

# UNIVERSITE DE STRASBOURG

ED 414 SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE  
INSERM U 666  
CNRS-UDS UMR 7364

## THÈSE

PRESENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG**  
SPECIALITE NEUROSCIENCES

PAR

**JEAN-BAPTISTE FAURE**

SOUTENUE LE 17 JANVIER 2014

EFFETS METABOLIQUES ET COMPORTEMENTAUX A  
LONG TERME DE L'ADMINISTRATION PRECOCE DE  
CARISBAMATE DANS LE MODELE D'EPILEPSIE  
"LITHIUM-PILOCARPINE" CHEZ LE RAT

**THÈSE DIRIGÉE PAR :**

**MME NEHLIG ASTRID**  
**M. CASSEL JEAN-CHRISTOPHE**

DIRECTEUR DE RECHERCHE INSERM, UNIVERSITE PARIS DESCARTES  
PROFESSEUR DES UNIVERSITES, UNIVERSITE DE STRASBOURG

**RAPPORTEURS :**

**M. DEPAULIS ANTOINE**  
**M. SCHROEDER HENRI**

DIRECTEUR DE RECHERCHE INSERM, UNIVERSITE DE GRENOBLE  
MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE DE LORRAINE

---

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**M. DUPUIS LUC**

CHARGE DE RECHERCHE INSERM, UNIVERSITE DE STRASBOURG









## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le comité de thèse qui m'a fait l'honneur d'accepter de prendre le temps de lire, d'évaluer et de critiquer mon travail de thèse : le Dr. Antoine Depaulis, le Dr. Luc Dupuis et le Dr. Henri Schroeder. Je vous remercie également de votre implication dans notre discussion, que j'ai particulièrement appréciée, lors de ma soutenance.

Mes remerciements les plus sincères vont également au Dr. Astrid Nehlig. Je vous remercie Astrid d'avoir passé tant de temps à m'écouter, à me laisser faire des erreurs pour mieux comprendre, à m'apprendre et à me conseiller, à me soutenir tout au long de cette thèse, ainsi qu'à me faire rencontrer le monde de l'épilepsie dans lequel je sais désormais que je vais poursuivre une nouvelle aventure avec grand plaisir. Je vous remercie pour votre générosité, votre aide et vos conseils.

Je remercie le Pr. Jean-Christophe Cassel pour ses conseils avisés, pour le temps qu'il a passé à m'expliquer cette spécialité qu'est le comportement et celui passé à corriger mon travail. Je le remercie également pour son indulgence et la qualité du travail comportemental qu'il m'a permis d'effectuer.

Je remercie également le Dr. Christian Kelche qui m'a accueilli en tant que directeur du LINC lors de mon arrivée, il m'a permis de réaliser ce travail. Je remercie aussi sa tessiture sifflatoire qui m'a permis de réviser mes classiques grâce aux magnifiques résonances de la cafet' et du couloir !

C'est avec beaucoup de plaisir que je remercie le Dr. Lucas « Habenula Master » Lecourtier. Lucas, merci pour ta confiance et ton amitié. Merci pour ta simplicité, pour ton humour et ta générosité. Merci pour tes conseils et ton soutien. Je te remercie également de m'avoir offert la possibilité de goûter à l'électrophysiologie (et à la DBS !) chez l'animal vigile, mais maintenant TU TE CALMES !

Mes prochains remerciements vont à mon compagnon d' « infortune », de bureau, de blagues et de « pétage de plomb » depuis bientôt 4 ans, Jean-Bastien « El Bibliothécaire » Bott. Merci de m'avoir permis de décompresser, merci pour nos discussions scientifiques ou non, et surtout merci pour nos non-discussions qui n'étaient pour la plupart du temps pas dans la langue de Molière ! Et n'oublie pas, ce n'est pas la même chose que d'avoir de l'originalité et du caractère !

Je remercie aussi José Eduardo Marques Carneiro da Silva (oui oui, c'est une seule et même personne). Merci à toi pour ta sympathie et ton sourire permanent. Merci aussi pour nos discussions sur l'épilepsie car tu étais le seul à être dans le même bateau que moi au labo !

Je remercie Brigitte Cosquer et Karin Geiger. Merci à vous deux les filles pour la bonne humeur que vous avez imposée à notre bureau du LINC puis du LNCA. Merci pour votre aide dans mon travail de thèse, et merci pour votre professionnalisme (oui vous savez être sérieuses quand il le faut !).

Je remercie aussi Arielle Ferrandon et Estelle Koning qui étaient avec moi dans le bureau (surchauffé) de l'Unité INSERM 666. Je vous remercie pour la bonne ambiance qui régnait là-bas, et je vous remercie pour votre aide indéfectible dans mes manip.

Je remercie le Dr. Alexandra Barbelivien qui m'a appris le fonctionnement et les secrets du 5-choice serial reaction time task (5-CSRTT pour les intimes), et qui m'a aidé dans l'analyse des (nombreux) résultats.

Je remercie également tous mes collègues du LINC puis du LNCA pour leur aide, leur. Les vieux de la vieille, les Drs. Pierre-Henri « PH » Moreau, Marc-Antoine « Marcoperfield » Muller (merci pour le montage des coupes fragiles des rats li-pilo, mais ta précision t'as permis de ne même pas ressentir la difficulté !) et Michaël « El amigo » Loureiro (merci pour tes blagues toujours à la limite du bide). Merci à Matthieu « Zwilly » Fonteneau pour son authenticité (et son rire). Merci au Dr. Pascal « Le bien urbain » Romieu pour ses craquages dans le couloir ou la cafet' et ses blagues de fou. Merci au Dr. Romain Goutagny pour son aide sur MATLAB et pour ses pépites humoristiques du net. Special thank to Jyoti who was waiting for a so long time that at least someone says the F word! You helped me, improving

my (correct) English last weeks! Good luck! Merci à Victor pour sa sympathie et son humour, la suite de ta thèse s'annonce bien, surtout avec un superviseur comme ça ! (et surtout avec le bureau que tu as maintenant !!!). Je remercie Gladys Akimana qui a réalisé une partie du travail comportemental chez les li-pilo. Merci pour ton aide et ton sourire !

Je remercie Jonathan et Anthony pour leur aide au quotidien, vous m'apportez le bol d'air qui a été nécessaire, notamment, au travail effectué lors de cette thèse ! Merci pour votre sympathie et votre professionnalisme. Merci aussi à Catherine pour toutes ces années !

Je remercie mes parents pour m'avoir toujours soutenu, conseillé, et permis de poursuivre mes études jusque là. Je remercie mon frère, Clément, pour son soutien. Courage, tu vas y arriver, j'ai confiance en toi !

Et bien sûr, last but clearly not least, je te remercie, Audrey, ma femme, pour ton soutien, pour ton amour et pour ton courage qui te permet (entre autres) de me supporter au quotidien (et j'peux t'dire qu'c'est pas fini !)...



## COMMUNICATIONS

### Publications présentées dans ce manuscrit de thèse :

**Faure JB**, Akimana G, Carneiro JE, Cosquer B, Ferrandon A, Geiger K, Koning E, Penazzi L, Cassel JC, Nehlig A (2013) A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia* 54:1203-1213.

**Faure JB**, Marques-Carneiro JE, Akimana G, Cosquer B, Ferrandon A, Herbeaux K, Koning E, Barbelivien A, Nehlig A, Cassel JC. The first assessment of attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy. *Epilepsia*, *sous presse*.

Hadera MG, **Faure JB**, Berggaard N, Tefera TW, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A, Sonnewald Ursula. Consequences of early carisbamate treatment on brain metabolism in the lithium-pilocarpine model: a <sup>13</sup>C NMR study in rats. *Manuscrit en preparation*.

### Publications issues de collaborations pendant la thèse :

Marques-Carneiro JE, **Faure JB**, Cosquer B, Koning E, Ferrandon A Barbelivien A, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC, Nehlig A. Anxiety and locomotion in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): The need for Wistar rats as an essential control. *En revision chez Epilepsia*.

Marques-Carneiro JE, **Faure JB**, Barbelivien A, Nehlig A, Cassel JC. Normal sustained attention but altered memory in GAERS. *Manuscrit en preparation pour Epilepsia*.

### Communications orales :

L'effet « modificateur de pathologie » du carisbamate dans le modèle lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal se traduit par des fonctions cognitives préservées. *Colloque*

*de la Société Cerveau et Maladies Cérébro-vasculaires (SCMC), Paris (France), janvier 2012.*

The disease-modifying effect of carisbamate in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy translates into preserved cognitive functions. *10<sup>th</sup> European Congress on Epileptology (ECE), Londres (Royaume-Uni), septembre-octobre 2012.*

### Communications affichées :

Marques-Carneiro JE, **Faure JB**, Araujo MGL, Cassel JC, Fernandes MJS, Nehlig A. Anxiety in GAERS rats, a genetic strain of absence epilepsy: use the right control or catch the wrong effect. *17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), Aguas de Lindoia (Brésil), août 2012.*

**Faure JB**, Fernandes MJS, Nehlig A. Consequences of early postnatal drug treatment on the expression of spike-and-wave discharges in adult Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). *30<sup>th</sup> International Epilepsy Congress (IEC), Montréal (Canada), juin 2013.*

Marques-Carneiro JE, **Faure JB**, Fernandes MJS, Nehlig A, Cassel JC. Broad behavioral evaluation of the GAERS absence epilepsy model: inclusion of the Wistar strain as a second control. *30<sup>th</sup> International Epilepsy Congress (IEC), Montréal (Canada), juin 2013.*







## SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX .....	1
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS .....	5
AVANT-PROPOS .....	7
OBJECTIFS .....	9
INTRODUCTION.....	13
PREMIERE PARTIE : LA CLASSIFICATION INTERNATIONALE DES CRISES ET DES EPILEPSIES ET L'EPIDEMIOLOGIE DES EPILEPSIES.....	15
1. LA CLASSIFICATION INTERNATIONALE DES CRISES ET DES EPILEPSIES.....	17
2. L'EPIDEMIOLOGIE DES EPILEPSIES.....	21
2.1. Difficultés générales.....	21
2.2. Les études fiables .....	21
DEUXIEME PARTIE : L'EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL .....	24
1. L'EPIDEMIOLOGIE DE L'EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL.....	27
2. L'ETIOLOGIE DE L'EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL .....	28
2.1. Les crises fébriles .....	28
2.2. Les traumatismes crâniens .....	29
2.3. L'état de mal épileptique.....	30
3. LES CRISES DANS L'EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL.....	31
3.1. Les symptômes critiques .....	31
3.2. Les symptômes post-critiques .....	32
3.3. Les symptômes inter-critiques .....	32
3.4. Les symptômes pré-critiques.....	33
4. LES LESIONS ET REORGANISATIONS CEREBRALES .....	34
4.1. Les modifications hippocampiques .....	34
4.1.1. La sclérose de l'hippocampe .....	34
4.1.2. Le bourgeonnement des fibres moussues.....	36
4.1.3. L'altération des interneurons .....	38
4.1.4. La dispersion des cellules granulaires .....	38

4.1.5. La neurogenèse.....	39
4.2. Les modifications extra-hippocampiques.....	40
4.2.1. L'amygdale.....	40
4.2.2. La région parahippocampique .....	41
4.2.3. Le thalamus .....	42
4.2.4. Le cervelet.....	42
4.2.5. Les autres structures cérébrales.....	43
5. LES PERTURBATIONS METABOLIQUES .....	44
6. LES TROUBLES COGNITIFS ET COMPORTEMENTAUX .....	46
6.1. Les troubles mnésiques .....	46
6.1.1. Mémoire spatiale et navigation .....	48
6.2. Les troubles attentionnels.....	49
6.3. L'anxiété et la dépression.....	50
7. LES TRAITEMENTS .....	52
7.1. Les antiépileptiques.....	52
7.1.1. Action sur les canaux sodium et calcium voltage-dépendants.....	53
7.1.2. Action sur le système GABAergique .....	54
7.1.2. Autre action, action mixte ou inconnue .....	54
7.2. La résection chirurgicale .....	56
7.3. La stimulation profonde .....	59
7.4. Le régime cétogène .....	60
7.5. Une nouvelle stratégie, l'intervention précoce pendant ou après l'événement initial : l'exemple du carisbamate.....	61
7.5.1. Description du carisbamate .....	62
7.5.2. Les effets <i>in vitro</i> .....	63
7.5.3. Les effets <i>in vivo</i> chez le rongeur.....	64
7.5.4. Les effets chez le patient .....	66
TROISIEME PARTIE : LE MODELE LITHIUM-PILOCARPINE.....	70
1. L'ETAT DE MAL CONVULSIF .....	74
1.1. L'induction .....	74
1.2. Le maintien.....	80
1.3. La mise en place des lésions .....	80

2. LA PERIODE DE LATENCE .....	83
2.1. Les lésions .....	83
2.2. Les réorganisations.....	84
2.3. Le comportement.....	85
3. LA PERIODE CHRONIQUE .....	87
3.1. Les crises .....	87
3.2. Le comportement.....	88
4. LES TRAITEMENTS .....	92
4.1. Les antiépileptiques.....	92
4.2. Les antiépileptogènes (modification de l'événement initial ou de la période de latence) .....	92
4.2.1. Les traitements testés n'ayant aucun effet.....	93
4.2.2. Les traitements permettant de modifier l'épilepsie et/ou ses conséquences .....	95
MATERIELS ET METHODES .....	108
1. ANIMAUX .....	110
2. INDUCTION DE L'ETAT DE MAL LITHIUM-PILOCARPINE .....	111
3. TRAITEMENT PAR LE CARISBAMATE.....	112
4. RECUPERATION ET CONTROLE VIDEO DES CRISES .....	113
5. LES TESTS COMPORTEMENTAUX .....	114
5.1. L'actographie .....	114
5.2. Le test de franchissement d'une barre étroite surélevée (« test de la barre ») .....	115
5.3. Le test du champ ouvert ( <i>open field</i> ).....	116
5.4. Le test du labyrinthe en croix surélevé.....	117
5.5. Le test de la piscine de Morris .....	119
5.5.1. Entraînement à la tâche en utilisant une plate-forme visible .....	120
5.5.2. Apprentissage et rétention de mémoire spatiale à long-terme avec la plate-forme immergée.....	121
5.5.3. Evaluation de la motivation, de la motricité et de la vision : le test de la plate- forme visible.....	122
5.5.4. Evaluation de la mémoire spatiale de travail avec la plate-forme immergée.....	122
5.5.5. Evaluation de la mémoire procédurale avec la plate-forme immergée .....	123
5.6. Le test du labyrinthe en double-H .....	124

5.7. Le test du labyrinthe radial à huit branches.....	126
5.8. Le test de temps de réaction sérielle à cinq choix ( <i>5-choice serial reaction time task</i> ) .....	128
5.8.1. Entraînement .....	129
5.8.2. Tests .....	131
6. LA SPECTROSCOPIE A RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE DU <sup>13</sup> C .....	133
6.1. Prélèvement.....	135
6.2. Extraction .....	135
6.3. La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire.....	136
6.4. Obtention des spectres et identification des pics.....	137
CONTRIBUTION EXPERIMENTALE.....	140
1. PUBLICATION 1 : EVALUATION DES EFFETS DU CARISBAMATE SUR LES ALTERATIONS COMPORTEMENTALES ET COGNITIVES DANS LE MODELE LITHIUM- PILOCARPINE D'ÉPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL CHEZ LE RAT .....	142
2. PUBLICATION 2 : EVALUATION DES EFFETS DU CARISBAMATE SUR L'ATTENTION ET LES PROCESSUS INHIBITEURS ET DECISIONNELS DANS LE MODELE LITHIUM- PILOCARPINE D'ÉPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL CHEZ LE RAT .....	162
3. PUBLICATION 3 : EVALUATION DES EFFETS DU CARISBAMATE SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE NEURONAL ET ASTROCYTAIRE DANS LE MODELE LITHIUM-PILOCARPINE D'ÉPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL CHEZ LE RAT.....	182
DISCUSSION.....	232
1. QUELS ETAIENT LES OBJECTIFS DE CETTE THESE ?.....	234
2. QUELS SONT LES RESULTATS OBTENUS ? .....	236
2.1. Chez les rats lithium-pilocarpine non-traités .....	236
2.2. Chez les rats traités par le carisbamate.....	238
2.3. Au niveau du métabolisme énergétique .....	238
3. QU'APPORTE LA CONTRIBUTION EXPERIMENTALE AUX CONNAISSANCES DU MODELE LITHIUM-PILOCARPINE ? .....	241
4. QUEL EST L'EFFET DU CARISBAMATE SUR L'ÉPILEPTOGENESE ? .....	243

5. COMMENT EXPLIQUER LA DIFFERENCE ENTRE LES EFFETS COMPORTEMENTAUX ET METABOLIQUES DU CARISBAMATE ? .....	245
6. VERS L'APPLICATION DU CARISBAMATE COMME TRAITEMENT DE L'ETAT DE MAL .....	246
7. VERS L'AMELIORATION DE LA RECHERCHE PRECLINIQUE DE L'ANTIEPILEPTOGENESE.....	247
8. CONCLUSION .....	248
BIBLIOGRAPHIE .....	251

# LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : EXEMPLES DE TRAITEMENTS N'AYANT AUCUN EFFET DANS DES PROTOCOLES VISANT L'ÉPILEPTOGENESE .....	94
TABLEAU 2 : EXEMPLES DE TRAITEMENTS NEUROPROTECTEURS AYANT OU NON UN EFFET SUR LE COMPORTEMENT .....	97
TABLEAU 3 : EXEMPLES DE TRAITEMENTS NEUROPROTECTEURS AYANT OU NON UN EFFET SUR LE COMPORTEMENT .....	98
TABLEAU 4 : EXEMPLES DE TRAITEMENTS AYANT UN EFFET ANTIEPILEPTOGENE.....	102
TABLEAU 5 : EXEMPLES DE TRAITEMENTS AYANT UN EFFET ANTIEPILEPTOGENE.....	103
TABLEAU 6 : EXEMPLES DE TRAITEMENTS AYANT UN EFFET ANTIEPILEPTOGENE.....	104



# LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : EXEMPLE D'ACTIVITE INTER-CRITIQUE SUR L'ACTIVITE EEG CHEZ UNE PATIENTE AVEC ELT MÉSIALE (JAVIDAN, 2012) .....	33
FIGURE 2 : EXEMPLES DE CLICHES IRM A 7 TESLA OBTENUS CHEZ DES SUJETS SAINS (A GAUCHE) AVEC UN HIPPOCAMPE NORMAL (FLECHES), ET CHEZ DES PATIENTS (A DROITE) AVEC ELT MÉSIALE ET SH DROIT EN A ET GAUCHE EN B, C ET D (FLECHES) (HENRY ET AL., 2011).....	35
FIGURE 3 : LES DIFFERENTS TYPES DE SH. A : SH DE TYPE 1. B : SH DE TYPE 2. C : SH DE TYPE 3. D : PAS DE SH, SEULEMENT UNE GLIOSE. IMMUNOHISTOCHEMIE : NEUN ET HEMATOXYLINE). (BLÜMCKE ET AL., 2013).	36
FIGURE 4 : BOURGEONNEMENT DES FIBRES MOUSSUES CHEZ UN PATIENT AVEC ELT (MARQUAGE TIMM). A : BOURGEONNEMENT IMPORTANT (FLECHES) DANS LA COUCHE MOLECULAIRE INTERNE DU GYRUS DENTE. B : GROSSISSEMENT. C : COUPE MARQUEE AU VIOLET DE CRESYL (SUTULA ET AL., 1989) .....	37
FIGURE 5 : PHOTOGRAPHIE DE LA COUCHE DES CELLULES GRANULAIRES DU GYRUS DENTE. A : SUJET SAIN. B : PATIENT AVEC ELT ET DISPERSION DE LA COUCHE DES CELLULES GRANULAIRES. (HOUSER, 1990).....	39
FIGURE 6 : EXEMPLES D'AE DONT LES MECANISMES D'ACTION SONT REGROUPES SELON QU'ILS DIMINUENT L'EXCITATION OU QU'ILS AUGMENTENT L'INHIBITION (GUNTORPE ET AL., 2012).....	56
FIGURE 7 : SCHEMA D'UNE RESECTION CLASSIQUEMENT PRATIQUEE DANS L'ELT. A GAUCHE, FACE LATÉRALE DU CERVEAU HUMAIN, RESECTION MAXIMALE AU NIVEAU TEMPO-LATERAL. A DROITE, FACE INFÉRIEURE DU CERVEAU, RESECTION MINIMALE AU NIVEAU TEMPORO-MEDIAN (WIEBE ET AL., 2001).....	59
FIGURE 8 : STRUCTURE CHIMIQUE DU CARISBAMATE : (S)-2-O-CARBAMOYL-1-O-CHLOROPHENYL-ETHANOL (LIU ET AL., 2009).....	63
FIGURE 9 : MECANISMES INTRACELLULAIRES LIES A L'ACCUMULATION D'INOSITOL-3-PHOSPHATE (IP3) INDUITE PAR LE LITHIUM (PI : PHOSPHATIDYL-INOSITOL ; PIP : PHOSPHATIDYL-INOSITOL-PHOSPHATE ; PIP <sub>2</sub> : PHOSPHATIDYL-INOSITOL-2-PHOSPHATE ; PLC : PHOSPHOLIPASE C ; DAG : DIACYLGLYCEROL ; PKC : PROTEINE KINASE C) (MODIFIE A PARTIR DE GOULD ET AL., 2004) .....	75
FIGURE 10 : TRACE EEG DE BASE AVANT INJECTION DE PILOCARPINE CHEZ UN RAT .....	78
FIGURE 11 : TRACE EEG JUSTE APRES L'INJECTION DE PILOCARPINE CHEZ UN RAT : DIMINUTION DE L'AMPLITUDE .....	78



FIGURE 12 : TRACE EEG DURANT LA PREMIERE CRISE APRES INJECTION DE PILOCARPINE CHEZ UN RAT : AUGMENTATION DE LA FREQUENCE ET DE L'AMPLITUDE DU TRACE (5EME LIGNE), SUIVIE D'UNE REDUCTION DE L'AMPLITUDE ET DE LA FREQUENCE A LA FIN DE LA CRISE .....	79
FIGURE 13 : TRACE EEG APRES 40 MIN D'EdM CHEZ UN RAT : ON OBSERVE DES TRAINS DE DECHARGES REPETES .....	79
FIGURE 14 : TRACE EEG APRES 5H30 D'EdM CHEZ UN RAT : LES TRAINS DE DECHARGES ONT LAISSE PLACE A DES DECHARGES POLYEPILEPTIFORMES, QUI SONT LE REFLET DE LA POURSUITE DE L'EdM.....	79
FIGURE 15 : CRISE MOTRICE SPONTANEE ENREGISTREE EN EEG PENDANT LA PHASE CHRONIQUE CHEZ UN RAT LITHIUM-PILOCARPINE. L'ACTIVITE SE MODIFIE (FIN DE LA 2EME LIGNE) POUR LAISSER PLACE A UN RYTHME THETA QUI SERA SUIVI PAR LA CRISE MOTRICE (FIN DE LA 5EME LIGNE).....	88
FIGURE 16 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF D'ACTOGRAPHIE.....	114
FIGURE 17 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DU TEST DE LA BARRE .....	115
FIGURE 18 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DU CHAMP OUVERT .....	116
FIGURE 19 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE.....	117
FIGURE 20 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DE LA PISCINE DE MORRIS .....	119
FIGURE 21 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DU LABYRINTHE EN DOUBLE-H .....	124
FIGURE 22 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DU LABYRINTHE RADIAL A HUIT BRANCHES .....	126
FIGURE 23 : PHOTOGRAPHIES DU DISPOSITIF DU 5-CHOICE SERIAL REACTION TIME TASK .....	128
FIGURE 24 : SCHEMA DES DIFFERENTES REPONSES ENREGISTRABLES DANS LE 5-CHOICE SERIAL REACTION TIME TASK .....	128
FIGURE 25 : PHOTOGRAPHIE DU DISPOSITIF DE SPECTROSCOPIE RMN ( <a href="http://www.ntnu.edu/inm/neurometabolism/research">HTTP://WWW.NTNU.EDU/INM/NEUROMETABOLISM/RESEARCH</a> ) .....	133
FIGURE 26 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PERTURBATIONS METABOLIQUES DANS LES STRUCTURES LIMBIQUES DES DIFFERENTS GROUPES (ADAPTE DE MELO ET AL., 2007).....	184
FIGURE 27 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PERTURBATIONS METABOLIQUES DANS L'HIPPOCAMPE POUR LES DIFFERENTS GROUPES (ADAPTE DE MELO ET AL., 2007).....	185
FIGURE 28 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES PERTURBATIONS METABOLIQUES DANS LE THALAMUS POUR LES DIFFERENTS GROUPES (ADAPTE DE MELO ET AL., 2007).....	186

## LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

AE : Antiépileptique

CA : Corne d'Ammon

EdM : Etat de mal

EEG : Electroencéphalographie

ELT : Epilepsie du lobe temporal

GABA : Acide gamma amino-butyrique

GAERS : *Genetical Absence Epilepsy Rat from Strasbourg*

HPLC : *High Performance Liquid Chromatography*

SH : Sclérose de l'hippocampe

ILAE : *International League Against Epilepsy*

IRM : Imagerie par résonance magnétique

NAA : N-acétylaspartate

NINDS : *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*

RMN : Résonance magnétique nucléaire



## AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse a débuté au moment où j'ai effectué mon stage de master au sein des unités INSERM 666 et CNRS-UdS 7237 (à présent URM 7364). Lorsque je suis arrivé dans le groupe d'Astrid Nehlig, une étudiante en thèse venait de montrer que le carisbamate (qui était alors en examen pour obtenir une autorisation de mise sur le marché américain en tant qu'antiépileptique) permettait, dans le modèle lithium-pilocarpine, de modifier l'état de mal puis l'épilepsie chronique quand il était administré à partir d'une heure après l'état de mal chez le Rat.

C'était la première fois qu'un traitement présentait une telle efficacité. Il entraînait la suppression des crises motrices spontanées dues à la pilocarpine chez environ la moitié des rats. De plus, il provoquait chez ces animaux l'apparition de décharges de pointes-ondes corticales bilatérales synchrones caractéristiques de l'épilepsie-absences humaine. Ces crises d'absences répondaient très bien aux antiépileptiques classiques.

Actuellement, tous les traitements utilisés en clinique sont ce qu'on appelle à tort des « antiépileptiques », mais ils correspondent en réalité à des « anticrises » ou « anticritiques ». En effet, ces traitements diminuent la gravité des crises ou les suppriment le temps du traitement dans le meilleur des cas, mais ils ne suppriment pas l'épilepsie elle-même.

La recherche pharmacologique actuelle s'oriente vers des traitements « antiépileptogènes », c'est-à-dire qui empêchent l'épilepsie de se développer. Cela sous-entend une action avant la phase chronique de l'épilepsie. L'idéal serait évidemment un réel « antiépileptique » qui serait capables de supprimer la pathologie, même une fois celle-ci installée de manière chronique. Ce but semble tout de même irréaliste étant donné les réorganisations mises en place pendant la période d'épileptogénèse.

Dans ce contexte, le carisbamate paraissait être un très bon candidat au vu de son effet chez le Rat. Il semblait donc nécessaire d'étudier plus spécifiquement l'effet de ce traitement, utilisé en tant qu'antiépileptogène, au niveau du comportement puisque les troubles cognitifs et comportementaux sont fortement présents chez les patients et constituent la plainte la plus importante.

## AVANT-PROPOS

Un travail de collaboration entre Astrid Nehlig (unité INSERM 666) et Jean-Christophe Cassel (UMR CNRS-UNISTRA 7237, aujourd'hui UMR 7364) s'est mis en place afin de réaliser une étude comportementale aussi complète que possible dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal chez le Rat, le modèle lithium-pilocarpine. C'est la volonté de m'engager dans cette aventure qui a donné naissance au travail de thèse que je consigne dans le présent mémoire. De nombreux tests ont donc été sélectionnés pour pouvoir évaluer un grand nombre de fonctions telles que la locomotion, l'habituation, l'anxiété, différents types de mémoire, l'attention et le contrôle inhibiteur. Ce travail a permis de caractériser le comportement des rats traités avec le carisbamate selon qu'ils expriment des crises motrices ou des crises de type absence. Cette évaluation a également permis d'approfondir les connaissances sur le comportement des rats du modèle lithium-pilocarpine. Cette caractérisation comportementale a été complétée par une quantification des lésions provoquées par l'état de mal et du degré de protection liée au carisbamate dans des structures jouant un rôle-clé dans l'épilepsie du lobe temporal et dans les comportements étudiés.

L'équipe dirigée par Astrid Nehlig a récemment étudié, en collaboration avec le groupe d'Ursula Sonnewald à Trondheim (Norvège), le métabolisme des deux modèles grâce à la technique de la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), qui est le domaine de compétence du groupe Norvégien. Nous avons donc collaboré avec Ursula Sonnewald pour étudier le métabolisme neuronal et astrocytaire durant la phase chronique chez les rats traités par le carisbamate selon le même protocole que pour les évaluations comportementales, qu'ils aient des crises motrices ou qu'ils n'en développent pas, de façon à caractériser le métabolisme avec ou sans traitement par le carisbamate.

Il est vrai que l'épilepsie du lobe temporal a beaucoup été étudiée (et elle l'est toujours) d'un point de vue histologique, électrophysiologique ou moléculaire. Toutefois, il manque souvent l'évaluation du métabolisme et du comportement, notamment bien que ce dernier fasse depuis peu de temps l'objet d'études plus approfondies qu'au cours des dernières décennies. Rappelons simplement que les déficits cognitifs sont jugés comme les plus handicapants par les patients. C'est ici l'analyse de ces deux éléments fonctionnels que je propose de vous présenter au niveau de l'effet du carisbamate.

## OBJECTIFS

## OBJECTIFS

Les objectifs de cette thèse sont les suivants :

**1) d'approfondir et d'enrichir les connaissances comportementales dans le modèle lithium-pilocarpine.**

La littérature sur le modèle lithium-pilocarpine s'est focalisée principalement sur la mémoire spatiale à long-terme et sur l'anxiété. Il est important de compléter ces connaissances par l'étude plus précise de différents systèmes de mémoire (mémoire à long-terme, mémoire de travail, mémoire procédurale), ainsi que celle de l'attention et du contrôle inhibiteur, qui sont également touchés chez le patient épileptique. De plus, l'évaluation de la locomotion et du système sensorimoteur doivent faire l'objet d'une caractérisation, puisqu'ils sont des sources potentielles de biais dans les tests comportementaux utilisés.

