

Travail de Maîtrise en médecine N° 3363

## **Corrélations électrocliniques des crises comitiales chez la souris HeCo**

*Etudiante*

Nadia Salhi<sup>1</sup>

*Tuteur*

Dr. Med. Alexandre Croquelois, MER<sup>1</sup>

*Co-tuteur*

Dr. Michel Kielar, PhD<sup>1</sup>

*Expert*

Dr. Med. Andrea O. Rossetti, MER<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Université de Lausanne, Faculté de Biologie et de Médecine, Suisse

<sup>2</sup>Département des Neurosciences Cliniques (DNC), Service de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Suisse

Lausanne, 15.12.2016

## Table des matières

1. Introduction .....	4
1.1 L'épilepsie .....	4
1.1.1 L'épilepsie chez le sujet jeune .....	4
1.1.2 L'épilepsie chez l'adulte .....	4
1.2 Epilepsie et malformations corticales.....	5
1.2.1 Hétérotopies corticales .....	5
a) Hétérotopies nodulaires .....	5
b) Hétérotopies sous-corticales .....	6
1.3 Physiopathologie.....	6
1.4 Traitement .....	7
1.5 Modèles animaux d'épilepsie et de malformations corticales .....	7
1.5.1 Modèles animaux d'épilepsie pharmaco-résistante.....	7
1.5.2 Modèles animaux de malformations corticales.....	7
a) Troubles de la prolifération .....	7
b) Troubles de la migration.....	8
1.5.3 Modèles animaux de malformations corticales associées à une épilepsie pharmaco-résistante.....	8
1.6 La souris HeCo : un modèle de malformation corticale ayant un phénotype épileptique .....	8
1.6.1 Phénotype .....	8
1.6.2 Physiopathologie.....	9
1.6.3 Génétique .....	9
1.7 Buts de l'étude .....	9
2. Matériel et méthode .....	10
2.1 Animaux .....	10
2.2 Chirurgie stéréotaxique pour l'implantation des électrodes intra-crâniennes .....	10
2.3 Enregistrement EEG-Vidéo.....	10
2.4 Analyse EEG et vidéo.....	10
2.5 Electrophysiologie.....	11
2.5.1 Expériences .....	11
2.6 Analyse des propriétés passives de la membrane et du déclenchement des potentiels d'action (PA).....	11
2.7 Analyse statistique .....	12
3. Résultats.....	12
3.1 Analyse EEG : nombre et durée d'évènements épileptiques .....	13

3.1.1	Activité électrique isolée.....	14
3.2	Types d'évènements épileptiques .....	15
3.2.1	Données générales.....	15
3.2.2	Crises focales.....	15
3.2.3	Crises généralisées.....	16
3.2.3.1	Crises subintrantes.....	17
3.2.4	Evènements interictaux (EI).....	18
3.3	Localisation et cinétique de propagation des crises.....	20
3.4	Données électro-physiologiques.....	21
3.4.1	Potentiel de repos.....	21
3.4.2	Seuil d'excitabilité .....	22
3.4.3	Fréquence des potentiels d'action.....	23
4.	Discussion.....	23
4.1	L'analyse des tracés EEG couplées à la vidéo démontre le statut épileptique des souris HeCo .....	23
4.2	Distinction entre crises généralisées et crises focales .....	24
4.2.1	Crises focales et généralisées .....	24
4.2.2	Evènements interictaux .....	24
4.3.	Quelles informations pouvons-nous obtenir sur la localisation des foyers épileptiques et sur la cinétique de propagation des crises ? .....	25
4.3.1	Point de départ cortical .....	25
4.3.2	Rôle des hétérotopies corticales.....	25
4.4	Corrélation entre les anomalies macroscopiques (EEG) et les résultats cellulaires en électrophysiologie.....	25
4.4.1	Résultats électrophysiologiques .....	25
a)	Corrélation clinique et électro-physiologique .....	25
b)	Anomalies du cortex HeCo homotopique.....	26
4.4.2	Etude au niveau moléculaire .....	26
5.	Conclusion.....	27
6.	Remerciements.....	27
7.	Références .....	27

# 1. INTRODUCTION

L'épilepsie chez l'humain représente un problème de santé publique majeur du fait de la prévalence élevée et de la résistance aux traitements pharmacologiques. En effet, il y a près de cinquante millions de personnes dans le monde souffrant d'épilepsie (1) et 30% des patients ne répondent pas aux antiépileptiques classiques, présentant ainsi une épilepsie dite « réfractaire » ou « pharmaco-résistante » (2).

## 1.1 L'épilepsie

En 2005, la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie (ILAE) et le Bureau International pour l'Epilepsie (IBE) (3) ont défini l'épilepsie comme étant un « trouble du cerveau caractérisé par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychosociales et sociales de cette condition. » La crise d'épilepsie, ou crise comitiale, quant à elle est définie comme étant une « occurrence transitoire de signes et/ou de symptômes dû à une activité neuronale excessive ou anormale dans le cerveau ».

On distingue également les crises épileptiques focales des crises généralisées. Une crise est dite focale lorsqu'elle survient dans un seul hémisphère cérébral. Le foyer épileptique peut être très localisé ou étendu. En revanche, une crise généralisée possède la caractéristique d'impliquer rapidement des structures bi-hémisphériques. Le cortex entier n'est pas nécessairement impliqué et les crises généralisées ne sont pas forcément symétriques (4).

Cette définition met en avant le fait que l'épilepsie ne représente pas une entité pathologique en soi mais qu'il s'agit d'une manifestation clinique de désordres cérébraux sous-jacents et d'origines variables.

D'autre part, bien que l'incidence maximale de l'épilepsie survienne durant la première année de vie du nouveau-né et chez les personnes âgées de 75ans ou plus (5), les causes de l'épilepsie ne sont pas les mêmes chez ces deux groupes d'individus.

### 1.1.1 L'épilepsie chez le sujet jeune

Les convulsions fébriles sont les crises convulsives les plus fréquentes chez les enfants puisqu'elles touchent 2% à 5% des enfants entre 6mois et 5ans (6). L'épilepsie chez les enfants et les adolescents est, en revanche, beaucoup plus rare puisqu'elle touche 50-100/100'000 individus (7). L'étiologie de l'épilepsie chez ces enfants peut être identifiée dans seulement 25% à 45% des cas (8), la majorité étant alors considérée comme idiopathique. Parmi les causes identifiées, les malformations du système nerveux central représentent la cause principale des épilepsies infantiles suivi des traumatismes péri-nataux (traumatisme, asphyxie) et des infections du système nerveux central (9). Les troubles métaboliques héréditaires et d'autres facteurs génétiques représentent aussi une part importante des étiologies (8). L'épilepsie fait aussi fréquemment partie des tableaux cliniques retrouvés dans les syndromes génétiques à l'image du syndrome de West qui est à l'origine de 2% des épilepsies infantiles (8).

### 1.1.2 L'épilepsie chez l'adulte

Contrairement aux enfants où l'épilepsie est un trouble fréquent, la prévalence est faible chez les adultes puis elle augmente à nouveau chez le sujet âgé (50-60 ans ; 10). De même, l'incidence suit un schéma équivalent. Aussi, les maladies cérébro-vasculaires représentent l'étiologie principale chez les adultes de plus de 35 ans avec

toutefois une nette prédominance dès l'âge de 65 ans puisqu'elle représente près de deux-tiers des causes d'épilepsie. Finalement, les traumatismes crânio-cérébraux, les néoplasies cérébrales et les maladies neuro-dégénératives représentent les autres principales causes d'épilepsie chez l'adulte (11, 12).

## 1.2 Epilepsie et malformations corticales

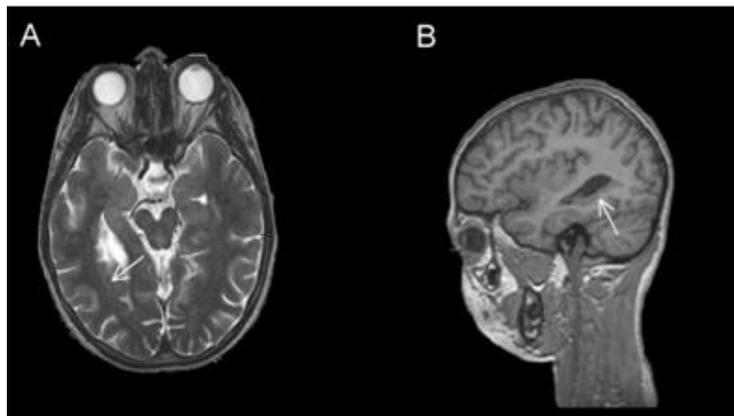
Les malformations corticales représentent une cause importante d'épilepsie chez les enfants et le tableau clinique y associe souvent un déficit moteur et intellectuel. La sévérité de l'expression clinique varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment de l'étendue et du type de l'atteinte. Au vu du nombre important de types de malformations corticales, l'étude de Barkovic (Brain, 2014) propose une classification basée sur la physiopathologie de ces atteintes et distingue trois grands groupes : « I) Les malformations secondaires à une prolifération ou une apoptose neuronale ou gliale anormale. II) Les malformations dues à une migration neuronale anormale. III) Les malformations secondaires à un développement anormal après migration » (13).

### 1.2.1 Hétérotopies corticales

Les hétérotopies corticales, appartenant au groupe II, se définissent comme des amas de neurones ayant une localisation anormale entre la paroi ventriculaire et le cortex cérébral. Elles sont la manifestation d'un trouble de la migration neuronale durant lequel les progéniteurs neuronaux, guidés par les cellules gliales radiaires, quittent la zone ventriculaire pour rejoindre le plateau cortical. Cette étape de la neurogenèse fait appel à de nombreux gènes, notamment ceux impliqués dans la production des protéines du cytosquelette.

#### a) Hétérotopies nodulaires

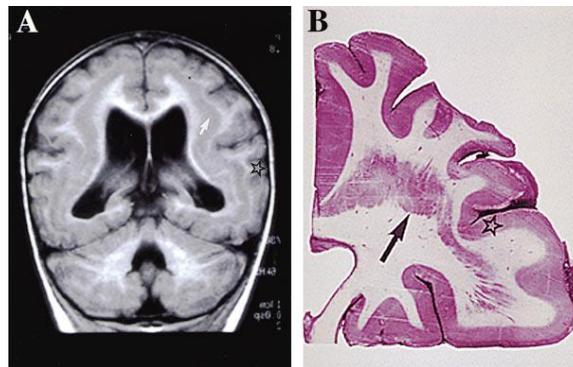
Les hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires sont la forme la plus fréquente des hétérotopies corticales et se caractérisent par des amas de substance grise longeant la paroi des ventricules. La mutation du gène FLNA codant pour une protéine associée au cytosquelette (Filamine A) empêche l'initiation de la migration neuronale avec pour conséquence une accumulation de neurones dans la zone ventriculaire. Cliniquement, cette atteinte se traduit par une épilepsie difficilement contrôlable sans réel trouble intellectuel (Figure 1 : A et B ; 14,15).



**Figure 1** Images IRM pondérées en T2 montrant des hétérotopies nodulaires péri-ventriculaires dans la région temporo-occipitale basale droite (flèches) chez l'enfant (19).

## b) Hétérotopies sous-corticales

Les hétérotopies sous-corticales peuvent être focales ou laminaires et sont formées de neurones ectopiques, c'est-à-dire des agrégats de cellules nerveuses séparées du cortex par une lame de substance blanche. Le syndrome du double cortex, ou hétérotopie sous-corticale en bande, fait partie des atteintes du groupe de la lissencéphalie : un cerveau dépourvu de sillons. La mutation du gène DCX se situant sur le chromosome X code pour la doublecortine, une protéine intervenant lors de la migration neuronale, juste avant que les neurones rejoignent le plateau cortical. La dysfonction de cette protéine cause donc une accumulation de neurones dans la substance blanche sous-corticale (Figure 2 : B). Chez les individus masculins, cette atteinte est létale et se traduit par une lissencéphalie. Chez les femmes en revanche, l'expression en mosaïque du chromosome X a pour conséquence qu'une partie des neurones rejoint sa destination corticale alors que l'autre partie reste bloquée à la moitié du trajet dans la substance blanche, créant ainsi une image de double cortex (Figure 2 : A). Cliniquement, cette atteinte se traduit par une épilepsie et un retard mental (16).



