.35) 300ml en 20 minutes par le ventricule gauche, en ouvrant simultanément l'oreillette droite afin de laisser le sang et la PAF s'écouler. Après prélèvement des cerveaux, ces derniers ont été postfixés pendant une heure et demie dans le même fixateur puis, après 3 lavages dans du PBS (0.01 M PB, 0.09% NaCl), cryoprotégés pendant une nuit dans du sucre 30% (70% PB 0.06 M, pH 7.35) jusqu'à ce qu'ils coulent dans le liquide.

Des sections coronales de 40µm d'épaisseur ont été coupées avec un cryotome et déposées dans du PBS. Les coupes de cerveaux ont ensuite été montées sur des lames de chrome-alun (SuperFrost, Menzel, Braunschweig, Germany) et utilisées pour réaliser l'immunohistochimie c-Fos et un marquage DAPI.

Les lames ont été lavées dans du PBS (0.1M pH 7.4), quenchées dans du PBS avec 2% méthanol et 0.3% H₂O₂ pendant 15 minutes, lavées à nouveau dans du PBS, bloquées et perméabilisées dans du PBS avec NBS (Normal Goat Serum) 10%, BSA (Bovine Serum Albumine) 1% et triton X-100 0.3% pendant une heure à température ambiante, puis incubées pendant une nuit à 4°C dans l'anticorps primaire (rabbit anti-mouse c-Fos, Calbiochem PC38-100UL) dilué à 1:5000 avec 1% NGS et 1% BSA.

Après lavage dans PBS et triton X-100 0.3%, les coupes ont été incubées dans l'anticorps secondaire (goat anti-rabbit) à une dilution de 1:1000 pendant 1h30 à température ambiante puis lavées avec du PBS et visualisées avec du DAB (Sigma) et du DAPI. Finalement, les lames ont été montées avec une lamelle et du Mowiol.

Quantification

Les images des coupes ont été prises au grossissement x10 en six images centrées sur la couche IV, l'hétérotopie médiale et l'hétérotopie latérale des deux côtés, ceci avec un microscope couplé à une caméra et au logiciel Axiovision. Puis, grâce au logiciel ImageJ, une zone d'intérêt de 200x200 microns a été sélectionnée, le background et le marquage définis grâce à la fonction *threshold*, puis le nombre de points comptés avec la fonction *analyse particles*. Le nombre de cellules c-fos positive pour 100µm² a été comparé entre la gauche et la droite du cerveau dans la couche IV, l'hétérotopie latérale et l'hétérotopie médiale.

Statistiques

Une ANOVA à facteur multiple (côtés x couches) a été utilisée pour comparer les mesures de la couche IV du cortex homotopique, de l'hétérotopie médiale et de l'hétérotopie latérale des deux côtés (stimulé et non stimulé). Une analyse post-hoc univariée basée sur l'estimation des moyennes marginales a été utilisée pour comparer la couche IV et les parties médiale et latérale entre les deux côtés.

3. RÉSULTATS

3.1 Activation chronique: Cytochrome oxydase



Figure 4. Coupes coronales du cortex hémisphérique droit de deux souris adultes HeCo (en haut) et NOR wild type (en bas) en coloration cytochrome oxydase.

Sur les coupes en cytochrome oxydase (Fig.4), le champ de tonneaux est visible latéralement dans la couche IV sous forme de taches arrondies bien définies tant dans les souris contrôles que les souris HeCo. Latéralement dans l'hétérotopie, juste au dessous du champ de tonneaux, on distingue également des zones de coloration plus intense. Ces constatations sont faites dans tous les animaux utilisés pour cette expérience.

Les résultats de l'ANOVA à facteur multiples sont les suivants : il n'y avait pas de différences significatives entre les souches de souris ($p=0.357$) ni de différence de répartition entre les couches corticales dans les deux souches ($p=0.488$). Il existait une différence d'intensité entre les couches ($p<0.001$). L'analyse post-hoc univariée basée sur l'estimation des moyennes marginales n'a montré aucune différence significative entre souris HeCo et contrôles pour chaque couche corticale.