**2) La caractérisation de l'effet antiépileptogène du carisbamate au niveau de ses éventuelles manifestations comportementales (motricité, anxiété, mémoires, attention).**

Le groupe a montré un effet antiépileptogène du carisbamate, ce qui est tout à fait nouveau. Cependant, il est indispensable d'évaluer l'effet de l'antiépileptogène au niveau des comorbidités liées à l'épilepsie, telles que les troubles comportementaux. En effet, un traitement permettant une suppression des crises motrices, mais qui ne serait pas accompagnée d'une amélioration comportementale, aurait beaucoup moins d'intérêt d'un point de vue thérapeutique. En effet, comme souligné plus haut, les troubles cognitifs sont la plainte majeure des patients épileptiques. De plus, la prévention des crises motrices pourrait avoir un effet non négligeable sur les capacités comportementales des animaux. Il est donc nécessaire d'étudier l'impact de la modification de la pathologie épileptique induite par le carisbamate au niveau comportemental.

## OBJECTIFS

### **3) La caractérisation de l'effet antiépileptogène du carisbamate au niveau du métabolisme (neuronal et astrocytaire).**

La compréhension des conséquences fonctionnelles de la modification de la pathologie épileptique induite par le carisbamate nécessite également l'évaluation des changements métaboliques cérébraux, en particulier au niveau neuronal, astrocytaire, mais aussi des échanges entre neurones et astrocytes dans les différentes régions cérébrales. Les modifications présentes lors de la phase chronique pourraient expliquer les modifications observées chez les rats ayant reçu du carisbamate. De plus, il est important de vérifier si on peut observer une différence métabolique entre les animaux présentant des crises motrices après le traitement au carisbamate et ceux chez qui n'en auront pas développé.







# INTRODUCTION



PREMIERE PARTIE :  
LA CLASSIFICATION INTERNATIONALE DES  
CRISES ET DES EPILEPSIES ET L'EPIDEMIOLOGIE  
DES EPILEPSIES



# 1. La classification internationale des crises et des épilepsies

Avant de faire de l'épilepsie le cœur de mon sujet de thèse, je parlais de « crise » et d'« épilepsie » pour évoquer la même chose. Cette « chose » était grossièrement représentée par des convulsions, une chute et risque énorme de se mordre la langue, l'ensemble étant le plus souvent assez bref. Cette vision est *grosso modo* celle d'un public non-spécialiste, et correspond plus ou moins à une crise tonico-clonique généralisée complexe, avec perte de conscience. Cette représentation est bien éloignée de la richesse qu'englobe le terme d'épilepsie. Il paraît donc indispensable avant toute chose de définir « clairement » l'épilepsie (du moins autant que faire se peut).

Comme dans de nombreuses pathologies, il n'existe pas une seule épilepsie mais des épilepsies. En effet de très nombreuses entités qui peuvent être classées selon différents axes : par exemple, selon la localisation du foyer épileptique, la perte de conscience ou non, le caractère acquis ou inné de l'épilepsie.

Il faut également faire la distinction entre l'épilepsie et la crise épileptique. La ligue internationale contre l'épilepsie (ILAE pour *International League Against Epilepsy*) a récemment proposé les définitions suivantes. La crise est définie par « l'apparition transitoire de signes et/ou symptômes dus à une activité neuronale excessive ou synchronisée anormale dans le cerveau ». L'épilepsie, elle, est « une pathologie cérébrale caractérisée par une prédisposition durable à générer des crises épileptiques et par les conséquences neurobiologiques, cognitives, psychologiques et sociales de cet état » (Fisher et al., 2005). De plus, « la définition d'épilepsie nécessite l'apparition d'au moins une crise épileptique ». Le groupe de travail définit ici comme suffisants des examens indiquant cette « prédisposition durable » associée à l'observation d'une seule crise. Il s'agit là d'un changement de cap par rapport aux définitions précédentes où plusieurs crises étaient nécessaires.

Dans un objectif de travail commun au niveau international et d'une correspondance terminologique, l'ILAE a publié en 1970 une classification clinique et électroencéphalographique (EEG) des crises épileptiques rédigée par le neurologue Henri Gastaut. Ce travail a proposé un système de classification standardisée et uniforme des crises, et uniquement de celles-ci, puisque les syndromes épileptiques n'y étaient pas décrits. L'élément le plus important de cette classification est la distinction entre les crises généralisées, qui le sont depuis le début, et les crises qui sont focales ou partielles au début et qui deviennent « secondairement généralisées ».

Une première révision de cette classification des crises a été publiée après 11 ans d'existence de celle de Gastaut (*Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1981*). Cette publication a été motivée par l'apparition de nouvelles méthodes telles que l'enregistrement simultané des crises en vidéo et EEG avec représentation partagée sur le même écran, ainsi que les connaissances sur la transmission héréditaire potentielle des épilepsies, le pronostic et les thérapies. En effet, une distinction de plus en plus précise entre les différentes formes de crises s'avère nécessaire. Ici, seules la description clinique de la crise et les expressions EEG critique et intercritique ont été retenues, supprimant ainsi les descriptions du substrat anatomique, de l'étiologie et des facteurs d'âge présentes dans la classification de Gastaut. Ces descriptions sont considérées comme basées sur des informations historiques ou spéculatives plutôt que sur des observations directes. L'autre évolution est la séparation des crises partielles en simple et complexe (soit sans ou avec perte de conscience). De plus, cette révision permet une certaine liberté dans la classification des manifestations critiques évoluant de simple à complexe, augmentant ainsi la précision de la description. La crise partielle est définie comme celle où les premiers changements cliniques et EEG indiquent « une activation initialement limitée à un système de neurones dans une partie d'un hémisphère cérébral » et la crise généralisée « une implication des deux hémisphères ». Une dernière catégorie est celle des crises « non-classées » pour cause de manque ou d'inadéquation de données. Une définition des crises prolongées ou répétées, ou état de mal (EdM), est également donnée : « une crise qui dure suffisamment longtemps ou répétée assez fréquemment pour que le retour à la normale entre les crises ne soit pas possible ». Il est précisé que cette révision n'est pas une classification des épilepsies mais bien des crises. Ce qui appelle la création d'une classification des épilepsies qui sera publiée par la suite.

Une révision de la classification des épilepsies et syndromes épileptiques est donc publiée après huit années supplémentaires (*Commission on Classification and Terminology of the ILAE*, 1989), avec pour but de compléter la révision précédente. Elle est décrite comme nécessaire parce que les épileptologues communiquent en termes de syndromes plutôt que de type de crise. Le syndrome épileptique est défini ici comme un « trouble épileptique caractérisé par un groupe de signes et symptômes apparaissant habituellement ensemble » et inclut « le type de crise, l'étiologie, l'anatomie, les facteurs précipitant, l'âge d'apparition, la sévérité, la chronicité, le cycle diurne et circadien, et quelquefois le pronostic ». Lorsque la révision de la classification des crises donne une importance majeure au type de crise clinique et EEG, la classification des épilepsies s'appuie également sur ce paramètre (« épilepsies avec crises généralisées » ou « épilepsies avec crises partielles/focales »), mais elle met aussi l'accent sur l'étiologie de l'épilepsie. Ainsi sont distinguées les épilepsies qui ont une étiologie connue, ou épilepsies secondaires ou « symptomatiques », les épilepsies primaires ou « idiopathiques », et les épilepsies « cryptogéniques ».

La révision la plus récente (Berg et al., 2010) nous incite à redéfinir la crise généralisée comme « apparaissant dans et engageant rapidement des réseaux distribués bilatéralement », et la crise focale comme « apparaissant dans des réseaux limités à un hémisphère et soit localisés discrètement soit plus largement distribués ». En ce qui concerne les épilepsies, on nous propose de remplacer le terme « idiopathique » par « génétique », « symptomatique » par « structural-métabolique » et « cryptogénique » par « inconnu », ce qui permettra de clarifier la classification. Cette dernière révision est plus flexible puisqu'une fois le ou les types de crise définis, une ou plusieurs causes à l'épilepsie peuvent être attribuées et le clinicien est libre d'ajouter les observations qu'il juge nécessaire.

**Résumé : Ces classifications sont indispensables au travail du chercheur puisqu'elles sont une base permettant de développer des modèles ou de vérifier la validité de ceux qui existent déjà à pouvoir reproduire les différents aspects de la pathologie d'intérêt. Il faut toutefois avoir un regard critique sur ces outils cliniques, car ils sont uniquement le reflet des connaissances sur les pathologies au moment de la publication et du point de vue du clinicien.**





## 2. L'épidémiologie des épilepsies

### 2.1. Difficultés générales

Il semblerait qu'étudier l'épidémiologie des épilepsies ne soit pas chose aisée. En effet, plusieurs revues dressent un bilan des études épidémiologiques existantes et ce bilan n'est pas en faveur d'une parfaite cohérence entre les études. Dans sa revue de 2003, Josemir Sander rappelle les raisons de ces difficultés : problèmes méthodologiques et hétérogénéité de l'épilepsie (Sander, 2003). Par ailleurs, Banerjee et al. (2009) nous indiquent que les auteurs n'utilisent pas toujours les définitions de l'ILAE. Par ailleurs, lorsqu'ils en ont utilisé une, ils ne précisent pas toujours laquelle. Il semble également que les études peuvent sous-estimer le nombre de patients car certaines familles cachent l'épilepsie à cause de la pression sociale (dans certaines cultures) ou de la peur de perdre l'emploi ou le permis de conduire. De plus, les différences obtenues au niveau de la prévalence peuvent être biaisées par les conditions sanitaires du pays, les structures médicales et les programmes de santé.

### 2.2. Les études fiables

L'étude la plus fiable dont nous disposons est celle de Hauser et al. (1996) réalisée sur la population de Rochester (Minnesota) entre 1935 et 1984. Elle prend uniquement en compte les crises qui sont distinguées selon le type et non l'origine. Ainsi, l'incidence de la population épileptique de cette étude est représentée à 36 % par des crises « partielles complexes », 14 % par des crises « partielles simples » et 7 % par des crises partielles « inconnues » (soit 57 % de crises partielles). Les crises généralisées tonico-cloniques représentent 23 % de l'incidence, les crises d'absence 6 %, les crises myocloniques 3 % et les « autres crises généralisées » 8 % (soit 40 % de crises généralisées). Enfin, 3 % des crises sont « non-classées ». Dans cette étude, les auteurs rapportent une prévalence active (toutes épilepsies avec crises non-contrôlées au moment de l'évaluation) de 6,8 cas pour 1000 en 1980. Cependant, cette étude a des limites. Elle concerne un pays développé, les Etats-Unis, et

a été réalisée à un moment donné. Elle ne reflète donc pas forcément la situation actuelle et certainement pas la situation des pays en développement. Le problème majeur de ce genre d'étude est qu'elle manque de précision puisqu'elle se base uniquement sur le type de crises et non sur l'étiologie de l'épilepsie.

Sander (2003) indique dans sa revue que l'incidence moyenne de l'épilepsie est de 50/100000 personnes/an (entre 40 et 70/100000 personnes/an selon les études). La prévalence est située entre 4 et 10/1000. Ngugi et al. (2011) montre que les pays développés ont une incidence d'épilepsie trois fois moins élevée que les pays en voie de développement.

**Résumé : De ces études épidémiologiques, il ressort principalement qu'il est difficile d'étudier précisément une forme d'épilepsie. Le même type de crise peut être retrouvé dans différentes formes d'épilepsie sans que les mécanismes sous-jacents ou l'origine soient identiques. Il est nécessaire que des études plus précises, prenant en compte les dernières classifications, soient effectuées car, au-delà de la compréhension de la pathologie, la connaissance de l'impact des différentes formes d'épilepsie permet la mise en œuvre de moyens plus ou moins importants par les politiques de santé publique et ont donc un retentissement à la fois sur les moyens alloués à la clinique et sur ceux consacrés à la recherche.**



DEUXIEME PARTIE :  
L'EPILEPSIE DU LOBE TEMPORAL



L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est considérée comme une épilepsie grave étant donné que les crises qui la constituent sont, pour une partie des patients, réfractaires au traitement. Il faut avant tout rappeler que l'ELT existe sous au moins deux formes différentes : l'ELT latérale (avec un foyer épileptique situé sur la face externe du lobe temporal) et l'ELT mésiale, qui est caractérisée par des lésions du système limbique (hippocampe, cortex entorhinal, amygdale) que l'on considère comme étant le foyer épileptique. L'ELT latérale semble beaucoup moins commune que l'ELT mésiale et elle est peu décrite, peu comprise et d'origine peu connue. Je ferai donc uniquement référence à l'ELT mésiale tout au long de cette thèse.

L'ELT mésiale est en fait considérée comme un syndrome car elle consiste en une série d'éléments associés les uns aux autres mais qui peuvent exister indépendamment dans d'autres conditions. En effet, l'ELT mésiale est souvent liée à la sclérose hippocampique (SH) ou une sclérose mésio-temporale (qui n'affecte pas uniquement l'hippocampe).

De plus, on retrouve généralement chez les patients un « événement initial » au cours de l'enfance (histoire de crises fébriles, EdM). Après cet épisode, une phase de latence de plusieurs années est souvent décrite, suivie de la phase chronique autour de l'âge adulte.

## 1. L'épidémiologie de l'épilepsie du lobe temporal

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'épidémiologie des épilepsies pose problème du fait même qu'il y ait plusieurs épilepsies. Il est donc difficile de décrire l'épidémiologie de l'ELT car elle est souvent mélangée avec les autres épilepsies qui provoquent des crises partielles avec ou sans perte de conscience. De plus, tous les auteurs n'ont pas les mêmes critères pour définir l'épilepsie (en général, il y a une variation dans le nombre de crises nécessaires pour déterminer une personne comme épileptique).

Il faut également garder à l'esprit qu'une différence est faite entre l'ELT mésiale due à une SH et l'ELT mésiale liée à une autre cause. Il est donc d'autant plus difficile de connaître clairement l'épidémiologie des différentes formes.

En effet, dans l'ELT, par exemple, on peut observer à différents moments des crises partielles simples ou complexes, et certaines crises simples peuvent évoluer vers une crise généralisée (dite « secondairement généralisée »).



## 2. L'étiologie de l'épilepsie du lobe temporal

Dans l'histoire naturelle de l'ELT, on parle souvent de période latente (ou de latence), ce qui correspond à la période entre l'événement initial « précipitant » et la première crise.

Chez des enfants avec ELT qui ne sont pas amenés à être opérés, Harvey et al. (1997) montrent que 24/63 (38 %) ont été sujets à un événement périnatal ou pendant la petite enfance qui pourrait être lié à l'ELT et il s'agit de crises pour 20/24 (83 %) (multiples pour 7/24 [29 %], prolongées pour 9/24 [36 %], focales pour 6/24 [25 %], associées à de la fièvre pour 16/24 [67 %]). Une étude plus récente, toujours chez des enfants avec une ELT, relève un nombre inférieur d'événements précédant l'ELT, celui-ci étant de 5/30 (17 %) (Sztrihai et al., 2002). Il est précisé que ces cinq patients ont eu des crises avec perte de conscience pendant plus de 30 min durant l'événement, il s'agit donc d'EdM (fébriles ou pas).

Les études chez le patient indiquent que de multiples causes peuvent être à l'origine de l'ELT. Parmi celles-ci, nous allons voir les crises fébriles, les infections, les traumatismes crâniens et l'EdM.

### 2.1. Les crises fébriles

La crise fébrile est définie par l'ILAE en 1997 comme « une crise épileptique apparaissant pendant l'enfance après l'âge d'un mois, associée à de la fièvre qui n'est pas causée par une infection du système nerveux central, sans crises néonatales ou non-provoquées (spontanées) précédentes, et qui ne correspond pas à des crises symptomatiques aiguës » (*ILAE Commission Report*, 1997). La crise fébrile peut être simple si elle est isolée, brève et généralisée, elle aura alors peu de chances d'être la cause ou l'une des causes de l'ELT. Par contre, elle peut être complexe si elle est focale, multiple (au sein d'un épisode de fièvre) ou prolongée (plus de 10-15 min) (Shinnar et Glauser, 2002), c'est dans cette forme qu'elle est associée à l'ELT.

Dans l'étude de Jacqueline French publiée en 1993 (French et al., 1993), qui s'intéresse à une cohorte de 67 patients ayant subi une chirurgie temporale, 54 patients (soit 81 %) avaient une

histoire de crises convulsives durant l'enfance, et pour 52 d'entre eux elles étaient associées à un épisode de fièvre. Bien que précise, cette étude est biaisée : tous les patients étaient candidats à une opération du lobe temporal et avaient donc une ELT pharmacorésistante. De plus, un second biais est dû au fait que les patients étudiés n'avaient plus de crises après la chirurgie, les patients résistants après chirurgie n'ayant pas été inclus dans l'étude. Une autre étude de 1993 réalisée au Brésil, encore une fois sur des patients candidats à la chirurgie, indique que 35 % des cas ont eu une histoire de convulsions fébriles prolongées (Cendes et al., 1993).

Une étude s'est tout de même intéressée à la présence d'une histoire de crises fébriles dans la population générale (pas de biais dû à l'hôpital ou à la sélection pour chirurgie). Les auteurs relèvent que 20 % de patients diagnostiqués comme ayant des crises partielles complexes ont une histoire de crises fébriles pendant l'enfance contre 2 % chez des sujets contrôles (Rocca et al., 1987). Le problème de cette étude est qu'aucune classification des épilepsies ne faisait consensus à cette date (la première date de 1989, voir plus haut la partie sur les classifications) donc le diagnostic est fait sur les crises et particulièrement ici les crises partielles complexes, qui ne représentent pas toutes les crises présentes dans l'ELT. Il est même probable que d'autres formes d'épilepsie entraînant ce type de crises aient été incluses dans l'étude.

## 2.2. Les traumatismes crâniens

French et al. (1993) n'observent un traumatisme crânien à l'origine de l'épilepsie que chez 10 sur 67 patients de leur étude (environ 15 %). Cependant, encore une fois, il s'agit d'une étude chez des patients candidats à la chirurgie. Mathern et al. (1994) relèvent dans leur étude que 12 % des patients pharmacorésistants ont été sujets à un traumatisme crânien avant l'apparition de l'ELT.

### 2.3. L'état de mal épileptique

Comme nous l'avons précédemment évoqué dans la partie sur les classifications, un EdM est défini dans la classification des crises de 1981 comme « une crise qui dure suffisamment longtemps ou qui est répétée assez fréquemment pour que le retour à la normale entre les crises ne soit pas possible ». Le temps de crise nécessaire pour définir un EdM a progressivement diminué au cours des dernières années. Quand les premières définitions ne considéraient pas la présence d'un EdM d'une durée inférieure à 30 min, les plus récentes proposent un seuil fixé à 5 min. Ces évolutions dépendent principalement de l'état d'urgence que représente l'EdM et des connaissances incitant à le traiter de plus en plus tôt.

DeLorenzo et al. (1996) ont montré que l'incidence de l'EdM à Richmond (Virginie) est de 41 patients/100000 personnes/an. L'apparition d'un EdM augmente le risque ultérieur de crise spontanée après 10 ans (41 % des patients) d'un facteur trois environ comparé à une population avec crises mais sans EdM (13 % des patients) (Hesdorffer et al., 1998). Une autre étude indique que 23 % des enfants qui ont présenté un EdM tous types confondus (« idiopathique », « fébrile », « symptomatique ») ont développé ensuite une épilepsie (Eriksson et Koivikko, 1997).

**Résumé : Le problème de la plupart de ces études est que l'on effectue en réalité des corrélations, ce qui n'implique pas systématiquement une causalité. Il est en effet possible qu'un autre facteur soit à l'origine de la susceptibilité à développer un EdM ainsi qu'une épilepsie. Il est également envisageable que cet autre facteur nécessite l'apparition d'un EdM pour entraîner une épilepsie.**

### 3. Les crises dans l'épilepsie du lobe temporal

La crise peut être décrite au niveau qualitatif ainsi qu'au niveau temporel. Ainsi, on va différencier les symptômes électrophysiologiques et cliniques, et on fera aussi la distinction entre les symptômes qui sont présents pendant la crise à proprement parler (appelés symptômes critiques), ceux qui apparaissent juste après la crise (symptômes post-critiques), et ceux qui se manifestent entre les crises (symptômes inter-critiques). A ces deux catégories temporelles peut s'ajouter une troisième, étudiée plus récemment et d'un intérêt particulier au niveau thérapeutique, celle des symptômes apparaissant avant la crise (pré-critiques).

#### 3.1. Les symptômes critiques

Au niveau clinique, chez des patients avec ELT pharmacorésistante et orientés vers la chirurgie (French et al., 1993), les crises sont très majoritairement précédées par des auras (64/67 patients, soit 96 % des cas). L'aura est un élément symptomatologique souvent subjectif qui est lié à l'arrivée d'une crise. Pour 39 patients sur 64 (61 %) l'aura est une sensation viscérale abdominale et pourra être accompagnée d'autres symptômes tels que peur, sensations d'étourdissement, de chaleur, gustative ou olfactive pour les plus fréquentes. Ces symptômes pourront également être présents chez les patients n'ayant pas une aura avec sensation viscérale (25/64 patients, soit 39 %).

Il faut bien distinguer les crises partielles selon qu'elles sont accompagnées ou non d'une perte de conscience. En effet, les crises partielles sans perte de conscience sont généralement caractérisées par une sensation épigastrique, souvent montante. Les crises partielles avec perte de conscience, quant à elles, débutent souvent par un arrêt comportemental qui est suivi par des automatismes oro-alimentaires et leur durée est généralement supérieure à une minute (*Commission on Classification and Terminology of the ILAE, 1989*).

Au niveau électrophysiologique, la crise va démarrer généralement par une interruption de l'activité de fond associée à une activité rythmique de haute amplitude avec des ondes rapides et lentes. Cette activité va devenir par la suite une activité rapide de faible amplitude qui

évoluera ensuite en une activité de plus grande amplitude avec des pointes et des pointes-ondes répétitives (Engel, 1996). Il s'agit d'une accumulation principalement latéralisée d'activité rythmique rapide entre 5 et 10 Hz (Williamson et al., 1993).

### 3.2. Les symptômes post-critiques

Il est habituel d'observer une confusion post-critique qui est souvent accompagnée par une amnésie lors des crises avec perte de conscience. De plus, un ralentissement global de l'activité est accompagné d'ondes lentes sur le tracé EEG.

### 3.3. Les symptômes inter-critiques

Au niveau électrophysiologique, on observe souvent une pointe ou une onde rapide qui est généralement suivie d'une onde lente (Javidan, 2012). Williamson et al. (1993) parlent d'activité paroxystique composée de complexes d'ondes lentes ou rapides (Figure 1). On décrit aussi une activité delta polymorphique.



Figure 1: Exemple d'activité inter-critique sur l'activité EEG chez une patiente avec ELT méssiale (Javidan, 2012)

### 3.4. Les symptômes pré-critiques

Plusieurs groupes se sont intéressés à ces derniers tant sur le plan clinique (Rajna et al., 1997, toutes épilepsies confondues) qu'électrophysiologique (Litt et al., 2001, ELT méssiale), et il semblerait que des signes précurseurs peuvent être observés jusqu'à plusieurs heures avant une crise. Ces résultats posent la question suivante : quand commence réellement la crise ?

## 4. Les lésions et réorganisations cérébrales

### 4.1. Les modifications hippocampiques

#### 4.1.1. La sclérose de l'hippocampe

La SH est un élément clinique très précisément décrit, en général à partir des échantillons de patients opérés (Figure 2 et Figure 3). L'ILAE a récemment proposé une définition (Blümcke et al., 2013) répertoriant trois types de SH selon les régions touchées : le type 1, caractérisé par une perte cellulaire et une gliose prononcées dans CA4 et CA1, une perte et une gliose dans CA3 et CA2 plus variables, une perte et une gliose variables dans le gyrus denté avec une perte abondante de cellules granulaires dans la lame interne, et préservation des cellules du subiculum. Le type 2, caractérisé par une perte cellulaire et une gliose prédominantes dans CA1. Et le type 3, caractérisé par une perte cellulaire et une gliose prédominantes dans CA4.

La SH est depuis longtemps associée à l'ELT. Sano et Malamud (1953) observaient un lien post-mortem entre SH (sclérose des cornes d'Ammon) et épilepsie psychomotrice ou ELT, avec 58 % de leurs patients présentant une SH. Meyer et Beck (1955) décrivaient une SH chez 66 % de leurs patients ayant subi une chirurgie. Ce résultat est confirmé par l'étude post-mortem de Margerison et Corsellis (1966) avec 65 % de patients présentant une SH.

Dès les premières observations, la SH a été liée à une épilepsie débutant précocement, par exemple à un âge moyen de 4 ans pour Cavanagh et Meyer (1956) ainsi qu'à une forte incidence d'EdM (64 %).

Une question a longtemps été débattue : la SH est-elle la conséquence ou la cause de l'apparition des crises ? Pour Sano et Malamud (1953), certaines ELT ont une lésion qui précède les crises, et d'autres des crises qui provoquent la lésion. Margerison et Corsellis (1966) défendaient l'idée d'une SH apparaissant à cause des crises. Meyer et al. (1954) ont proposé qu'un événement initial, soit à la naissance soit pendant l'enfance et l'adolescence, précède l'apparition de l'épilepsie, hypothèse appelée « hypothèse de Meyer ». Babb et al.

(1984) ont montré que l'augmentation du nombre de crises n'augmente pas la lésion hippocampique et que des crises de même intensité se propagent dans des zones non-sclérotiques sans provoquer de lésions, soutenant cette hypothèse. Gary Mathern a plus récemment soutenu ce point de vue (Mathern et al., 2002) en incluant dans son étude tout événement qui pourrait provoquer une lésion cérébrale, regroupés sous le terme d' « atteintes initiales précipitantes » (*initial precipitating injuries*). Il propose toutefois de modifier l'hypothèse de Meyer car la SH peut être selon lui aggravée par les crises, mais la perte neuronale initiale sévère est fortement liée aussi bien à une atteinte initiale précipitante qu'à des crises chroniques, relevant que 59,2 % des patients ont présenté une atteinte initiale avant l'arrivée des crises.

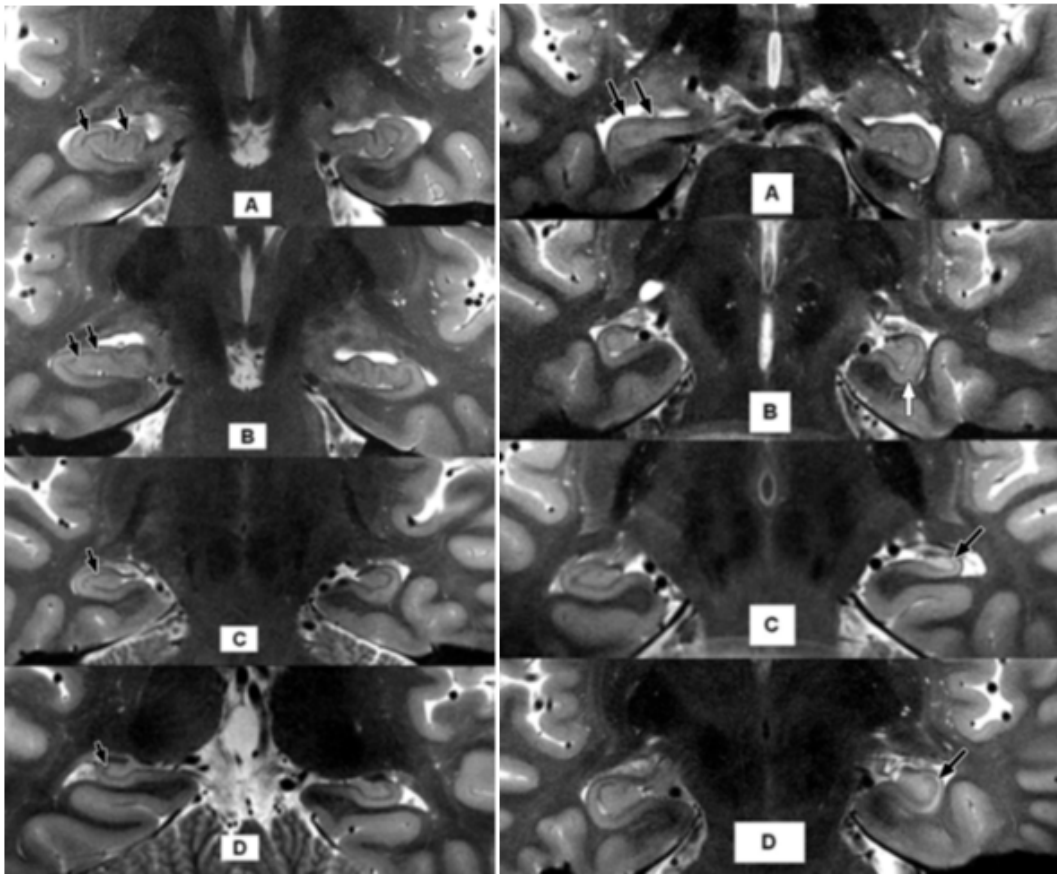


Figure 2 : Exemples de clichés IRM à 7 Tesla obtenus chez des sujets sains (à gauche) avec un hippocampe normal (flèches), et chez des patients (à droite) avec ELT méso-temporale et SH droite en A et gauche en B, C et D (flèches) (Henry et al., 2011)



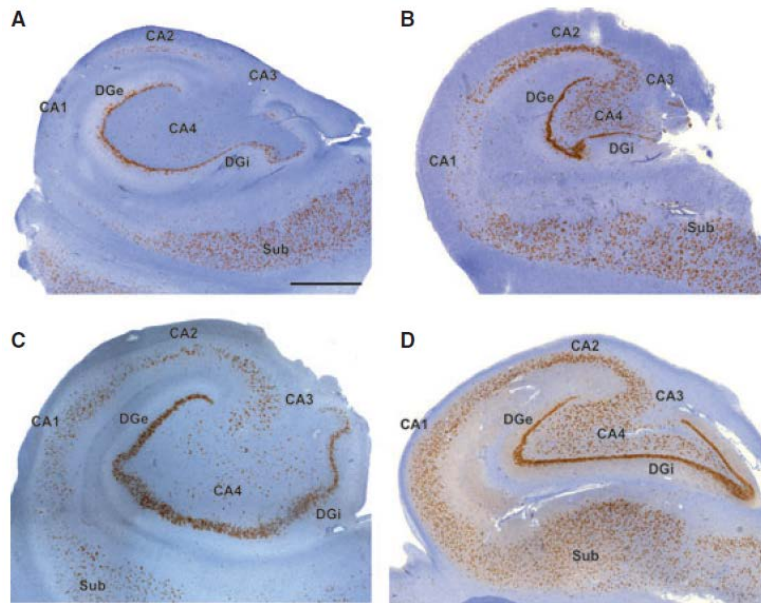


Figure 3 : Les différents types de SH. A : SH de type 1. B : SH de type 2. C : SH de type 3. D : Pas de SH, seulement une gliose. Immunohistochimie : NeuN et hématoxyline). (Blümcke et al., 2013)

#### 4.1.2. Le bourgeonnement des fibres moussues

Les fibres moussues sont les collatérales des axones des cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe. Dans une situation physiologique, ces axones projettent vers le hile et vers CA3 par la « voie des fibres moussues ». Cependant, dans le cas de l'ELT, ces fibres projettent massivement vers les dendrites apicales d'autres cellules granulaires dans la couche moléculaire du gyrus denté (pour revue, voir Blaabjerg et Zimmer, 2007). Thomas Sutula (Sutula et al., 1989) publie pour la première fois (manuscrit accepté en février 1989) la preuve d'un bourgeonnement des fibres moussues des cellules granulaires dans la couche moléculaire interne du gyrus denté chez 10 patients avec ELT en plus de leur contact normal avec le hile et CA3 (Figure 4). Bien que cette découverte lui soit généralement attribuée, de Lanerolle et al. (1989) ont publié quasiment au même moment (manuscrit accepté en mai 1989) une étude montrant ce même bourgeonnement chez des patients. Enfin Carolyn Houser a également observé le même résultat qui a donné lieu à manuscrit accepté en juillet 1989 (Houser et al., 1990). Ce dernier groupe propose d'ailleurs que le bourgeonnement soit lié à la perte des cellules moussues du hile avec lesquelles les fibres moussues font normalement synapse. Par

ailleurs, les cellules mousses font normalement synapse dans la couche moléculaire interne du gyrus denté et libèrent donc cet espace lors de leur disparition.