**Figure 2** A: Plan coronal d'une IRM de cerveau adulte d'une patiente portant la mutation du gène DCX et exprimant un phénotype de double cortex. B: Coupe coronale du cerveau de la patiente en (A) (16)

## 1.3 Physiopathologie

Bien que la physiopathologie de l'épilepsie ne soit pas encore totalement comprise, elle s'explique par un déséquilibre entre le système excitateur et inhibiteur du cerveau. En effet, les crises épileptiques proviennent de décharges électriques synchrones provoquées par un grand nombre de neurones qui peuvent se propager de proche en proche. Les manifestations cliniques vont donc dépendre de la localisation de ces décharges et de la quantité de neurones impliqués. Ainsi, par exemple, une implication du cortex moteur pourra donner une crise tonico-clonique alors que des décharges au niveau du cortex visuel pourront causer des hallucinations visuelles. Dans l'hétérotopie corticale, les crises d'épilepsie proviennent d'une diminution de l'activité du système inhibiteur du système nerveux central, le système GABAergique. En effet, plusieurs études réalisées sur des rats avec des hétérotopies corticales mettent en évidence des anomalies de ce système sans que le nombre de neurones inhibiteurs soit obligatoirement diminué (17,18). L'étude du groupe de Karlsson A. (Brain research, 2011) rapporte notamment une anomalie du GAT (GABA transporter 1) dont la mission est d'éliminer le GABA de la fente synaptique. Cela a pour conséquence une augmentation du GABA dans l'environnement extracellulaire et, via l'activation du récepteur pré-synaptique au GABA, une diminution de l'activité des neurones inhibiteurs (17).

## 1.4 Traitement

L'enjeu principal du traitement de l'épilepsie est donc de rétablir l'équilibre entre le système excitateur et inhibiteur du cerveau. Malheureusement, il n'existe pas encore de modalités curatives ou préventives à l'épilepsie. Le traitement le plus commun consiste en l'administration de médicaments agonistes du récepteur au GABA qui font partie de la classe des benzodiazépines ou des barbituriques. Malgré l'association de plusieurs molécules, jusqu'à 30% des patients ont une épilepsie non-contrôlée (2).

La chirurgie est un traitement historique de l'épilepsie que l'on propose encore actuellement à une faible proportion des patients. Elle concerne notamment les enfants et les jeunes adultes puisque chez cette population, la plasticité neuronale est optimale pour compenser les potentiels déficits occasionnés par cette intervention. La chirurgie peut se montrer efficace lors de la résection des zones générant une activité épileptique, comme par exemple dans les cas d'hétérotopie nodulaire péri-ventriculaire abordée précédemment où une intervention chirurgicale peut améliorer le contrôle des crises comitiales (19). Une intervention plus extrême consiste à sectionner le corps calleux pour éviter la propagation des décharges électriques d'un hémisphère à l'autre (20).

Le contrôle de la maladie épileptique revêt d'une importance capitale puisque chaque crise induit une souffrance neuronale qui favorisera non seulement la survenue d'autres crises épileptiques mais causera aussi des conséquences fonctionnelles et psycho-sociales à long terme (20).

Face à l'absence de traitement efficace et à l'importance du contrôle de l'épilepsie, il paraît indispensable d'étudier les modèles animaux. En effet, il devient urgent de comprendre l'origine et les mécanismes clés des manifestations épileptiques afin de proposer des cibles thérapeutiques pour développer des traitements efficaces.

## 1.5 Modèles animaux d'épilepsie et de malformations corticales

Il existe de nombreux modèles animaux souffrant d'épilepsie. En revanche, les modèles de malformations corticales, avec un phénotype épileptique, sont rares. Quelques exemples sont cités ci-dessous.

### 1.5.1 Modèles animaux d'épilepsie pharmaco-résistante

L'épilepsie pharmaco-résistante chez les modèles animaux est définie comme une « activité épileptique persistante répondant peu ou pas à une monothérapie par minimum deux médicaments anti-épileptiques aux doses maximales tolérées » (21). Le modèle du rat de l'épilepsie du lobe temporal (TLE) et le rat « *amygdala-kindled* » sont deux modèles illustrant ce type d'épilepsie (22,23).

### 1.5.2 Modèles animaux de malformations corticales

#### a) Troubles de la prolifération

La microcéphalie est un exemple de malformation corticale liée à une anomalie de la prolifération neuronale qui induit un cerveau de petite taille. Une mutation du gène NDE1 qui code pour une protéine de la famille NudE chez la souris provoque cette atteinte. Cette protéine qui se localise sur le centrosome joue un rôle important

pour l'organisation du cytosquelette, l'assemblage du fuseau mitotique et la migration neuronale. Par conséquent, la perte de l'expression de NDE1 chez les progéniteurs neuronaux provoque une anomalie de la progression et l'orientation mitotique ainsi que de la position des chromosomes dans les neurones menant à un cerveau de petite taille (24).

#### b) Troubles de la migration

Il existe également chez les animaux des modèles ayant des anomalies de la migration neuronale. C'est le cas par exemple du rat exposé durant la période pré-natale au 1,3-Bis-chloroéthyle-nitrosurée (BCNU). Les conséquences de cette exposition se traduisent par un amincissement du cortex, une désorganisation des couches corticales et des hétérotopies corticales et péri-ventriculaires (25).

La souris BXD29 et le rat « *tish* » (telencephalic internal structural heterotopia) représentent deux modèles spontanés d'hétérotopies sous-corticale en bande (26,27). Cependant, les origines génétiques sont toujours inconnues.

### 1.5.3 Modèles animaux de malformations corticales associées à une épilepsie pharmaco-résistante

Les rats exposés *in utero* au méthylazoxyméthanol (MAM) présentent une microcéphalie ainsi que des hétérotopies neuronales que l'on retrouve au niveau du cortex et de l'hippocampe. Cliniquement, ces animaux souffrent d'une épilepsie réfractaire lors de l'administration de kainate ou d'un inhibiteur de la synthèse du cholestérol AY-9944 (28).

Un autre exemple est celui du groupe de recherche d'Ackmann et al. (The Journal of Neuroscience, 2009) qui a démontré qu'une extinction du gène DCX chez le rat induit des hétérotopies corticales et une épilepsie réfractaire. La cause de ces atteintes provient d'un retard de maturation du système GABAergique chez des neurones conservant des propriétés immatures (29). Néanmoins des études supplémentaires sont nécessaires afin de démontrer le caractère réfractaire de l'épilepsie chez ce modèle.

Le rat « *tish* » (17), la souris exprimant une dysplasie corticale focale de type II (30) et la souris avec un déficit p-35 (31) sont d'autres modèles animaux étudiés qui expriment des malformations corticales associées à une épilepsie réfractaire au traitement.

## 1.6 La souris HeCo : un modèle de malformation corticale ayant un phénotype épileptique

### 1.6.1 Phénotype

La souris mutante HeCo est un modèle de malformation corticale génétique apparue spontanément dans la colonie de souris NOR-CD1 du groupe du Dr. A. Croquelois (32).

En raison d'une anomalie de prolifération ce modèle présente bilatéralement des amas de neurones hétérotopiques dans la partie rostro-médiale du néo-cortex, dans la substance blanche sous-corticale (Figure 3). Le phénotype HeCo présente des crises d'épilepsie et un retard de développement.

## 1.6.2 Physiopathologie

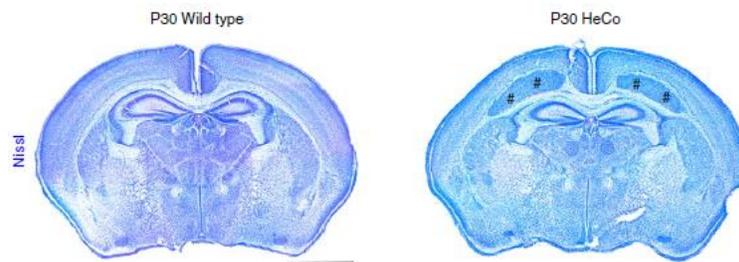
L'étude de cette souris a mis en évidence une distribution anormale des progéniteurs neuronaux dans la zone intermédiaire et la plaque corticale. En revanche, il a été observé une migration normale de ces neurones tout au long de la corticogenèse.

## 1.6.3 Génétique

La souris HeCo présente une mutation du gène *eml1* (*Echinoderm Microtubule Associated Protein-like 1*) qui code pour une protéine associée aux microtubules. Ce gène fait partie de la famille des protéines EMAP (*Echinoderm Microtubule Associated Protein*) qui sont impliquées dans la dynamique des microtubules du cytosquelette. En effet, ces protéines permettent de moduler la polymérisation et la dépolymérisation (33) des microtubules et elles sont notamment impliquées dans le processus de division cellulaire. Chez la souris HeCo, les conséquences de la mutation d'*eml1* ont pour effet une division cellulaire dans un plan anormal. Ainsi, ce phénomène empêcherait la cellule fille d'hériter une partie de la membrane apicale et du patrimoine génétique pour finalement entraîner son détachement vers la plaque corticale (34).

A noter que, chez l'humain, la mutation d'EML1 a été retrouvée chez deux familles différentes dont les enfants présentaient des hétérotopies périventriculaires et sous-corticales en bandes bilatérales ainsi qu'une polymicrogyrie et une agénésie du corps calleux. Cliniquement, ces anomalies se traduisent chez l'humain par de l'épilepsie réfractaire et une déficience mentale.

Ainsi, la souris HeCo est un modèle d'épilepsie pertinent pour étudier la genèse des crises comitiales et, à terme, pour trouver un traitement efficace contre l'épilepsie liée aux malformations corticales.



**Figure 3** Coupe histologique d'une souris sauvage (WT, à gauche) et d'une souris mutante (HeCo, à droite) au même âge. On retrouve les hétérotopies sous-corticales dans la substance blanche (#) chez la souris HeCo. (32)

## 1.7 Buts de l'étude

Il a déjà été démontré chez les souris HeCo (n=2) une corrélation entre des anomalies cliniques et des anomalies électriques sur l'EEG dans un protocole expérimental sur animal libre de tout mouvement.

Mon travail de Maîtrise comporte plusieurs questions.

- 1) L'analyse de tracés EEG couplées à la vidéo permet-elle de confirmer le statut épileptique des souris HeCo par rapport aux WT ?
- 2) Est-il possible de distinguer des crises généralisées et focales en fonction de la localisation des électrodes enregistrées ?

3) Quelles informations pouvons-nous obtenir sur la localisation des foyers épileptiques et sur la cinétique de propagation des crises ? En effet, l'hippocampe étant souvent impliqué dans la genèse des crises épileptiques (15, 35, 36), nous nous interrogeons de même pour les crises observées chez la souris HeCo.

4) Existe-t-il une corrélation entre les anomalies observées macroscopiquement et les résultats électrophysiologiques obtenus au niveau cellulaire chez la souris HeCo ?

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

### 2.1 Animaux

Selon le Travail de Maîtrise sur le sujet réalisé précédemment (37), traduit de l'anglais, les souris utilisées pour les expériences étaient âgées de 60 à 90 jours et de sexe masculin afin d'éviter les influences hormonales sur les résultats. Les animaux étaient contenus dans des cages transparentes de 30x20cm et libres de tous mouvements. Les cages se trouvaient dans l'animalerie du Département des Neurosciences Fondamentales de l'université de Lausanne avec un cycle circadien de 14h de lumière et 10h de nuit. De la nourriture et de l'eau étaient disponible en permanence pour les animaux. Les souris ont été traitées en accord avec les guidelines de l'Université de Lausanne et approuvé par l'Office Vétérinaire Cantonal (Lausanne, Suisse) en accord avec la loi fédérale suisse.