Le résultat de l'ANOVA comparant les couches du cortex homotopique avec les parties médiale et latérale de l'hétérotopie était significatif ($p<0.001$). Une analyse post-hoc univariée a montré des différences significatives ($p<0.001$) pour toutes les comparaisons à l'exception de la comparaison entre les couches V et VI et celle entre la partie latérale de l'hétérotopie et la couche II-III.

3.2 Activation aiguë: [14C]2-DG

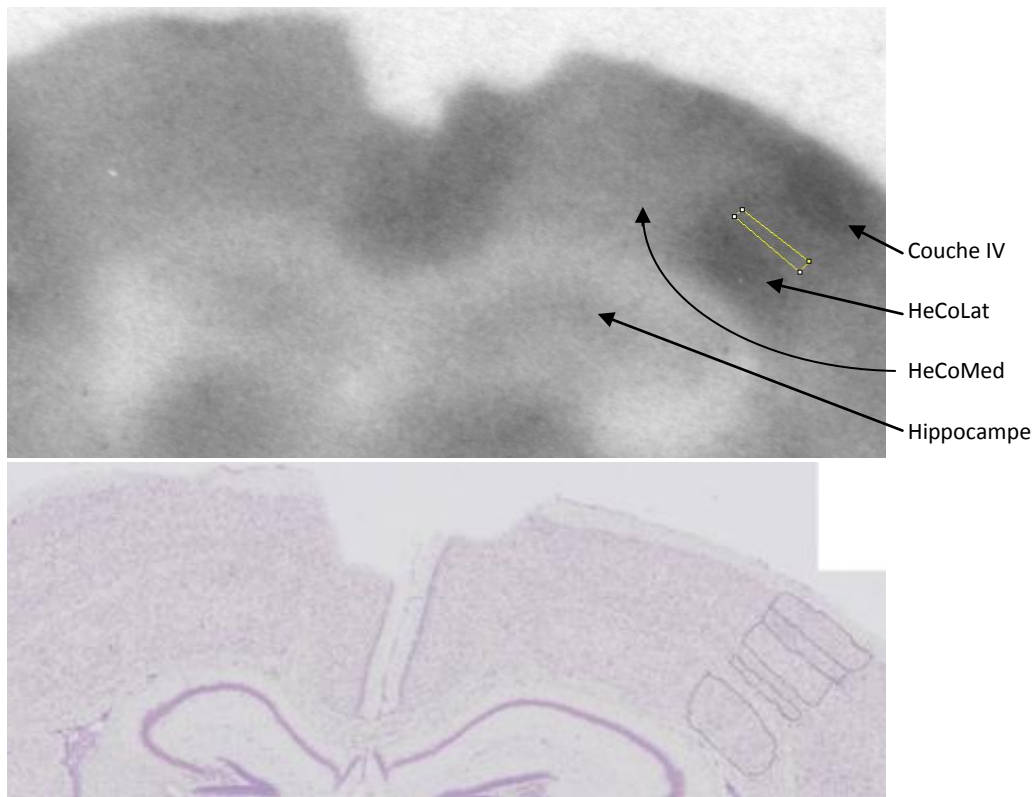


Figure 5. Autoradiographie en [14C]2-DG et Nissl d'un cerveau de souris HeCo.

Autoradiographie (Fig.5 en haut) : On observe une importante intensité de marquage dans la couche IV et l'hétérotopie latérale (HeCoLat) à droite de l'image qui correspond à la gauche de la souris, c'est-à-dire du côté stimulé (les vibrisses ont été coupées à gauche). On observe une absence de marquage dans toutes les couches et dans l'hétérotopie du côté opposé.

Coloration de Nissl (Fig.5 en bas) : L'hétérotopie latérale et les différentes couches du cortex au-dessus sont repérées afin de mesurer l'intensité du marquage au même endroit dans l'autoradiographie (ici, la couche VI est entourée).