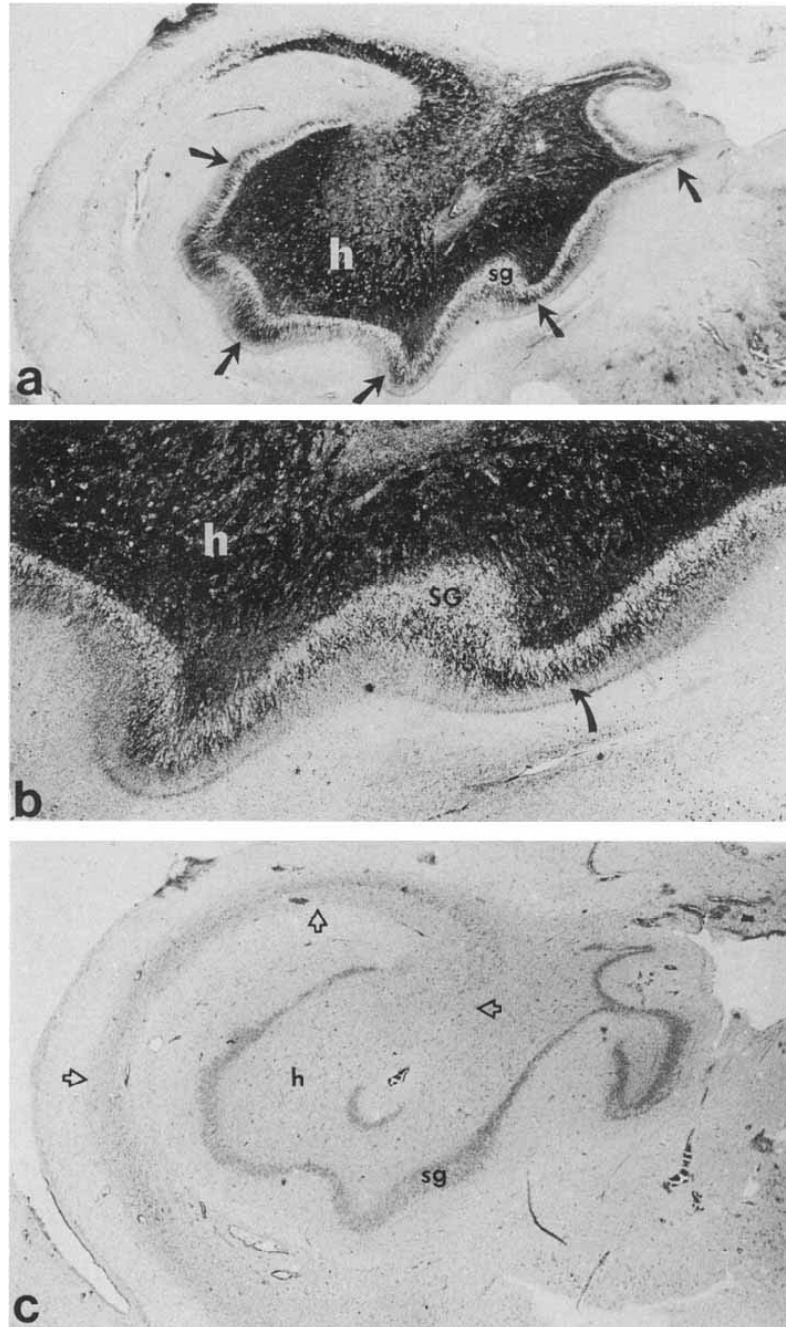


Figure 4 : Bourgeonnement des fibres mousses chez un patient avec ELT (marquage Timm).  
a : Bourgeonnement important (flèches) dans la couche moléculaire interne du gyrus denté. b :  
Grossissement. c : Coupe marquée au violet de crésyl (Sutula et al., 1989)

#### 4.1.3. L'altération des interneurones

Il a été décrit une perte d'interneurones dans l'ELT mésiale, une réorganisation de ceux qui restent avec un bourgeonnement axonal et de nouveaux réseaux.

L'étude de De Lanerolle et al. (1989) a montré que les patients avec une ELT présentent une perte de cellules moussues (*mossy cells*) somatostatine-, neuropeptide Y- et GABA-positives dans le hile. Magloczky et al. (2000) retrouvent cette perte des neurones neuropeptide Y mais aussi des neurones à calrétinine, ce qui est confirmé par le même groupe en 2010 (Toth et al., 2010), alors que Blümcke et al. (1996) n'avaient pas observé cette perte auparavant, mais ils avaient inclus des patients avec d'autres troubles neurologiques (ischémie, gliomes) et des contrôles fixés à un délai post-mortem important. En revanche, les cellules « en panier » (*basket cells*) GAD-positives sont préservées chez les patients (Babb et al., 1989).

Globalement, la perte d'une partie de ces interneurones entraîne une hyperexcitabilité de l'hippocampe dans l'ELT et provoque des réorganisations telles que le bourgeonnement des fibres moussues.

#### 4.1.4. La dispersion des cellules granulaires

En même temps que sa description du bourgeonnement des fibres moussues (Houser et al., 1990), Carolyn Houser décrit brièvement pour la première fois une dispersion des cellules granulaires chez les patients avec ELT (Figure 5). Elle reprend cette découverte dans un autre papier plus détaillé (Houser, 1990). Cette dispersion est caractérisée par une couche cellulaire plus large et une limite externe avec la couche moléculaire mal définie. Il en est de même pour la limite interne avec le hile mais dans une moindre mesure. Houser et al. (1990) proposent déjà que cette dispersion soit une exagération d'une variation développementale normale et une altération de la migration neuronale. Elle propose aussi que la perte des cellules du hile et de leurs fibres projetant sur les cellules granulaires entraîne cette dispersion à cause de la perte d'informations liées à l'organisation. Toutefois, la dispersion n'ayant pas été observée chez quelques-uns des spécimens étudiés, Houser et al. (1990) en concluent qu'elle n'est pas indispensable à l'expression de l'ELT. Plus tard, Haas et al. (2002) font le

lien chez le patient entre la dispersion et une diminution des taux de reeline (protéine synthétisée et sécrétée par les cellules de Cajal-Retz dans la matrice extracellulaire), qui semble impliquée dans l'organisation laminaire de la couche des cellules granulaires.

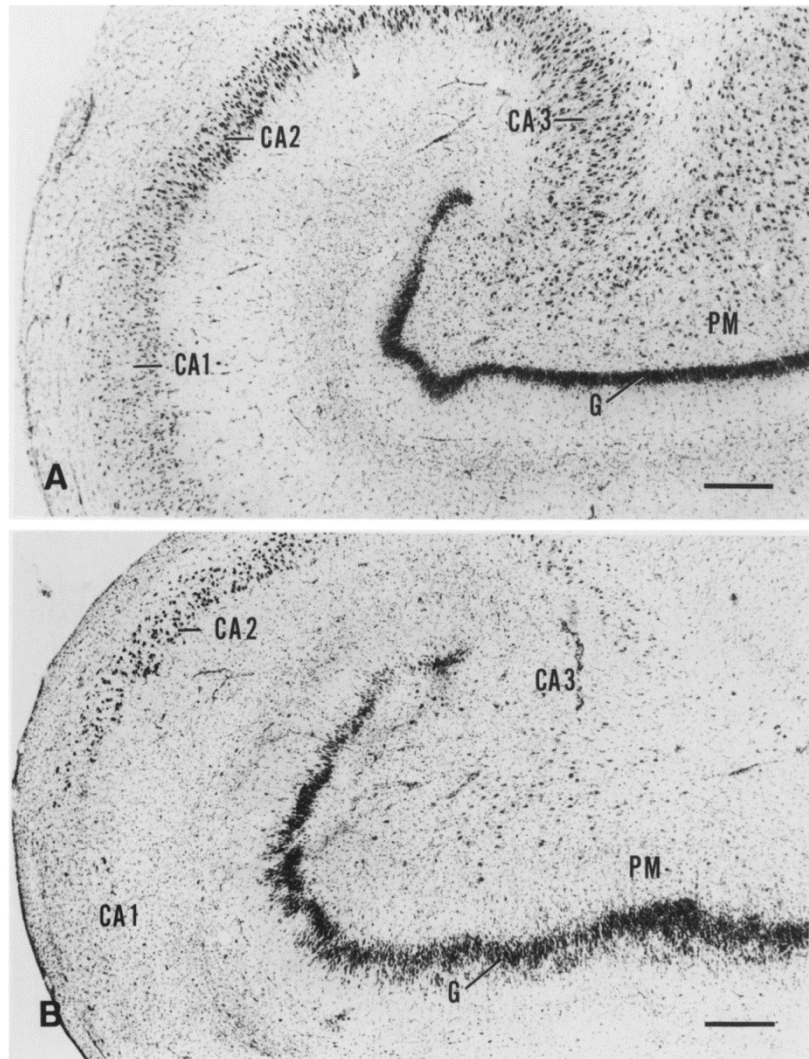


Figure 5 : Photographie de la couche des cellules granulaires du gyrus denté. A : Sujet sain. B : Patient avec ELT et dispersion de la couche des cellules granulaires. (Houser, 1990)

#### 4.1.5. La neurogenèse

La neurogenèse a été l'objet d'un intérêt particulier ces dernières années. Les premières observations chez les patients avec ELT étaient controversées. Ainsi, Blümcke et

al. (2001) ont observé une surexpression de nestin (qui est un marqueur des cellules progénitrices neuronales et gliales [voir la revue sur les marqueurs de la neurogenèse de von Bohlen und Halbach, 2007]) dans les spécimens chirurgicaux d'hippocampe de patients de moins de deux ans ayant une ELT, mais pas chez des patients adultes. Pour confirmer les travaux de Blümcke et al. (2001), le groupe de Carola Haas (Fahrner et al., 2007) a montré que la neurogenèse n'est pas plus importante chez des patients adultes avec ELT. En revanche, le groupe de Mireille Lerner-Natoli (Crespel et al., 2005) a mis en évidence une augmentation du nombre de cellules progéniteurs neuronales. Le travail de Liu et al. (2008) a confirmé ces résultats et fait état d'une augmentation de la double-cortine qui est un marqueur spécifique des neurones néoformés dans l'hippocampe et le néocortex temporal de patients.

**Résumé : L'hippocampe est la région la plus souvent citée dans l'ELT mésiale et probablement celle dont les lésions et réorganisations sont les mieux décrites à l'heure actuelle. Bien que cette structure soit bien évidemment d'un intérêt majeur puisque qu'elle est très sensible aux atteintes telles que les crises fébriles ou l'EdM, d'autres structures jouent un rôle majeur dans l'ELT mésiale.**

## 4.2. Les modifications extra-hippocampiques

### 4.2.1. L'amygdale

L'amygdale est également impliquée dans l'ELT mésiale, même si l'hippocampe est le plus souvent cité. En effet, les patients pharmacorésistants subissent souvent une amygdalo-hippocampectomie, reflétant le rôle important de l'amygdale dans la genèse des crises. Cavanagh et Meyer (1956) décrivaient une atteinte de l'amygdale chez au moins la moitié de leurs patients présentant une SH. Dix ans plus tard, Margerison et Corsellis (1966) observaient une lésion de l'amygdale chez 27 % de leurs patients. Hudson et al. (1993) décrivent des cas de patients avec ELT mésiale avec lésions du noyau latéral de l'amygdale mais pas de SH, lésions qu'ils nomment « sclérose de l'amygdale ». Cendes et al. (1993), dans une étude d'imagerie par résonance magnétique (IRM), décrivent une atrophie de

l'amygdale. Le groupe de Duncan (Van Passchen et al. 1996) a montré que 54 % (44/82) de leurs patients avec ELT mésiale pharmacorésistants présentaient des anomalies de l'amygdale en imagerie par résonance magnétique (IRM) également. Plus récemment, Bernasconi et al. (2003) relevaient aussi une atrophie de l'amygdale chez leurs patients.

#### 4.2.2. La région parahippocampique

La région parahippocampique est constituée des cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampiques postérieurs. Cette région est depuis longtemps associée à l'ELT puisque Cavanagh et Meyer (1956) indiquent que les cortex à proximité de l'hippocampe (gyrus hippocampique, gyrus fusiforme) sont lésés chez leurs patients ayant une SH, en particulier les couches II et III.

##### 4.2.2.1. Le cas particulier du cortex entorhinal

Récemment, le cortex entorhinal a été le sujet d'un regain d'intérêt et n'est à présent plus vu uniquement comme une structure de propagation de la crise démarrant dans l'hippocampe. Au niveau anatomique, Du et al., (1993) ont décrit une lésion du cortex entorhinal dans les échantillons chirurgicaux de quatre patients avec ELT, préférentiellement au niveau de la couche III mais aussi de la couche II dans une moindre mesure. Dans une étude d'imagerie cérébrale chez 20 patients, Bernasconi et al. (1999) montrent également une diminution bilatérale du volume du cortex entorhinal. Le même groupe, ainsi que d'autres confirment ces résultats, également en IRM (Bernasconi et al., 2000 ; Jutila et al., 2001 ; Bernasconi et al., 2003).

Au niveau électrophysiologique, le groupe de Patrick Chauvel à Marseille (Bartolomei et al., 2005) a montré non seulement que le cortex entorhinal pouvait être la structure qui dirige les crises, mais aussi qu'il y a un lien entre sa lésion et son implication dans les crises. Sur leurs 11 patients, le cortex entorhinal dirigeait la crise chez quatre d'entre eux, ce qui représente 57 % des patients ayant une lésion entorhinale. Par contre, le cortex entorhinal ne dirigeait jamais les crises chez les patients non-lésés.

#### 4.2.2.2. Les cortex périrhinal et parahippocampiques postérieurs

Bernasconi et al. (2000, 2003) ont montré que le volume cortex périrhinal est diminué chez une partie des patients (33 % et 44 % respectivement), mais que les cortex parahippocampiques postérieurs ne sont pas réduits. Ce résultat n'a pas été confirmé par Jutila et al. (2001), qui ne trouvent pas de réduction de volume dans le cortex périrhinal.

#### 4.2.3. Le thalamus

Les lésions thalamiques avaient déjà été observées par Margerison et Corsellis (1966). Une réduction du volume du thalamus chez des patients avec ELT mésiale a également été observée en IRM (Dreifuss et al., 2001 ; Natsume et al., 2003 ; Bonilha et al., 2010). Le groupe de Bernasconi a récemment publié une étude précise sur cette réduction de volume (Bernhardt et al., 2012). Cette atrophie est observée sur la face médiale du thalamus au niveau des subdivisions antérieure, médiale et postérieure.

Au niveau électrophysiologique, Guye et al. (2006) montrent une implication du thalamus chez 11/13 patients. Cette implication est particulièrement présente à la fin de la crise, mais elle est également observée chez certains patients en début de crise.

#### 4.2.4. Le cervelet

Margerison et Corsellis (1966) avaient déjà relevé des lésions cérébelleuses chez 45 % de leurs patients. Plus récemment, Hermann et al. (2005) décrivent une diminution de 4 à 6 % du volume du cervelet observée en IRM chez 13 à 22 % des patients. Bonilha et al. (2010) et Oyegbile et al. (2011) confirment la présence de cette atrophie.

#### 4.2.5. Les autres structures cérébrales

Des lésions ou des atrophies ont également été retrouvées dans d'autres régions cérébrales chez les patients avec ELT. Les cortex frontal et occipital ont été cités par Margerison et Corsellis (1966) comme lésés, et Bonilha et al. (2010) ont confirmé leur atrophie observée en IRM. Le noyau caudé et le putamen ont été décrits comme atrophiés par Dreifuss et al. (2001).



## 5. Les perturbations métaboliques

La tomographie par émission de positons permet d'évaluer, suite à l'injection d' $H_2^{15}O$  ou de  $^{18}F$ -2-désoxyglucose, respectivement le débit sanguin cérébral ou la consommation de glucose (métabolisme cérébral). Gaillard et al. (1995) indiquent une réduction du métabolisme et du débit sanguin chez les patients avec ELT dans le lobe temporal ipsilatéral au foyer (région temporale inférieure et région mésiotemporale), mais ils précisent que ces réductions sont dissociées puisque la baisse est plus importante pour le métabolisme (environ 11 %) que pour le débit sanguin (entre 3 et 6 %). Les auteurs proposent que le tonus vasculaire et l'autorégulation soient perturbés dans le foyer épileptique. Cependant, certains auteurs se sont demandé si la baisse de métabolisme était liée à l'atrophie. Ainsi O'Brien et al. (1997) observent que l'étendue de l'atrophie n'est pas liée à celle de l'hypométabolisme chez leurs patients. Knowlton et al. (2001) ont montré finalement que l'hippocampe présente bien un hypométabolisme par unité de matière grise, ce qui permet d'exclure le facteur atrophie.

Une autre technique permettant l'évaluation du fonctionnement métabolique cérébral est la spectroscopie par résonance magnétique. Elle utilise le principe de la résonance magnétique nucléaire qui est basé sur la propriété de noyaux chimiques distincts à résonner à des fréquences légèrement différentes lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Grâce à cette technique, il est notamment possible de mesurer les niveaux de métabolites *in vivo* et *in vitro*. Les premières études utilisant la spectroscopie indiquent une diminution du taux de N-acétylaspartate (NAA) dans les hippocampes ipsilatéral et controlatéral au foyer épileptique (Ende et al., 1997). Stefan et al. (2001) confirment ces résultats en observant un rapport NAA/choline plus faible au niveau hippocampique chez leurs patients avec ELT et SH que chez les contrôles. On considère généralement que le NAA est un métabolite intracellulaire présent dans tous les neurones matures et que la choline est liée à la membrane des cellules gliales. Ainsi une diminution du NAA pourrait indiquer une perte neuronale, et une augmentation de la choline une gliose. Mueller et al. (2001) montrent qu'il n'y a pas que les régions limbiques qui sont affectées puisqu'ils observent une diminution du glutathion dans la zone pariéto-occipitale qui n'est pas censée être impliquée dans les crises, le glutathion étant impliqué dans la régulation du stress oxydatif. L'année suivante, le même groupe (Mueller et al., 2002) montre une réduction du taux de NAA dans le cortex frontal,

mais sans modification des niveaux de choline et de créatine (marqueur du métabolisme énergétique). Ces résultats sont cohérents si on considère la présence de lésions frontales et occipitales chez les patients avec ELT (Margerison et Corsellis, 1966).

Dans une étude métabolique directement *in vitro* sur du tissu chirurgical, le groupe de Dennis Spencer (Petroff et al., 1995) a confirmé les résultats observés en imagerie en montrant une diminution du rapport NAA/créatine dans le néocortex temporal chez les patients qui ont une ELT mésiale par rapport à ceux qui ont une ELT latérale (la créatine est présente dans le cytosol et est ici utilisée comme un marqueur de l'intégrité des cellules, si les membranes cellulaires sont détruites, le taux de créatine dans le milieu extracellulaire va augmenter).

Le même groupe a plus récemment publié une étude plus précise chez le patient qui a reçu du glucose marqué au <sup>13</sup>C avant la chirurgie (Petroff et al., 2002), il a ainsi montré une perturbation du cycle glutamate-glutamine sous la forme d'un ralentissement de ce cycle chez les patients présentant une SH par rapport à ceux n'ayant pas de lésion visible.

**Résumé : L'ensemble de ces études oriente clairement vers un trouble métabolique majeur dans le lobe temporal, zone fortement lésée, mais pas uniquement. Ces études renforcent le rôle des lésions dans les échanges métaboliques et donc possiblement dans la genèse des crises. De plus, elles montrent que d'autres régions qui ne sont pas rapportées comme étant majoritairement lésées peuvent présenter des dysfonctions métaboliques. La question de savoir si ces perturbations sont liées à l'origine de la pathologie ou sont la conséquence des crises, secondairement généralisées par exemple, serait intéressante à étudier.**

## 6. Les troubles cognitifs et comportementaux

Les troubles cognitifs et comportementaux constituent une part importante de l'ELT mésiale. Dans une étude objective sur une population hospitalière, 65 % des patients présentent des troubles cognitifs (Oddo et al., 2003), principalement mnésiques. Dans une étude subjective basée sur les réponses à un questionnaire (Fisher et al., 2000), jusqu'à 46 % des patients se plaignent de l'effet de l'épilepsie et de son traitement sur la cognition (mémoire, réflexion, concentration). Ces problèmes cognitifs ont donc une importance majeure pour les patients et le *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) a récemment fait de l'étude des « comorbidités » de l'épilepsie (dont la cognition) l'une des ses recommandations principales concernant la recherche (Kelley et al., 2009).

### 6.1. Les troubles mnésiques

Les troubles mnésiques sont maintenant associés à l'ELT mésiale du fait du rôle du lobe temporal dans la mémoire (voir Eichenbaum, 2000 pour revue) et de la lésion de l'hippocampe dans l'ELT mésiale (voir plus loin, la partie sur les lésions de l'hippocampe dans l'ELT), cependant ce ne fut pas toujours le cas. Le cas du patient H.M. (Scoville et Milner, 1957) est souvent rapporté comme ayant participé à l'avancement des connaissances sur le rôle du lobe temporal dans la mémoire, suite à la large lobectomie bilatérale temporale qu'il a subie. H.M. Après son opération, une amnésie antérograde et partiellement rétrograde caractérisent son fonctionnement mnésique, et l'handicaperont jusqu'à sa mort. Cependant, ce patient ne semblait pas atteint d'ELT mésiale puisqu'il présentait aussi bien des crises d'absence que tonico-cloniques. De plus, il a continué à présenter des crises, bien que moins sévères, après l'opération. A l'image de l'étude du patient H.M., on s'est beaucoup intéressé à l'effet de la chirurgie du lobe temporal sur les fonctions cognitives (Blakemore & Falconer, 1967) puisqu'elle permettait de soustraire les lobes temporaux du fonctionnement cérébral.

Cependant, certaines études se sont intéressées à l'effet de l'ELT mésiale sur la mémoire ; ainsi Fedio et Mirsky ont rapporté dès 1969 des déficits d'apprentissage et de mémoire verbaux ou non-verbaux, respectivement chez des enfants présentant une ELT mésiale avec

un foyer du côté gauche ou droit (Fedio et Mirski, 1969). Cette étude, outre l'indication que l'ELT mésiale entraîne des problèmes mnésiques, nous rend attentif à la sélectivité de la perturbation du lobe temporal gauche ou droit par rapport au matériel verbal ou non-verbal. Plus tard, Helmstaedter et al. (1991) insistent sur le déficit de d'apprentissage et de mémoire visuelle, en y ajoutant le rappel immédiat, chez les patients avec un foyer du côté droit sur un matériel non-verbal également. Gleissner et al. (1998) ont aussi observé des déficits de mémoire visuelle chez des patients atteints d'ELT mésiale à foyer du côté droit et une lésion hippocampique qui allaient subir une chirurgie ; encore une fois aucun sujet sain n'a été inclus dans l'étude.

Mais une étude assez complète des fonctions cognitives (Hermann et al., 1997) s'oppose au fait que l'ELT mésiale est uniquement caractérisée par des déficits mnésiques. En effet, en plus des problèmes de mémoires verbale et non-verbale chez leurs patients qui ont une importante lésion hippocampique (perte neuronale supérieure à 50 %), les auteurs observent également que le niveau académique, le langage et la perception visuelle ou visuo-spatiale sont également perturbés. Malheureusement, ils n'ont pas inclus de sujets sains et comparent ainsi leurs patients uniquement à d'autres patients avec ELT mésiale et une lésion « légère » ou inexistante (perte neuronale inférieure à 10 %). Dans une étude sans distinction entre patients avec et sans SH mais incluant des sujets sains (Oyegbile et al., 2004), les auteurs décrivent la désormais classique atteinte des mémoires visuelle et verbale, immédiate et différée, et de la mémoire de travail. Comme Hermann et al. (1997), ils détectent des troubles touchant l'intelligence, le langage, les fonctions exécutives, l'attention, la perception visuelle, la dénomination et la dextérité motrice rapide, ce qui est ensuite confirmé par Marques et al. (2007) chez des patients avec une SH.

Un autre type de problème mnésique qui a été observé plus récemment est l'oubli accéléré à long-terme. En effet, certains patients (Blake et al., 2000) ne présentent pas de déficits dans les tests neuropsychologiques classiques de mémoire verbale à 30 min mais ne se souviennent plus de l'information huit semaines après l'apprentissage alors que les sujets sains n'ont pas ce problème. Il concerne particulièrement les patients qui ont un foyer du côté gauche, ce qui est cohérent avec l'utilisation d'un matériel verbal. Muhlert et al. (2011) ont aussi observé cet oubli accéléré à un délai plus court (trois semaines) pour le rappel de scènes visuelles mais sans distinction de latéralité de la lésion cette fois. Une étude plus poussée de Wilkinson et al. (2012) montre un déficit à partir de 1 h de rétention pour un matériel verbal chez les patients

ayant une SH à gauche et seulement après six semaines chez les patients ayant une SH à droite. Pour un matériel visuospatial, les auteurs ont observé l'inverse, c'est-à-dire un déficit dès 1 h chez les patients avec une SH du côté droit et à six semaines pour les patients avec SH du côté gauche.

Enfin, un déficit de mémoire ancienne a aussi été décrit. Il correspond à un oubli des événements personnels et publics qui datent de plusieurs années mais dont le patient se souvenait avant. Plusieurs études (Bergin et al., 2000 ; Haag et al., 2010) montrent que les patients avec ELT se souviennent moins de des événements publics anciens, et Bragin et al. (2000) indiquent que le déficit important serait lié à un grand nombre de crises vécues par les patients sur une période de 10 ans. Cependant, quand on connaît le problème mnésique de ces patients, on peut supposer que cette information n'est pas fiable. Pour Voltzenlogel et al., (2006), en plus des problèmes concernant les événements publics, les patients avec ELT présentent des troubles de mémoire ancienne des événements personnels. D'après ces auteurs, les patients avec un foyer épileptique à gauche avaient une performance moindre que ceux avec un foyer droit, bien que les deux groupes soient déficitaires par rapport aux sujets sains.

### 6.1.1. Mémoire spatiale et navigation

Les premières études sur la mémoire spatiale à proprement parler chez les patients avec ELT mésiale sont celles du groupe de Richard Morris (Abrahams et al., 1997, 1999). En utilisant un dispositif rappelant le labyrinthe radial utilisé chez le rongeur, les auteurs décrivent un déficit de mémoire spatiale de référence et de travail uniquement chez les patients avec une ELT mésiale dont les lésions sont localisées à droite. De plus, un déficit de mémoire spatiale pour des patients avec ELT mésiale à foyer droit et non à foyer gauche a été observé par Pereira et al. (2011) avec un test nécessitant une « navigation » du patient dans l'hôpital. La tâche n'était cependant pas réellement une tâche de navigation spatiale puisqu'il n'y avait pas de choix de direction mais simplement des objets à mémoriser le long du tracé.

Le groupe de Lynn Nadel (Bohbot et al., 1998) a aussi développé des tâches qui ressemblent beaucoup à celles utilisées chez le rongeur (piscine de Morris, reconnaissance spatiale et d'objet ou encore labyrinthe radial). Cependant, dans leurs tests, les patients avec ELT n'avaient pas de déficit de mémoire spatiale, ce qui peut s'expliquer par le fait que ces

patients n'étaient pas candidats à une chirurgie et avaient donc une ELT pharmacosensible plus bénigne.

En revanche, dans un environnement virtuel, Glikmann-Johnston et al. (2008) ont montré que les patients avec ELT mésiale présentent bien un déficit de mémoire spatiale quel que soit le côté de la lésion hippocampique. Weninger et al. (2012) ont également testé des patients avec une SH dans un environnement virtuel et ils ont obtenu des résultats différents. Contre toute attente, les patients avaient des déficits fortement marqués de mémoire égocentrique (quand il faut utiliser des indices vestibulaires, proprioceptifs) mais peu marqués de mémoire allocentrique (quand il faut utiliser des indices environnementaux). Par contre, les patients qui n'avaient pas de SH n'avaient aucun déficit.

Enfin, Bell (2012) a publié une étude de navigation réelle permettant le choix entre plusieurs chemins au cours du trajet. Il a montré que les patients avec ELT faisaient plus d'erreurs de trajet que les contrôles mais que plus l'hippocampe gauche était petit plus il y avait d'erreurs, ce qui va à l'encontre des résultats de Abrahams et al. (1997, 1999) et de Pereira (2011).

Globalement, ces études montrent que les patients avec ELT mésiale présentent des troubles de la mémoire spatiale et de la navigation, ce qui n'est pas étonnant puisque l'hippocampe et le cortex entorhinal, deux structures particulièrement impliqués dans ces tâches cognitives, sont régulièrement lésés dans l'ELT. Il est d'ailleurs intéressant de constater que la mémoire spatiale à proprement parler fait l'objet d'études plus précises, alors que l'on a longtemps privilégié les mémoires verbale ou visuelle (qui sont plus simples à évaluer dans la pratique).

## 6.2. Les troubles attentionnels

L'attention semble également être une fonction cognitive qui est touchée dans l'ELT. Ainsi, Helmstaedter et al. (1991) rapportent un déficit attentionnel chez les patients qui ont un foyer bilatéral dans un test consistant à barrer des lettres cibles placées parmi des distracteurs le plus vite possible. Par contre ce déficit n'a pas été retrouvé en utilisant le même test chez des enfants avec ELT (Lendt et al., 1999). Chez des patients avec une ELT bilatérale, Zhang et al. (2009) ont également montré un déficit attentionnel dans un test où il faut relier des

chiffres en allant de la valeur la plus faible à la plus élevée. Hudson et al. (2013) proposent que l'attention des patients n'est pas touchée dans une tâche à faible demande cognitive (attention soutenue) mais l'est plutôt dans les tâches de haute demande cognitive (attention sélective ou attention divisée).