### 2.2 Chirurgie stéréotaxique pour l'implantation des électrodes intra-crâniennes

Selon le Travail de Maîtrise sur le sujet réalisé précédemment (37), traduit de l'anglais, les enregistrements vidéo-EEG analysés ont été réalisés grâce à des électrodes montées sur la tête des animaux (Pinnacle Technology, Inc.) Des souris HeCo et Wild Type âgées de sept semaines ont été anesthésiées par des injections intra-péritonéales de Xylazine (70mg/kg) et de Kétamine (80mg/kg). Une fois la peau du crâne incisée rostro-caudalement, quatre électrodes ont été implantées selon des coordonnées stéréotaxiques : deux électrodes bilatérales de surface au niveau du cortex antérieur (2.0 mm postérieur et 1.6mm latéral au Bregma) et deux électrodes en profondeur au niveau de l'hippocampe (2.2mm postérieur, 1.6 mm latéral au Bregma et 1.6mm de profondeur). Une électrode électromyographique a été implantée dans la musculature de la nuque. Au terme des enregistrements, les souris ont été euthanasiées à l'aide d'une injection péritonéale de pentobarbital.

### 2.3 Enregistrement EEG-Vidéo

Selon le Travail de Maîtrise sur le sujet réalisé précédemment (37), traduit de l'anglais, toutes les souris ont bénéficié d'un repos de quatorze jours entre l'intervention et le début des enregistrements. En tout, deux HeCo et deux Wild type ont été utilisées pour réaliser des enregistrements de vingt-quatre heures consécutives. Les signaux EEG ont été filtré à 1000Hz afin d'éliminer les artefacts. Une vidéo a été enregistrée en parallèle de l'acquisition EEG.

### 2.4 Analyse EEG et vidéo

Le logiciel Sirenia Seizure Pro a été utilisé pour l'analyse des tracés EEG. Les enregistrements de quatre souris contrôles ont été analysés à raison de deux heure par souris ce qui fait huit heures d'enregistrements en tout. En ce qui concerne les souris HeCo, les acquisitions EEG-vidéo de quatre souris ont été analysées pour une durée

totale de sept heures d'enregistrement (une heure analysable sur les deux enregistrées pour la souris HeCo11). Un filtre de fréquence entre 1Hz et 30Hz a été appliqué pour chaque tracé afin d'en faciliter la lecture. L'analyse consistait à observer les tracés EEG à la recherche d'évènements électriques perturbant le tracé de base tel que des spike (pointe transitoire de 25-70ms ; 38), spike-waves (pointe suivie d'une onde ; 38) ou encore polyspikes (décharge de spikes). Il a été décidé de ne tenir compte que des évènements électriques ayant une corrélation comportementale visualisable sur la vidéo, sans durée minimale. Lorsqu'un évènement répondant à ces critères était identifié, sa durée, son amplitude maximale et sa fréquence étaient mesurés manuellement et le comportement associé relevé. L'implication de chaque électrode dans les évènements observés a également été relevée afin de différencier les crises épileptiques focales des crises généralisées. Une crise était considérée comme généralisée lorsque l'ensemble des électrodes était impliqué et que le corps entier de l'animal était touché. Lorsqu'une partie des électrodes était impliquée et que les manifestations cliniques ne concernaient pas l'entier du corps de la souris, la crise était considérée comme focale.

La recherche de patterns de crises récurrents ou non s'effectuait en comparant visuellement les tracés EEG et les manifestations cliniques associées chez un même animal ou chez plusieurs animaux différents.

## 2.5 Electrophysiologie

Les données d'électrophysiologie présentées dans ce travail ont été produites par le Dr. M. Kielar, PhD dans le groupe du Dr. A. Croquelois, au Département des Neurosciences Fondamentales de l'Université de Lausanne.

### 2.5.1 Expériences

Des tranches aigües de cerveaux de souris âgées entre 20-25 jours ont été utilisées. Plus précisément, les neurones corticaux du phénotype sauvage ont été enregistrés dans la couche II/III du cortex. Chez la souris HeCo, les neurones de la couche II/III et ceux de la région hétérotopique ont également été enregistrés. Après la décapitation et l'extraction du cerveau, des coupes coronales de 250  $\mu\text{m}$  d'épaisseur ont été préparées à l'aide d'un vibratome (VT 1000S, Leica). Pour les enregistrements, les coupes ont été incubées 30 min à 34°C pour stabiliser l'homéostasie. Les tranches ont été ensuite déposées dans une cuvette à température ambiante avant de les transférer dans la chambre d'enregistrement. Puis, les coupes ont été maintenues en place avec une harpe en platine et perfusées par du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRA) oxygéné, le tout effectué à 34°C. La solution externe de LCRA contenait (en mM) : Na 125, KCl 3, NaHCO<sub>3</sub> 26, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, glucose 10, tout étant gazéifiée avec 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>. La chambre d'enregistrement était reliée à un microscope Zeiss LSM510 Meta équipé d'un contraste d'interférentiel (infrarouge-différentiel).

Les cellules ont été sélectionnées et enregistrées dans une configuration de cellule entière. Le *patch-clamp cellule entière* a été obtenu avec des pipettes en verre de borosilicate (5-7 M $\Omega$ ). La solution intracellulaire de la pipette de *patch-clamp* contenait (en mM): K-gluconate 120, NaCl 5, KCl 5, MgCl<sub>2</sub> 1, EGTA 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.025, HEPES 10, glucose 4, Mg-ATP 1, et Na<sub>3</sub>-GTP 0.2 (pH 7.3 avec KOH, 290 mOsm).

## 2.6 Analyse des propriétés passives de la membrane et du déclenchement des potentiels d'action (PA)

Les enregistrements ont été obtenus en configuration « potentiel-imposé » grâce à l'amplificateur Multiclamp 700B (Molecular Devices). Le potentiel de membrane était maintenu à -70mV. Les cellules étaient aussi maintenues au potentiel membranaire de repos ( $V_r$ ) durant les enregistrements en mode « courant-imposé ».

L'acquisition des données fut réalisée à 10kHz et filtré à 2kHz par le convertisseur analogique-digital Digidata 1440 (Molecular Devices) et contrôlé par le logiciel pCLAMP 10. Les critères d'inclusion de l'expérience pour l'analyse des données étaient basés sur la vérification de la stabilité au niveau de l'accès à la résistance d'entrée ( $R_n$ ) et au niveau du courant injecté ( $\leq 100$  pA at  $-80$ mV).  $R_n$  était déterminée comme le tracé du meilleur signal correspondant au graphique de la relation potentiel-courant. Les mesures des PA unitaires ont été pratiquées sur le premier potentiel d'action généré dans une série en mode courant-imposé de 200ms. La rhéobase (courant minimum requis pour provoquer un seul potentiel d'action), a été déterminée avec une rampe de courant dépolarisante de 0-200 pA et d'une durée de 2s. Le seuil de déclenchement de potentiel d'action a été mesuré sur une échelle de temps étendue à l'initiation précise de la déflexion positive du pic. Une série de 12 mesures de courant hyperpolarisant et dépolarisant (avec une incrémentation de 50pA allant de -200 à +400 pA), d'une durée de 2 s à chaque fois, a été implémentée pour une évaluation de déclenchement répétitif de potentiels d'action. La caractéristique d'une dépolarisation médiée par un courant  $I_h$  (39), le courant hyperpolarisant de -200pA, évoquait un voltage lentement émergeant dépolarisant appelé "sag". L'amplitude de "sag" a été mesurée du potentiel minimum jusqu'à l'amplitude maximale de la déflexion vers la dépolarisation (Clampfit software, Molecular Devices) ainsi que pour déterminer la fréquence des potentiels d'action.

## 2.7 Analyse statistique

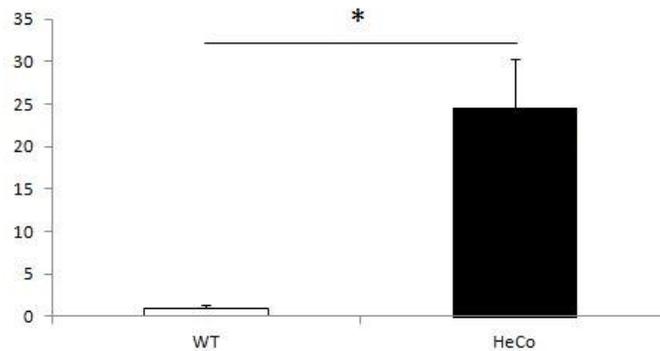
Toutes les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  s.e.m. L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel JMP (© SAS Institute Inc.). La variance a été estimée pour chaque type de donnée et le  $t$ -test de Student a été adapté conformément pour des comparaisons partielles. Tous les tests étaient effectués de façon bilatérale. La comparaison des moyennes a été effectuée selon le  $t$ -test de Student non apparié. Les effets significatifs ont ensuite été analysés par comparaison *post hoc* des moyennes avec le  $t$ -test de Student Newman-Keuls. Les données EEG et d'électrophysiologie n'ont pas pu être collectées ni traitées en aveugle puisque l'expérimentateur pouvait clairement reconnaître les différentes conditions. Les critères d'exclusions pour les données électrophysiologiques sont : cellule ayant un potentiel de membrane au repos  $> -55$ mV ; cellule n'ayant pas deux potentiels d'actions durant le temps d'enregistrement.

## 3. RÉSULTATS

Les expériences d'EEG couplées à l'enregistrement vidéo synchronisé ont été effectuées sur 8 animaux au total: 4 souris WT durant 8 heures d'enregistrement et 4 animaux HeCo sur 7 heures d'enregistrement.

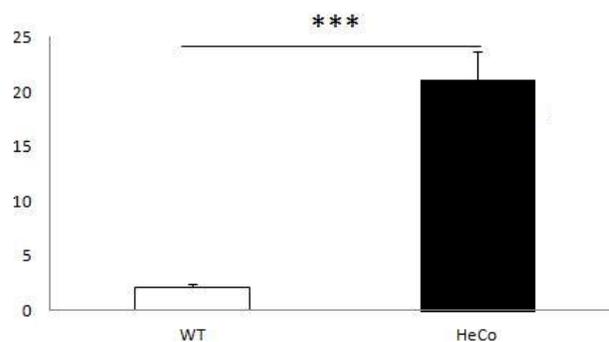
### 3.1 Analyse EEG : nombre et durée d'évènements épileptiques

L'analyse des tracés EEG et du monitoring vidéo a permis de mettre en évidence 165 évènements épileptiques chez les souris HeCo et seulement 8 évènements chez les souris WT. En moyenne, les souris WT présentent spontanément 1 évènement épileptique / hr tandis que les souris HeCo en montrent 24.5 / hr (Figure 4).