L'ANOVA à facteurs multiples a montré un résultat significatif pour les côtés ($p < 0.001$). L'analyse post-hoc univariée a montré des différences significatives pour chaque couche et pour l'hétérotopie latérale entre les deux côtés (stimulé et non stimulé, $p < 0.001$ pour les couches II-III, IV, V et l'hétérotopie latérale, $p = 0.002$ pour la couche VI).

3.3 Activation aiguë: c-Fos

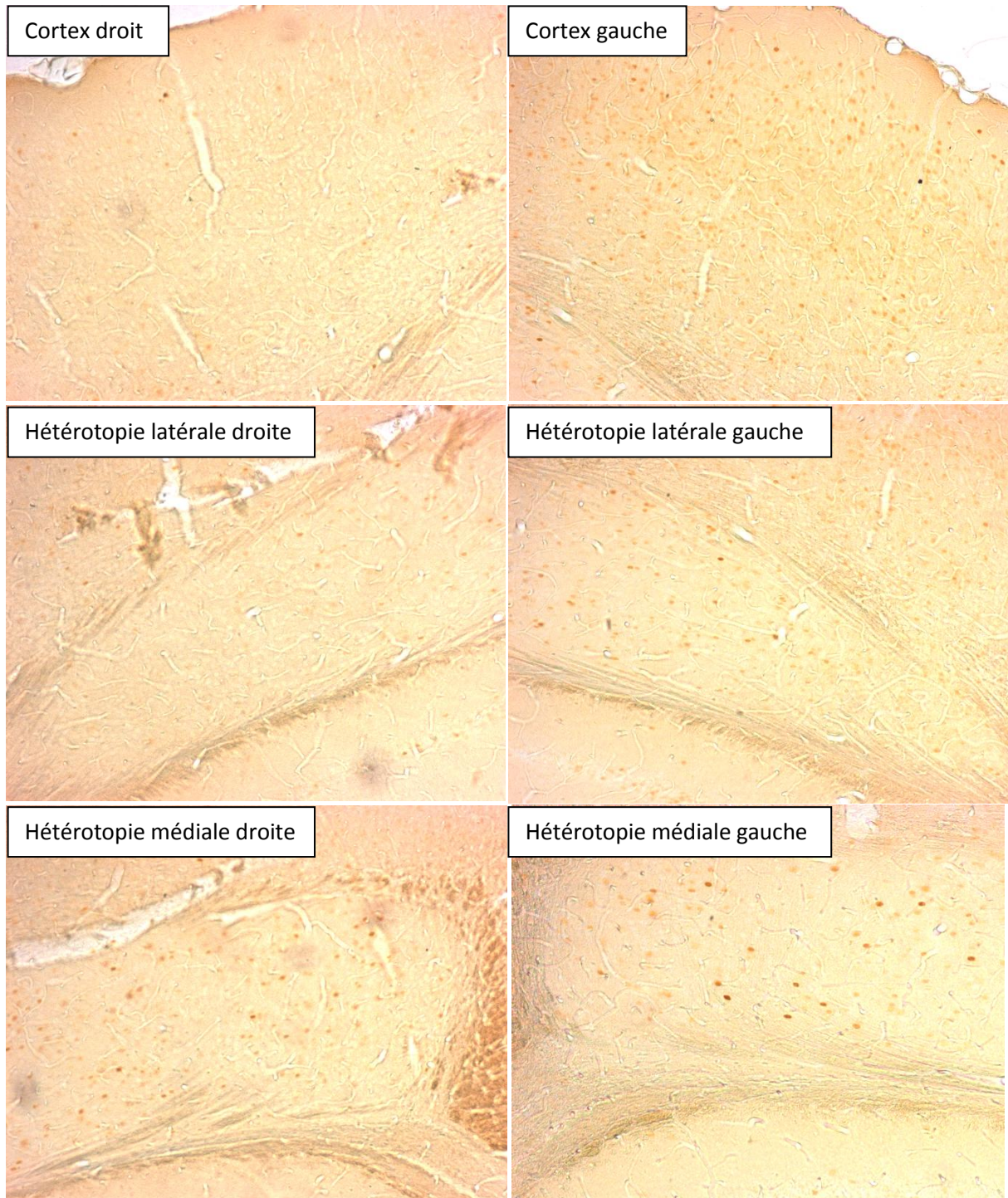


Figure 6. Coupes en immunohistochimie c-Fos du cortex sensitif primaire et de l'hétérotopie médiale et latérale d'une même souris HeCo. A gauche, l'hémisphère droit non stimulé car les vibrisses du côté gauche ont été clippées (contrôle négatif). A droite, les coupes de l'hémisphère gauche stimulé par les afférences sensibles des vibrisses intactes du côté droit.