Bien que la mémoire soit la fonction cognitive la plus rapportée comme dysfonctionnant chez le patient, l'attention est de plus en plus étudiée. L'ensemble des études nous indique que le système attentionnel est perturbé chez les patients avec ELT. L'hypothèse principale émise par les auteurs est l'effet des lésions limbiques sur le fonctionnement frontal (Bocquillon et al., 2009).

### 6.3. L'anxiété et la dépression

La dépression semble être fortement associée à l'ELT. Dans une étude comparant l'effet de la lobectomie sur les épisodes dépressifs dans l'ELT, Altshuler et al. (1999) révèlent que 15 % des patients pour qui une chirurgie n'était pas programmée, mais 45 % de ceux qui allaient en subir une avaient déjà présenté un épisode dépressif majeur au cours de leur vie. Les patients avec une épilepsie grave sont ceux qui ont le plus de chance d'être dépressifs. La prévalence de la dépression chez ces patients est bien plus importante que celle de la population générale qui est de 16,2 % durant toute la vie et 6,6 % durant les 12 derniers mois (Kessler et al., 2003). En revanche, les patients qui ne se font pas opérer ont une prévalence normale. L'étude espagnole de Sanchez-Gistau et al. (2010) sur des patients pharmacorésistants confirme l'idée que la dépression est particulièrement présente dans l'ELT puisque 22,2 % de leurs patients avec une ELT grave ont connu au moins un épisode dépressif majeur durant toute leur vie et 14,6 % durant les 12 derniers mois. De plus, 25,4 % des patients ont connu des problèmes d'anxiété.

Les troubles anxieux et la dépression sont représentés chez une partie des patients. Ils peuvent être la conséquence du stress provoqué par la pathologie elle-même (survenue inattendue des crises, troubles de mémoire et d'attention perturbant la vie quotidienne) mais ils peuvent aussi être la conséquence des lésions et foyers épileptiques situés notamment dans l'amygdale et d'autres structures jouant un rôle dans les émotions.

**Résumé : Les troubles cognitifs ne sont pas négligeables dans l'ELT mésiale. D'ailleurs les récentes lignes directrices du NINDS vont dans ce sens puisqu'elles préconisent de mener des recherches sur ces déficits et de trouver des solutions pour y remédier (Kelley et al., 2009). Il n'est jamais facile dans une pathologie telle que l'épilepsie nécessitant un traitement permanent de faire la part des causes provoquant ces troubles. Ils peuvent être la conséquence des crises elles-mêmes, ou/et des lésions cérébrales, ou/et des dysfonctionnements dus à l'activité épileptique et aux lésions, et/ou aux traitements antiépileptiques eux-mêmes. Il est donc nécessaire de comprendre l'origine exacte de ces déficits et surtout de limiter l'impact des traitements sur la cognition.**



## 7. Les traitements

A ce jour, de nombreux traitements sont disponibles pour les patients avec ELT, sans qu'aucun ne permette d'empêcher l'apparition des crises chez 100 % des patients. Les plus utilisés sont les antiépileptiques (AE) pharmacologiques (ou anti-ictogéniques car ils n'agissent que sur la crise) et il est fréquent que les patients nécessitent la combinaison d'au moins deux AE pour contrôler les crises. De nombreux auteurs considèrent que l'ELT est résistante rapidement après son apparition (Kwan et Brodie, 2000 ; Dlugos et al., 2001). Cependant, d'autres proposent que les crises pourraient d'abord être contrôlées par plusieurs AE puis, au bout de quelques années d'alternance entre crises non-contrôlées et rémissions, la résistance aux traitements se mettrait en place et nécessiterait une intervention chirurgicale (Berg et al., 2003). D'autres options que la chirurgie, ou en adjonction de celle-ci, sont également évaluées et proposées dans certains centres : la stimulation cérébrale profonde, le régime cétogène ou encore l'intervention précoce après un épisode grave (crises fébriles, EdM) pouvant conduire au développement de l'ELT

### 7.1. Les antiépileptiques

Il existe plusieurs types d'AE que l'on peut classer selon leur mode d'action, lorsque celui-ci est connu. Les AE ont pour fonction d'empêcher l'apparition des crises, et non de l'épilepsie. Les demandes en termes d'AE ont beaucoup évolué : lors du développement des premiers AE, le but était de réduire la durée et le nombre de crises ; à présent, l'objectif est d'empêcher totalement l'apparition des crises mais en plus de limiter au maximum les effets secondaires. Globalement (Figure 6), les AE agissent sur les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants, sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants, sur le système GABAergique (récepteur, transporteur ou enzyme de conversion du neurotransmetteur), glutamatergique et/ou ont une action mixte ou encore inconnue (pour revue, voir Rogawski et Löscher, 2004).

### 7.1.1. Action sur les canaux sodium et calcium voltage-dépendants

Les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants sont ceux qui permettent de générer le potentiel d'action. Quand la dépolarisation du potentiel de membrane du neurone atteint le seuil de déclenchement du potentiel d'action, les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants vont changer de conformation pour laisser entrer un courant  $\text{Na}^+$  transitoire. Les canaux vont ensuite se trouver dans un état inactivable avant de retrouver leur conformation d'origine et de pouvoir être à nouveau activés. Pendant que les canaux sont inactivables, un faible courant  $\text{Na}^+$  persistant est présent, provoquant la diminution du seuil nécessaire à la prochaine dépolarisation, et permettant ainsi les trains de décharge à haute fréquence. La plupart des AE agissant sur ces canaux vont bloquer les trains de décharges à haute fréquence mais pas le potentiel d'action initial, empêchant ainsi la crise épileptique de se développer sans bloquer toute l'information neuronale.

Des AE classiques tels la carbamazépine et la phénytoïne ont une action sélective sur les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants (Willow et al., 1985). La carbamazépine et la phénytoïne causent un blocage des canaux sodiques qui est voltage-dépendant, fréquence-dépendant et usage-dépendant. Plus le canal va être activé, plus ces AE vont pouvoir le bloquer. A l'inverse de ces deux AE, le lacosamide est un traitement récent qui, lui, potentialise l'inactivation lente des canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants (Errington et al., 2008).

D'autres AE, comme la lamotrigine ont une action combinée. Ils agissent sur les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants provoquant une réduction des trains de décharge à haute fréquence qui est voltage, fréquence et usage-dépendante (Cheung et al., 1992). De plus, ils ont une action sur les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants qui jouent un rôle dans les courants activés à haut voltage de type N et P (HVA, Stefani et al., 1996b). Les canaux calciques voltage-dépendants sont activés par une dépolarisation de la membrane au niveau du bouton synaptique suite à un potentiel d'action, le courant  $\text{Ca}^{2+}$  entrant va entraîner la sécrétion et la transmission synaptique par exemple.

### 7.1.2. Action sur le système GABAergique

Le système GABAergique est le système de neurotransmission inhibitrice le plus important du cerveau mature. Il est donc logique de s'y être intéressé pour tenter d'inhiber l'activité excitatrice prépondérante dans l'épilepsie. Tout d'abord, les benzodiazépines (comme le diazépam) vont agir directement sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> post-synaptiques et permettre l'influx de Cl<sup>-</sup> qui va hyperpolariser la cellule. Cependant, ce type de composé sera surtout utilisé dans les cas d'urgence comme l'EdM, et non de façon chronique en raison de la sédation et de la myorelaxation qu'il provoque. Les barbituriques (comme le phénobarbital) vont agir sur les récepteur GABA<sub>A</sub> en suivant un autre mécanisme qui est d'augmenter la fréquence de passage du canal à un état ouvert de longue durée plutôt que de courte durée, augmentant ainsi le temps total d'ouverture du canal (pour revue, voir Macdonald et Olsen, 1994).

Une autre voie d'action sur le système GABAergique est d'interférer avec les enzymes qui permettent la synthèse du GABA (comme la glutamate décarboxylase) ou sa dégradation (comme la GABA transaminase). Le vigabatrin, par exemple, est un inhibiteur de la GABA transaminase (Lippert et al., 1977) et conduit à une augmentation tissulaire du taux de GABA. L'inhibition des transporteurs du GABA (tel que GAT-1) permet de diminuer la recapture du neurotransmetteur et donc d'augmenter son temps de présence dans la fente synaptique. La tiagabine, par exemple, semble agir comme inhibiteur de GAT-1 (pour revue, voir Meldrum et Chapman, 1999).

### 7.1.2. Autre action, action mixte ou inconnue

Certains AE agissent sur différents canaux et plusieurs systèmes de neurotransmission à la fois. Le felbamate en est un bon exemple avec son action rapide à la fois inhibitrice sur les courants NMDA et potentiatrice sur les courants GABA<sub>A</sub> (Rho et al., 1994). De plus, il bloque aussi les canaux Na<sup>+</sup> voltage-dépendants probablement en se liant pendant leur état inactivé (Tagliatela et al., 1996) et inhibe les courants HVA (activés à haut voltage) calciques en modulant spécifiquement les canaux de type L (Stefani et al., 1996a). Au niveau

clinique, il faut noter que le felbamate entraîne des effets indésirables graves (tels que de graves problèmes hépatiques) et il est désormais conseillé de le prescrire uniquement si le rapport bénéfice/risque est élevé, comme dans le cas d'une épilepsie réfractaire chez l'adulte ou encore le syndrome de Lennox-Gastaut (French et al., 1999).

Un autre exemple d'AE ayant de multiples cibles est le topiramate (pour revue, voir Shank et al., 2000). Il bloque les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants, potentialise les courants GABA en agissant sur le récepteur  $\text{GABA}_A$ , antagonise les courants kaïnate, inhibe les canaux calciques HVA de type L.

Le valproate est un AE dont les mécanismes d'action sont encore débattus à l'heure actuelle (pour revue, voir Löscher, 2002). Il semble jouer un rôle de potentialisation sur le GABA au niveau présynaptique (augmentation du niveau de GABA) ou post-synaptique (action sur le récepteur), il pourrait aussi antagoniser l'excitation liée aux récepteurs NMDA. Il inhibe les décharges rapides répétitives en agissant peut-être sur les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants. Un effet sur la conductance potassique a également été proposé mais celui-ci semble trop faible pour expliquer le mécanisme AE du valproate. Il pourrait agir sur les courants calciques mais le mécanisme est encore inconnu.

Pour sa part, le lévétiracétam est un traitement plus récent qui possède une propriété unique parmi les AE : il module la protéine de vésicule synaptique SV2A (Lynch et al., 2004). Le rôle de cette protéine n'est pas encore compris, elle semble être un modulateur de la transmission synaptique en préparant les vésicules synaptiques pour la fusion.

Enfin, l'un des AE les plus récents, la rétigabine augmenterait l'inhibition en agissant sur les canaux  $\text{Cl}^-$  comme le topiramate, mais il aurait aussi une action unique sur les canaux  $\text{K}^+$  (Main et al., 2000, pour revue voir Gunthorpe et al., 2012).

AED	Decreased excitation				Increased inhibition	
	Na <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	SV2A	Glutamate	Cl <sup>-</sup> (GABA)	K <sup>+</sup> (KCNQ)
Retigabine /ezogabine					●	●
Benzodiazepines					●	
Carbamazepine	●					
Felbamate				●	●	
Gabapentin		●				
Lacosamide	●					
Lamotrigine	●					
Levetiracetam			●			
Oxcarbazepine	●					
Phenobarbital		●		●	●	
Phenytoin	●					
Pregabalin		●				
Rufinamide	●					
Tiagabine					●	
Topiramate	●			●	●	
Valproate					●	
Vigabatrin					●	
Zonisamide	●	●				

Figure 6 : Exemples d'AE dont les mécanismes d'action sont regroupés selon qu'ils diminuent l'excitation ou qu'ils augmentent l'inhibition (Gunthorpe et al., 2012)

**Résumé :** Les traitements pharmacologiques de l'ELT sont nombreux et ont une action étendue au niveau électrophysiologique et neurochimique. Ils vont toujours dans le sens d'une régulation de l'excitabilité directement ou indirectement (par une augmentation de l'inhibition). Cependant, malgré la disponibilité de tous ces traitements et leurs différents modes d'action, la proportion des patients épileptiques n'évolue pas particulièrement. Il semble donc que l'action pharmacologique pendant la phase chronique de l'ELT doit être remise en question.

## 7.2. La résection chirurgicale

La chirurgie chez le patient avec ELT a longtemps été considérée comme la solution de dernier recours. Le principe est de supprimer le foyer épileptique du cerveau du patient. Les premières chirurgies étaient massives, donc peu précises, identiques chez tous les patients et ont donc pu entraîner des effets secondaires graves chez les patients (c'est par exemple le

cas du patient H.M. qui présentait après résection temporale d'importants troubles mnésiques, voir Scoville et Milner, 1957). Cependant, la précision des opérations a été nettement améliorée par l'utilisation plus récente de la stéréo-EEG qui consiste à implanter des électrodes dans le parenchyme cérébral à l'aide d'un appareil stéréotaxique permettant de connaître les coordonnées exactes d'implantation. Grâce à cette technique et à l'IRM, le chirurgien connaît de façon beaucoup plus précise le foyer épileptique et a la possibilité de réaliser une résection focalisée et surtout adaptée au foyer de chaque patient (pour revue, voir Wieser, 1998). Cette façon de faire n'est pas l'unique méthode mais elle est appliquée particulièrement par l'école de Montréal. D'autres techniques ont également été proposées et appliquées, tels que la résection temporale antérieure « en bloc » (Figure 7) ou encore l'amygdalo-hippocampectomie qui semble être la plus adaptée à l'ELT mésiale.

Cette évolution des pratiques a permis à la résection d'être proposée beaucoup plus fréquemment et de ne plus voir en elle un derniers recours mais bien une solution à part entière dans l'arsenal de traitements de l'ELT. Samuel Wiebe (Wiebe et al., 2001) a récemment dirigé un essai clinique sur le traitement chirurgical dans l'ELT, première étude sur le sujet car les autres publications rapportaient uniquement des cas cliniques. Cette étude a montré que 58 % des patients opérés n'avaient plus de crise provoquant une perte de conscience 12 mois après l'essai, contre 8 % chez les patients ayant reçu un traitement pharmacologique. En ce qui concerne l'ensemble des crises, 38 % des patients opérés n'avaient plus du tout de crise, contre 3 % des patients traités pharmacologiquement. Ce résultat confirme la supériorité d'efficacité de la chirurgie à 12 mois. De plus, la qualité de vie et l'emploi ou la scolarité ont été améliorés chez ces patients.

La question suivante peut alors se poser : à quel moment de la pathologie peut-on considérer la chirurgie ? Une partie de la réponse a été obtenue dans un essai clinique qui a été mené récemment dans une quinzaine de centres d'épilepsie aux Etats-Unis et dirigé par Jerome Engel (Engel et al., 2012). La caractéristique de cette étude est l'intervention chirurgicale précocement après le début de la pharmacorésistance dans l'ELT mésiale. La chirurgie effectuée rapidement a permis l'absence de crise durant 24 mois chez 11 des 15 patients (soit environ 73 %) mais chez aucun des patients traités pharmacologiquement. Cet essai nous renseigne sur le fait que la chirurgie est plus efficace que le traitement pharmacologique même rapidement après le début de la pharmacorésistance.

Malgré ces aspects positifs, la chirurgie n'est pas tout à fait anodine puisqu'elle va entraîner des complications mineures pour 5,1 % des patients et majeures pour 1,5 % (pour revue, voir Hader et al., 2013). Les complications médicales les plus fréquentes sont la perte de liquide céphalo-rachidien, la méningite, l'infection bactérienne et l'hématome intracrânien. Les complications neurologiques les plus fréquentes sont les déficits mineur (un quadrant) et majeur (hémianopsie) du champ visuel, le déficit d'un nerf crânien, la dysphasie, l'hémi-parésie. Des complications psychiatriques majeures sont également rapportées chez 1,9 % des patients. Même s'ils ne sont pas majoritairement présentés par les patients, ces effets secondaires ne doivent pas être négligés et un rapport coût/bénéfice doit être évalué avec l'intervention.

La chirurgie dans le cadre de l'ELT se démocratise et elle est proposée de plus en plus tôt dans l'évolution de la pathologie. La limite principale de cette thérapie est son aspect irrémédiable et les effets secondaires qui sont rapportés. De plus, une intervention précoce qui ne permettrait pas de supprimer totalement le foyer épileptique (certains mécanismes d'épileptogenèse étant peut-être en train de se mettre en place dans d'autres régions) pourrait entraîner une réapparition des crises plus tard, nécessitant alors une nouvelle chirurgie. L'intervention chirurgicale est donc un outil intéressant mais ne permet pas d'éradiquer l'épilepsie puisque certains patients sont résistants à cette thérapie.

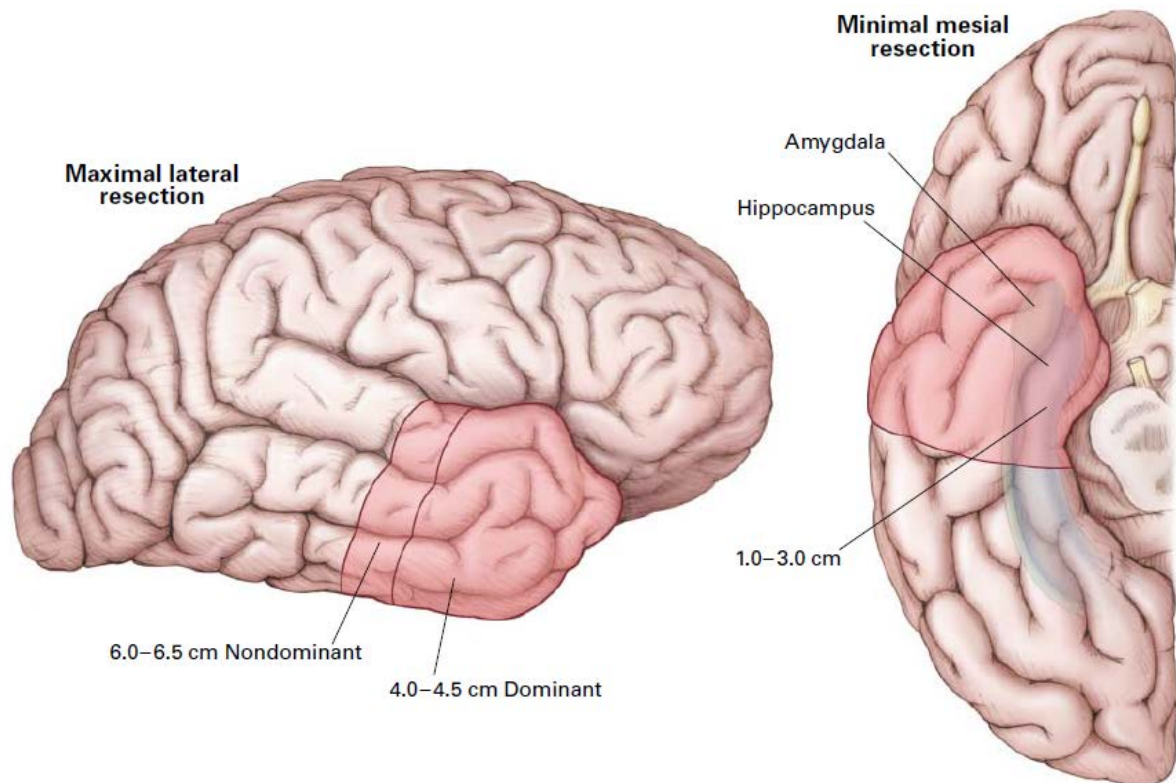


Figure 7 : Schéma d'une résection classiquement pratiquée dans l'ELT. A gauche, face latérale du cerveau humain, résection maximale au niveau tempo-latéral. A droite, face inférieure du cerveau, résection minimale au niveau temporo-médian (Wiebe et al., 2001)

### 7.3. La stimulation profonde

Depuis quelques années maintenant, la stimulation du nerf vague s'est développée et est proposée dans certains centres d'épilepsie comme tentative avant la chirurgie ou pour les patients qui continuent à avoir des crises malgré la chirurgie. La stimulation magnétique transcrânienne et la stimulation intracérébrale (corticale ou profonde) sont des options en cours de développement et d'essai clinique mais ne sont pas encore autorisées comme traitement (pour revue, voir Boon et al., 2009)

On ne connaît pas encore exactement le mécanisme d'action de la stimulation du nerf vague mais il semble qu'il influence différentes structures cérébrales tels que le locus coeruleus, le thalamus et le système limbique, avec une implication particulière du système GABAergique. Une étude récente sur des patients pharmacorésistants (De Herdt et al., 2007) a entraîné la



réduction de la fréquence mensuelle de crises de 51 % avec un taux de répondants de 59 %. De plus 9 % des patients n'avaient plus aucune crise. La stimulation du nerf vague est donc une thérapie à prendre en considération comme alternative à la chirurgie. Des essais de stimulation profonde dans le système limbique et dans le thalamus sont en cours, bien que cette technique ne soit pas encore approuvée comme thérapie dans l'épilepsie.

La stimulation cérébrale est une alternative intéressante qui nécessite un développement majeur. Elle est déjà utilisée dans d'autres pathologies (notamment la maladie de Parkinson), ce qui est un avantage majeur qui permet une émulation des connaissances autour de cette technique.

#### 7.4. Le régime cétogène

Le régime cétogène est une technique non-invasive datant d'une centaine d'années. Il est utilisé dans l'épilepsie sans pour autant que l'on en connaisse le mécanisme d'action exact (pour revue, voir Rho et Stafstrom, 2012). Par ailleurs, ce traitement a la particularité d'être plus efficace chez l'enfant que chez l'adulte. Il consiste à proposer un régime alimentaire caractérisé par une proportion élevée d'acides gras et un faible taux de glucides et de protéines (en général un rapport de 4:1 ou 5:1), de façon à favoriser la dégradation des graisses (lipolyse) comme principal apport d'énergie entraînant la cétose. L'oxydation des acides gras dans le foie produit des corps cétoniques ( $\beta$ -hydroxybutyrate, acétoacétate et acétone). Ceux-ci vont traverser la barrière hémato-encéphalique pour entrer dans les cellules, y être convertis pour entrer dans le cycle de Krebs. Le mécanisme d'action du régime cétogène conduisant à son effet antiépileptique pourrait être une action des acides gras sur l'excitabilité neuronale, mais la diminution de l'apport glucidique jouerait aussi un rôle dans la neuroprotection.

Un essai clinique récent sur le régime cétogène a été effectué sur des enfants ne répondant pas à deux AE et présentant différentes formes d'épilepsie (Neal et al., 2008). La fréquence des crises a été réduite de 38 % par rapport à la ligne de base à trois mois dans le groupe expérimental (contre une augmentation de 37 % dans le groupe contrôle). Le régime cétogène semble donc bien être efficace chez les jeunes patients pharmacorésistants mais il n'existe

malheureusement pas d'étude évaluant l'effet de ce régime sur les patients avec ELT en particulier.

Le régime cétogène permet un traitement non-invasif chez certains patients. Malheureusement, cela concerne prioritairement les enfants puisqu'il est moins efficace chez l'adulte. Les études doivent se poursuivre pour comprendre son mécanisme et possiblement l'utiliser avec d'autres thérapies évitant les effets sur la croissance inhérents à ce régime.

## 7.5. Une nouvelle stratégie, l'intervention précoce pendant ou après l'événement initial : l'exemple du carisbamate

Chez l'humain, la plupart des stratégies visent à agir, une fois l'épilepsie installée, sur les crises et indirectement sur les comorbidités telle que la cognition. Les demandes concernant les nouveaux traitements testés dans le domaine de la recherche se sont de plus en plus modifiées (suppression des crises sans aucun effet secondaire) et tendent vers la modification de la pathologie une fois installée. Cet objectif paraissant difficile (par exemple, les lésions du lobe temporal médian semblent difficilement remédiables), d'autres stratégies sont étudiées en recherche telles que l'intervention précoce, au moment où l'événement initial se produit, ou le plus rapidement possible pendant la potentielle période d'épileptogénèse qui va suivre cet événement. Pour parvenir à proposer un tel traitement potentiel en clinique, il est cependant indispensable de déterminer quels sont les patients à risque après l'apparition d'une crise fébrile prolongée ou d'un EdM. Dans ce cadre, des recherches sont menées pour identifier des marqueurs potentiels du devenir du patient.

L'intérêt d'agir à ce moment est que, aussi bien en ce qui concerne les crises fébriles que l'EdM, c'est la période où beaucoup de lésions et de réorganisations se mettent en place. Si l'on agit plus tard (au moment de la phase chronique), on peut éventuellement modifier les réorganisations mais il est beaucoup moins évident de « réparer » les lésions. C'est pour cela que pour un certain nombre de modifications, l'événement initial et l'épileptogénèse semblent être des périodes beaucoup plus propices à une action quelle qu'elle soit.

De nombreux auteurs proposent une action sur l'épileptogenèse consécutive à l'événement initial et non pas sur celui-ci (pour revue, voir Pitkänen et Lukasiuk, 2011), cependant dans le cas de l'EdM en particulier, les lésions s'installent très rapidement et l'action après l'EdM semble plus anecdotique en termes de neuroprotection. L'intervention précocement après le début de l'événement initial n'est pas incohérente avec la pratique clinique, pour reprendre l'exemple de l'EdM les patients sont rapidement admis aux urgences lorsque que l'EdM ne s'arrête pas spontanément au bout de quelques minutes ou suite à un traitement donné au domicile. C'est dans cette optique que nous avons évalué l'effet du carisbamate sur un modèle animal.

### 7.5.1. Description du carisbamate

Le carisbamate (RWJ-333369) est traitement neuromodulateur développé par SK Biopharmaceuticals dont le brevet a été racheté et exploité temporairement par Johnson et Johnson, il est à présent à nouveau la propriété de SK Biopharmaceuticals (Figure 8). Il a déjà été testé dans différents modèles et chez l'humain dans l'épilepsie. Il s'agit d'un monocarbamate ayant des similarités structurelles avec le felbamate qui est un dicarbamate. Les dicarbamates sont connus pour avoir des effets multiples (sur les courants  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et NMDA).

Chez l'humain (Yao et al., 2006), le carisbamate est rapidement absorbé avec une concentration maximale dans le sérum atteinte 1-2 h après son administration orale. Sa demi-vie est d'environ 12 h, ce qui permet une administration deux fois par jour.

Chez le rat (Mamidi et al., 2007), la concentration maximale dans le sérum est retrouvée à 3 h et sa demi-vie est d'environ 6 h.

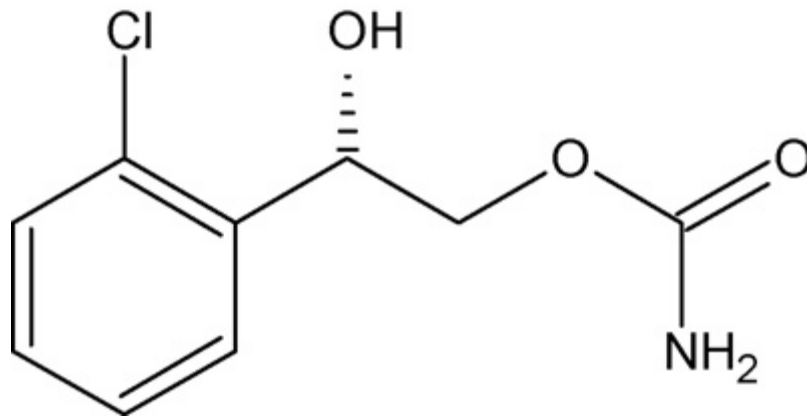


Figure 8 : Structure chimique du carisbamate : (S)-2-O-carbamoyl-1-o-chlorophenyl-ethanol (Liu et al., 2009)

### 7.5.2. Les effets *in vitro*

On ignore pour l'instant l'ensemble des mécanismes d'action du carisbamate. Liu et al. (2009) ont montré que le carisbamate inhibe les canaux  $\text{Na}^+$  voltage-dépendants dans des hippocampes en culture de rats nouveau-nés. L'action du carisbamate est donc probablement de maintenir ces canaux à l'état inactivé, ce qui empêcherait les décharges répétitives des neurones. Son action est concentration- et voltage-dépendante et il bloque les décharges répétitives des neurones hippocampiques. Son action sur des cellules en culture contenant le canal  $\text{Na}_v1.2$  de rat mime l'action de la phénytoïne et correspond à son action dans les cultures d'hippocampe. Le carisbamate n'a pas d'action sur les canaux  $\text{K}^+$  voltage-dépendants activés rapidement.

En utilisant un modèle d'EdM de 3 h chez des neurones hippocampiques en culture avec décharges épileptiformes spontanées, Deshpande et al. (2008a) rapportent que le carisbamate inhibe complètement ces décharges épileptiformes spontanées, un effet similaire à celui de la phénytoïne, confirmant un mécanisme d'action similaire comme le proposaient Liu et al. (2009). De plus, le carisbamate diminue la fréquence de décharge des neurones et supprime la phase soutenue de la décharge sans bloquer la décharge initiale (ce qui permet une action sur les crises sans empêcher toute information d'être délivrée).

Dans une deuxième publication la même année (Deshpande et al., 2008b), le même groupe a utilisé le même modèle d'induction d'EdM dans des cultures cellulaires et appliqué le

carisbamate pendant 12 h après l'EdM de 3 h. Les cellules enregistrées par la suite ne présentaient pas de décharges épileptiformes spontanées après traitement, ce qui indique que le carisbamate possède un effet à long-terme, à l'inverse de la phénytoïne et du phénobarbital qui n'empêchent pas la présence de décharges spontanées épileptiformes une fois qu'ils ne sont plus appliqués. De plus, leur modèle d'EdM entraîne une mort neuronale due aux dépolarisations prolongées qui entraînent une activation prolongée des récepteurs NMDA, permettant une entrée excessive de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ce qui active les voies de mort cellulaire excitotoxique. Le carisbamate permet d'éviter cette mort cellulaire et présente donc des caractéristiques neuroprotectrices.

L'action sur les canaux  $\text{Na}^+$  a été confirmée par Whalley et al. (2009). Ils ont également montré que le carisbamate bloque la transmission excitatrice et qu'il pourrait activer la conductance chlore liée au récepteur  $\text{GABA}_A$  à des concentrations très élevées dans des neurones du cortex piriforme. Enfin, Lee et al. (2011) ont montré que le carisbamate réduit les courants post-synaptiques excitateurs liés aux récepteurs AMPA et NMDA, il joue donc un rôle sur la transmission glutamatergique, probablement par inhibition des canaux sodiques présynaptiques.