**Figure 4** Graphique illustrant le nombre moyen d'évènements épileptiques par heure. Il arrive 1 évènement / hr chez les WT contre 24.5 évènements / hr chez les HeCo. Données présentées en moyenne  $\pm$  SEM.  $p=0.0178$

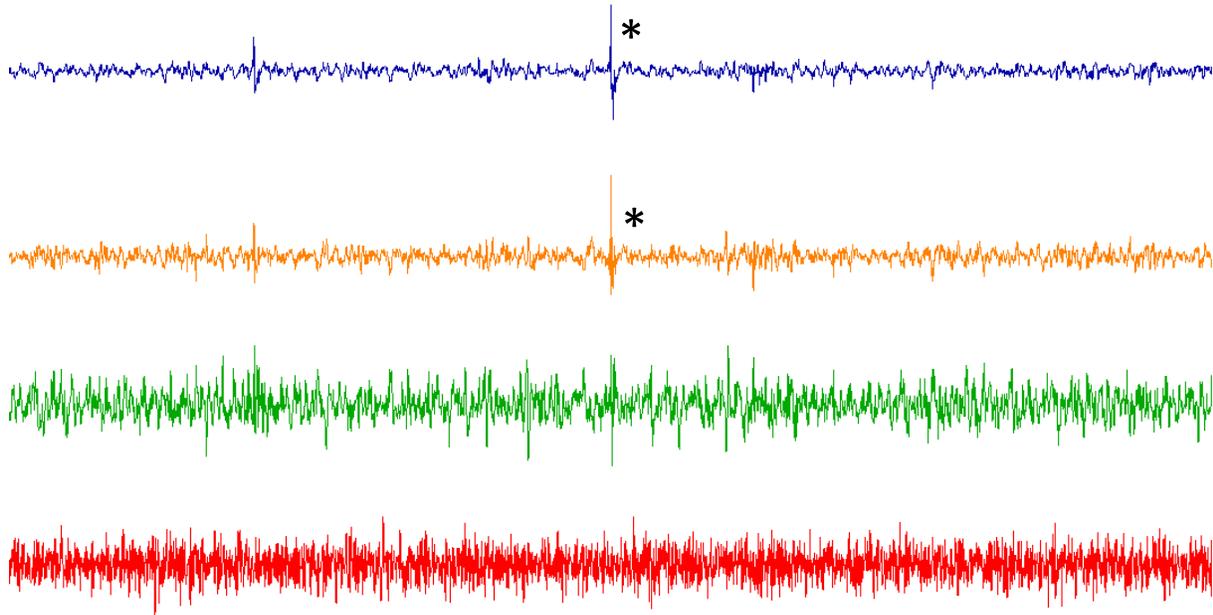
Ces chiffres correspondent à une durée totale de 57,81 minutes (3468,54 secondes) pour l'ensemble des souris HeCo avec une durée moyenne d'évènement de 21.02 secondes. En ce qui concerne les souris WT, la durée totale des évènements observés est de 16.71 secondes avec une durée moyenne de 2.08 secondes (Figure 5). Ainsi, au vu du nombre et de la durée des crises d'épilepsie, ces données démontrent bien que les souris HeCo ont un seuil épileptique très abaissé par rapport aux contrôles.



**Figure 5** Graphique illustrant la durée moyenne d'un évènement épileptique en seconde chez les souris WT (2.08s) et HeCo (21.02s). Données présentées en moyenne  $\pm$  SEM.  $p<0.0001$

### 3.1.1 Activité électrique isolée

Les souris HeCo et WT présentent également de façon récurrente des pointes-ondes isolées et ceci sans aucune modification comportementale. Cette activité électrique a lieu plusieurs fois par heure, enregistrée par une ou plusieurs électrodes à la fois et survenir durant la phase de veille ou de sommeil (Figure 6, T= 11hr 45min 20 sec). En moyenne, il y a 85 évènements / hr chez les souris WT et 70.5 évènements / hr chez les souris HeCo. Ces données nécessitent une investigation approfondie avec un nombre d'animaux plus élevé et une prudence dans l'interprétation quant à la fonction de cette activité électrique de base.

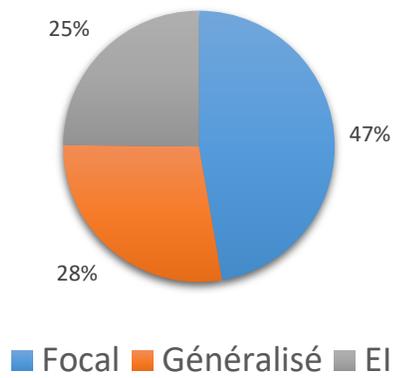


**Figure 6** Tracé EEG de l'animal WT10 mettant en évidence un spike isolé sur les EEG1-3 d'une durée de 440ms. La souris ne présente aucune activité comportementale spécifique associée à cette pointe-onde.

## 3.2 Types d'évènements épileptiques

### 3.2.1 Données générales

Sur les 165 évènements épileptiques observés, 78 sont considérés comme des crises épileptiques focales, 46 comme des crises généralisées et 41 comme des évènements interictaux. Les évènements interictaux sont des évènements électro-cliniques qui ont été observés et qui ne correspondent ni à une crise focale ni à une crise généralisée (voir chapitre 2.4 « Evènements interictaux »). La figure 7 illustre la répartition entre les différents types d'évènements pour l'ensemble des souris HeCo. Bien que ce résultat ne soit pas significatif (focal vs EI  $p=0.433$ , focal vs généralisé  $p=0.207$ , EI vs généralisé  $p=0.913$ ), la tendance semble indiquer une majorité de crises focales, suivi des crises généralisées et finalement des évènements interictaux.

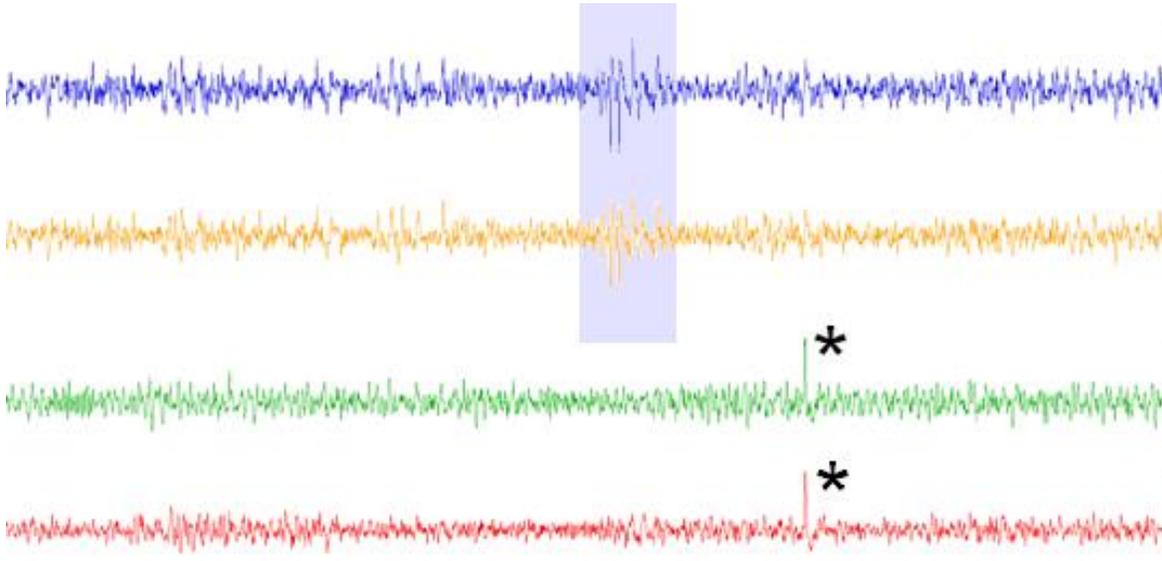


**Figure 7** Répartition des différents évènements épileptiques pour l'ensemble des souris HeCo. On observe une majorité de crises focales (47%), suivi des crises généralisées (28%) et finalement des évènements interictaux (25%). Données présentées en moyenne  $\pm$  SEM.  $p$  focal vs EI=0.433,  $p$  focal vs généralisé=0.207,  $p$  EI vs généralisé=0.913

### 3.2.2 Crises focales

Des crises épileptiques focales ont été observées chez chaque souris HeCo. Ces évènements se traduisent par des décharges de polyspikes visibles sur une à trois des quatre électrodes. Les manifestations cliniques associées sont des mouvements toniques ou tonico-cloniques répétitifs concernant une partie du corps de l'animal comme la tête ou l'hémicorps. Par exemple, chez la souris HeCo12 on observe une salve de polyspikes d'une durée de 2.19 secondes sur les EEG 1 et 2 (Figure 8, segment bleu, T=2hr 18min 33sec). Durant ce temps, l'animal présente des mouvements tonico-cloniques rapides de la tête d'avant en arrière. A noter que la pointe-onde visible sur l'EEG 3 et 4 (\*, T= 2hr, 18min, 38sec) n'était associée à aucun évènement clinique.

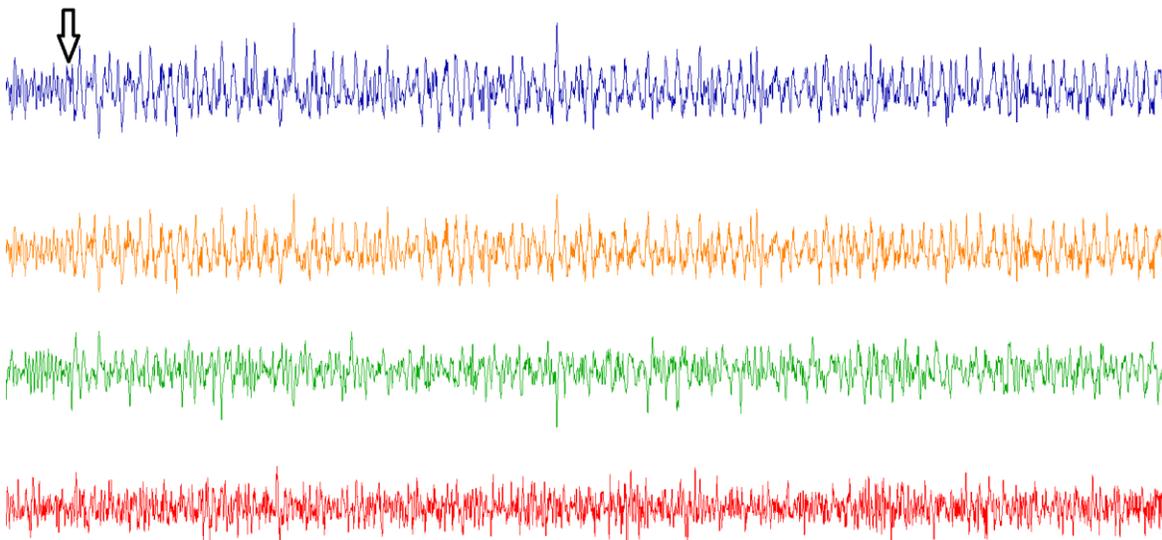
Certaines crises focales sont associées à des comportements stéréotypés de nettoyage ou de grattage que l'on retrouve également lors de crises généralisées.



**Figure 8** Crise focale chez HeCo 12. On observe une salve de polyspikes d'une durée de 2.19 secondes sur l'EEG 1 & 2 (segment bleu) associée à des mouvements tonico-cloniques de la tête d'avant en arrière.

### 3.2.3 Crises généralisées

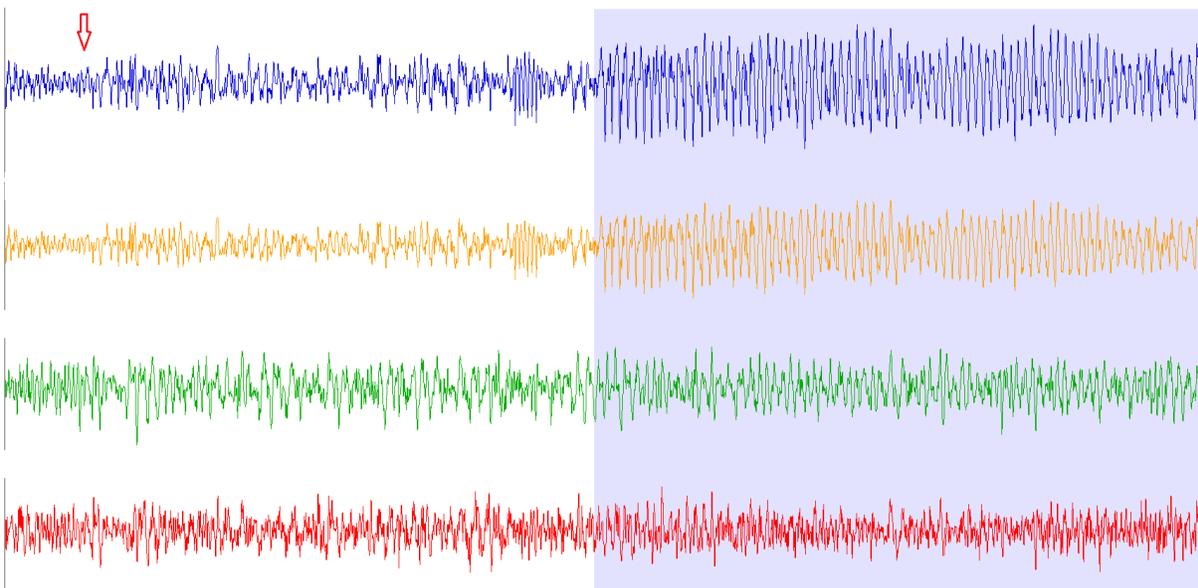
Les crises généralisées observées se caractérisent par des modifications du tracé EEG sur les quatre électrodes associées à des mouvements tonico-cloniques. Chez la souris HeCo 11 (Figure 9), on note un changement de l'aspect du tracé sur les 4 électrodes au début du tracé (flèche noire, T= 00hr 37min 15sec) avec notamment l'amplitude des décharges qui augmente. Cliniquement, la souris se met à convulser en position fœtale.