Sur les coupes de l'immunohistochimie c-Fos (Fig.6), on voit une différence de marquage entre les deux côtés au niveau de la couche IV du cortex et de l'hétérotopie latérale, la différence semblant moins importante dans l'hétérotopie médiale.

L'ANOVA à facteurs multiples à montré un résultat significatif pour les côtés ($p < 0.001$). L'analyse post-hoc univariée a montré des différences significatives pour la couche IV et pour les parties médiale et latérale de l'hétérotopie entre les deux côtés (stimulé et non stimulé, $p < 0.001$ les trois analyses).

4. DISCUSSION

4.1 L'hétérotopie sous-corticale en bandes

L'hétérotopie sous-corticale en bandes est une malformation corticale sévère dans laquelle se forme un deuxième cortex à l'intérieur de la substance blanche sous-corticale (30). Elle fait partie du groupe des défauts de migration neuronale (11) et est le plus souvent causée par la mutation du gène *Dcx* codant pour la protéine doublecortine, plus rarement du gène *LIS1* (15,16). *Dcx* favorise la formation de faisceaux de microtubules nécessaire à la migration des neurones et se transmet sur un mode dominant lié à l'*X*. Environ 90 % des individus atteints sont de sexe féminin et hétérozygotes, les sujets de sexe masculin développant souvent une lissencéphalie incompatible avec la vie (11).

La clinique de l'hétérotopie sous-corticale en bandes est variable mais on observe le plus souvent un retard de développement, un retard mental, des caractéristiques dysmorphiques, des troubles du sommeil et une épilepsie réfractaire (18).

Le cortex ectopique se trouve en profondeur de la région corticale somatotopique motrice et sensitive et les neurones ectopiques semblent participer aux fonctions somatosensorielles et motrices simples (19).

La pathogenèse de l'hétérotopie sous-corticale en bandes est toujours mal comprise, c'est pourquoi il est important d'avoir plusieurs modèles animaux. Jusqu'il y a peu, il n'existait que le rat TISH (20) chez qui le mode de formation du cortex hétérotopique n'est pas le même que dans l'hétérotopie sous-corticale en bandes (22).

4.2 La Souris HeCo [heterotopic cortex]

Découverte en 2009, la souris HeCo est un nouveau modèle animal d'anomalie du développement cortical et elle présente des caractéristiques cliniques et morphologiques très semblables aux affections humaines.

Chez HeCo comme chez TISH et dans le double-cortex (23,11), l'hétérotopie est située dans la substance blanche sous-jacente au cortex homotopique (HoCo) et séparée de ce dernier par une fine lame de substance blanche, alors qu'au dessous se trouve une couche plus épaisse. Il a été démontré que les cellules de l'hétérotopie sont plutôt de type supragranulaire et similairement à TISH, les connexions afférentes du cortex hétérotopique sont comparables à celles du HoCo (24).

4.3 Rappel des objectifs

Le but de ce travail est de déterminer si le cortex hétérotopique de la souris HeCo est activé lors d'une tâche sensitive (exploration de l'environnement à l'aide des vibrisses), ceci car il a été démontré par IRM fonctionnelle chez des sujets atteints d'hétérotopie sous-corticale en bandes que, lors d'une tâche motrice ou sensitive, le cortex hétérotopique adjacent à MI ou SI s'activait également (19). On sait également que les connexions afférentes de l'hétérotopie sont plus ou moins conservées (24).

La question qui pourrait se poser dans un deuxième temps est de savoir si l'organisation somatotopique des vibrisses dans le champ de tonneaux est également présente dans l'hétérotopie. Chez TISH, on a observé dans l'hétérotopie latérale des groupes de cellules ressemblant à des neurones et ayant une activité métabolique semblable aux neurones de la couche IV (26).