### 7.5.3. Les effets *in vivo* chez le rongeur

#### 7.5.3.1. L'action antiépileptique

Une des premières études sur l'effet antiépileptique du carisbamate *in vivo* a été publiée par Grabenstatter et Dudek (2008). Avec le modèle d'EdM induit par l'injection systémique de kaïnate chez le rat, les auteurs ont montré que le carisbamate administré pendant la phase chronique permettait une diminution de 74 % de la fréquence des crises et même une suppression totale des crises chez sept des huit animaux pendant les 6 h suivant l'injection d'une dose de 30 mg/kg. Notre groupe a également publié une étude la même année (François et al., 2008) montrant que le carisbamate supprimait temporairement les crises d'absences des rats GAERS à partir de 30 mg/kg et les crises audiogènes des Wistar AS à partir de 20 mg/kg. De plus, le carisbamate semble avoir un effet AE dans les modèles murins de crises induites par électrochoc maximal, injection de pentylènetétrazole, bicuculine

et picrotoxine, et un modèle d'embrasement de la cornée chez le rat (pour revue, voir Novak, 2007).

Dans un modèle de spasmes infantiles, Ono et al. (2011) montrent un effet aigu du carisbamate (30-60 mg/kg), pendant 2-3 h après une injection unique, qui supprime les spasmes électrocliniques (spasmes comportementaux avec une atténuation de l'activité de fond en EEG), tandis que le phénytoïne n'a aucun effet. Dans un modèle de traumatisme crânien, Eastman et al. (2011) ont également évalué l'effet du carisbamate mais ils n'ont pas observé d'effet AE dans leur modèle, hormis une possible amélioration sur les crises limbiques (leur modèle induit plusieurs types de crise).

**Résumé : Le carisbamate semble donc avoir un spectre d'action large puisqu'il est efficace dans plusieurs modèles de crise et d'épilepsie. Cependant, il est inefficace dans un modèle d'épilepsie post-traumatique.**

#### 7.5.3.2. L'action antiépileptogène

La première indication d'une action antiépileptogène du carisbamate vient de la publication de notre groupe (André et al., 2007) qui indique que lorsqu'il est injecté deux fois par jour pendant sept jours à partir d'une heure après le début l'EdM (induit par injection de lithium-pilocarpine), le carisbamate (60-120 mg/kg) retarde ou empêche l'apparition des crises spontanées de la phase chronique. Cet effet antiépileptogène est lié à une neuroprotection majeure dans CA1 et les cortex piriforme et entorhinal. Cette étude a été approfondie en 2011 (François et al., 2011), montrant que 2 h après l'injection de carisbamate (soit 3 h après le début de l'EdM) environ la moitié des rats traités étaient sous sédation et ne présentaient plus de crises convulsives à la dose de 90 mg/kg. Cette sédation était associée à une baisse de l'amplitude de l'ensemble du tracé EEG. Un résultat plus inattendu est la prévention des crises convulsives de la période chronique chez une partie des rats (environ la moitié) associée à une très forte neuroprotection des structures limbiques (cortex piriforme et entorhinal, hippocampe, amygdale, thalamus). Chez ces rats des décharges de pointes-ondes (à 6-9 Hz) bilatérales et synchrones étaient présentes au niveau fronto-pariétal. Ces décharges sont caractéristiques des crises de type absence et répondent aux traitements

pharmacologiques classiques de l'épilepsie-absences (ethosuximide et triméthadione). Chez les rats présentant ces décharges de pointes-ondes, l'EdM était réduit en intensité à partir de 1 h après l'injection mais revenait à l'état des rats non-traités au bout de 4 h post-injection. Le carisbamate jouerait donc un rôle de modification de l'événement initial mais pas uniquement : d'une part car l'EdM n'est pas totalement stoppé par le traitement, et d'autre part car l'injection de pentobarbital, qui lui stoppe l'EdM, ne protège pas du tout les structures limbiques.

Dans l'étude publiée par Eastman et al. (2011), les auteurs ont testé l'effet du carisbamate en tant que traitement antiépileptogène également en l'administrant 15 min après un traumatisme crânien. Aucun effet antiépileptogène du carisbamate n'a été constaté dans cette étude.

Ainsi le carisbamate a une action majeure dans le modèle d'EdM lithium-pilocarpine qui n'est pas retrouvé dans un modèle de traumatisme crânien. Cette différence peut être liée à la nature de l'événement initial et les lésions qu'il provoque, à l'action du carisbamate sur l'événement initial et/ou l'épileptogénèse.

#### 7.5.4. Les effets chez le patient

La première étude internationale à avoir montré un effet du carisbamate dans l'épilepsie est celle de Trenité et al. (2007). Le carisbamate permettrait de diminuer (500-750 mg/kg) ou d'abolir (1000 mg/kg) les crises chez des patients avec une épilepsie photosensible. Faught et al. (2008) ont effectué une étude de phase II chez 537 patients avec une épilepsie dont les crises sont principalement partielles. A partir de 300 mg par jour, le carisbamate permettait en moyenne une réduction des crises d'environ 20 % chez des patients pharmacorésistants. Le taux de répondants (baisse de plus de 50 % des crises) était d'environ 20 %. Chez le même type de patients, Sperling et al. (2010) ont mené deux études multicentriques de phase III sur 565 et 562 patients. L'une des deux a révélé une efficacité du carisbamate sur les crises partielles à 400 mg mais pas la seconde, suggérant la nécessité d'utiliser des doses plus importantes. Un dernier essai clinique de phase III a été publié par Halford et al. (2011) chez 547 patients présentant une épilepsie partielle et n'a pas non plus

confirmé les résultats de la première étude. L'ensemble de ces essais cliniques a conduit à un retrait par le laboratoire de la molécule en tant qu'antiépileptique.

**Résumé : A l'heure actuelle, les études cliniques portant sur le carisbamate chez l'humain dans le cadre de l'épilepsie sont arrêtées. Cependant, c'est l'effet antiépileptique chez des patients dont l'épilepsie est installée (en phase chronique) qui a été testé. L'effet qui serait intéressant à évaluer est l'effet antiépileptogène du traitement. Il est donc nécessaire de poursuivre l'étude du carisbamate de façon à connaître précisément ses mécanismes d'action et son fonctionnement pour permettre le développement de traitement plus efficace à l'avenir.**







TROISIEME PARTIE :  
LE MODELE LITHIUM-PILOCARPINE



La compréhension de l'ELT et de son traitement nécessite l'utilisation de la modélisation animale. Le modèle nous permet d'utiliser des techniques invasives, sous réserve du respect de la législation en vigueur en matière de bien-être animal, et surtout une étude plus complète du fonctionnement cérébral grâce à la possibilité d'effectuer des analyses histologiques, neurochimiques, ou encore génétiques sur le cerveau de l'animal. Un modèle doit tendre vers la reproduction d'un maximum d'éléments présents dans la pathologie humaine. Ainsi, le meilleur des modèles devrait respecter un principe d'isomorphisme (validité d'aspect), d'homologie (validité de construction) et de prédictivité (validité de prédiction). Le principe d'isomorphisme renvoie à la capacité du modèle à reproduire l'ensemble des symptômes de la pathologie humaine. Dans l'ELT, l'idéal serait des crises comportementales identiques, des déficits comportementaux et cognitifs semblables, des lésions cérébrales similaires, des crises électrophysiologiques et des modifications moléculaires qui soient comparables. L'homologie renvoie à la capacité du modèle à reproduire la cause de la pathologie, autrement dit à son étiologie. Dans l'ELT, des crises fébriles convulsives, un EdM convulsif ou encore un traumatisme crânien, tous suivis par une période de latence précédant l'apparition de crises spontanées, seraient les caractéristiques d'un modèle homologue. Enfin, la prédictivité est généralement la capacité du modèle à répondre de la même façon aux différents traitements que le fera la pathologie humaine. Dans l'ELT, les antiépileptiques classiquement utilisés en clinique devraient diminuer la fréquence et la durée des crises tandis que des antiépileptiques n'ayant aucun effet dans la pathologie ne devraient pas en avoir sur les crises du modèle. En revanche, s'il s'agit de modéliser la pharmacorésistance, les crises du modèle ne devraient pas être diminuées par les traitements qui ne fonctionnent pas dans l'ELT pharmacorésistante.

Il existe de nombreux modèles reflétant certains aspects de l'ELT. Tout d'abord, des modèles de « crises » ont été développés. Ces crises ne se répètent pas par la suite, l'aspect de chronicité de l'épilepsie n'est donc pas présent. Dans le modèle d'embrasement (*kindling*), l'administration répétée d'une stimulation électrique de faible intensité (généralement dans l'amygdale, l'hippocampe ou le cortex piriforme), manipulation qui ne déclenche pas de crise au départ, va progressivement déclencher des crises limbiques de plus en plus intenses. Cette fois, bien que des mécanismes de plasticité évoquant une certaine chronicité se mettent en

place, aucune crise n'apparaît sans stimulation (sauf après plus d'une centaine de stimulations), ce qui ne permet pas de modéliser l'aspect spontané des crises propres à l'ELT.

Des modèles d'épilepsie à proprement parler existent également. Il s'agit, selon les cas, d'induire un événement initial (crises, traumatisme, hypoxie, etc.) qui constitue l'origine d'une épiléptogenèse qui provoquera par la suite des crises spontanées de façon chronique. L'événement initial peut être un EdM convulsif caractérisé par des crises convulsives sévères prolongées et répétées. L'EdM est induit généralement par l'administration d'une substance pharmacologique convulsivante comme la pilocarpine seule (Turski et al., 1983a ; Furtado et al., 2002), la pilocarpine à la suite d'une injection de lithium (Honchar et al., 1983), ou le kaïnate (Schwarcz et al., 1978 ; Ben-Ari et al., 1979, pour revue voir Sperk, 1994). L'administration de la substance proconvulsive peut se faire par voie systémique ou intracérébrale (généralement dans l'hippocampe ou l'amygdale). Une stimulation électrique intense et continue, dans l'amygdale par exemple (différent de l'embrassement), peut aussi être utilisée pour déclencher un EdM (Nissinen et al., 2000). L'événement initial peut aussi être des crises fébriles : un modèle récent consiste à induire des crises fébriles en exposant l'animal à une chaleur constante pour que sa température corporelle atteigne le seuil de déclenchement des crises (Baram et al., 1997). Enfin, lorsque l'événement initial correspond marginalement à un traumatisme crânien, il s'agit souvent d'une forte pression mécanique appliquée sur le cortex pariétal de l'animal anesthésié (Lowenstein et al., 1992).

Toutefois, même au sein de ces modèles chroniques il existe des différences en termes de mise en place et d'évolution de l'épilepsie, d'étendue des lésions et de réponses aux traitements. Ainsi, la projection de données obtenues dans un modèle comme liminaire d'une hypothèse testée sur un autre modèle est risquée (pour revue, voir Sloviter, 2008). L'ensemble des études présentées dans ce chapitre concerne donc uniquement la caractérisation des modèles « pilocarpine seule » et « lithium-pilocarpine », puisqu'il s'agit du modèle que j'ai dans le cadre de cette thèse.

## 1. L'état de mal convulsif

Dans le modèle pilocarpine seule, l'apparition de l'EdM nécessitera une dose importante (300-400 mg/kg), provoquant d'importants effets périphériques (salivation, piloérection, chromodacryorrhée, diarrhée). Dans le modèle lithium-pilocarpine, l'injection de pilocarpine (25 mg/kg), environ 20 h après une injection de chlorure de lithium (127 mg/kg), induira le déclenchement d'un EdM d'une durée de 6-12 h. Malgré quelques différences, Clifford et al. (1987) ont montré que les modèles « pilocarpine » et « lithium-pilocarpine » se ressemblent fortement sur les plans électro-clinique et lésionnel.

### 1.1. L'induction

Tout d'abord, l'injection de lithium permet de réduire considérablement la dose de pilocarpine utilisée (25-30 mg/kg au lieu de 300-400 mg/kg). Cette réduction, associée à l'injection de méthylbromure de scopolamine (un antagoniste muscarinique aux effets essentiellement périphériques), permet de limiter les effets périphériques de la pilocarpine. Le lithium permet également d'assurer le déclenchement d'un EdM chez la quasi-totalité des rats par rapport à la pilocarpine seule à condition d'être administrée à haute dose (Clifford et al., 1987).

Bien que le mécanisme d'action du lithium soit encore méconnu à l'heure actuelle, il semble qu'il ait deux rôles distincts dans la potentialisation de l'incidence de la pilocarpine. D'une part, le lithium permettrait l'accumulation et le maintien d'une concentration élevée d'acétylcholine dans l'hippocampe et le cortex pendant l'EdM (Jope et Gu, 1991). Il aurait aussi un effet de potentialisation de la transmission excitatrice cholinergique par un mécanisme facilitateur au niveau présynaptique (Evans et al., 1990). De plus, le lithium est inefficace quand il est administré avec la plupart des convulsivants qui ne sont pas cholinomimétiques, tels que le kainate, le NMDA, la bicuculine et le pentylènetétrazole (Ormandy et al., 1991).

D'autre part, il inhibe les enzymes inositol-1-phosphatases (IMPases), qui sont responsables de la dégradation de l'inositol 3-phosphate (IP<sub>3</sub>) en myo-inositol (Figure 9 : Mécanismes intracellulaires liés à l'accumulation d'inositol-3-phosphate (IP<sub>3</sub>) induite par le lithium (PI : phosphatidyl-inositol ; PIP : phosphatidyl-inositol-phosphate ; PIP<sub>2</sub> : phosphatidyl-inositol-2-phosphate ; PLC : phospholipase C ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C) (modifié à partir de Gould et al., 2004)). Le lithium provoque donc une diminution de la disponibilité du myo-inositol intracellulaire et une accumulation d'IP<sub>3</sub> (Hallcher et Sherman, 1980). La diminution de myo-inositol induit la diminution du stock de phospho-inositide 2-phosphate (PIP<sub>2</sub>) disponible pour les cascades de signalisation liées aux protéines G, incluant l'action de la phospholipase C (pour revue, voir Gould et al., 2004). Cependant, cette diminution de myo-inositol pourrait être compensée par un apport de myo-inositol extracellulaire via un transporteur. Cet apport jouerait aussi un rôle dans l'induction de l'EdM lithium-pilocarpine puisque l'inhibition du transporteur du myo-inositol provoque une diminution du temps d'initiation de l'EdM (Einat et al., 1998).

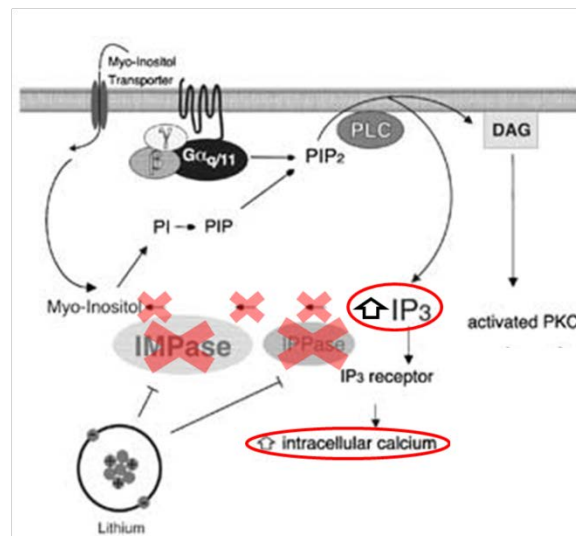


Figure 9 : Mécanismes intracellulaires liés à l'accumulation d'inositol-3-phosphate (IP<sub>3</sub>) induite par le lithium (PI : phosphatidyl-inositol ; PIP : phosphatidyl-inositol-phosphate ; PIP<sub>2</sub> : phosphatidyl-inositol-2-phosphate ; PLC : phospholipase C ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C) (modifié à partir de Gould et al., 2004)



De son côté, la pilocarpine se lie préférentiellement aux récepteurs muscariniques de type M5 puis M2, M1 et M3 (par ordre décroissant d'affinité du ligand pour les récepteurs, Dong et al., 1995). Les récepteurs M5 sont faiblement représentés dans le cerveau (environ 2 % des récepteurs cholinergiques) et sont distribués dans quelques régions cérébrales : l'hippocampe, l'hypothalamus, la substance noire (pars compacta) et l'aire tegmentale ventrale (pour revue, voir Yamada et al., 2003).

Les récepteurs M2 sont principalement présents dans les noyaux du pont, le bulbe olfactif, les noyaux du septum médian, la bande diagonale de Broca, l'habénula, le thalamus (noyaux antéroventraux) (Buckley et al., 1988).

Les récepteurs M1 sont répartis dans l'hippocampe (couche des cellules pyramidales et couche des cellules granulaires du gyrus denté), le bulbe et les tubercules olfactifs, les noyaux de l'amygdale (principalement le noyau basolatéral) et le cortex piriforme. Ils sont aussi présents, mais de façon moindre, dans le cortex cérébral et le caudé-putamen (Buckley et al., 1988).

Les récepteurs M3 sont observés dans les couches pyramidales de l'hippocampe, le cortex cérébral, le cortex piriforme, les tubercules olfactifs, le bulbe olfactif, l'habénula, le thalamus (noyaux antéroventraux, ventrolatéraux et médians). Dans une moindre mesure, ils sont présents dans les noyaux du septum latéral, le caudé-putamen, les collicules supérieurs et les noyaux du pont (Buckley et al., 1988).

Il est intéressant de noter que de nombreuses structures où sont présents les récepteurs muscariniques – récepteurs auxquels se lie la pilocarpine – telles que le cortex piriforme, l'hippocampe, l'amygdale, le thalamus et le septum, sont des régions fortement lésées après un EdM dans le modèle lithium-pilocarpine (Clifford et al., 1987).

Deux mécanismes principaux sont provoqués par la liaison d'un ligand aux récepteurs muscariniques, qui sont des récepteurs métabotropiques : pour les récepteurs M1, M3 et M5, la protéine G à laquelle ils sont couplés va stimuler la phospholipase C (PLC). La PLC va cliver le PIP<sub>2</sub>, ce qui va donner deux seconds messagers intracellulaires : l'IP<sub>3</sub> et le diacylglycérol (DAG). L'IP<sub>3</sub> va provoquer une libération du calcium à partir des stocks intracellulaires. Le DAG va activer la protéine kinase C (PKC), qui est impliquée (soit seule, soit en association avec la libération de calcium induite par l'IP<sub>3</sub>) dans la libération de neurotransmetteurs.

En ce qui concerne les récepteurs M2 et M4, la protéine G va inhiber l'adénylate-cyclase, provoquant une diminution de la formation d'AMP cyclique (pour revue, voir Nathanson, 1987).

L'induction de l'EdM dû à l'administration de lithium-pilocarpine semble bien être lié au système cholinergique, puisque l'injection d'un antagoniste cholinergique (atropine) avant la pilocarpine bloque l'apparition de l'EdM (Clifford et al., 1987). Le travail de Hamilton et al. (1997) a permis de déterminer que la plupart des effets convulsivants de la pilocarpine se font par l'intermédiaire du récepteur M1. Les auteurs ont montré que des souris knock-out pour le récepteur M1 ne présentaient pas l'EdM induit normalement par la pilocarpine.

Au niveau comportemental et électrophysiologique (Fig. 10-14), dès 5 min après l'injection de pilocarpine (30 mg/kg), les effets cholinergiques périphériques sont observés. Quinze à 20 min après, apparaissent les premiers automatismes comportementaux tels que les « *wet dog shakes* » (secouements du corps), les toilettages, les grattements et les mâchonnements (stade 1 de l'échelle de Racine et al., 1972).

Au bout de 20 min, les animaux présentent un comportement d'arrêt qui correspond à l'apparition des premières décharges simples. Les décharges se propagent rapidement dans différentes régions dans les 2 à 3 min suivantes, un mouvement répétitif de la tête apparaît avec des trains de décharges, suivis par un redressement et des clonies des membres antérieurs (stades 2-3). Puis les premières tonico-clonies et les clonies des pattes postérieures apparaissent (stades 3-4).

Ensuite, pendant une période de 1 à 2 min, une activité de décharges généralisées est présente, avec une activité de faible amplitude intermittente, puis les trains de décharges deviennent continus. C'est à ce moment (au bout de trois chutes) que l'on considère que l'animal est en EdM (stade 5). Sans aucun traitement supplémentaire, la majorité des animaux meurent dans les 24 h qui suivent (Jope et al., 1986). C'est pour cette raison que notre groupe administre une faible dose de diazépam (2,5 mg/kg) qui permet d'améliorer la survie des animaux sans interrompre l'EdM. En effet, le diazépam est inefficace pour bloquer l'EdM à cette dose à partir de l'apparition du stade 3 (Jones et al., 2002), alors que nous l'injectons 1 h après l'apparition du stade 5 (entrée en EdM), soit beaucoup plus tard.

L'imagerie de la protéine Fos est une technique qui permet d'observer l'évolution spatiale de l'activation neuronale liée à un événement. Notre groupe a montré qu'une forte expression de

cette protéine est présente dès 2 min après le début de l'EdM dans le cortex piriforme, l'amygdale, ainsi que dans le hile du gyrus denté (Motte et al., 1998). Ces régions sont d'ailleurs fortement lésées dans le modèle lithium-pilocarpine. A partir de 30 min après le début de l'EdM, l'activation Fos est largement distribuée parmi les différentes structures cérébrales, ce qui est certainement dû aux crises tonico-cloniques observées chez les animaux. A l'aide du marquage du 2-désoxyglucose au <sup>14</sup>C, notre groupe a également montré que la consommation de glucose était augmentée 1 h après le début de l'EdM de 275 à 875% dans les régions qui seront lésées dans le modèle lithium-pilocarpine (Fernandes et al., 1999).

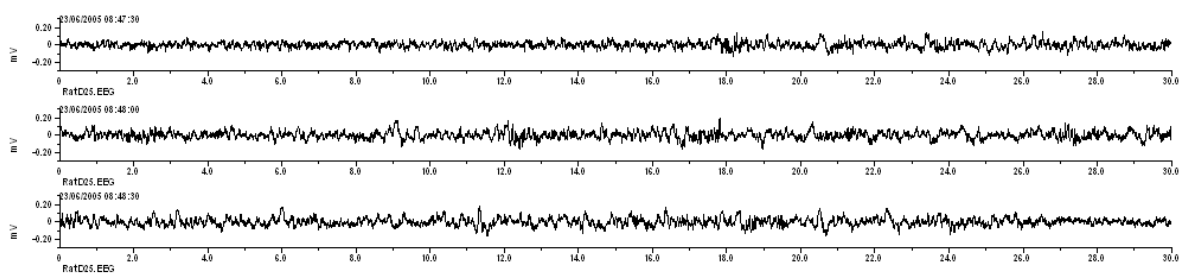


Figure 10 : Tracé EEG de base avant injection de pilocarpine chez un rat

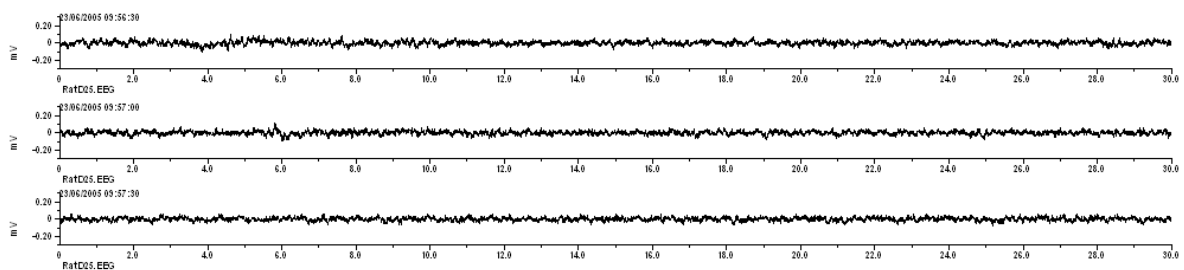


Figure 11 : Tracé EEG juste après l'injection de pilocarpine chez un rat : diminution de l'amplitude

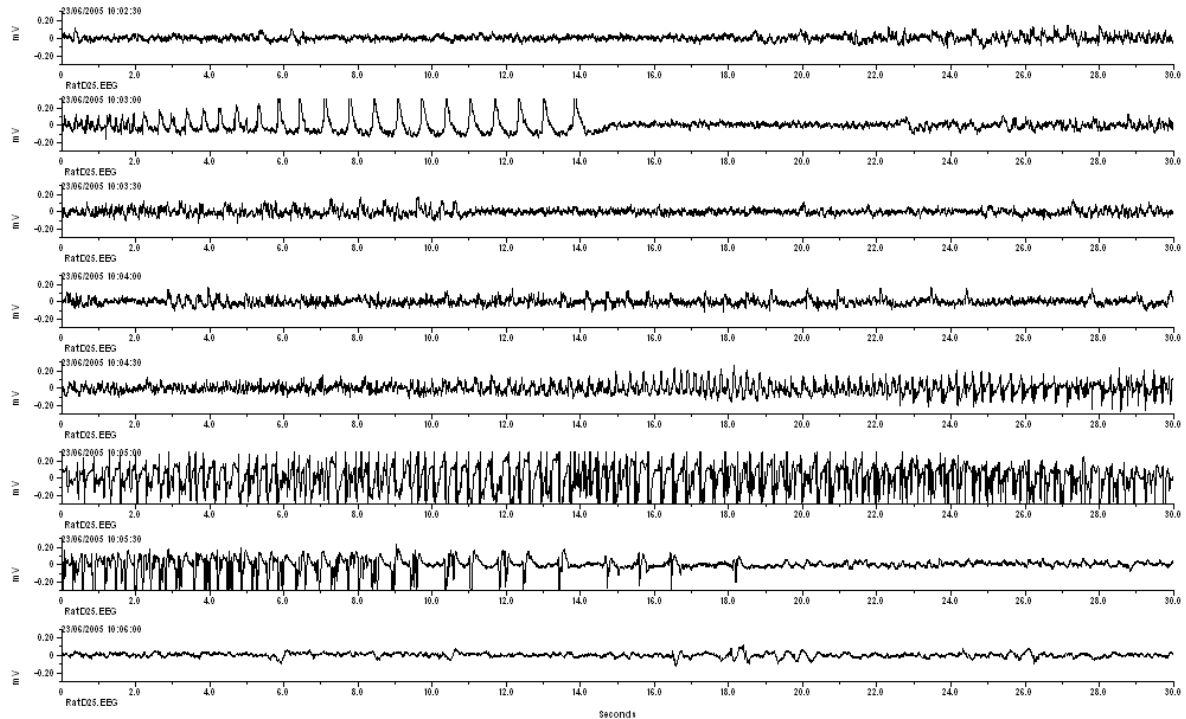


Figure 12 : Tracé EEG durant la première crise après injection de pilocarpine chez un rat : augmentation de la fréquence et de l'amplitude du tracé (5ème ligne), suivie d'une réduction de l'amplitude et de la fréquence à la fin de la crise

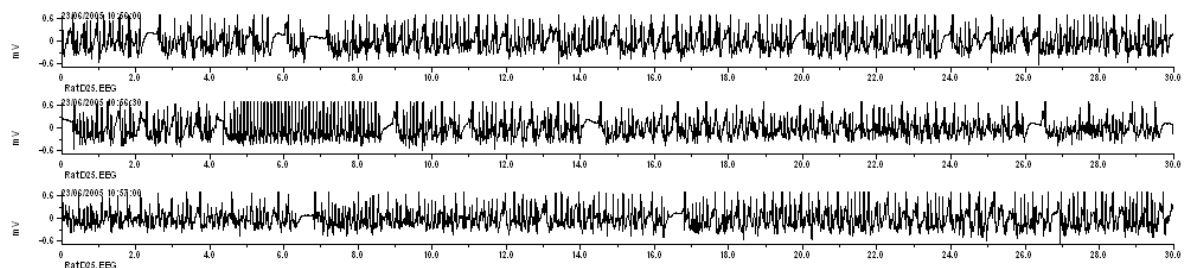


Figure 13 : Tracé EEG après 40 min d'EdM chez un rat : on observe des trains de décharges répétés

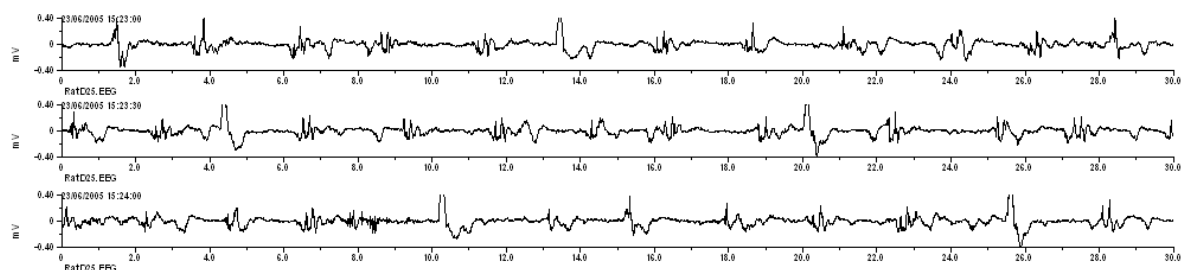


Figure 14 : Tracé EEG après 5h30 d'EdM chez un rat : les trains de décharges ont laissé place à des décharges polyépileptiformes, qui sont le reflet de la poursuite de l'EdM

**Résumé : L'injection de lithium-pilocarpine va déclencher un EdM dépendant des récepteurs muscariniques. Ceux-ci sont particulièrement présents dans le système limbique (hippocampe, cortex piriforme, amygdale), ce qui favorise la genèse des crises dans cette région.**

## 1.2. Le maintien

Une fois déclenché, l'EdM ne peut pas être arrêté par l'atropine (antagoniste cholinergique), ce qui laisse supposer que l'implication du système cholinergique n'est plus déterminante à partir de ce moment, ou qu'elle échappe désormais à toute régulation pharmacologique directe. La plupart des travaux insistent sur le rôle des récepteurs NMDA. Le groupe de Massimo Avoli (Nagao et al., 1996) a montré que le récepteur NMDA est impliqué dans certaines décharges épileptiformes induites dans un modèle *in vitro* d'EdM provoqué par la pilocarpine. De plus, il semble que la pilocarpine induise, dans un premier temps, une diminution de la libération de glutamate (Smolders et al., 1997). Puis, dans un second temps, une forte augmentation de la libération de ce neurotransmetteur est observée. Les acides aminés et le récepteur NMDA jouent dès lors un rôle prépondérant, puisqu'un antagoniste NMDA (le MK-801) empêche l'augmentation du niveau de glutamate extracellulaire et l'apparition des convulsions.