**Figure 9** Modification de l'amplitude du tracé chez HeCo11 (flèche) sur les quatre électrodes au moment où la souris se met à convulser en position fœtale lors d'une crise généralisée.

Cet évènement illustre par ailleurs la durée importante que peuvent atteindre ces crises puisque celle-ci a duré 4 minutes et 51 secondes.

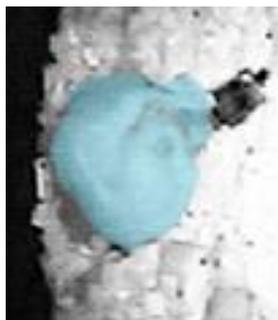
Comme dans le cas des crises focales, il arrive parfois que la crise généralisée soit accompagnée d'un comportement stéréotypé de nettoyage ou de grattage du corps. C'est le cas de la souris HeCo 12 (Figure 10) lors d'une crise généralisée. Au début de l'enregistrement (flèche rouge, T= 9hr 42min 00sec), le tracé change sensiblement d'aspect sur les quatre EEG, avec un comportement de nettoyage du museau et des oreilles. Quelques secondes plus tard (segment bleu, T= 9hr 42min 13sec), on constate l'apparition de décharges de polyspikes principalement sur les EEG 1 et 2 mais aussi dans une moindre mesure sur les électrodes 3 et 4 pour une durée de 19 secondes. A ce moment-ci la souris convulse en position fœtale.



**Figure 10** Crise généralisée chez HeCo12 avec changement de l'aspect du tracé (flèche rouge) précédant les décharges de polyspikes (segment bleu).

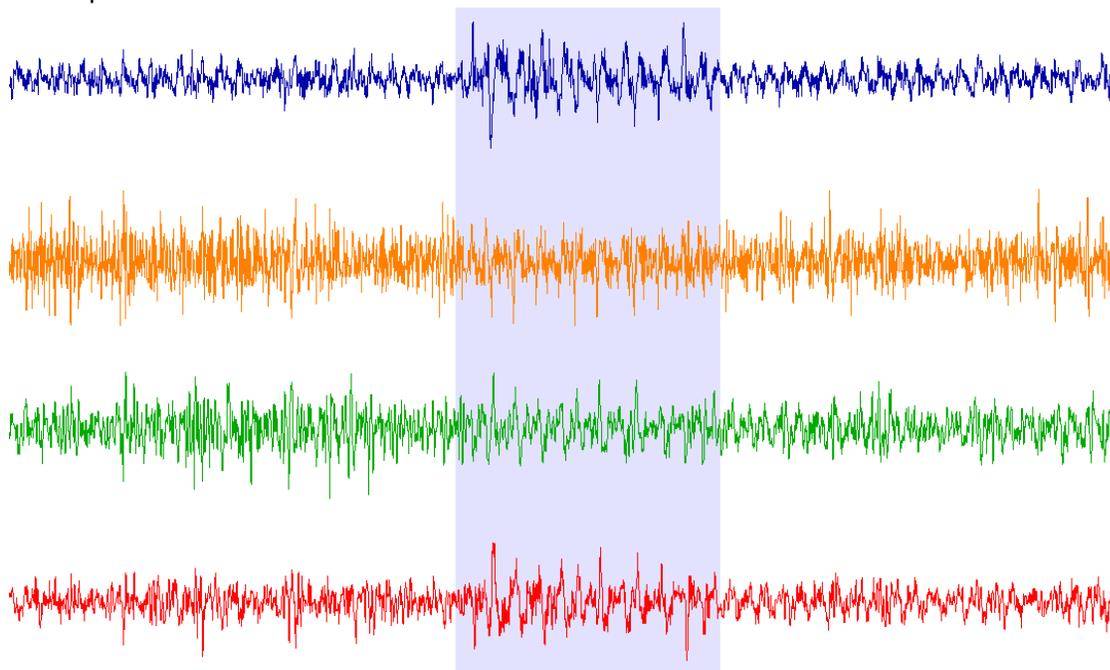
### 3.2.3.1 Crises subintrantes

Les crises subintrantes sont définies comme « des épisodes récurrents de convulsions dans un intervalle de cinq minutes sans retour au status neurologique pré-convulsif » (40). La souris HeCo8 a présenté des crises subintrantes durant dix minutes. Cet animal a tout d'abord souffert d'une crise généralisée durant laquelle elle convulsait en position fœtale, couchée au sol (Figure 11).



**Figure 11** Capture d'écran à partir de l'enregistrement vidéo de l'animal HeCo8 (en bleu) convulsant en position foetale durant une crise généralisée.

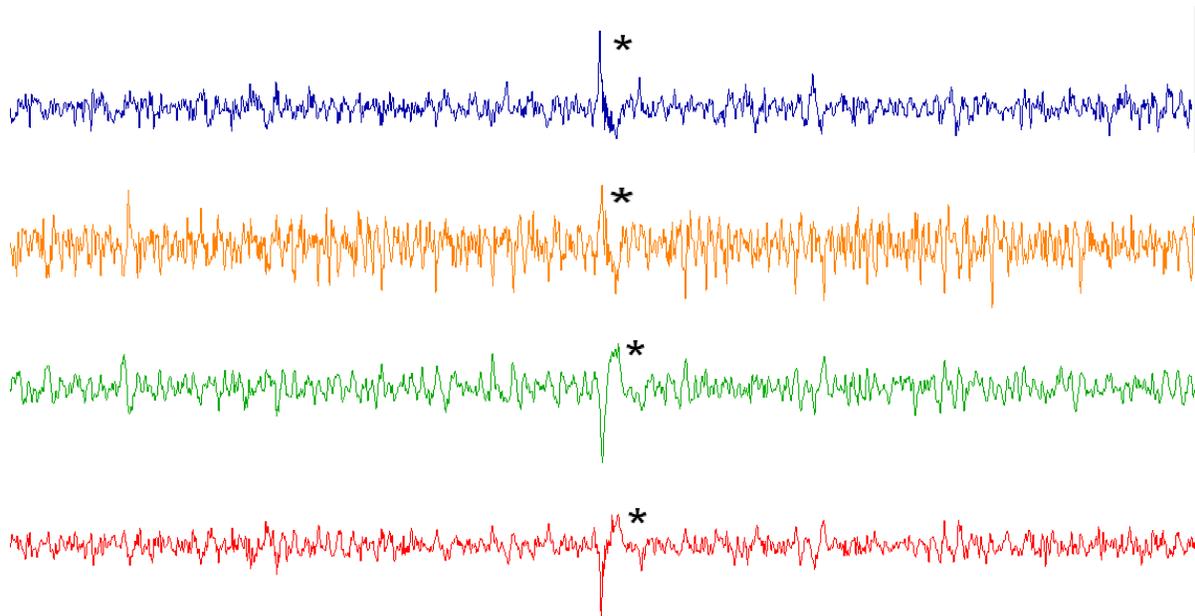
Au terme de cette crise, on observe que le tracé EEG reste anormal avec des pointes monomorphes se répétant à la même fréquence. Cliniquement, la souris reste immobile en position fœtale. Puis, au bout de quelques secondes, on observe des brèves décharges avec des pointes de plus grande amplitude durant lesquelles l'animal recommence à convulser en position fœtale (Figure 12, segment bleu, T=09 hr 29 min 27sec). Ces crises subintrantes se sont produites 14 fois en l'espace de dix minutes. A noter que les souris HeCo12 et HeCo14 ont également présenté des crises subintrantes.



**Figure 12** Crise subintrante survenant chez HeCo8 après une crise généralisée. Le segment bleu indique les décharges de pointes survenant sur un rythme de fond perturbé en dehors du segment.

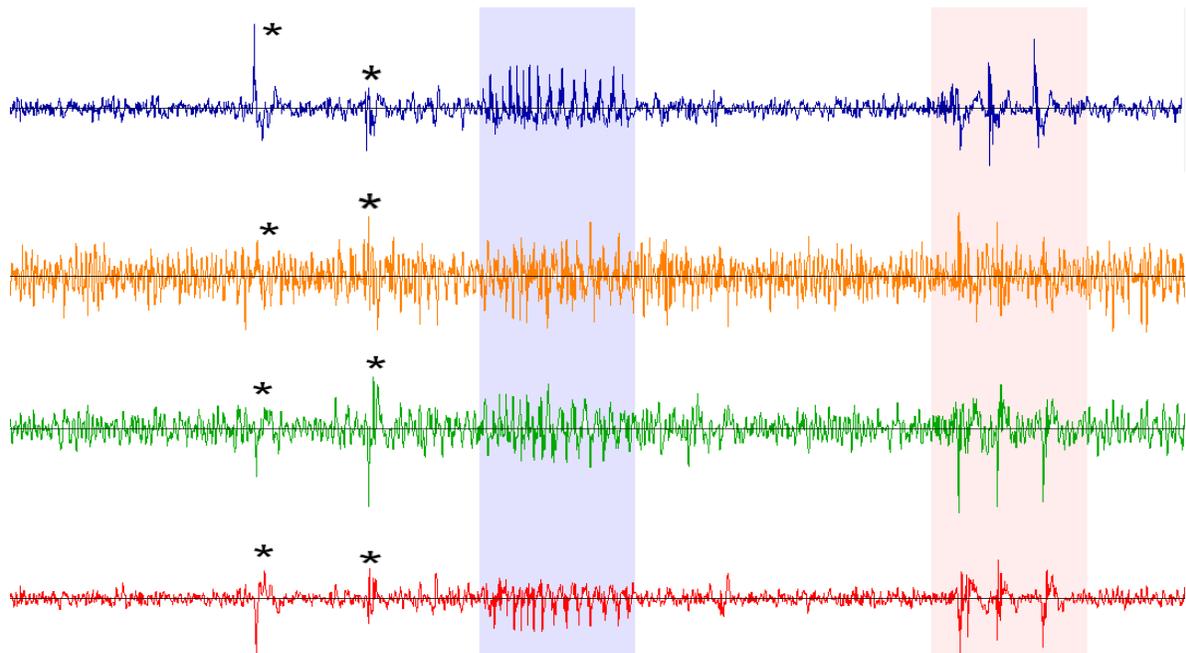
### 3.2.4 Evènements interictaux (EI)

Des évènements épileptiques ne correspondant ni à des crises généralisées ni à des crises focales ont été observés à plusieurs reprises. Il a été décidé de les nommer « évènements interictaux (EI) ». Ces EI consistent en une pointe-onde unique, d'une durée inférieure à une seconde, associée à une brève secousse parcourant l'entier du corps de l'animal et l'interrompant momentanément dans son activité (Figure 13, (\*)). Il s'agit typiquement d'un « pattern » que l'on retrouve chez plusieurs souris HeCo (HeCo8, HeCo12 et HeCo14). Ces évènements se distinguent des activités électriques spontanées par le fait qu'ils sont associés à une manifestation clinique (secousse).