4.4 Discussion des résultats

Cytochrome oxydase et Nissl : activation chronique

Dans tous les cerveaux de souris HeCo colorés en cytochrome oxydase, l'hétérotopie médiale est la couche la moins intense, alors que l'hétérotopie latérale est plus intense et est de même intensité que les couches II-III.

Les tests statistiques n'ont pas montré de différence significative entre le cortex homotopique des souris HeCo et le cortex des souris contrôles.

La coloration de la cytochrome oxydase devait permettre de répondre aux deux questions posées dans le cadre de ce travail :

1. L'hétérotopie participe-t-elle au traitement de l'information sensitive ?

L'hétérotopie latérale, située en dessous du champ de tonneaux, montre un marquage en cytochrome oxydase identique à la couche II-III du cortex homotopique, alors que la partie médiale de l'hétérotopie est moins marquée.

2. La somatotopie est-elle conservée dans l'hétérotopie ?

On observe clairement dans la partie latérale de l'hétérotopie des taches plus intenses qui se situent toujours juste au-dessous du champ de tonneaux.

Chez TISH, des patchs de forte intensité en cytochrome oxydase ont également été vus dans l'hétérotopie latérale (26). Dans cette étude, ces patchs étaient de même intensité que les tonneaux de la couche IV et les auteurs en ont déduit qu'il s'agissait de pseudo-tonneaux qui remplissaient le même rôle dans l'hétérotopie que les tonneaux de la couche IV. Etant donné la forte ressemblance de nos résultats avec ceux de cette étude, on peut supposer qu'il s'agit chez HeCo du même genre de pseudo-tonneaux. Cependant, leur intensité était moindre par rapport aux vrais tonneaux. Ceci

pourrait être dû au fait que ces structures sont un peu moins bien organisées et moins denses que les tonneaux de la couche IV et que chez TISH.

On ne peut bien sûr pas être certain à ce stade que les taches dans l'hétérotopie correspondent à une activation sensitive. Il pourrait s'agir de l'activation de neurones ayant une tout autre fonction. La localisation de ces taches en-dessous du champ de tonneaux est un argument en faveur d'une fonction sensitive mais les expériences d'activation aiguë doivent confirmer cette hypothèse.

[14C]2-Déoxyglucose et c-Fos : activation aiguë

Chez la souris, les vibrisses sont des organes sensitifs essentiels dans l'exploration de l'environnement (1). Donc, pour déterminer si le cortex hétérotopique est actif lors d'une tâche sensitive, nous avons utilisé un exercice d'exploration de l'environnement, ceci à l'aide d'une cage enrichie stimulant la souris à explorer à l'aide de ses vibrisses.

Afin de visualiser les régions du cerveau métaboliquement actives, nous avons utilisé deux méthodes : le 2-Déoxyglucose et le c-Fos qui, contrairement à la cytochrome oxydase, sont des marqueurs d'activation aiguë.

Le contrôle négatif a été réalisé en coupant les vibrisses du côté gauche du museau avant la tâche sensitive, ce qui diminue de manière importante les influx nerveux à destination du cortex sensitif droit et devrait donc donner l'image d'un champ de tonneaux et d'une hétérotopie non stimulés à droite.

[14C]2-déoxyglucose (2-DG) :

Les résultats montrent une différence significative d'intensité entre les deux côtés (stimulé et non stimulé) pour les toutes les couches du cortex homotopique mais aussi pour l'hétérotopie latérale. Ainsi, celle-ci est activée dans le même ordre que le cortex homotopique lors d'une expérience sensorielle.