Une fois que l'EdM est déclenché et maintenu, par l'action sur les récepteurs cholinergiques et par voie de répercussion sur les récepteurs NMDA, deux mécanismes importants interviendront. D'une part, des lésions cérébrales se développeront et, d'autre part, les crises cesseront au bout de plusieurs heures.

## 1.3. La mise en place des lésions

Les lésions sont généralement expliquées par l'hypothèse de l'excitotoxicité. Selon celle-ci, les récepteurs NMDA post-synaptiques étant suractivés par une libération excessive de glutamate induira une entrée massive de calcium dans la cellule et une libération additionnelle de calcium à partir des stocks intracellulaires. Cette hausse du niveau de calcium dans la cellule provoquera l'activation de protéases, de l'oxyde nitrique synthétase neuronale, la génération de radicaux libres et la destruction des membranes cellulaires, de protéines de structure et d'enzymes indispensables à la survie cellulaire (pour revue, voir Fujikawa, 2005).

Les récepteurs NMDA sont largement distribués dans le cerveau du rat. En particulier la sous-unité NR1 qui a la plus large expression avec une présence particulièrement importante dans le bulbe olfactif, les cortex piriforme et entorhinal, les couches pyramidales CA1, CA2 et CA3, ainsi que le hile de l'hippocampe, le caudé-putamen et le noyau accumbens, l'habénula, le thalamus, l'hypothalamus et le cervelet (Petrulia et al., 1994b). Les sous-unités NR2A et B présentent la même distribution que NR1 (Petrulia et al., 1994a). En revanche, la sous-unité NR2C est quasiment uniquement exprimée dans le cervelet, et NR2D est exprimée dans le thalamus, le noyau subthalamique, le pallidum, la substance noire, les collicules supérieurs, les noyaux du tronc et le cervelet (Wenzel et al., 1995). Enfin, la sous-unité NR3A est fortement exprimée dans le bulbe olfactif, les cortex cingulaire, préfrontal et entorhinal, le subiculum dorsal, l'amygdale, l'habénula, le thalamus, le cervelet et les noyaux du pont (Wong et al., 2002). La sous-unité NR3B est particulièrement présente dans les tubercules olfactifs, le cortex piriforme, les différentes couches de CA1 et CA3 et le gyrus denté de l'hippocampe et le cervelet (Wee et al., 2008).

Les régions cérébrales où sont fortement représentés les récepteurs NMDA sont autant de régions qui seront probablement lésées par une forte libération de glutamate selon la théorie de l'excitotoxicité.

De nombreuses études ont eu pour but d'évaluer l'évolution temporelle des lésions provoquées par l'EdM lithium-pilocarpine ou pilocarpine. Fujikawa (1996) a montré que 10 min d'EdM ne suffisent pas à la mise en place de lésions dans le modèle pilocarpine. Après un EdM de 20 min, seul l'hippocampe ventral (CA1 et CA3) présente des lésions. En revanche, après un EdM de 40 min, de nombreuses lésions sont présentes : les parties dorsale et ventrale de l'hippocampe (CA1, CA2, CA3 et le gyrus denté) sont endommagées, et ces

dommages sont accompagnés par des lésions de l'amygdale, des cortex piriforme, entorhinal et fronto-temporo-pariétal, des noyaux du septum latéral, du caudé-putamen et de la substance noire (pars reticulata). Avec un EdM de 1 h, aucune lésion supplémentaire n'apparaît. Environ 24 h après le début de l'EdM induit par la pilocarpine, ce sont les mêmes lésions qui sont observées (Turski et al., 1983a).

Dans le modèle lithium-pilocarpine, toutes ces structures sont également lésées après 5 h d'EdM. (Clifford et al., 1987). De plus, il a été montré que c'est la couche III du cortex entorhinal qui est particulièrement affectée, et ce dès 24 h après l'EdM lithium-pilocarpine ; cette lésion persiste au bout d'un mois (Du et al., 1995).

**Résumé : Une fois l'EdM déclenché, c'est une perturbation fonctionnelle du système glutamatergique qui semble prendre le relais pour entretenir l'EdM. La plupart des lésions, qui sont provoquées par l'excitotoxicité, se mettent en place à la fin de l'EdM. Ces lésions sont principalement situées dans l'hippocampe, les cortex piriforme et entorhinal, l'amygdale et le thalamus. L'apparition précoce de ces lésions soutient l'idée que la neuroprotection doit être apportée assez tôt (pendant ou juste après l'EdM).**

## 2. La période de latence

L'ensemble des groupes qui ont étudié l'effet convulsivant de la pilocarpine ou de l'association lithium-pilocarpine se sont d'abord intéressés à la phase aiguë, c'est-à-dire l'EdM en soi, et non à la période chronique qui s'ensuit (Turski et al., 1983a, 1983b ; Honchar et al., 1983). Puis l'intérêt s'est porté sur la phase de latence qui intervient entre la phase aiguë et la phase chronique (pour revue, voir Leite et al., 1990). La phase de latence est généralement proposée comme étant une période d'épileptogénèse. Dans ce cas, on considère qu'il s'agit de la maturation lente de différents processus (pertes cellulaires, réorganisations, modifications moléculaires) qui vont entraîner l'apparition des crises spontanées de la phase chronique. Une autre hypothèse est celle de Robert Sloviter, qui propose que les lésions, déclenchées par l'EdM ou la substance convulsivante elle-même dans le cas du modèle kainate, vont réduire dans un premier temps les connexions entre régions limbiques, et donc empêcher les crises d'apparaître tout de suite (pour revue, voir Sloviter, 2008).

La durée de latence avant l'apparition de la première crise motrice a longtemps été fixée à environ 15 jours (valeurs extrêmes 4-44 jours, pour revue, voir Leite et al., 1990). Cependant, le groupe d'Asla Pitkänen a récemment montré, à l'aide d'un enregistrement vidéo-EEG en continu, que cette période est en réalité d'environ 7 jours dans le modèle pilocarpine (Goffin et al., 2007).

### 2.1. Les lésions

Après l'EdM, plusieurs changements ont été observés en IRM par notre groupe dans le modèle lithium-pilocarpine (Roch et al., 2002 ; André et al., 2007). A partir de 6 h après le début de l'EdM, un signal apparaît dans les cortex piriforme et entorhinal. Ce signal va s'intensifier et durer deux à trois jours. Un signal plus faible est également observé à la même période dans le thalamus et l'amygdale. Trois à quatre jours après l'EdM, un signal commence à apparaître dans l'hippocampe et il va progressivement s'intensifier jusqu'à au moins neuf semaines (fin de l'étude). Les lésions neuronales suivent globalement les mêmes tendances (Roch et al., 2002) : les cortex piriforme et entorhinal sont très rapidement lésés, à



partir de 24 h après l'EdM, et les lésions n'évolueront plus par la suite (de 58 à 69 % de pertes neuronales pour le cortex piriforme, et de 39 à 59 % pour le cortex entorhinal). Les pertes dans le thalamus (45%) sont également déjà maximales dès 24 h après l'EdM. Les lésions de l'amygdale sont de 36 % à 24 h, elles restent à ce niveau à 14 jours, puis la perte neuronale s'intensifie jusqu'à atteindre 57 % à neuf semaines.

Comme c'est le cas pour l'amygdale, les lésions hippocampiques évoluent avec le temps. Les pertes dans CA1 et CA3 sont de 13 à 35 % à 24 h, de 30 à 57 % à 14 jours, et de 52 à 64 % à neuf semaines. L'évolution est plus rapide dans le hile du gyrus denté avec une perte de 50 % dès 24 h et un plafond de 70 % atteint dès 14 jours.

Plus précisément, l'évolution des interneurons hippocampiques contenant des protéines de liaison du calcium a été particulièrement étudiée durant la phase d'épileptogenèse (André et al., 2001b). Les interneurons parvalbumine-positifs subissent des pertes dans le *stratum oriens* de CA1 allant de 56 à 80% dès 24 h après l'EdM induit par le lithium-pilocarpine. Dans le gyrus denté, le hile présente une perte de 60 % dès 24 h. Dans la couche des cellules granulaires, une perte de 30 % est présente à 24 h et augmente à 46 % à 12 jours. Les neurones calrétinine-positifs sont également touchés avec une diminution de 56 à 71 % dans la couche pyramidale de CA3, de 36 % dans la couche pyramidale de CA1, et de 60 à 80 % dans le *stratum oriens* de CA1. Le hile subit une perte de 31 à 47 %. Toutes ces pertes sont présentes dès 24 h et sont toujours présentes après 6 et même 12 jours, ainsi qu'au moment de l'apparition des crises spontanées. En ce qui concerne les cellules calbindine-positives, aucune différence n'est observée à 24 h. A 6 jours, une diminution du marquage est relevée dans le *stratum oriens* de CA1, et dans la couche des cellules granulaires (de 38 à 58 %).

Enfin, notre groupe a également montré un bourgeonnement des axones GABAergiques dans la couche moléculaire interne du gyrus denté.

## 2.2. Les réorganisations

Mello et al. (1993) avaient déjà observé un bourgeonnement des fibres moussues dans la couche moléculaire interne du gyrus denté pendant la période de latence (4 jours après l'EdM induit par la pilocarpine). Ce bourgeonnement semble augmenter progressivement

après l'EdM, atteignant un plateau environ 3 mois après l'EdM. Alors que certains auteurs conçoivent le bourgeonnement comme un facteur causal de l'apparition des crises spontanées, d'autres proposent que ce ne soit pas nécessairement le cas : en effet, son blocage (avec le cycloheximide, un inhibiteur de la synthèse protéique) ne prévient pas l'apparition des crises de la phase chronique (Longo et Mello, 1997). Cependant, ce résultat a été sujet à controverse, puisque le groupe de Dudek a indiqué que ce traitement ne permettait pas de réduire le bourgeonnement dans une étude sur le même modèle (Williams et al., 2002). Plus récemment, Buckmaster et al., 2009 ont montré que le bourgeonnement peut être réduit par la rapamycine, un composé qui inhibe mTOR (*mammalian target of rapamycine*), la cible de la rapamycine qui est fortement activée par l'EdM induit par la pilocarpine. Plus la molécule est administrée longtemps, plus elle réduit le bourgeonnement, mais la rapamycine n'est plus active lorsque le traitement est débuté 2 mois après l'EdM. Par contre, dès que l'on stoppe le traitement, le bourgeonnement reprend pour atteindre son niveau maximal. Peu après, un autre groupe a montré que la rapamycine permettait également de réduire le nombre de crises spontanées (Huang et al., 2010), mais sans pouvoir définir si elle agit directement sur l'expression des crises ou via la diminution du bourgeonnement. Le bourgeonnement est donc un élément de l'ELT qui nécessite un blocage continu. Il semble donc être lié à un mécanisme qui persiste après l'EdM (tel que les lésions, par exemple).

### 2.3. Le comportement

La première étude comportementale réalisée durant la période de latence est celle de Rice et al. (1998). Ces auteurs ont évalué la mémoire spatiale chez des rats ayant subi un EdM induit par la pilocarpine 5 jours avant le test. Cette étude montre que ces animaux sont déficitaires dans le test aussi bien à 5 jours qu'à 6 semaines après l'induction de l'EdM, quand les animaux ont des crises spontanées. Une étude « longitudinale » a également été menée entre le 3<sup>e</sup> et le 33<sup>e</sup> jour après un EdM induit par la pilocarpine (Hort et al., 1999). Dans celle-ci, les rats avaient d'abord tendance à rester contre les parois de la piscine de Morris (les 3<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> jours), puis ils ont amélioré leur performance entre le 9<sup>e</sup> et le 15<sup>e</sup> jour, sans pour autant être au niveau des contrôles. Le test de la piscine de Morris évalue l'apprentissage et le souvenir d'une information spatiale. Enfin, leur performance s'est dégradée par la suite (à partir du 18<sup>e</sup> jour). Les auteurs rapportent que les crises spontanées ont été observées entre les

20<sup>e</sup> et 37<sup>e</sup> jours. L'altération des performances d'apprentissage et de mémoire semble donc réapparaître au moment de l'apparition des crises, étant donné que la première crise est observée au 20<sup>e</sup> jour grâce un contrôle vidéo de 16 h par jour qui ne tient pas compte des crises infracliniques. Dans la même logique d'une évaluation longitudinale, le groupe de Christophe Bernard (Chauvière et al., 2009) a évalué les performances en mémoire spatiale et mémoire des objets (forme de mémoire non-spatiale) de rats ayant subi un EdM induit par la pilocarpine 4, 7, 10, 25 et 40 jours avant. Quel que soit le délai de l'évaluation, les animaux ont présenté un déficit de mémoire spatiale, ce qui n'était pas le cas de la mémoire des objets. Ce déficit était présent avant l'apparition des crises spontanées (entre 12 et 16 jours après l'EdM). De plus, les auteurs ont montré que ce déficit était corrélé à une diminution de l'amplitude du rythme thêta enregistré dans l'hippocampe. Or, ce rythme thêta hippocampique semble jouer un rôle important dans la navigation et la mémoire spatiale (pour revue, voir Buzsaki et Moser, 2013).

**Résumé : Ces résultats nous montrent que la période de latence est critique pour l'installation de l'épilepsie et constitue une phase d'épileptogenèse. En plus des lésions, qui continuent à progresser pendant cette période, une réorganisation axonale se met en place (le bourgeonnement) et les déficits comportementaux apparaissent. Il semblerait donc nécessaire de bloquer ces processus et d'agir pendant la période de latence pour les empêcher de nuire au fonctionnement cérébral.**

## 3. La période chronique

### 3.1. Les crises

L'apparition des crises spontanées marque le début de la période chronique (Figure 15 : Crise motrice spontanée enregistrée en EEG pendant la phase chronique chez un rat lithium-pilocarpine. L'activité se modifie (fin de la 2ème ligne) pour laisser place à un rythme thêta qui sera suivi par la crise motrice (fin de la 5ème ligne)). Une caractérisation très précise de ces crises a été effectuée par Goffin et al. (2007). Ce groupe a ainsi observé que les rats font en moyenne 2,6 crises par jour (entre 0,04 et 5,4 crises), d'une durée moyenne de 47 sec (entre 35 et 51 sec). Environ 56 % de ces crises sont secondairement généralisées, ce qui est confirmé par le score comportemental moyen qui est de 3,2 (un score de 3 correspond à une crise avec clonie des membres antérieurs).

Les crises débutent souvent par un arrêt comportemental suivi de mâchonnements, puis les clonies prennent place. Elles peuvent se poursuivre par un redressement et une chute si elles se généralisent.

Il a longtemps été présumé que ces crises débutaient dans l'hippocampe (voir Leite et al., 1990). Pour autant, même si des signaux étaient enregistrés dans l'hippocampe et non dans d'autres régions du cortex qui faisaient l'objet d'un enregistrement, cela ne permettait pas de confirmer l'origine hippocampique des crises. En effet, les signaux pouvaient déjà résulter d'une propagation à partir d'une zone non-enregistrée. Cette absence de preuve a entraîné une critique du modèle pilocarpine et des modèles d'EdM convulsif en général, notamment par Robert Sloviter (Harvey et Sloviter, 2005 ; pour revue, lire Sloviter et al., 2007). En effet, celui-ci proposait que les crises spontanées n'ont pas pour foyer l'hippocampe. Mais très récemment, Toyoda et Buckmaster (2013) ont publié une étude précise de l'origine des crises spontanées et de leur propagation dans le modèle pilocarpine seule. D'après ces auteurs, les crises débutent la plupart du temps dans la formation hippocampique (et particulièrement dans l'hippocampe ventral), le subiculum et le cortex entorhinal étant également des structures souvent initiatrices de ces crises. L'amygdale est moins souvent un lieu d'initiation des crises.

En revanche, le thalamus, le septum et la substance noire sont généralement impliqués plus tardivement dans les crises, et sont donc plutôt liés à la propagation qu'au déclenchement.

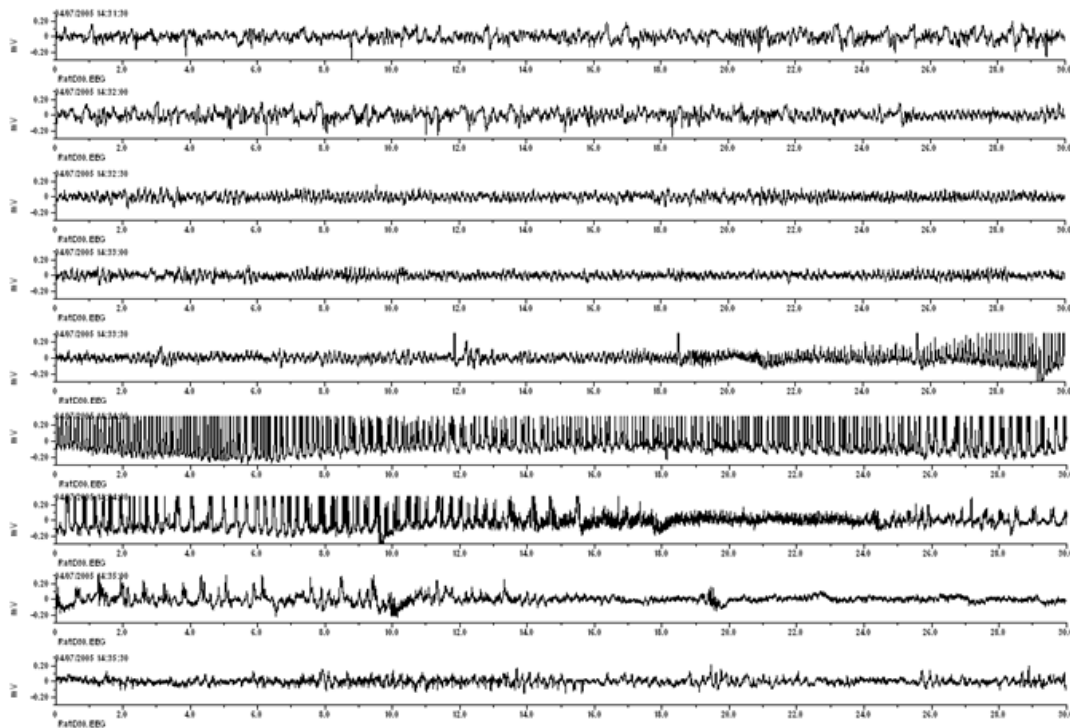


Figure 15 : Crise motrice spontanée enregistrée en EEG pendant la phase chronique chez un rat lithium-pilocarpine. L'activité se modifie (fin de la 2<sup>ème</sup> ligne) pour laisser place à un rythme thêta qui sera suivi par la crise motrice (fin de la 5<sup>ème</sup> ligne)

### 3.2. Le comportement

Les modèles épileptiques induits par la pilocarpine et la combinaison « lithium-pilocarpine » chez le rat adulte ont fait l'objet d'études des capacités cognitives et comportementales pendant la période chronique.

Au niveau des comportements de base, il a été montré dans le modèle lithium-pilocarpine une faible habitude des rats dans un champ ouvert, déterminée par une activité locomotrice élevée et constante (au lieu d'une diminution progressive) (Kubova et al., 2004). Dos Santos

et al. (2005) et Inostroza et al. (2012) ont montré une augmentation de l'activité exploratoire chez les rats « pilocarpine » et « lithium-pilocarpine ». Cependant, il n'a pas été possible de distinguer une augmentation de l'activité locomotrice basale d'une absence d'habituation, puisque les auteurs n'ont pas quantifié cette augmentation au fil du temps passé dans le champ ouvert. En opposition avec ces résultats, de Sales Santos et al. (2010) ont décrit une diminution de l'activité exploratoire dans le cadre du modèle « pilocarpine ». Persinger et Koren (1993) ont montré une augmentation de l'activité nocturne jusqu'à 25 jours après l'EdM, suivie par une normalisation dans le modèle lithium-pilocarpine. Stewart et Leung (2003) ont rapporté une augmentation de l'activité diurne et nocturne à partir d'une semaine, jusqu'à 8 semaines, suivie par une normalisation à 12 semaines dans le modèle pilocarpine.

Notre groupe (Detour et al., 2005), dos Santos et al. (2005), Cardoso et al. (2009) et Inostroza et al. (2011) ont caractérisé les comportements des rats « pilocarpine » et « lithium-pilocarpine » dans le test du labyrinthe en croix surélevé, qui est une situation potentiellement anxiogène (à cause de la hauteur du labyrinthe et de l'absence de paroi au niveau des bras ouverts dans ce protocole). Ainsi les rats épileptiques semblent être moins anxieux dans cette situation, reflétant un trouble du comportement par rapport aux rats témoins, une différence peut-être liée à une désinhibition. Précédemment (Kubova et al., 2004), le comportement de ces rats avait été étudié dans le même test, mais les auteurs n'ont pas pu terminer l'évaluation car les rats sautaient du dispositif (peut-être en raison d'une lumière trop intense en opposition avec une lumière rouge utilisée par Detour et al., (2005)), ce qui confirme l'hypothèse de la désinhibition et pourrait refléter une impulsivité.

L'étude de Michael Persinger et al. (1993) est l'une des premières à avoir décrit des déficits de mémoire spatiale à long-terme et de mémoire spatiale de travail dans le modèle lithium-pilocarpine adulte, et ce en utilisant le labyrinthe radial à huit branches. Ce déficit de mémoire spatiale de travail a été confirmé par notre groupe dans le même test (Detour et al., 2005), mais la limite du protocole appliqué est qu'il permet une recherche basée sur des indices égocentriques : l'animal peut, par exemple, tourner à droite à chaque fois qu'il sort d'une branche pour accéder à la suivante, et faire ainsi le tour du labyrinthe pour terminer la tâche sans avoir à solliciter sa mémoire spatiale ou sa mémoire de travail. Un déficit d'apprentissage spatial a également été décrit en piscine de Morris dans les modèles

« pilocarpine » (Rice et al., 1998) et « lithium-pilocarpine » (Kubova et al., 2004). Deux autres groupes ont relevé un déficit d'apprentissage en mémoire spatiale des rats pilocarpine par rapport aux rats contrôles dans la piscine de Morris (dos Santos et al., 2005 ; Frisch et al., 2007). Les groupes de Gregory Holmes (Zhou et al., 2007) et de Liset Menendez de la Prida (Inostroza et al., 2011) ont conclu à un déficit à la fois d'apprentissage spatial et de mémoire spatiale à long-terme dans le modèle « lithium-pilocarpine » (ce qui est cohérent avec l'idée que les rats ne peuvent pas se rappeler une information qu'ils n'ont pas réussi à apprendre). Ce déficit serait lié à un dysfonctionnement des cellules de lieu (les cellules de l'hippocampe participant à la navigation dans un environnement connu) (Zhou et al., 2007). Un temps important était passé à proximité des parois de la piscine (comportement appelé « thigmotaxie ») plutôt qu'au centre. Ce comportement peut, d'après certains auteurs, refléter un stress important ou une incompréhension de la tâche (Inostroza et al., 2011).

Une seule publication (de Sales Santos et al., 2010) est en opposition avec tous ces résultats. Celle-ci décrit une absence de déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale à long-terme dans le modèle « pilocarpine ». Toutefois l'exploitation des données est sujette à caution. De Sales Santos et al. (2010) décrivaient également un déficit de mémoire spatiale de travail, mais le protocole utilisé ne permettait de tirer aucune conclusion claire quant à l'intégrité de cette fonction (le nombre trop important d'essais ayant favorisé l'utilisation d'un système de mémoire à long-terme plutôt que de mémoire de travail).

Lorsqu'ils ont été testés avec un protocole évaluant la reconnaissance des objets, les rats « lithium-pilocarpine » ne présentaient pas de déficits (Detour et al., 2005), ce qui a été confirmé un peu plus tard dans le modèle « pilocarpine » (Chauvière et al., 2009).

Il a été montré par ailleurs qu'il est impossible de mettre en place un conditionnement aversif au goût chez les rats « lithium-pilocarpine » (Persinger et al., 1993). Toutefois, étant donné les lésions du bulbe olfactif et du cortex piriforme, structures particulièrement impliquées dans l'odorat, on peut se demander si ce déficit n'était pas dû à un problème d'intégration de l'information sensorielle. Par contre, Inostroza et al. (2012) ont révélé une forte préférence au sucre chez les rats « lithium-pilocarpine » par rapport à des rats témoins. De plus, les rats du modèle pilocarpine présentaient un déficit de conditionnement de peur (avec choc électrique) au son et au contexte (dos Santos et al., 2005 ; Cardoso et al., 2009), une altération qui pourrait ne pas dépendre d'un déficit sensoriel étant donné que les rats lithium-pilocarpine

exhibent un seuil de perception de la douleur comparable à celui des témoins (Szyndler et al., 2005). Enfin, Inostroza et al. (2012) ont montré une diminution de l'exploration sociale chez les mêmes rats.

**Résumé : Les crises spontanées de la phase chronique, ainsi que les pertes neuronales et les réorganisations qui s'ensuivent, provoquent des déficits comportementaux et cognitifs touchant l'activité locomotrice, altérant l'anxiété face à une situation potentiellement dangereuse, empêchant l'apprentissage et la rétention d'informations spatiales, ainsi que la mise en place d'une peur conditionnée.**



## 4. Les traitements

### 4.1. Les antiépileptiques

Leite et Cavalheiro (1995) ont étudié l'effet de plusieurs antiépileptiques (classiquement utilisés en clinique) sur les crises spontanées de la phase chronique dans le modèle pilocarpine. Ainsi, le phénobarbital (40 mg/kg), la phénytoïne (100 mg/kg), la carbamazépine (120 mg/kg) et le valproate (à 600 mg/kg et non 450 mg/kg) administrés pendant la période chronique ont un effet antiépileptique et diminuent fortement le nombre de crises chez les rats. En revanche, l'éthosuximide n'a pas eu cet effet (il est classiquement administré dans une autre forme d'épilepsie, l'épilepsie-absences).

### 4.2. Les antiépileptogènes (modification de l'événement initial ou de la période de latence)

La plupart des traitements testés pour leur potentielle action antiépileptogène sont administrés pendant ou après l'EdM et/ou durant la période de latence (pour revue, voir Löscher et Brandt, 2010). Plusieurs actions peuvent être distinguées. Une fois la phase chronique atteinte (soit un à deux mois après l'EdM), les effets de ces traitements peuvent se traduire par : une modification des crises (latence d'apparition, fréquence, sévérité), une neuroprotection et une modification du comportement. On fait également la distinction entre les traitements qui modifient l'événement initial, car administrés pendant l'EdM, et ceux qui modifient la phase de latence, administrés après la fin de l'EdM.

#### 4.2.1. Les traitements testés n'ayant aucun effet

Certains traitements n'ont eu d'effet ni sur les crises, ni sur la perte neuronale et le comportement (Tableau 1).

Parmi ces traitements, le valproate est le seul antiépileptique testé à ne pas avoir eu d'effet dans le modèle pilocarpine (Klitgaard et al., 2001). Cependant, la neuroprotection et le comportement n'ont pas été testés. Le bumétanide (un inhibiteur des co-transporteurs du sodium, du potassium et du chlore, NKCC1) n'avait pas permis de modifier les crises, ni d'induire une neuroprotection ou une modification comportementale (Brandt et al., 2010). La rapamycine (Buckmaster et al., 2009) n'a pas non plus permis de diminuer la perte neuronale hippocampique.

Tableau 1 : Exemples de traitements n'ayant aucun effet dans des protocoles visant l'épileptogénèse

Traitement	Durée EdM, stoppé avec	1 <sup>ère</sup> injection du traitement	Durée traitement	Effet sur les crises	Effets sur les lésions	Effets sur le comportement	Références
Valproate	30 min (pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	30 min (200 mg/kg)	21 jours (600 mg/kg) avec pompe à infusion continue	Aucun	Non explorés	Non explorés	Klitgaard et al., 2001 (groupe Margineanu)
Bumétanide (inhibiteur NKCC1)	90 min (lithium-pilocarpine), phénobarbital (25 mg/kg) + diazépam (10 mg/kg)	90 min (2 mg/kg)	3 fois par jour pendant 5 jours avec pompe à infusion continue (0,8 mg/kg/h)	Aucun	Aucun	Aucun	Brandt et al., 2010 (Groupe Löscher)
Rapamycine	120 min (pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	Entre 1 h et 8 h dans l'hippocampe avec pompe à infusion continue	1 ou 2 mois	Aucun	Non explorés	Non explorés	Buckmaster et al., 2009 (groupe Buckmaster)

#### 4.2.2. Les traitements permettant de modifier l'épilepsie et/ou ses conséquences

##### 4.2.2.1. Les traitements neuroprotecteurs qui ont ou non des effets sur les déficits comportementaux

Certains traitements ont une action sur l'effet de l'EdM, sans pour autant modifier l'épilepsie qui s'ensuivra. En effet, les études évoquées dans cette partie démontrent des effets neuroprotecteurs voire contre les comorbidités comportementales explorées (Tableau 2 et Tableau 3).

L'antiépileptique vigabatrin (André et al., 2001a) a uniquement permis de diminuer la perte neuronale mais aucun effet sur les crises n'a été constaté malgré le long traitement mis en place. Le lévétiracétam a également été testé (Klitgaard et al., 2001; Zhou et al., 2007). Klitgaard et al. (2001) Ce traitement a permis de limiter la perte neuronal dans l'hippocampe mais pas d'agir sur les crises. En étudiant les capacités de mémoire spatiale des animaux, Zhou et al. (2007) ont montré que les rats traités avaient des déficits d'apprentissage mais parvenaient tout de même à avoir une rétention mnésique identique aux rats contrôles (mais les statistiques ne permettent pas de conclure sur la différence par rapport au hasard).

Le topiramate a fait l'objet de plusieurs études (DeLorenzo et al., 2002; Rigoulot et al., 2004 ; François et al., 2006 ; Suchomelova et al. (2006) ; Frisch et al., 2007 ; Shatskikh et al., 2009). Ce traitement a permis de limiter la perte neuronale dans l'hippocampe, mais l'effet sur les déficits de mémoire spatiale des rats ne sont pas clair (Frisch et al., 2007 ; Shatskikh et al., 2009).

Le MK-801 (un antagoniste des récepteurs NMDA) a permis de diminuer les pertes neuronales dans CA1, CA3, la substance noire et le cortex piriforme bien que les rats aient été observés en histologie uniquement après 48 heures et donc avant les phases de latence et chronique (Bankstahl et al., 2008). L'érythropoïétine (une hormone ayant des effets neuroprotecteurs) a permis une neuroprotection dans CA1, CA3 et le hile de l'hippocampe observée 15 jours après l'EdM (Nadam et al., 2007). Le traitement avec l'immunosuppresseur tacrolimus a entraîné une neuroprotection de l'hippocampe (Chwiej et al., 2010).

Tous ces protocoles ont permis une neuroprotection et/ou un effet sur le comportement, mis aucun n'a permis d'empêcher l'apparition des crises ou de la retarder, ni même de diminuer la fréquence des crises ou leur intensité. Ils n'ont donc pas d'effet antiépileptogène. En revanche, les protocoles suivants ont permis d'obtenir des résultats antiépileptogènes.