**Figure 13** Tracé EEG de l'animal HeCo8 montrant une pointe-onde (\*) sur les 4 électrodes d'une durée de 588ms associé à une secousse parcourant le corps entier de la souris.

Il est intéressant de constater que cette manifestation clinique peut précéder et/ou suivre de quelques secondes une crise épileptique généralisée plus sévère (Figure 14). Lors de cet évènement, l'animal présente une secousse sur les deux pointe-ondes isolées (\*, T=08hr 50 min 42 sec). Quelques secondes plus tard, on observe un train de polyspikes (segment bleu, T= 08hr 50 min 48 sec) d'environ quatre secondes durant lequel la souris convulse en position fœtale.

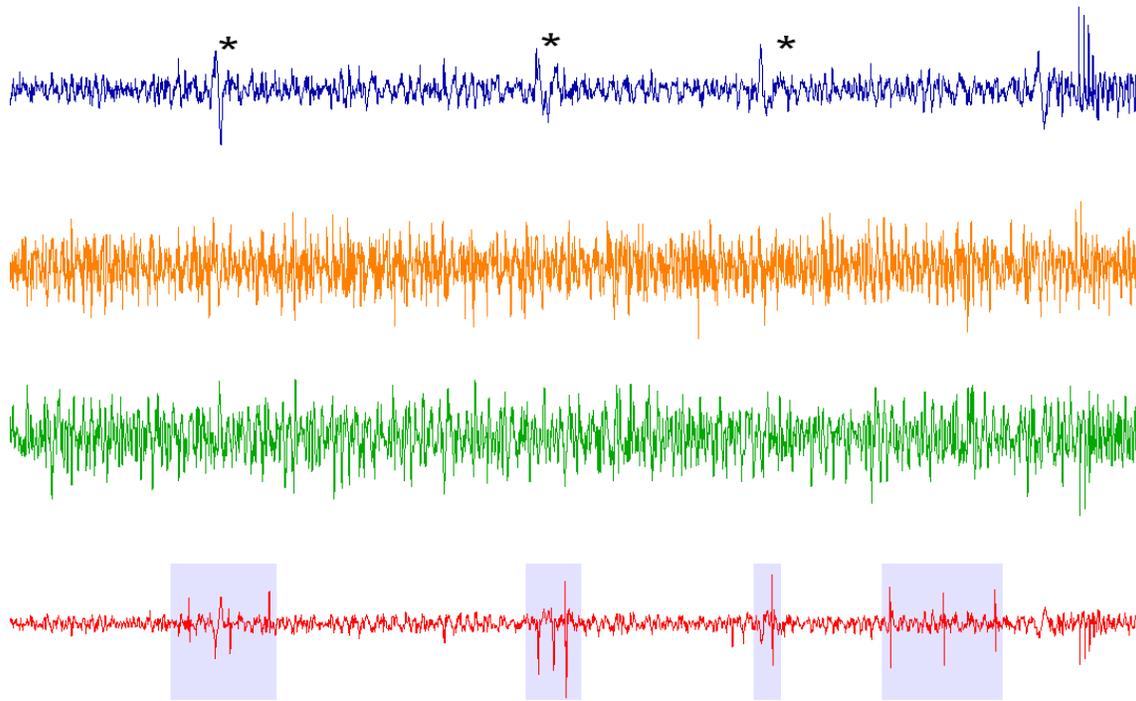


**Figure 14** Enregistrement EEG de l'animal HeCo8 montrant tout d'abord deux pointe-ondes (flèches noires), suivi d'un train de polyspikes (flèche rouge) et finalement de trois pointe-ondes isolées (flèche bleue).

Finalement, l'évènement se termine par les trois dernières pointes-ondes (segment rouge, T= 08hr 41min 11 sec), similaires aux premières, où la souris est à nouveau parcourue de secousses qui la déséquilibrent.

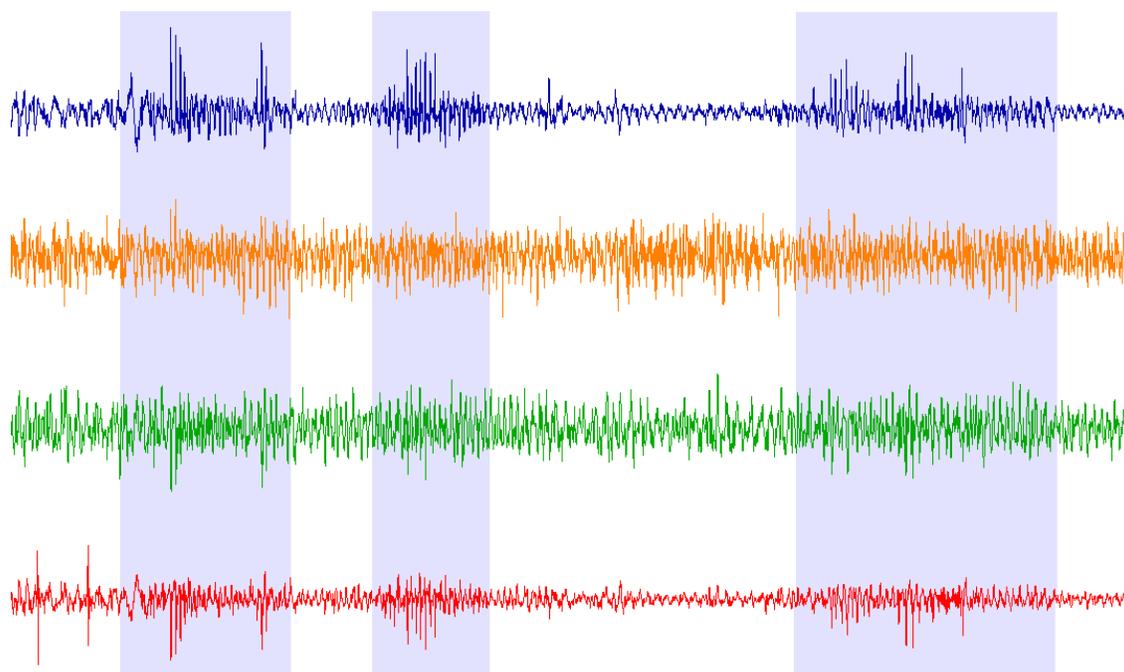
### 3.3 Localisation et cinétique de propagation des crises

La souris HeCo8 a manifesté une crise focale avec foyer de départ cortical qui s'est ensuite généralisée (Figure 15, dès T= 09hr 13min 12 sec). En effet, on observe dix pointes-ondes sur la quatrième électrode située au niveau cortical gauche (segments bleus). Or, sur la première électrode, localisée au niveau hippocampique gauche, on ne retrouve que trois de ces pointes-ondes (\*). Cliniquement, lors de ces anomalies visibles sur l'électrode hippocampique, la souris présente une dystonie de la tête vers la gauche. La qualité de l'enregistrement ne permet pas de se prononcer sur les électrodes placées à droite en raison d'un bruit très important.



**Figure 15** Crise focale chez la souris HeCo8 avec dix pointes-ondes au niveau cortical gauche qui ne sont que partiellement transmis au niveau hippocampique gauche (3 pointes-ondes, tracé bleu). On observe le début de la crise généralisée à la fin du tracé (polyspikes).

Suite à ces pointes-ondes, on observe cinq salves de polyspikes durant lesquelles la souris convulse en position fœtale (Figure 16, segments bleus, dès T= 08hr 13min 48sec).



**Figure 16** Salves de polyspikes chez la souris HeCo8 se manifestant cliniquement par une crise généralisée.

A nouveau, la qualité de l'enregistrement ne permet pas de se prononcer sur la cinétique de propagation du côté droit bien que l'on arrive faiblement à distinguer les salves de polyspikes du bruit.

Cette crise suggère comment un évènement très localisé au départ pourrait ensuite s'étendre à l'hippocampe ipsi-latéral avant de se propager à l'hémisphère controlatéral. Néanmoins cet enregistrement ne permet pas de l'affirmer. Cet évènement nous indique également que l'hippocampe ne semble pas être nécessairement l'inducteur de crises d'épilepsie chez la souris HeCo.

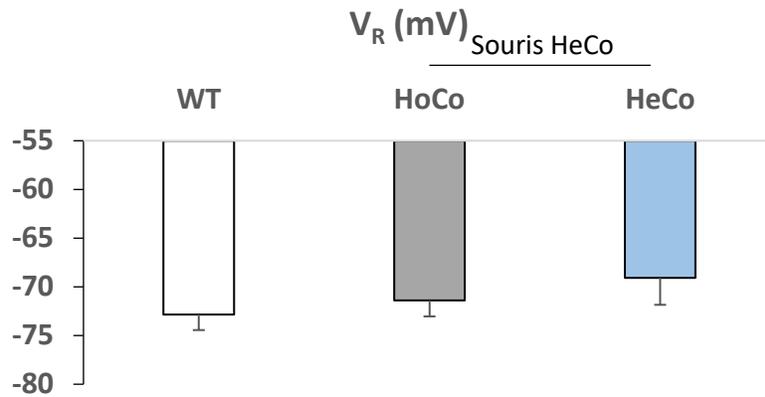
### 3.4 Données électro-physiologiques

Les données électro-physiologiques ont été mesurées dans les neurones (n=11) corticaux de la couche II/III des souris WT ainsi que dans les neurones corticaux des souris HeCo : dans les cellules (n=12) de la couche II/III (HoCo = cortex homotopique) ainsi que dans les cellules (n=14) de l'hétérotopie (HeCo = cortex hétérotopique).

#### 3.4.1 Potentiel de repos

Le potentiel membranaire de repos ( $V_r$ ) est similaire entre les neurones des souris WT et HeCo (Figure 17). En effet, le potentiel est de -72.8 mV pour les neurones WT, de -71.4 mV dans les neurones de la zone HoCo et de

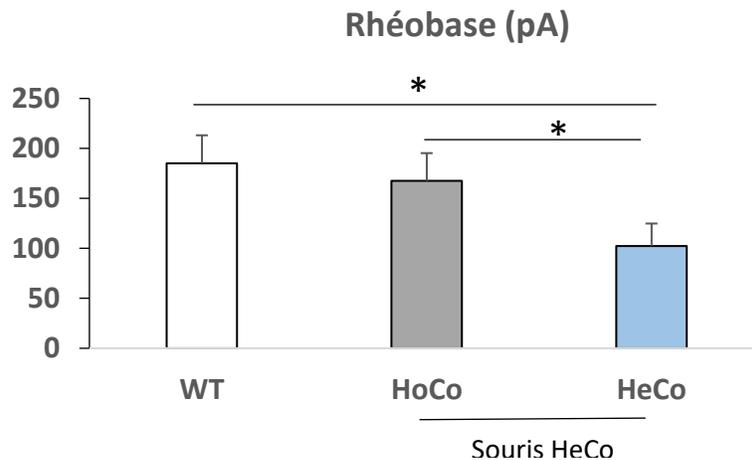
-69.1 mV dans les neurones de la région HeCo. Les neurones des souris WT et HeCo ont donc le même profil quant à leur activité électrique de repos.