Immunohistochimie (c-Fos) :

Des résultats similaires ont été observés avec une différence hautement significative entre les deux côtés (stimulé et non stimulé) pour la couche IV mais aussi pour l'hétérotopie latérale. Un résultat significatif a également été observé pour l'hétérotopie médiale, mais la différence était moins importante. Ceci peut être dû au fait que c-Fos étant un gène d'activation très sensible (30), sa transcription peut être déclenchée par d'autres stimuli soit pendant, soit avant ou après l'expérience sensorielle. Dans ce travail, ces stimuli pourraient être par exemple le clipping des vibrisses. Il faut préciser que nous avons vérifié que toutes les souris soient correctement anesthésiées, qu'elles ont été manipulées avec soin et que la tâche sensitive a eu lieu dans une pièce silencieuse et dans un carton fermé pour éviter la lumière d'y entrer. Cependant, toute interférence sensitive ne peut pas être totalement exclue.

5. CONCLUSION

Ce travail avait pour but d'aborder deux questions. Premièrement, le cortex hétérotopique de HeCo participe-t-il au traitement de l'information sensitive ? Deuxièmement, l'organisation somatotopique des vibrisses présente dans le champ de tonneaux est-elle conservée dans l'hétérotopie ?

Les résultats de ce travail tendent à répondre positivement à la première question grâce aux résultats congruents de trois techniques différentes. La partie latérale de l'hétérotopie se trouvant sous le champ de tonneaux semble participer au traitement de l'information sensorielle. Ceci est congruent avec les résultats obtenus en IRMf dans les cas humains d'hétérotopie sous-corticale en bandes. Les neurones hétérotopiques semblent participer également aux circuits de traitement de l'information sensitive malgré leur malposition dans la substance blanche sous-corticale.

Pour la deuxième question, bien que des patches de marquage en cytochrome oxydase (déjà décrit chez le rat TISH) ont été observés, des expériences de traçage des axones thalamo-corticaux ou cortico-corticaux et d'électrophysiologie sont nécessaires pour préciser si des formations de type tonneaux existent dans l'hétérotopie.

6. REMERCIEMENTS

Pour terminer ce mémoire, je souhaite adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à son élaboration.

Tout d'abord je tiens à remercier sincèrement le Docteur Alexandre Croquelois qui, en tant que tuteur, s'est toujours montré à l'écoute, pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Sans lui ce travail de Master n'aurait pas été réalisable.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Egbert Welker pour ses conseils avisés et pour la gentillesse et la patience dont il a su faire preuve malgré ses charges académiques et professionnelles.

Merci également aux membres du Groupe Welker et Croquelois : Michel Kielar, Inès Khadimallah, Aouatef Abaza, Leticia Pedrido et Sonia Naegele-Tollardo pour leur accueil chaleureux, leur aide, leurs conseils éclairés et l'intérêt qu'ils ont porté à mon projet malgré leur emploi du temps chargé. Une pensée particulière est adressée à Aglae Plazas et Christine Savary qui ont bien voulu m'apporter leur aide et leur énergie, sans qui je ne serais pas venue à bout de ce mémoire et dont j'ai apprécié la gentillesse et l'enthousiasme.

Enfin, je remercie mes proches et amis qui m'ont soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce projet de Master.