Tableau 2 : Exemples de traitements neuroprotecteurs ayant ou non un effet sur le comportement

Traitement	Durée EdM, non stoppé	1 <sup>ère</sup> injection du traitement	Durée traitement	Effet sur les crises	Effets sur les lésions	Effets sur le comportement	Références
Vigabatrin	Non précisée (lithium-pilocarpine), non stoppé	10 min avant l'EdM (100 mg/kg)	45 jours (J1 à J6, puis 250 mg/kg)	Aucun	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Non explorés	André et al., 2001a (groupe Nehlig)
Lévétiracétam	30 min (pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	30 min (54 mg/kg)	21 jours (50, 150 ou 300 mg/kg)	Aucun	Diminution dans l'hippocampe	Non explorés	Klitgaard et al., 2001 (groupe Margineanu)
Lévétiracétam	120 min (lithium-pilocarpine), pentobarbital (30 mg/kg)	24 h (50 mg/kg)	14 jours (50 mg/kg)	Aucun	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Déficit d'apprentissage spatial mais rétention préservée	Zhou et al., 2007 (groupe Holmes)
Topiramate	Non précisé (pilocarpine), diazépam (4 mg/kg) donné au bout de 2 h	40 min (20 ou 100 mg/kg)	Injection unique	Non explorés	Diminution dans CA1 et CA3	Diminution des déficits de mémoire spatiale	Frisch et al., 2007 (groupe Helmstädter)
Topiramate	Non précisé (lithium-pilocarpine), non stoppé	60 min (10, 30 ou 60 mg/kg)	6 jours (10, 30 ou 60 mg/kg)	Aucun	Diminution dans CA1 et CA3	Non explorés	Rigoulot et al., 2004 (groupe Nehlig)
Topiramate	Non précisé (lithium-pilocarpine), diazépam (2,5 mg/kg) donné au bout de 2 h	Dès le début de l'EdM (10, 30 ou 60 mg/kg)	6 jours (10, 30 ou 60 mg/kg)	Aucun	Diminution dans CA1 et le hile	Non explorés	François et al., 2006 (groupe Nehlig)
Topiramate	120 min (lithium-pilocarpine), pentobarbital (20 mg/kg)	3 h (80 mg/kg)	42 jours (80 mg/kg)	Non explorés	Légère diminution dans l'hippocampe	Aucun (mémoire spatiale)	Shatskikh et al., 2009 (groupe Holmes)

Tableau 3 : Exemples de traitements neuroprotecteurs ayant ou non un effet sur le comportement

Traitement	Durée EdM, stoppé avec	1 <sup>ère</sup> injection du traitement	Durée traitement	Effet sur les crises	Effets sur les lésions	Effets sur le comportement	Références
MK-801 (antagoniste récepteurs NMDA)	90 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	90 min (0,1 mg/kg)	Injection unique puis histologie 48h après EdM	Non explorés	Diminution dans CA1, CA3, la substance noire et le cortex piriforme	Non explorés	Bankstahl et al., 2008 (groupe Löscher)
Erythropoïétine (hormones avec effets neuroprotecteurs)	2 h - 3 h (pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	2h30-3h30 (42 µg/kg)	Injection 1 et 3 jours après EdM (42 µg/kg) puis histologie 15 jours après EdM	Non explorés	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Non explorés	Nadam et al., 2007 (groupe Bezin)
Tacrolimus (immunosuppresseur)	Non précisé (pilocarpine), non stoppé	Au début de l'EdM (2 mg/kg)	Injection unique puis histologie 6h après EdM	Non explorés	Diminution dans l'hippocampe	Non explorés	Chwiej et al., 2010 (groupe Setkowicz)

#### 4.2.2.2. Les traitements antiépileptogènes

Ce sont les traitements les plus prometteurs puisqu'ils permettent de modifier durablement la pathologie, et particulièrement les symptômes de l'ELT qui sont les plus handicapants pour les patients (Tableau 4, Tableau 5, et Tableau 6).

Avec le prégabaline (André et al., 2003), les rats traités ont bénéficié d'une neuroprotection dans les cortex piriforme et entorhinal. De plus, le délai avant l'apparition des crises a été prolongé de 17 jours en moyenne (39 jours de latence contre 22 chez les rats non-traités). Cependant, ce traitement est potentiellement modificateur de l'événement initial puisqu'il est administré entre et l'injection de la pilocarpine et le début de l'EdM. A l'inverse des protocoles utilisés plus haut avec le topiramate, DeLorenzo et al., (2002) ont décrit une protection neuronale dans CA1, et surtout diminution du nombre de rats présentant des crises spontanées (-60 %) après 3 à 6 mois après l'EdM. Le phénobarbital a aussi permis d'obtenir des résultats intéressants (Brandt et al., 2010). Ce traitement n'a pas permis d'empêcher la perte neuronale, ni les déficits comportementaux des rats, mais il a induit une augmentation de la latence avant la première crise spontanées (25 % des rats n'avait pas de crise 8 semaines après l'EdM quand les rats non-traités en avaient tous) et une diminution de la fréquence des crises.

L'administration d'une dose unique de kétamine 15 minutes après l'EdM a empêché les lésions de se mettre en place, entraîné une absence de déficit de mémoire spatiale des rats et une absence de crises spontanées (Hort et al., 1999). Ces résultats intéressants doivent cependant être nuancés par le fait que le traitement a clairement modifié l'événement initial et uniquement celui-ci. Son administration 2 heures après l'EdM n'a d'ailleurs pas permis d'obtenir ces modifications. L'érythropoïétine a été testée avec un protocole différent de celui de Nadam et al. (2007). Chu et al. (2008) l'ont administré à partir d'une heure après le début de l'EdM et non 2-3 heures après. Ce traitement a permis une diminution des pertes neuronales dans CA1, CA3 et le hile de l'hippocampe, ainsi que dans le cortex piriforme. Il a également permis de diminuer la fréquence et la sévérité des crises, et surtout il a empêché l'apparition des crises spontanées chez 33 % des rats. L'observation des crises motrices a été



effectuée jusqu'à 35-42 jours après l'EdM, ce qui peut-être considéré comme un délai trop court. Paradiso et al. (2009) ont injecté unilatéralement dans l'hippocampe un facteur viral exprimant le FGF-2 et le BDNF (qui sont des facteurs neurotrophiques) 3 jours après l'EdM. Ces facteurs neurotrophiques n'ont pas eu d'effet neuroprotecteur mais ont induit une augmentation de la neurogenèse dans l'hippocampe. Ils ont entraîné une diminution de la fréquence et la sévérité des crises, ainsi qu'empêché l'apparition des crises spontanées chez 20 % des rats.

L'effet des anti-inflammatoires (inhibiteurs de la Cox, qui joue un rôle dans la production de prostaglandines pro-inflammatoires) aspirine (Ma et al., 2012), celecoxib (Jung et al., 2006) et parecoxib (Polascheck et al., 2010) ont été évalué. L'administration d'aspirine a entraîné la diminution de la fréquence et de la durée des crises, ainsi qu'une neuroprotection dans l'hippocampe. Le celecoxib a permis de diminuer la perte neuronale dans CA1, CA3 et le hile de l'hippocampe, de diminuer la fréquence et la durée des crises, et d'empêcher l'apparition des crises spontanées chez 44 % des rats (observation jusqu'à 42 jours après l'EdM). Le parecoxib a induit la diminution des pertes neuronales dans CA1 et le cortex piriforme, une très légère amélioration de l'apprentissage spatial, et une diminution la sévérité des crises. L'immunosuppresseur fingolimod (Gao et al., 2012) a entraîné la prévention de l'apparition des crises motrices chez la moitié des rats. Cependant, la durée d'enregistrement des crises était seulement 21-34 jours après l'EdM, ce qui n'est pas suffisant pour conclure sur un effet à long-terme. En revanche une diminution de la fréquence, de la durée et de la sévérité a été relevée. Une neuroprotection dans l'hippocampe a également été observée.

Le groupe de Wolfgang Löscher (Brandt et al., 2010) a associé le bumétanide (sans effet quand il est administré seul, voir plus haut) au phénobarbital (qui est efficace seul, voir plus haut). Cela a permis de diminuer fortement l'altération des comportements liés à l'anxiété, de diminuer la fréquence des crises spontanées, et d'augmenter la latence d'apparition des crises.

Enfin, notre groupe (François et al., 2011) a récemment testé le carisbamate (90 mg/kg) administré 1 heure et 9 heures après le début de l'EdM lithium-pilocarpine puis deux fois par jours pendant 7 jours. Ce traitement a protégé CA1, les cortex piriforme et entorhinal, ainsi que le thalamus. Il a permis d'empêcher l'apparition des crises spontanées (contrôlées jusqu'à 2 mois après l'EdM) chez la moitié des rats. Ces crises étaient remplacées par des décharges

de pointes-ondes corticales bilatérales et synchrones (caractéristiques de l'épilepsie-absences) répondant très bien au traitement antiépileptique adapté (ethosuximide). C'est la première fois qu'un traitement permet de modifier une épilepsie grave en une forme beaucoup moins grave.

**Résumé : De plus en plus d'études montrent des effets très intéressants concernant la neuroprotection et la modification de l'épileptogénèse. Cependant, peu d'études à l'heure actuelle décrivent de vrais effets « antiépileptogènes », c'est-à-dire le fait qu'un traitement empêche l'apparition des crises. C'est ce type de modification qu'il faut rechercher dans un traitement pour éviter aux patients tous les aspects délétères de la pathologie (crises et cognition). Toutefois, la diversité des protocoles rend difficiles les comparaisons entre études, et nécessite une certaine homogénéisation entre études précliniques. C'est d'ailleurs l'objectif des récentes recommandations proposées par l'ILAE et l'AES (*American Epilepsy Society*) de façon à permettre la reproductibilité des résultats dans différents groupes de recherches, et à résoudre les difficultés techniques et méthodologiques couramment observées dans les différentes études (Galanopoulou et al., 2013).**

Tableau 4 : Exemples de traitements ayant un effet antiépileptogène

Traitement	Durée EdM, stoppé avec	1 <sup>ère</sup> injection du traitement	Durée traitement	Effet sur les crises	Effets sur les lésions	Effets sur le comportement	Références
Prégabalin	Non précisée (lithium-pilocarpine), non stoppé	20 min après injection de pilocarpine (début EdM, 50 mg/kg))	7 jours (50 mg/kg) puis 10 mg/kg jusqu'à la fin de l'expérience	Augmentation latence (39 jours vs 22 jours chez les rats on-traités)	Diminution dans cortex piriforme et entorhinal	Non explorés	André et al., 2003 (groupe Nehlig)
Topiramate	60 min (pilocarpine), diazépam	60 min (30 mg/kg)	4 jours (30 mg/kg)	Diminution proportion de rats avec crises motrices (-60 %) 3 à 6 mois après EdM	Diminution dans CA1	Non explorés	DeLorenzo et al., 2002 (groupe Razvi)
Phénobarbital	90 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	90 min (25 mg/kg)	5 ou 14 jours (15 mg/kg, deux fois par jour)	Augmentation latence et diminution fréquence	Aucun	Aucun	Brandt et al., 2010 (groupe Löscher)
Kétamine (antagoniste NMDA)	120 min (pilocarpine), clonazépam (1 mg/kg)	15 min ou 120 min (100 mg/kg)	Injection unique	Protocole 15 min : Pas de crises motrices Protocole 120 min : Aucun effet	Protocole 15 min : Pas de lésions Protocole 120 min : Aucun effet	Protocole 15 min : Pas de déficit de mémoire spatiale Protocole 120 min : Aucun effet	Hort et al., 1999 (groupe Komarek)

Tableau 5 : Exemples de traitements ayant un effet antiépileptogène

Traitement	Durée EdM, stoppé avec	1 <sup>ère</sup> injection du traitement	Durée traitement	Effet sur les crises	Effets sur les lésions	Effets sur le comportement	Références
Erythropoïétine	60 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	1h (5000 unités/kg)	7 jours (5000 unités/kg)	Pas de crises motrices chez 33 % des rats (35-42 jours après EdM), diminution de la fréquence et de la sévérité	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Non explorés	Chu et al., 2008 (groupe Rho)
Facteur viral (HSV) exprimant FGF-2 + BDNF (facteurs neurotrophiques)	120 min (pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	3 jours (injection intrahippocampique unilatérale avec pompe à infusion)	Injection unique	Pas de crises motrices chez 20 % des rats (14-28 jours après EdM), diminution de la fréquence et de la sévérité	Aucun, mais augmentation neurogenèse dans l'hippocampe	Non explorés	Paradiso et al., 2009 (groupe Simonato)
Aspirine (inhibiteur Cox non-sélectif)	70 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	70 min ou 4 h ou 25 h (20 mg/kg)	20 jours (20 mg/kg)	Diminution de la fréquence et la durée (30 jours après EdM)	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Non explorés	Ma et al., 2012 (groupe Jiang)
Fingolimod (immunosuppresseur)	60 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	24 h	14 jours	Pas de crises motrices chez 50 % des rats (21-34 jours après EdM), diminution de la fréquence, de la durée et de la sévérité	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Non explorés	Gao et al., 2012 (groupe Jiang)

Tableau 6 : Exemples de traitements ayant un effet antiépileptogène

Traitement	Durée EdM, stoppé avec	1 <sup>ère</sup> injection du traitement	Durée traitement	Effet sur les crises	Effets sur les lésions	Effets sur le comportement	Références
Celecoxib (anti-inflammatoire inhibiteur de la Cox-2)	120 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	1 jour (voie orale)	28 jours	Pas de crises motrices chez 44 % des rats (42 jours après EdM), diminution fréquence et intensité	Diminution dans CA1, CA3 et le hile	Non explorés	Jung et al., 2006 (groupe Roh)
Parecoxib (anti-inflammatoire inhibiteur de la Cox-2)	90 min (lithium-pilocarpine, femelles), diazépam (10 mg/kg)	90 min (10 mg/kg)	17 jours (10 mg/kg deux fois par jour)	Diminution de la sévérité des crises	Diminution dans CA1 et le cortex piriforme	Très faible légère diminution des déficits de l'apprentissage spatial	Polascheck et al., 2010 (groupe Löscher)
Bumétanide + phénobarbital	90 min (lithium-pilocarpine), diazépam (10 mg/kg)	90 min (pompe à infusion continue)	5 ou 14 jours	Augmentation latence, diminution fréquence	Non explorés	Diminution de l'altération de l'anxiété	Brandt et al., 2010 (groupe Löscher)
Carisbamate	Non précisée (lithium-pilocarpine), non stoppé (Diazépam 2,5 et 1,25 mg/kg à 1 h et 9 h)	60 min (90 mg/kg)	7 jours (90 mg/kg)	Pas de crises motrices chez 50 % des rats (8 semaines après EdM), remplacées par décharges de pointes-ondes corticales bilatérales et synchrones	Diminution dans CA1, les cortex piriforme et entorhinal, et le thalamus	Non explorés	François et al., 2011 (groupe Nehlig)









# MATERIELS ET METHODES



## 1. Animaux

Les animaux utilisés dans ce travail de thèse étaient des rats Sprague-Dawley mâles adultes (185-200 g) provenant des centres d'élevage Charles River (L'Abresle, France). Ils étaient maintenus dans des cages individuelles (42 x 26 x 18 cm) dans des conditions contrôlées (température  $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , cycle diurne/nocturne 12 h/12 h avec éclairage à partir de 7 h du matin) avec de la nourriture et de l'eau à volonté.

Toutes les expériences ont respecté la directive du Conseil de l'Union Européenne du 22 septembre 2010 (2010-63), et les décret et arrêtés du Ministère de l'Agriculture du 7 février 2013 (2013-118). Les expériences ont été menées sous la direction et la responsabilité d'Astrid Nehlig (autorisation n°67-97) et Jean-Christophe Cassel (autorisation 67-215). Les protocoles ont été approuvés par le Comité Régional d'Ethique en Matière d'Expérimentation Animale de l'Université de Strasbourg (CREMEAS) (autorisations n°AL/01/04/03/07 pour les publications 1 et 2, et n°AL/100/103/02/13 pour la publication 3). Les recommandations ARRIVE du NC3Rs ([www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk)) et de la déclaration de Bâle ([www.basel-declaration.org](http://www.basel-declaration.org)) ont été respectées. Par conséquent, le concept des 3R (remplacement, raffinement, réduction) a été pris en considération lors de l'élaboration des expérimentations.

## 2. Induction de l'état de mal lithium-pilocarpine

Tous les EdM ont été induits chez des rats Sprague-Dawley mâles adultes une à deux semaines après leur arrivée au laboratoire. Cette souche a été choisie pour améliorer la reproductibilité et l'efficacité (moins de morts, plus d'animaux épileptiques) des EdM lithium-pilocarpine, car elle est utilisée en routine par le groupe (Motte et al., 1998 ; Fernandes et al., 1999 ; André et al., 2001a, 2001b ; Roch et al., 2002 ; André et al., 2003, Rigoulot et al., 2004 ; Detour et al., 2005 ; François et al., 2006 ; André et al., 2007 ; François et al., 2011).

Les animaux ont subi l'injection d'une dose de chlorure de lithium (127 mg/kg, i.p., Sigma-Aldrich) entre 18 et 24 heures avant l'administration d'hydrochlorure de pilocarpine (25 mg/kg, s.c., Sigma-Aldrich), l'agoniste cholinergique ciblant les récepteurs muscariniques qui a permis de déclencher l'EdM. Trente minutes avant et 30 minutes après cette injection, les animaux ont reçu une dose de méthylbromure de scopolamine (1 mg/kg, s.c., Sigma-Aldrich) afin de limiter les effets périphériques de la pilocarpine (bradycardie, diarrhée, piloérection, salivation). Les animaux témoins ont subi l'injection de lithium et une injection de sérum physiologique à la place de la pilocarpine.

Les premières crises (mâchonnements et clonies des pattes antérieures) induites par la pilocarpine apparaissent environ une demi-heure après l'administration de la pilocarpine. L'entrée en EdM correspond à l'apparition de la troisième crise de stade 5 (selon l'échelle de Racine (1972)), c'est-à-dire une crise avec clonies, redressement, puis chute. Une heure après le début de l'EdM, les animaux subissaient l'injection d'une dose de diazépam (2,5 mg/kg, i.m., Roche), suivie d'une seconde injection, 8 heures plus tard (1.25 mg/kg, i.m.). Ces injections permettent de diminuer la mortalité liée à l'EdM grâce aux effets myorelaxants et anxiolytiques du diazépam à ces faibles doses qui toutefois n'atténuent pas la sévérité de l'EdM et donc l'épilepsie qui s'ensuivra.

### 3. Traitement par le carisbamate

A la place du diazépam (à 1 et 9 heures après l'EdM), une partie des rats ayant subi l'administration de pilocarpine recevaient du carisbamate (90 mg/kg, i.p., Johnson & Johnson). Ce composé était dissous dans 45 % d'hydropropyl- $\beta$ -cyclodextrine (Acros Organics). Pendant les 6 jours suivants, les rats recevaient deux injections par jour de carisbamate (90 mg/kg, s.c.).

## 4. Récupération et contrôle vidéo des crises

Pendant les premiers jours « de récupération », les animaux étaient nourris avec de la blédine sucrée. Ensuite, ils étaient placés sous surveillance vidéo à raison de 10 heures d'enregistrement par jour (de 7h00 à 17h00) et ce durant 8 semaines. Dès qu'un rat avait une crise motrice au minimum de stade 3 (clonies des pattes antérieures), il était considéré comme épileptique du lobe temporal. Les groupes étaient ensuite constitués : les rats qui avaient reçu du sérum physiologique étaient les rats témoins ; ceux qui avaient reçu de la pilocarpine et du diazépam, et qui présentaient au moins une crise motrice de stade 3 lors de la vidéosurveillance étaient les rats avec ELT (100 % des rats traités par le diazépam) ; ceux qui avaient subi l'administration de la pilocarpine et du carisbamate, et 1) qui avaient présenté au moins une crise motrice de stade 3 étaient alloués au groupe ELT (avec ou sans traitement par le carisbamate) ; 2) qui n'ont pas présenté de crise motrice étaient alloués au groupe de rats épileptiques de type absence. En effet, dans l'article du groupe portant sur les effets du carisbamate (François et al., 2011), il a été montré que l'absence de crise motrice chez les rats traités par le carisbamate était corrélée à la présence de décharges de pointes-ondes au niveau cortical, un marqueur caractéristique de l'épilepsie-absences.

## 5. Les tests comportementaux

### 5.1. L'actographie



Figure 16 : Photographie du dispositif d'actographie

Ce test a pour but de mesurer l'activité locomotrice dans un environnement relativement familier : une cage d'élevage (Figure 16). Les animaux étaient placés dans de nouvelles cages avec peu de sciure (cages identiques aux cages de stabulation habituelles). Les cages étaient posées sur des étagères équipées de cellules photoélectriques à faisceau infrarouge (2 cellules par cage, 1 à chaque extrémité, séparées de 28 cm). Ces cellules étaient disposées de sorte que les faisceaux traversent la cage dans le sens de sa largeur à une hauteur de 4,5 cm. Lorsque l'animal coupait les deux faisceaux consécutivement en se déplaçant dans la cage, un déplacement longitudinal était enregistré par un ordinateur. L'enregistrement débutait par une phase d'habituation de 3 heures (de 11h00 à 14h00). Pendant cette période, le rat se familiarise avec les conditions du test, ce qui se traduit par une progressive atténuation d'une activité locomotrice initialement élevée. S'ensuivait l'enregistrement de l'activité locomotrice dite « basale ». Cette dernière était divisée en deux périodes : une période où les lumières étaient allumées (de 14h00 à 19h00, puis de 7h00 à 11h00 le lendemain), et une période où elles étaient éteintes (de 19h00 à 7h00 le lendemain). Ce cycle correspondait au cycle respecté dans les salles de stabulation.

## MATERIELS ET METHODES

La période d'habituation permet de ne pas inclure l'augmentation de l'activité due à l'exploration d'un nouvel environnement dans la mesure de l'activité locomotrice basale. Elle permet également de vérifier que cette période d'habituation se déroule normalement chez les animaux.

Ce test permet de connaître l'activité motrice des animaux pendant les périodes diurne et nocturne afin de pouvoir déceler un éventuel ralentissement locomoteur ou au contraire une augmentation de l'activité. De plus, ce test permet d'observer, quoique de manière relativement imprécise, la cyclicité du rythme des animaux (augmentation locomotrice nocturne par rapport à l'activité diurne). Ainsi, ces observations peuvent permettre de déceler des altérations dans les comportements de base susceptibles de biaiser d'autres variables comportementales.

### 5.2. Le test de franchissement d'une barre étroite surélevée (« test de la barre »)



Figure 17 : Photographie du dispositif du test de la barre

Ce test permet de mesurer la coordination sensorimotrice des animaux. Une barre de 200 cm de long (et 2,5 cm de large) est placée à 80 cm du sol, juste sous un néon qui fournit



## MATERIELS ET METHODES

l'éclairage (Figure 17). La cage de l'animal est déposée à une extrémité de la barre (elle sert de motivation). Cette dernière est virtuellement divisée en quatre segments de 50 cm. Ce test nécessite un entraînement préalable qui s'étale sur 4 jours successifs. Au cours du premier jour, le rat est déposé sur la barre à une distance de 50 cm de sa cage (le dernier segment), cela à cinq reprises. Si l'animal n'avance pas ou avance difficilement, il est possible de déposer un peu de sa sciure sur la barre afin de le motiver à rejoindre sa cage. Le deuxième jour, le rat doit parcourir successivement 50, 100, 150 et 200 cm. Lors du troisième jour, le rat est placé deux fois de suite à 100 cm et deux fois à 200 cm de sa cage. Le quatrième jour, le rat est placé à 200 cm de sa cage trois fois de suite. Enfin, le lendemain du quatrième jour d'entraînement, on procède au test, qui comporte trois essais. En effet, le rat est placé trois fois de suite à 200 cm de la cage. Il doit traverser la barre, mais cette fois, son comportement est évalué : l'expérimentateur attribue 1 point pour chaque segment de 50 cm traversé avec les quatre pattes sur la surface de la barre. Si le rat glisse ou place ses doigts sur le côté de la barre en parcourant un segment, le score attribué pour ce segment est de 0. Le score maximal pour 3 essais est donc de 12 points. L'expérimentateur ne connaît pas le groupe d'appartenance des rats.

### 5.3. Le test du champ ouvert (*open field*)



Figure 18 : Photographie du dispositif du champ ouvert

## MATERIELS ET METHODES

Ce test permet de mesurer l'habitué d'un rat à un nouvel environnement. Le champ ouvert est constitué d'un dispositif carré (65 cm de côté) délimité par des cloisons d'une hauteur de 43 cm. Le sol présente un quadrillage de 25 carrés égaux (5 x 5 ; côté = 13 cm) (Figure 18). Ce champ ouvert est placé sous un néon de façon à ce que l'illumination soit relativement homogène dans l'enceinte, et à éviter la mise en place d'une préférence pour un endroit du dispositif qui serait moins éclairé. Pour commencer le test, le rat est placé au centre du champ ouvert. Il est laissé dans le dispositif pendant 10 minutes. Le nombre de carrés traversés et celui des redressements sont relevés par intervalles de 2 minutes par un expérimentateur ne connaissant pas le groupe d'appartenance des rats. Outre l'évaluation d'une réactivité locomotrice à la nouveauté de la situation, ce test permet également une mesure fine de l'habitué, qui se caractérise classiquement par une activité locomotrice s'amenuisant progressivement au cours du test.

### 5.4. Le test du labyrinthe en croix surélevé



Figure 19 : Photographie du dispositif du labyrinthe en croix surélevé

Ce test permet d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux. Le dispositif est constitué d'un labyrinthe en croix comportant deux branches opposées qui sont ouvertes (50 cm de

## MATERIELS ET METHODES

longueur, 10 cm de largeur, et une bordure d'une hauteur de 1,5 cm) et deux branches opposées de même longueur et largeur qui sont dites « fermées », car bordées de cloisons d'une hauteur de 40 cm (Figure 19). Ces quatre branches sont reliées au niveau d'une plate-forme centrale carrée (10 cm de côté). L'ensemble du dispositif est placé à 73 cm de hauteur. Quatre lampes halogènes sont disposées à des points équidistants du dispositif de sorte que l'illumination des bras ouverts soit de 30 lux et celle des bras fermés de 5 lux. Une caméra placée au-dessus du dispositif permet d'enregistrer les déplacements du rat dans le dispositif à l'aide d'un ordinateur. Le rat est amené dans la pièce d'expérimentation 5 minutes avant le début du test pour lui permettre de s'habituer à l'environnement du test. Le test dure 5 minutes et débute par le placement du rat sur la plate-forme centrale, tête dirigée vers un bras fermé. Le nombre d'entrées dans chaque branche de même que le temps passé dans chaque branche sont relevés. L'expérimentateur ne connaît pas le groupe d'appartenance des rats.

Ce test, développé par Pellow et File (1986), repose sur l'opposition entre le comportement naturel d'exploration d'un nouvel environnement (qu'est le dispositif) et la peur des environnements lumineux et ouverts (bras ouverts). Ainsi, un rat plus anxieux passera plus de temps et entrera plus fréquemment dans les bras fermés qu'un rat moins anxieux.

## 5.5. Le test de la piscine de Morris



Figure 20 : Photographie du dispositif de la piscine de Morris

Ce test développé par Morris (1981) permet, en adaptant le protocole, d'évaluer plusieurs formes différentes de mémoire: notamment la mémoire spatiale à long-terme (ou mémoire de référence), la mémoire spatiale de travail et la mémoire procédurale. Le dispositif est constitué d'une piscine circulaire (de 160 cm de diamètre et 60 cm de hauteur) remplie à mi-hauteur d'eau (à environ 21°C). L'eau est opacifiée par adjonction de lait en poudre (Figure 20). Des indices visuels sont présents dans l'environnement (racks contenant les cages des animaux, lampe, formes géométriques noires accrochées aux murs, fenêtre, porte-manteau, etc.). Une plate-forme circulaire (de 11 cm de diamètre) est dissimulée à 1 cm sous le niveau de l'eau. Pour chaque essai, le rat est déposé dans l'eau face à la cloison de la piscine. Il dispose de 60 secondes au maximum pour rejoindre la plate-forme. Une fois sur cette dernière, il y demeure pendant 10 secondes. S'il ne trouve pas la plate-forme pendant les 60 secondes que dure l'essai, l'expérimentateur l'y guide délicatement à l'aide de sa main. La piscine est virtuellement divisée en quatre quadrants égaux, et les points de départ du rat, ainsi

## MATERIELS ET METHODES

que la position de la plateforme sont déterminés selon un plan précis en fonction de la forme de mémoire testée (voir ci-après). Chaque essai est enregistré à l'aide d'un système de vidéo-*tracking* placé au-dessus de la piscine et connecté à un ordinateur équipé d'un logiciel spécialisé. La latence et la distance nagée avant d'atteindre la plate-forme sont enregistrées, comme l'est le trajet du rat, le temps passé dans les différents quadrants et sa vitesse de nage. D'autres variables sont également recueillies si des analyses plus fines devaient s'avérer nécessaires, notamment pour ce qui concerne la thigmotaxie (tendance d'un rat à nager à proximité de la cloison de la piscine plutôt que dans une partie plus centrale du bassin).

Le test de la piscine de Morris repose sur l'aspect aversif de l'eau à température ambiante pour le rat, ce qui le motive à retrouver la plate-forme pour sortir de l'eau rapidement. Néanmoins, son aptitude naturelle à la nage lui permet de se déplacer jusqu'à ce qu'il trouve cette plate-forme. Les indices visuels, ainsi que les indices auditifs (radio) et olfactifs (congénères dans leur cage), qui sont présents dans l'environnement sont autant d'éléments permettant au rat de se forger une représentation spatiale du dispositif et de la pièce de test, et d'apprendre l'emplacement de la plate-forme qui n'est pas visible. Une fois qu'il l'a trouvée, le fait de le laisser pendant 10 secondes sur son refuge permet au rat d'observer l'environnement pour en mémoriser les indices et leur configuration. Le rat est ensuite récupéré par l'expérimentateur puis emmené vers le prochain point de départ. Pendant ce déplacement, l'expérimentateur ne fait pas un trajet direct, de façon à limiter la possibilité pour le rat d'utiliser les indices du déplacement pour déterminer à l'avance la direction à prendre vers la plate-forme à partir du point de départ de l'essai suivant. La vitesse de nage est utilisée comme indicateur de motricité et de motivation. Plus le rat nage lentement, plus il est probable qu'il ait un problème locomoteur ou motivationnel.