**Figure 17** Graphique illustrant le potentiel de repos ( $V_r$ ) moyen en mV dans les neurones corticaux de la couche II/III chez les souris sauvages (WT) ainsi que les souris HeCo au niveau : des neurones corticaux de la couche II/III (HoCo) et ceux de la région hétérotopique (HeCo). HeCo vs WT :  $p=0.24$  ; HeCo vs HoCo :  $p=0.30$  ; HoCo vs WT :  $p=0.86$  ; données présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

### 3.4.2 Seuil d'excitabilité

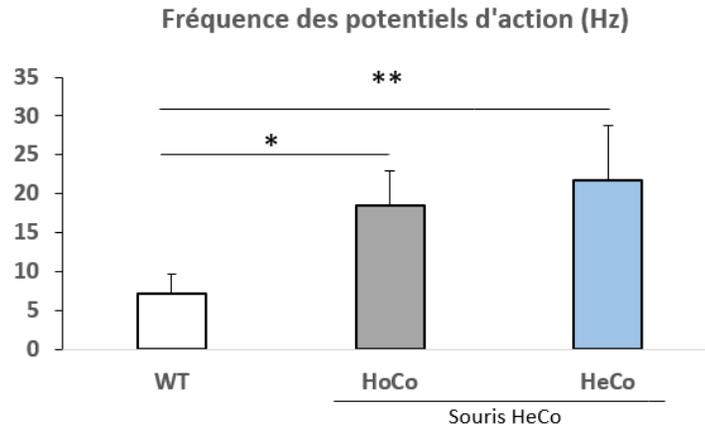
La rhéobase (Figure 18), courant nécessaire pour déclencher un potentiel d'action, est presque deux fois plus faible chez les neurones de la région HeCo (101.2 pA) par rapport aux neurones des souris WT (175.3 pA). Ainsi, ces données indiquent que les neurones de la souris HeCo, et plus particulièrement dans l'hétérotopie, sont beaucoup plus excitables que les cellules des souris WT.



**Figure 18** Graphique illustrant le courant minimum à injecter pour déclencher un potentiel d'action chez les neurones WT (175.3 pA), HoCo (167.6 pA) et HeCo (101.2 pA). HeCo vs WT :  $p=0.032$  ; HeCo vs HoCo :  $p=0.048$  ; HoCo vs WT :  $p=0.82$  ; données présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

### 3.4.3 Fréquence des potentiels d'action

Pour un même niveau de stimulation, la fréquence des potentiels d'action (Figure 19) est augmentée de trois fois dans les neurones de la souris HeCo (HoCo : 18.46 Hz ; HeCo : 20.54 Hz) comparés aux neurones des souris WT (6.73 Hz). Le niveau de décharge de potentiels d'action des neurones des souris HeCo, que ce soit au niveau du néocortex ou de l'hétérotopie, est donc anormalement plus élevé par rapport aux cellules des souris WT.



**Figure 19** Graphique illustrant la fréquence des potentiels d'action dans les neurones des animaux WT et HeCo. Dans toutes les zones de mesure chez la souris HeCo, la fréquence du train de potentiel d'action est plus élevée (HeCo : 20.54 Hz; HoCo : 18.46 Hz) comparée aux neurones des souris WT (6.73 Hz). HeCo vs WT :  $p=0.0035$  ; HeCo vs HoCo :  $p=0.48$  ; HoCo vs WT :  $p=0.024$  ; données présentées en moyenne  $\pm$  SEM.

## 4. DISCUSSION

Nous avons étudié le cortex de la souris HeCo grâce à un set-up d'EEG et vidéo simultanée chez l'animal libre de tout mouvement dans le but de clarifier le phénotype épileptique. Les cellules neuronales homotopiques et hétérotopiques de la souris HeCo ont également été étudiées en électrophysiologie afin de déterminer leurs propriétés électriques et de comparer les résultats cellulaires aux données globales obtenues en EEG.

### 4.1 L'analyse des tracés EEG couplées à la vidéo démontre le statut épileptique des souris HeCo

Les résultats obtenus montrent de manière significative que les souris HeCo présentent en moyenne plus d'événements épileptiques par heure par rapport aux WT. De plus, les événements épileptiques ont une durée moyenne significativement plus longue chez les souris HeCo que chez les WT. Ces deux arguments nous permettent donc de confirmer le statut épileptique des souris HeCo.

Bien que cette analyse ait permis de mettre en évidence 165 évènements épileptiques chez l'ensemble des souris HeCo, seuls les évènements électro-cliniques avec une manifestation motrice ont pu être recensés.

Ainsi, comme l'épilepsie peut également se manifester par des symptômes sensitifs tels que des auras visuelles ou des troubles de la sensibilité, l'analyse effectuée ne permet pas de dire si les souris HeCo présentent également de telles manifestations.

## 4.2 Distinction entre crises généralisées et crises focales

### 4.2.1 Crises focales et généralisées

L'analyse des évènements épileptiques chez les souris HeCo a permis de mettre en évidence une majorité de crises focales (47%) mais aussi des crises généralisées (28%) et des évènements interictaux (25%). Néanmoins, il faut relativiser cette répartition car l'analyse statistique montre qu'elle n'est pas significative. Pour pouvoir affirmer que les souris HeCo présentent plus de crises focales, il faudrait enregistrer un plus grand nombre d'animaux.

D'autre part, bien que les critères de définition des crises focales et généralisées dans ce travail aient été clairement définis, il a parfois été difficile d'attribuer un évènement épileptique à l'une ou l'autre des catégories en raison du bruit important présent sur les électrodes. En effet, le tracé grossier de base peut parfois masquer la présence d'activité électrique anormale sur une électrode ou au contraire donner l'impression qu'il y en a une.

### 4.2.2 Evènements interictaux

Les évènements interictaux font partie des découvertes inattendues de ce travail. En effet, ces évènements ont été observés chez trois des quatre souris HeCo et aucune des souris WT. Comme ces évènements sont trop brefs (quelques millisecondes) pour être considérés comme des crises focales ou généralisées, mais qu'il s'agit d'une manifestation électro-clinique qui perturbe le fonctionnement de l'animal, il a été décidé d'en faire une entité propre. On peut postuler l'hypothèse qu'il s'agisse d'une manifestation directe du seuil d'excitabilité abaissé chez les souris HeCo. On peut également se questionner sur le lien entre ces évènements et la présence des hétérotopies corticales. Ces évènements existent-ils chez d'autres modèles animaux d'épilepsie et sont-ils liés aux épilepsies associées à des malformations corticales ? De même chez l'humain, il serait intéressant de mener une étude chez les patients épileptiques avec malformations corticales.

Il pourrait être intéressant de procéder à des expériences complémentaires pour voir si ces évènements ont toujours leur origine dans la même zone du cerveau, comme une sorte de « pacemaker » qui déchargerait épisodiquement mais qui ne serait pas toujours suffisant pour déclencher des crises épileptiques focales ou généralisées. De même, puisqu'il a été observé que ces évènements précèdent ou suivent parfois des crises, on peut se demander pour quelles raisons ces évènements sont parfois associés à des crises et parfois pas. Ces résultats permettraient de mieux comprendre la physiopathologie de l'épilepsie chez la souris HeCo.

## 4.3. Quelles informations pouvons-nous obtenir sur la localisation des foyers épileptiques et sur la cinétique de propagation des crises ?

### 4.3.1 Point de départ cortical

L'analyse des tracés EEG a permis de mettre en évidence un possible exemple de crise à point de départ focal, intéressant tout d'abord le cortex gauche puis l'hippocampe gauche avec par la suite généralisation secondaire du côté droit. Malheureusement, la présence d'un bruit important sur les EEGs et le logiciel utilisé n'offrant pas d'outils pour l'analyse de la cinétique des crises, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'autres événements similaires. Néanmoins, cette observation met en évidence le fait que les crises ne sont pas nécessairement générées par l'hippocampe comme c'est le cas dans d'autres modèles animaux. En effet, chez les rats atteints de PNH, il a été démontré que les décharges épileptiques avaient leur origine dans l'hippocampe (15). Il serait intéressant de procéder à d'autres enregistrements sur un plus grand nombre d'animaux et avec une technologie plus précise, qui permettrait de spécifier le rôle de l'hippocampe chez les souris HeCo.

### 4.3.2 Rôle des hétérotopies corticales

La prochaine étape afin de mieux connaître l'origine des crises serait également d'étudier quel rôle occupent les hétérotopies dans la genèse et/ou la propagation des crises épileptiques. Pour cela, nous pourrions implanter des électrodes intra-corticales directement dans les hétérotopies. L'étude menée par Ackman (The Journal of Neuroscience, 2009) sur les rats avec une mutation du gène DCX et présentant également des hétérotopies corticales, a démontré que le cortex est à l'origine des crises épileptiques qui sont relayées ensuite par les hétérotopies (29). De même, l'étude menée par le groupe de Chen ZF (Epilepsia, 2000) sur le rat avec des hétérotopies sous-corticales en bande suggère également que les neurones hétérotopiques sont recrutés par les décharges épileptiformes générées par le cortex homotopique (36). Pour aller plus loin, le groupe de recherche de Chevassus-Au-Louis N. (Developmental Neuroscience, 1999) a démontré que chez le rat avec des hétérotopies corticales induites par le MAM, les neurones hétérotopiques intra-hippocampiques forment des « ponts » qui permettent une propagation facilitée des décharges épileptiformes au néocortex (41).

Ainsi, si les hétérotopies corticales chez la souris HeCo font également partie des malformations permettant de propager des activités paroxystiques générées au niveau cortical, cela pourrait indiquer un problème plus global concernant l'ensemble du cortex. Si au contraire les hétérotopies sont à l'origine des crises épileptiques, il serait intéressant d'étudier en quoi ce modèle diffère des autres.

## 4.4 Corrélation entre les anomalies macroscopiques (EEG) et les résultats cellulaires en électrophysiologie

### 4.4.1 Résultats électrophysiologiques

#### a) Corrélation clinique et électro-physiologique

Les résultats électro-physiologiques montrent un seuil d'excitabilité abaissé chez les neurones des souris HeCo qui se manifeste à plusieurs niveaux : un seuil abaissé pour le déclenchement d'un potentiel d'action et une fréquence de décharge des potentiels d'action augmentée ; alors que le potentiel membranaire de repos est

inchangé. Ces observations confirment ainsi au niveau cellulaire ce que nous avons obtenu par l'analyse des enregistrements EEG-vidéos.

#### b) Anomalies du cortex HeCo homotopique

Il est intéressant d'observer que non seulement l'activité électrique des neurones hétérotopiques est anormale par rapport aux résultats WT, mais nous avons également obtenu des résultats similaires au niveau des cellules du cortex homotopique. Ainsi, le cortex homotopique et les hétérotopies pourraient participer à la genèse de décharges paroxystiques. La même conclusion a été obtenue chez d'autres modèles animaux présentant des hétérotopies corticales (18, 36, 42).

Cette observation postule l'hypothèse que le cortex qui semble apparemment normal, ne l'est peut-être pas entièrement. En effet, bien que les cellules semblent avoir rejoint leur destination, elles possèderaient tout de même des propriétés fonctionnelles altérées.

#### 4.4.2 Etude au niveau moléculaire

La prochaine étape dans l'étude de la souris HeCo se situe au niveau moléculaire afin de comprendre l'origine de cette hyperexcitabilité. Le fonctionnement du système inhibiteur GABAergique serait le premier élément à étudier.

En effet, l'étude du système inhibiteur GABAergique chez d'autres modèles animaux d'hétérotopies corticales a mis en évidence une diminution de l'activité inhibitrice de ce système. C'est le cas notamment chez les rats exposés au MAM dont les neurones hétérotopiques présentent une réduction de la fréquence des courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (IPSCs) par rapport aux neurones homotopiques (17). Ces courants sont provoqués par l'entrée d'ions Cl<sup>-</sup> dans le neurone post-synaptique, causant ainsi une augmentation du potentiel de membrane. En d'autres termes, le neurone pré-synaptique inhibiteur va relarguer un neurotransmetteur inhibiteur (par exemple le GABA) qui, en se liant au récepteur post-synaptique, va entraîner une hyperpolarisation du neurone post-synaptique.

Une diminution des courants post-synaptiques inhibiteurs spontanés (IPSCs) qui est donc l'activité unitaire en aval de la synapse, a également été observée chez le rat « tish ». De plus, il a été observé une diminution de la densité des terminaisons GABAergiques pré-synaptiques qui était par ailleurs plus importante dans les neurones homotopiques (18).