7. BIBLIOGRAPHIE

1. **Brecht M, Preilowski B, Merze MM.** Functional architecture of the mystacial vibrissae. *Behavioural Brain Research.* 1997;(84).
2. **Diamond ME, von Heimendahl M, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E.** 'Where' and 'what' in the whisker sensorimotor system. *Nature Reviews Neuroscience.* 2008 Août.
3. **Watson C, Paxinos G, Puelles L.** *The Mouse Nervous System*, 563-569: Elsevier Academic Press; 2011.
4. **Woolsey TA, Van der Loos H.** The structural organization of layer IV in the somatosensory region (S I) of mouse cerebral cortex : The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research.* 1970 Janvier; 17(2).
5. **Welker C, Woolsey T.** Structure of layer IV in the somatosensory neocortex of the rat: description and comparison with the mouse. *The Journal of Comparative Neurology.* 1974 Décembre; 158(4).
6. **K. Chapin J, Chia-Sheng L.** Mapping the body representation in the SI cortex of anesthetized and awake rats. *Journal of Comparative Neurology.* 1984 October; 229(2).
7. **Woolsey T, Van der loos H.** The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Research.* 1970 Janvier; 17(2).
8. **Barkovich A, Jackson DJ, Boyer R.** Band heterotopias: a newly recognized neuronal migration anomaly. *Radiology.* 1989 May; 171(2).
9. **Rakic P.** Specification of cerebral cortical areas. *Science.* 1988 July; 241(4862).
10. **Meencke H, Veith G.** Migration disturbances in epilepsy. *Epilepsy Research supplement.* 1992; 9(31).
11. **Hehr U, Uyanik G, Aigner L.** GeneReviews™ [Internet]. [Online].; 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1185/>.
12. **Gressens P.** Pathogenesis of migration disorders. *Current Opinion in Neurology.* 2006 April; 19(2).
13. **LoTurco J, Bai J.** The multipolar stage and disruptions in neuronal migration. *Trends in neurosciences.* 2006 July; 29(7).
14. **Clark G.** The classification of cortical dysplasias through molecular genetics. *Brain and Development.* 2004 September; 26(6).
15. **des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A.** A Novel CNS Gene Required for Neuronal Migration and Involved in X-Linked Subcortical Laminar Heterotopia and Lissencephaly Syndrome. *Cell.* 1998 January; 92.
16. **Leventer RJ, Delatycki MB.** Listen carefully: LIS1 and DCX MLPA in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *European Journal of Human Genetics.* 2009; 17.
17. **Liu JS.** Molecular Genetics of Neuronal Migration Disorders. *Current Neurology and Neuroscience Reports.* 2011 April; 11(2).
18. **Spencer-Smith M, Leventer R, Jacobs R R, Luca C, Anderson V.** Neuropsychological profile of children with subcortical band heterotopia. *Developmental Medicine & Child Neurology.* 2009 November; 51(11).
19. **Wennberg R, McAndrews MP, Mikuli D.** Functional Imaging of the Double Cortex. *The Canadian Journal of Neurological Sciences.* 2004 Mai; 31(2).
20. **Lee KS, Schottler F, Collins JL, Lanzino G, Couture D, Rao A.** A Genetic Animal Model of Human Neocortical Heterotopia. *The Journal of Neuroscience.* 1997 August; 17(16).
21. **Ross M.** Brain malformations, epilepsy, and infantile spasms. *International Review of Neurobiology.* 2002; 49.
22. **Lee KS, Collins JL, Anzivino MJ, Frankel EA, Schottler F.** Heterotopic Neurogenesis in a Rat with Cortical Heterotopia. *The Journal of Neuroscience.* 1998 November; 18(22).
23. **Schottler F, Couture D, Rao A, Kahn H, S. Lee K.** Subcortical Connections of Normotopic and Heterotopic Neurons in Sensory and Motor Cortices of the tish Mutant Rat. *Journal of Comparative Neurology.* 1998; 395.
24. **Croquelois A, Giuliani F, Savary C, Kielar M, Amiot C, Schenk F, et al.** Characterization of the HeCo Mutant Mouse: A New Model of Subcortical Band Heterotopia Associated with Seizures and Behavioral Deficits. *Cerebral Cortex.* 2009 March; 19.
25. **Hammers A, Koepf M, Richardson M, Labbe C, Brooks D, Cunningham V, et al.** Central benzodiazepine receptors in malformations of cortical development: a quantitative study. *Brain.* 2001; 124(8).
26. **Schottler F, Fabiato H, Leland JM, Chan LY.** Normotopic and heterotopic cortical representations of mystacial vibrissae in rats with subcortical band heterotopia. *Neuroscience.* 2001 November; 108(2).
27. **Karp G.** *Biologie cellulaire et moléculaire: Concepts and experiments.* 3rd ed.: De Boeck Supérieur; 2010.
28. **Wong-Riley M.** **Cytochrome oxidase:** an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences.* 1989 March; 12(3).
29. **Sokoloff L, Reivich M M, Kennedy C, Des Rosiers M, Patlak CS C, Pettigrew K, et al.** The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of Neurochemistry.* 1977 May; 28(5).
30. **Bullit E.** Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology.* 1990 June; 296(4).