L'hypothèse d'une diminution du nombre d'interneurones inhibiteurs a été réfutée chez plusieurs modèles animaux de malformations corticales et d'épilepsie. En effet, chez le rat présentant un trouble de la migration neuronale induite par le froid, l'analyse immunohistochimique montre un nombre préservé de neurones GABAergiques. La diminution de l'activité du système GABAergique pourrait alors être expliquée par une diminution de la densité des récepteurs GABA-A (43) ou par des anomalies dans les sous-unités du récepteur GABA-A (44). Chez le rat exposé au MAM, il n'a pas non plus été observé de diminution du nombre de neurones GABAergiques (45, 46). A noter que chez la souris HeCo le nombre d'interneurones est inchangé par rapport aux souris WT. En revanche, il a été observé un déplacement de ces neurones dans les hétérotopies (résultats non présentés dans cette étude).

L'une des pistes étudiées pour expliquer cette diminution des IPSCs concerne l'inhibition des neurones pré-synaptiques inhibiteurs. En effet, les résultats obtenus par Calcagnotto et al. (Neuroscience, 2002), sur les rats exposés aux MAM ont mis en évidence une diminution de l'expression des transporteurs au GABA GAT-1 et GAT-3 dans les hétérotopies induisant ainsi une augmentation du niveau de GABA extra-cellulaire (47). Ce résultat suggère qu'il y ait une inhibition du neurone pré-synaptique inhibiteur via l'activation du récepteur pré-synaptique GABA-B par le GABA ambiant ce qui diminuerait les IPSCs.

L'étude des IPSCs représente donc une piste sérieuse à étudier chez la souris HeCo, de même que l'intégrité du système GABAergique.

## 5. CONCLUSION

En conclusion, ce travail a permis de confirmer le statut épileptique des souris HeCo par rapport aux WT. Néanmoins, un enregistrement d'un plus grand nombre d'animaux permettrait de mieux comprendre les caractéristiques épileptiques des souris HeCo ; notamment en ce qui concerne la cinétique de propagation des crises. Un enregistrement intra-cortical des hétérotopies corticales et de l'hippocampe permettrait également de mieux comprendre l'implication de ces structures dans la genèse et la propagation des crises d'épilepsie. Enfin, les anomalies ayant été démontrées au niveau clinique et cellulaire chez la souris HeCo, la prochaine étape serait d'aller rechercher des anomalies sur le plan moléculaire en s'intéressant notamment au fonctionnement du système inhibiteur.

## 6. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail et sans qui rien n'aurait été possible. Je remercie tout particulièrement le Dr. Michel Kielar pour sa disponibilité, son soutien et sa contribution à ce travail et le Dr. Alexandre Croquelois pour sa disponibilité, son implication et sa supervision.

## 7. RÉFÉRENCES

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs165/fr/>, consulté le 15.12.2016.
2. Eastman CL, Fender JS, Temkin NR, D'Ambrosio R. Optimized methods for epilepsy therapy development using an etiologically realistic model of focal epilepsy in the rat. *Exp Neurol.* 2015 Feb;264:150–62.
3. Fisher RS, Boas W van E, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, et al. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia.* 2005 Apr;46(4):470–2.

4. Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*. 2010 Apr;51(4):676–85.
5. Hauser WA, Annegers JF, Kurland LT. Incidence of epilepsy and unprovoked seizures in Rochester, Minnesota: 1935-1984. *Epilepsia*. 1993 Jun;34(3):453–68.
6. Steering Committee on Quality Improvement and Management, Subcommittee on Febrile Seizures American Academy of Pediatrics. Febrile seizures: clinical practice guideline for the long-term management of the child with simple febrile seizures. *Pediatrics*. 2008 Jun;121(6):1281–6.
7. Hauser WA. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*. 1994;35 Suppl 2:S1–6.
8. Cowan LD. The epidemiology of the epilepsies in children. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*. 2002;8(3):171–81.
9. Eriksson KJ, Koivikko MJ. Prevalence, classification, and severity of epilepsy and epileptic syndromes in children. *Epilepsia*. 1997 Dec;38(12):1275–82.
10. Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W. The descriptive epidemiology of epilepsy—A review. *Epilepsy Res*. 2009 Jul;85(1):31–45.
11. Forsgren L, Bucht G, Eriksson S, Bergmark L. Incidence and clinical characterization of unprovoked seizures in adults: a prospective population-based study. *Epilepsia*. 1996 Mar;37(3):224–9.
12. Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA. Descriptive Epidemiology of Epilepsy: Contributions of Population-Based Studies From Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc*. 1996 Jun;71(6):576–86.
13. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain J Neurol*. 2012 May;135(Pt 5):1348–69.
14. Christodoulou JA, Barnard ME, Del Tufo SN, Katzir T, Whitfield-Gabrieli S, Gabrieli JDE, et al. Integration of gray matter nodules into functional cortical circuits in periventricular heterotopia. *Epilepsy Behav*. 2013 Nov;29(2):400–6.
15. Tschuluun N, Jürgen Wenzel H, Doisy ET, Schwartzkroin PA. Initiation of epileptiform activity in a rat model of periventricular nodular heterotopia: *Epileptiform Activity in Rat PNH*. *Epilepsia*. 2011 Dec;52(12):2304–14.
16. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, et al. doublecortin, a Brain-Specific Gene Mutated in Human X-Linked Lissencephaly and Double Cortex Syndrome, Encodes a Putative Signaling Protein. *Cell*. 1998 Jan;92(1):63–72.
17. Karlsson A, Lindquist C, Malmgren K, Asztely F. Altered spontaneous synaptic inhibition in an animal model of cerebral heterotopias. *Brain Res*. 2011 Apr;1383:54–61.
18. Trotter SA, Kapur J, Anzivino MJ, Lee KS. GABAergic Synaptic Inhibition Is Reduced before Seizure Onset in a Genetic Model of Cortical Malformation. *J Neurosci*. 2006 Oct 18;26(42):10756–67.
19. Stefan H, Nimsky C, Scheler G, Rampp S, Hopfengärtner R, Hammen T, et al. Periventricular nodular heterotopia: A challenge for epilepsy surgery. *Seizure*. 2007 Jan;16(1):81–6.

20. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, McNamara JO, et al. La plasticité synaptique. In: Neurosciences. 4th ed. De Boeck; 2008. p. 202–3.
21. Stables JP, Bertram E, Dudek FE, Holmes G, Mathern G, Pitkanen A, et al. Therapy discovery for pharmaco-resistant epilepsy and for disease-modifying therapeutics: summary of the NIH/NINDS/AES models II workshop. *Epilepsia*. 2003 Dec;44(12):1472–8.
22. Löscher W. Experimental models for intractable epilepsy in nonprimate animal species. Raven Press N Y. 1986;25–37.
23. Löscher W. Animal models of intractable epilepsy. *Prog Neurobiol*. 1997 Oct;53(2):239–58.
24. Feng Y, Walsh CA. Mitotic spindle regulation by Nde1 controls cerebral cortical size. *Neuron*. 2004 Oct 14;44(2):279–93.
25. Moroni RF, Inverardi F, Regondi MC, Pennacchio P, Spreafico R, Frassoni C. Genesis of Heterotopia in BCNU Model of Cortical Dysplasia, Detected by Means of in utero Electroporation. *Dev Neurosci* [Internet]. 2013 [cited 2016 Oct 16]; Available from: <http://www.karger.com?doi=10.1159/000355392>
26. Lee KS, Schottler F, Collins JL, Lanzino G, Couture D, Rao A, et al. A genetic animal model of human neocortical heterotopia associated with seizures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 1997 Aug 15;17(16):6236–42.
27. Rosen GD, Azoulay NG, Griffin EG, Newbury A, Koganti L, Fujisaki N, et al. Bilateral subcortical heterotopia with partial callosal agenesis in a mouse mutant. *Cereb Cortex N Y N* 1991. 2013 Apr;23(4):859–72.
28. Smyth MD, Barbaro NM, Baraban SC. Effects of antiepileptic drugs on induced epileptiform activity in a rat model of dysplasia. *Epilepsy Res*. 2002 Aug;50(3):251–64.
29. Ackman JB, Aniksztejn L, Crépel V, Becq H, Pellegrino C, Cardoso C, et al. Abnormal network activity in a targeted genetic model of human double cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Jan 14;29(2):313–27.
30. Lim JS, Kim W, Kang H-C, Kim SH, Park AH, Park EK, et al. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med*. 2015 Apr;21(4):395–400.
31. Wenzel HJ, Robbins CA, Tsai LH, Schwartzkroin PA. Abnormal morphological and functional organization of the hippocampus in a p35 mutant model of cortical dysplasia associated with spontaneous seizures. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2001 Feb 1;21(3):983–98.
32. Kielar M, Tuy FPD, Bizzotto S, Lebrand C, de Juan Romero C, Poirier K, et al. Mutations in *Eml1* lead to ectopic progenitors and neuronal heterotopia in mouse and human. *Nat Neurosci*. 2014 May 25;17(7):923–33.
33. Sun J-J, Huang M, Xiao F, Xi Z-Q. Echinoderm microtubule-associated protein -like protein 5 in anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy. *Iran J Basic Med Sci*. 2015 Oct;18(10):1008–13.
34. Konno D, Shioi G, Shitamukai A, Mori A, Kiyonari H, Miyata T, et al. Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat Cell Biol*. 2008 Jan;10(1):93–101.
35. Schwarz P, Stichel CC, Luhmann HJ. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: loss or preservation of inhibitory interneurons? *Epilepsia*. 2000 Jul;41(7):781–7.

36. Chen ZF, Schottler F, Bertram E, Gall CM, Anzivino MJ, Lee KS. Distribution and initiation of seizure activity in a rat brain with subcortical band heterotopia. *Epilepsia*. 2000 May;41(5):493–501.
37. Reinhold Ilana. *Epilepsy and Electroencephalography in the HeCo Mouse a Mutant Model for Subcortical Band Heterotopia*. 2014.
38. Misulis KE. *Atlas of EEG, Seizure Semiology, and Management*. [Internet]. Oxford: Oxford University Press, USA; 2013 [cited 2016 Sep 8]. Available from: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1426695>
39. Zhang K, Peng B, Sanchez RM. Decreased IH in Hippocampal Area CA1 Pyramidal Neurons after Perinatal Seizure-inducing Hypoxia. *Epilepsia*. 2006 Jun;47(6):1023–8.
40. Al-Mufti F, Claassen J. Neurocritical care: status epilepticus review. *Crit Care Clin*. 2014 Oct;30(4):751–64.
41. Chevassus-Au-Louis N, Jorquera I, Ben-Ari Y, Represa A. Abnormal connections in the malformed cortex of rats with prenatal treatment with methylazoxymethanol may support hyperexcitability. *Dev Neurosci*. 1999 Nov;21(3-5):385–92.
42. Petit LF, Jalabert M, Buhler E, Malvache A, Peret A, Chauvin Y, et al. Normotopic cortex is the major contributor to epilepsy in experimental double cortex. *Ann Neurol*. 2014 Sep;76(3):428–42.
43. Zilles K, Qü M, Schleicher A, Luhmann HJ. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors: Transmitter receptors and migration disorder. *Eur J Neurosci*. 1998 Oct;10(10):3095–106.
44. Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW. Differential downregulation of GABA<sub>A</sub> receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2000 Jul 1;20(13):5045–53.
45. Baraban SC, Wenzel HJ, Hochman DW, Schwartzkroin PA. Characterization of heterotopic cell clusters in the hippocampus of rats exposed to methylazoxymethanol in utero. *Epilepsy Res*. 2000 Apr;39(2):87–102.
46. Colacitti C, Sancini G, DeBiasi S, Franceschetti S, Caputi A, Frassoni C, et al. Prenatal methylazoxymethanol treatment in rats produces brain abnormalities with morphological similarities to human developmental brain dysgeneses. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999 Jan;58(1):92–106.
47. Calcagnotto ME, Paredes MF, Baraban SC. Heterotopic neurons with altered inhibitory synaptic function in an animal model of malformation-associated epilepsy. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2002 Sep 1;22(17):7596–605.