### 5.5.1. Entraînement à la tâche en utilisant une plate-forme visible

Le protocole de plate-forme visible consiste en quatre essais par jour pendant 3 jours au cours desquels la plate-forme émergée (1 cm au-dessus de la surface) est localisée au même emplacement pendant une même journée, mais est déplacée d'un jour à l'autre. Suite à ces 3 jours d'entraînement, on passe à l'évaluation de la mémoire à long-terme (ou de

référence). A l'issue de l'évaluation de cette mémoire, une nouvelle session de plate-forme visible est réalisée ; la plate-forme est alors située à un emplacement différent de celui utilisé dans le protocole de mémoire à long-terme.

Les trois premiers jours ont pour but de familiariser le rat avec l'environnement et la tâche. Cette durée de trois jours, plus longue que pour un test classique, a été choisie du fait de déficits marqués en mémoire spatiale associés au modèle pilocarpine dans la littérature. En effet, il est possible que ces déficits soient en partie occasionnés par un manque d'entraînement des animaux au principe-même de la tâche avant de passer à la phase de test de mémoire à proprement parler.

### 5.5.2. Apprentissage et rétention de mémoire spatiale à long-terme avec la plate-forme immergée

Suite à ces trois jours, la plate-forme est immergée à 1 cm sous le niveau de l'eau et reste au même emplacement (le quadrant « sud-ouest ») pendant les 5 jours d'acquisition. En revanche, les points de départ ne sont jamais les mêmes au cours d'une session de 4 essais, et leur séquence est modifiée d'une séance à l'autre. Le test comprend 5 jours d'acquisition au cours desquels l'animal voit, théoriquement, sa performance s'améliorer (distance et latence pour accéder à la plate-forme de plus en plus courtes). Cette phase d'acquisition permet de mesurer l'apprentissage de l'emplacement de la plate-forme. Lors du 6<sup>e</sup> jour de test (soit 24 heures après la dernière séance d'apprentissage), le rat est soumis à un test de rétention qui consiste à placer l'animal dans la piscine pour un seul essai de 60 secondes, mais cette fois sans qu'il n'y ait de plate-forme dans la piscine. Pour ce test de rétention, la piscine est virtuellement divisée en quatre quadrants, dont le quadrant cible qui est celui où se trouvait la plate-forme lors de l'acquisition de la tâche. La mesure du temps passé dans chaque quadrant permet à l'expérimentateur de savoir si le rat se souvient de l'emplacement de la plate-forme. En effet, si le rat passe plus de temps dans le quadrant cible que dans chacun des autres quadrants, on peut conclure qu'il se souvient de l'emplacement de la plate-forme. On peut également mesurer le nombre de fois que le rat passe sur l'emplacement exact de la plate-forme, ce qui donne une information sur le degré de précision de la mémoire du rat. Il faut

toutefois noter que si d'une séance d'apprentissage à l'autre c'est la mémoire à long terme qui est utilisée, d'un essai à l'autre au sein de la même séance la mémoire de travail intervient également, surtout au début de l'acquisition.

### 5.5.3. Evaluation de la motivation, de la motricité et de la vision : le test de la plate-forme visible

Un nouveau test avec plate-forme visible est réalisé le jour qui suit le test de rétention dans le but de vérifier les capacités visuelles, de motivation et motrices des animaux (une fois qu'ils ont appris et compris la tâche). La procédure est la même que pour l'« entraînement avec plate-forme visible » (voir plus haut), la plate-forme est disposée au-dessus du niveau de l'eau, et le rat effectue 4 essais consécutifs depuis différents points de départ. L'emplacement de la plate-forme est différent de celui qui a été utilisé pour l'apprentissage de l'emplacement d'une plate-forme immergée.

### 5.5.4. Evaluation de la mémoire spatiale de travail avec la plate-forme immergée

Suite au second test avec une plate-forme visible, les rats sont soumis à un protocole de test étalé sur 9 jours, à raison de 2 essais consécutifs par jour (points de départ équidistants de la plate-forme et modifiés tous les jours). La plate-forme immergée est déplacée tous les jours de façon à ce que l'animal ne puisse utiliser qu'une mémoire à court terme sans que les informations des jours précédents ne puissent lui être d'une quelconque utilité. Ainsi, pour chaque jour de test, le premier essai permettra au rat de repérer l'emplacement de la plate-forme pour le jour en question, le second d'utiliser la connaissance de cet emplacement pour le rejoindre le plus rapidement possible. Les moyennes des distances parcourues par le rat pour atteindre la plate-forme aux premier et deuxième essais sont calculées et leur comparaison permettra de vérifier s'il y a eu ou non amélioration d'un essai à l'autre. Une amélioration des performances entre les deux essais est considérée comme traduisant une mémoire de travail opérationnelle.

### 5.5.5. Evaluation de la mémoire procédurale avec la plate-forme immergée

Enfin, un protocole d'apprentissage visant à évaluer la mémoire procédurale a été utilisé. Dans ce protocole, la plate-forme est immergée et 4 essais quotidiens sont réalisés pendant 8 jours consécutifs. La plate-forme n'est jamais déplacée et les 4 essais de chaque jour se font à partir du même point de départ (le point « Sud-Est »), de manière à influencer le type de mémoire que le rat utilise. En effet, partant du même point pour arriver au même endroit au cours de tous les essais, le rat a la possibilité d'utiliser une forme d'automatisme, de mémoire appelée mémoire procédurale et basée sur des informations « égocentrées », c'est-à-dire liées au mouvement de son corps. Ces informations sont la direction du corps, les mouvements effectués pour se déplacer, les informations proprioceptives. Ce type de mémoire ne nécessite pas une représentation complexe de l'environnement. A l'inverse de la mémoire spatiale, il requiert un apprentissage important basé sur la répétition et débouche sur la mise en place d'un automatisme. Après cet apprentissage, les animaux sont soumis à un test de rétention (sans plate-forme) de 60 secondes. Le point de départ du rat est différent de celui utilisé pendant l'apprentissage. Il correspond à une rotation de 90° dans le sens des aiguilles d'une montre du point de départ précédent. Le point de départ n'est donc plus au « Sud-Est » mais au « Sud-Ouest ». L'intérêt de cette manipulation est de pouvoir vérifier quel type de mémoire le rat a utilisé dans ce test. Si le rat utilise uniquement sa mémoire procédurale, auquel cas il devrait être leurré par le nouveau point de départ, il effectue exactement le même trajet par rapport au point de départ que pendant l'apprentissage, et donc ira dans une direction qui ne correspond pas à l'ancien emplacement de la plate-forme d'un point de vue allocentrique, mais qui lui correspondra bien du point de vue égocentrique. A l'inverse, s'il a utilisé sa mémoire spatiale (éventuellement en combinaison avec sa mémoire procédurale), il va se diriger directement vers l'ancien emplacement de la plate-forme sans être leurré.

L'inconvénient de ce test est que la piscine permet un déplacement libre dans l'espace du dispositif. Il est donc difficile de forcer l'animal à apprendre un trajet unique de façon à ce qu'il devienne « procédural » malgré un nombre d'essais important. C'est pour cette raison, et pour évaluer le passage d'une mémoire procédurale à une mémoire spatiale, qu'un autre test a été développé au sein du laboratoire, celui dit du « double-H » (voir Pol Bodetto et al., 2011).



## 5.6. Le test du labyrinthe en double-H



Figure 21 : Photographie du dispositif du labyrinthe en double-H

Le « double-H » est un labyrinthe (au sens strict du terme) aquatique récemment développé par Jean-Christophe Cassel et validé par le laboratoire (Pol-Bodetto et al., 2011 ; Schumacher et al., 2011 ; Cassel et al., 2012 ; Lecourtier et al., 2012 ; Cholvin et al., 2013). Il est composé de 3 branches parallèles (de 160 cm de longueur et 20 cm de largeur) qui sont traversées en leur milieu par une 4<sup>ème</sup> branche (perpendiculaire) (Figure 21). Le labyrinthe est fermé par des cloisons d'une hauteur de 35 cm. Des portes-guillotine permettent de condamner l'entrée de chaque branche. L'ensemble du dispositif est placé en hauteur (80 cm au-dessus du sol) dans une pièce dédiée pourvue de nombreux indices visuels. Le dispositif est partiellement rempli d'eau (21°C environ) qui est opacifiée à l'aide de lait en poudre. Une plate-forme d'un diamètre de 11 cm est placée sous le niveau de l'eau (2,5 cm en-dessous) dans le bras « Nord-Ouest ». Le protocole comporte 4 jours d'apprentissage à raison de 4 essais discrets par jour (le rat est placé 5 minutes dans sa cage entre chaque essai), puis d'un test de rétention le 5<sup>ème</sup> jour, suivi à nouveau de 4 jours d'apprentissage et d'un second test de rétention. Lors de l'apprentissage, le rat est placé dans le bras « Nord » au début de chaque essai. De la même façon que dans le test de la piscine de Morris, si le rat ne trouve pas la plate-forme au bout de 60 secondes, il y est conduit par l'expérimentateur. On mesure la distance parcourue avant d'atteindre la plate-forme. Lors des tests de rétention, le rat est placé

## MATERIELS ET METHODES

dans la branche « Nord-Est » et laissé libre de son comportement de recherche pendant 60 secondes. Pour cet essai, la plate-forme est retirée du dispositif. On mesure alors le temps passé dans le bras « Nord-Ouest » (où se trouvait auparavant la plate-forme) et la latence d'entrée dans les bras « Nord » et « Nord-Ouest ».

L'intérêt de ce dispositif est qu'il ne permet pas un déplacement aussi libre que dans la piscine de Morris. Le test offre en outre la possibilité d'influencer plus facilement le type de mémoire utilisée par le rat pour apprendre à aller vers la plate-forme. L'animal va être en quelque sorte contraint d'effectuer une séquence de déplacement qui sera identique d'un essai à l'autre pour rejoindre la plate-forme ; dans notre cas, aller à droite puis à droite, par exemple.

L'intérêt du protocole est qu'il permet de vérifier le niveau d'apprentissage au fur et à mesure de la tâche grâce aux deux tests de rétention. De plus, après avoir provoqué un apprentissage procédural, le test de rétention permet de vérifier si l'animal a également (et en parallèle) effectué un apprentissage basé sur les indices spatiaux. L'expérimentateur peut donc vérifier si le rat est capable d'utiliser un apprentissage plus que l'autre (par exemple, un rat qui va directement dans le bras « Nord-Ouest » lors du test de rétention n'aura pas utilisé son apprentissage procédural puisqu'il n'aura pas effectué la séquence de déplacement, à savoir droite-droite, qui l'aurait amené dans le bras « Nord »).

## 5.7. Le test du labyrinthe radial à huit branches



Figure 22 : Photographie du dispositif du labyrinthe radial à huit branches

Le labyrinthe radial à 8 branches, également connu sous le nom de labyrinthe de Olton (Olton et Samuelson, 1976), permet d'évaluer la mémoire spatiale à long-terme et la mémoire spatiale de travail. Le dispositif est composé d'une plate-forme centrale octogonale (de 40 cm de diamètre), d'où rayonnent 8 branches radiales (de 56 cm de longueur et 10 cm de largeur) équipées de cloisons sur la partie proche de l'entrée (de 30 cm de hauteur et 20 cm de longueur), et d'un rebord sur le bout de la branche (3 cm de hauteur) (Figure 22). A 3 cm du bout de la branche, un petit réceptacle creusé permet d'y placer de la nourriture. Les branches sont équipées d'émetteurs et de photorécepteurs infrarouges dont les faisceaux traversent les branches à 12 cm de l'entrée et à 10 cm de l'extrémité (à une hauteur de 4 cm au-dessus du sol du dispositif). Le dispositif est placé en hauteur (à 68 cm du sol de la salle d'expérimentation). Le labyrinthe est relié à un ordinateur qui permet d'enregistrer le nombre d'interruptions des faisceaux, ainsi que la séquence des interruptions, donc de suivre le déplacement du rat dans les branches du dispositif. Avant de commencer le test, les animaux sont placés en restriction alimentaire, c'est-à-dire que le poids des rats est diminué progressivement (sur 10 jours) jusqu'à atteindre 85 % du poids de départ.

## MATERIELS ET METHODES

L'évaluation de la mémoire spatiale de travail dans le labyrinthe radial à 8 branches nécessite un pré-entraînement de l'animal au dispositif et à la tâche qu'il doit accomplir. Ce pré-entraînement dure 5 jours, au cours desquels le rat est placé dans le dispositif dont une seule branche est accessible le 1<sup>er</sup> jour (avec trois pastilles de nourriture de 45 mg chacune dans le réceptacle), deux branches adjacentes le 2<sup>ème</sup> jour (avec trois pastilles dans chaque branche), et trois branches adjacentes les trois derniers jours (avec deux pastilles dans chaque branche). Les animaux sont laissés dans le dispositif jusqu'à ce qu'ils aient mangé toutes les pastilles.

Suite à ce pré-entraînement, l'entraînement débute. Chaque branche est alors appâtée à l'aide d'une pastille et toutes les branches sont ouvertes. Une fois placés dans le dispositif, les rats peuvent visiter toutes les branches, ce qui met fin à l'essai. Lorsque le rat n'a pas visité toutes les branches au bout de 10 minutes, l'ordinateur met automatiquement fin à l'essai. Au cours d'un même essai, lorsque l'animal visite une branche plus d'une fois, chaque nouvelle visite de cette branche est considérée comme une erreur de mémoire de travail. Ce protocole standard a été appliqué lors des 8 premiers jours, à raison de deux essais par jour. Ensuite, un second protocole a été mis en place et utilisé pendant 6 jours à raison de deux essais par jour. Dans ce deuxième protocole, les rats sont retirés du labyrinthe après 4 visites pendant 10 secondes avant d'y être réintroduits face au premier bras visité. Ce second protocole avait pour but de pénaliser (par un nombre d'erreurs plus important) les stratégies égocentriques non-spatiales des animaux (c'est-à-dire lorsqu'ils n'utilisent pas les indices spatiaux mais une stratégie procédurale, telle que « tourner à gauche, puis à gauche, puis à gauche..., par exemple »).

Le protocole utilisé permet d'évaluer la mémoire spatiale de travail. Toutefois, si un rat reste entre 5 et 10 minutes dans le labyrinthe et qu'il entre à nouveau dans une branche 5 minutes après la première entrée dans celle-ci, on peut se poser la question du type de mémoire que l'on évalue. Bien que les rats ne puissent pas effectuer des déplacements totalement libres du fait des branches, il est impossible de maîtriser la stratégie mise en place par les animaux pour récupérer les pastilles. C'est pour répondre à ce problème que le deuxième protocole reposant sur l'interruption d'un essai a été mis en place. Ainsi, si un rat utilise une stratégie qui n'est pas basée sur les indices spatiaux, une fois remis en face de la première branche visitée après l'interruption d'un essai, il visitera cette branche et continuera à visiter le labyrinthe de la même façon que lors de la première visite. Le nombre d'erreurs sera inévitablement augmenté, reflétant l'utilisation d'une stratégie non-spatiale.

5.8. Le test de temps de réaction sérielle à cinq choix (*5-choice serial reaction time task*)



Figure 23 : Photographies du dispositif du *5-choice serial reaction time task*

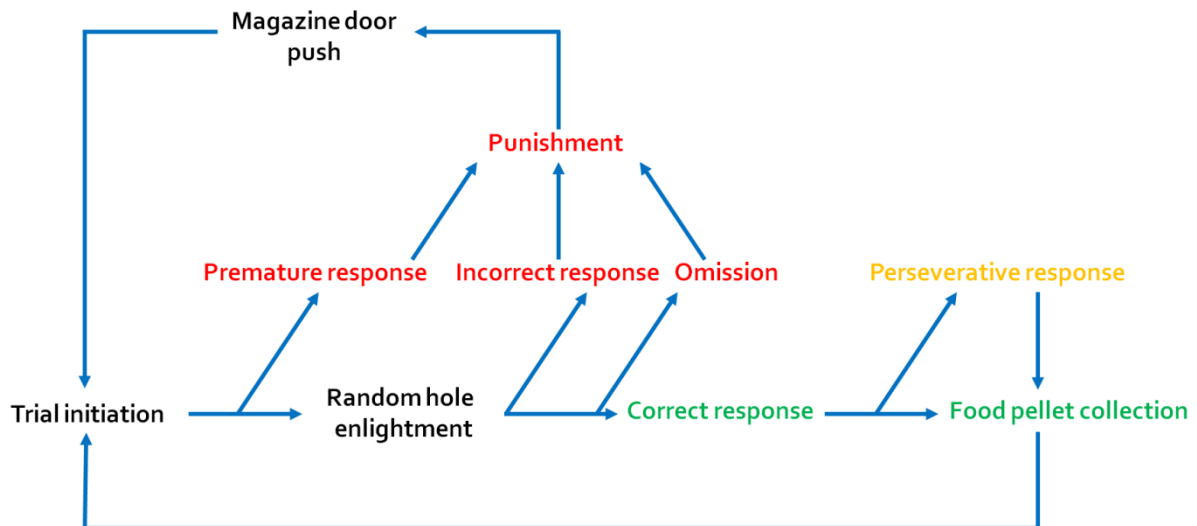


Figure 24 : Schéma des différentes réponses enregistrables dans le *5-choice serial reaction time task*

Ce test développé dans le laboratoire de Trevor Robbins (Carli et al., 1983) permet l'évaluation de plusieurs fonctions exécutives : l'attention visuelle soutenue, le contrôle inhibiteur (impulsivité, compulsivité) et les processus décisionnels. Le dispositif consiste en une chambre de conditionnement opérant à neuf trous placée dans une boîte ventilée et insonorisée pour minimiser l'incidence d'éventuels distracteurs. La chambre (d'une longueur de 25,2 cm, d'une largeur de 28 cm et d'une hauteur de 24 cm) dispose d'une lumière au plafond qui fournit un éclairage ambiant. Sur l'une des cloisons, qui est concave, se trouvent

## MATERIELS ET METHODES

neuf trous (d'un diamètre de 2,3 cm et d'une profondeur de 1,4 cm) équipés d'émetteurs et de photorécepteurs infrarouges pour détecter les réponses du museau de l'animal (Figure 23). Chaque trou permet de présenter un stimulus lumineux dont on peut définir la durée et l'intensité. Ce stimulus doit être détecté par les rats qui lui répondent en mettant leur museau dans le trou où le stimulus a été perçu. Dans la cloison opposée à la cloison concave, un réceptacle est placé (à distance égale de chaque trou) derrière une trappe battante. Le réceptacle est l'endroit où sont distribuées des pastilles calibrées de sucre (identiques à celles utilisées dans le labyrinthe radial) grâce à un distributeur automatique. Le rat doit pousser la trappe pour récupérer la pastille. La chambre est contrôlée par un ordinateur à l'aide d'un logiciel.

### 5.8.1. Entraînement

Le test nécessite un entraînement composé de plusieurs phases pour habituer l'animal au dispositif et pour lui permettre de comprendre progressivement la tâche qu'il doit effectuer pour obtenir les pastilles. Lors des trois premières phases, aucun trou n'est ouvert. Durant la première phase, les rats sont placés pendant 15 minutes dans la chambre de conditionnement. La lumière du plafond est éteinte et la porte battante du réceptacle retirée (elle n'est pas présente lors des deux premières séances). Quinze pastilles sont présentes dans le réceptacle. Lors de la deuxième phase, les rats sont placés pendant 20 minutes dans la chambre, avec la lumière du plafond allumée, et 20 pastilles sont délivrées dans le réceptacle suivant un programme à temps variable avec un intervalle moyen de 1 minute (c'est-à-dire que les pastilles vont tomber une à une automatiquement avec un intervalle entre deux pastilles qui est défini pseudo-aléatoirement, de façon à ce que le temps moyen entre deux pastilles soit de 1 minute). La troisième phase est la même que la seconde, mais la porte battante est mise en place dans le dispositif pour habituer les animaux à sa présence et pour les conduire à la pousser. Pendant la quatrième phase, les rats sont placés pendant 30 minutes dans la chambre et seul le trou central est ouvert et illuminé. Chaque fois que le rat met son museau dans le trou, une pastille est délivrée dans le réceptacle. Au moins 50 visites du museau dans le trou sont nécessaires pour passer à la prochaine phase.

## MATERIELS ET METHODES

Après ces quatre premières phases, cinq trous sont désormais ouverts. La tâche du rat consiste à répondre au stimulus visuel présenté aléatoirement dans un des cinq trous. Une séance démarre avec la lumière du plafond allumée ; une pastille est automatiquement délivrée. Les rats doivent pousser la porte battante pour récupérer la pastille et initier le premier essai, après un intervalle inter-essais de 5 s. Après cet intervalle inter-essais, l'un des cinq trous s'allume aléatoirement selon une durée de stimulus déterminée précédemment et fixe pendant l'ensemble de la séance. Si le rat répond au stimulus en plaçant son museau dans le trou pendant la présentation du stimulus ou pendant la période déterminée qui suit (5 secondes après l'extinction de la lumière du trou), une réponse correcte est enregistrée et récompensée par la distribution d'une pastille (Figure 24). Chaque réponse supplémentaire donnée par le rat dans n'importe quel trou au cours de ce même essai est enregistrée comme une réponse persévérative. Une réponse donnée par le rat pendant la période de réponse (constituée de la durée du stimulus additionnée à la période de 5 secondes qui suit) dans n'importe quel autre trou que le trou allumé est enregistrée comme une réponse incorrecte et est punie par une extinction de toutes les lumières pendant 5 secondes. Une absence de réponse pendant la période de réponse est considérée comme une omission, et une réponse pendant l'intervalle inter-essais comme une réponse prématurée. Toutes deux sont également punies par 5 secondes d'extinction des lumières. Après une réponse correcte ou une période d'extinction des lumières, l'essai suivant est initié quand le rat pousse la porte battante du réceptacle. Une séance est terminée lorsque le rat a effectué 100 essais ou que 30 minutes se sont écoulées. Lors des premières séances, la durée du stimulus est de 45 secondes, puis elle est progressivement diminuée à 30, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1 et 0,5 secondes. Les critères pour atteindre la phase suivante sont qu'au moins 35 essais aient été terminés (comprenant uniquement les réponses correctes et incorrectes), 60 % de réponses correctes données (nombre de réponses correctes / nombre d'essais terminés x 100), et moins de 20 % d'omissions relevées (omissions / tous les essais exceptés ceux qui finissent pas une réponse prématurée x 100). Lors de l'apprentissage, une fois la durée du stimulus abaissée à 3 secondes, le critère en matière de pourcentage d'omissions a été augmenté à 40 % car certains rats épileptiques omettaient plus d'essais et n'atteignaient pas le critère précédent (20 %). Le nombre d'essais initiés (omissions + réponses prématurées + réponses correctes + réponses incorrectes), le pourcentage de réponses persévératives (réponses persévératives / réponses correctes x 100), la latence aux réponses correctes, et la latence à la récupération d'une pastille après une réponse correcte (latence au réceptacle) ont été analysés.

### 5.8.2. Tests

Après trois sessions caractérisées par des performances stables (séances consécutives sans différences significatives entre les séances) à une durée de stimulus égale à 0,5 seconde, tous les rats sont passés dans différentes conditions de variation paramétrique pour permettre l'évaluation de leurs fonctions exécutives. Tout d'abord, l'intensité du stimulus est diminuée de 9 (100 %) à 2 (22 %). Ensuite, les rats sont testés à nouveau en conditions lumineuses standard (9), mais la durée de stimulus est augmentée de 0,5 à 5 secondes. Les données collectées sont celles de trois sessions consécutives caractérisées par des performances stables, et ce dans chaque condition.

Le principal avantage de ce test est qu'il est l'un des seuls permettant d'évaluer l'attention chez le rongeur. Il permet également de tester d'autres fonctions exécutives telles que le contrôle inhibiteur et les processus décisionnels. L'évaluation des animaux dans ce test nécessite un entraînement long (entre 1 et 2 mois, à raison d'une séance par jour) du fait de la complexité de la tâche. En effet, le fait pour le rat de mettre son museau dans un trou annoncé par un stimulus lumineux pour pouvoir récupérer la nourriture dans le réceptacle au niveau de la cloison opposée n'est pas naturel et nécessite une mise en place progressive de cet ensemble d'actions à l'aide d'un conditionnement opérant (avec comme renforçateur les pastilles alimentaires). Notamment, certaines actions comme celle de pousser la porte battante sont difficiles à apprendre pour les animaux, et celle-ci nécessite à elle seule une phase entière d'entraînement (on ajoute simplement la porte dans la phase 3). De plus, l'utilisation d'un renforçateur alimentaire nous oblige à garder les animaux sous régime alimentaire restreint (comme pour le test du labyrinthe radial) avec les éventuels inconvénients que cela pourrait impliquer (par ex., l'action physiologique de la restriction sur l'expression de l'épilepsie). Une limite importante du test est aussi que l'on ne peut pas observer le rat visuellement pendant la tâche et on ne peut donc pas déterminer si le rat est en train de faire une crise, s'il est en arrêt comportemental, ou s'il est entrain de se toiletter par exemple, toutes ces actions pouvant influencer sur le déroulement de la tâche et les résultats obtenus. De plus, ce dispositif n'est pour l'instant pas adapté à l'enregistrement EEG permettant de contrôler la



## MATERIELS ET METHODES

survenue des crises. Enfin, le test lui-même est également long (environ 1 mois, à raison d'une séance par jour).

## 6. La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire du $^{13}\text{C}$



Figure 25 : Photographie du dispositif de spectroscopie RMN (<http://www.ntnu.edu/inm/neurometabolism/research>)

Les premières études de métabolisme cérébral employaient les mesures biochimiques, qui nécessitaient le cerveau entier comme échantillon. Ces techniques ne permettaient pas de différencier les structures cérébrales, et encore moins le type cellulaire responsable d'éventuelles variations métaboliques.

Suite à ces premiers travaux, le métabolisme cérébral a été étudié grâce à la macro-autoradiographie qui permettait de mesurer les concentrations locales de traceurs radioactifs (comme le  $^{14}\text{C}$ ) avec le 2-désoxyglucose marqué comme traceur métabolique. Cette technique ne permettait pas de déterminer où les échanges métaboliques avaient lieu à l'échelle de la cellule, ni de déterminer quels types cellulaires avaient prélevé et métabolisé le glucose. Elle

## MATERIELS ET METHODES

permettait toutefois une assez bonne résolution à l'échelle des structures en ayant pour principal inconvénient une résolution temporelle médiocre.

La micro-autoradiographie par densité de grains et la  $\beta$ -trajectographie au  $^{14}\text{C}$ , couplée au marquage immunohistologique du type cellulaire, ont permis de pallier bon nombre d'inconvénients en matière de résolution anatomique. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas de déterminer les voies métaboliques sous-jacentes puisqu'on ne peut pas mesurer les différents métabolites.

La spectroscopie RMN au  $^{13}\text{C}$  réunit une partie de ces possibilités (Figure 25) : on peut mesurer les métabolismes distincts, astrocytaire vs. neuronal, ainsi que les échanges de métabolites entre les deux types cellulaires. Différents métabolites marqués peuvent être identifiés, en connaissant leur origine (neuronale ou astrocytaire). En revanche, bien que l'on soit à l'échelle de la structure, il est difficile de descendre à une résolution structurale plus fine en raison de la quantité de tissu nécessaire à l'analyse RMN ; il est par exemple impossible d'étudier une sous-région de l'hippocampe. Dans la dernière partie de mon travail de thèse, nous avons utilisé la spectroscopie RMN au  $^{13}\text{C}$  afin de déterminer si le changement de type d'épilepsie induit par le carisbamate était couplé à des modifications métaboliques neuronales et astrocytaires.

Deux mois après l'induction de l'EdM, les rats ont été injectés avec une solution de sodium mélangé à du  $[1,2\text{-}^{13}\text{C}]$ acétate (504 mg/kg) et du  $[1\text{-}^{13}\text{C}]$ glucose (543 mg/kg). Quinze minutes après l'injection, la tête des rats était soumise à une fixation par irradiation à l'aide d'un système de micro-ondes focalisées (6 kW, 1,8 secondes).

Dans les études métaboliques, l'azote liquide est couramment utilisé pour stopper le métabolisme des cerveaux à étudier. Toutefois, les micro-ondes présentent un grand intérêt par rapport à l'azote liquide (Detour et al., 2011) : elles permettent une meilleure préservation des métabolites liés à la dégradation post-mortem et au métabolisme anaérobie, ainsi que des neurotransmetteurs.

L'avantage du  $^{13}\text{C}$  est qu'il est caractérisé par une faible abondance naturelle, et les métabolites marqués au  $^{13}\text{C}$  sont donc facilement détectés en spectroscopie RMN.

Puisque l'acétate est sélectivement prélevé par les astrocytes et que l'acétyl-coA dérivé du glucose est métabolisé à 65 % par les neurones — bien qu'il soit prélevé en quantités égales

## MATERIELS ET METHODES

par les neurones et les astrocytes (Nehlig et al., 2004) — l'injection simultanée de glucose et d'acétate marqués permet l'étude du métabolisme neuronal et astrocytaire chez le même animal.

### 6.1. Prélèvement

Après irradiation avec les micro-ondes, les cerveaux sont prélevés et disséqués immédiatement. La dissection régionale a permis d'isoler plusieurs zones d'intérêt, les cortex piriforme et entorhinal, et l'amygdale (ces trois structures sont prélevées ensemble et composent le « pôle temporal »), l'hippocampe dorsal et ventral, le thalamus, les cortex moteur et pariétal, et le cervelet. Les échantillons prélevés sont pesés, puis congelés à -80°C. Les échantillons de plasma sanguin sont obtenus en sectionnant l'artère fémorale du rat au moment du prélèvement du cerveau. Ces échantillons sont ensuite placés dans la glace et centrifugés pendant 5 minutes à 3000 g, puis le sérum est prélevé et congelé à -80°C jusqu'à son extraction.

### 6.2. Extraction

Les opérations qui suivent ont été effectuées à la Faculté de Médecine de Trondheim en Norvège, dans le laboratoire d'Ursula Sonnewald.

Du méthanol et de l'acide alpha-amino-butyrique (standard interne pour l'HPLC [*High Performance Liquid Chromatography*]) sont ajoutés à l'échantillon, qui est homogénéisé. De l'eau et du chloroforme sont ajoutés et l'ensemble est centrifugé à 3000 g à 4°C pendant 15 minutes. Les surnageants sont transférés dans un nouveau tube conservé dans la glace. Du méthanol, de l'eau et du chloroforme sont ajoutés au tissu restant du premier tube, puis l'ensemble est centrifugé. Les surnageants sont aussi collectés et transférés dans un second tube. Une nouvelle fois, du méthanol, de l'eau et du chloroforme sont ajoutés au tissu restant du premier tube, puis l'ensemble est centrifugé. Les surnageants sont, une fois encore collectés et transférés dans le second tube. De l'eau est ajoutée au second tube, l'échantillon est centrifugé pour séparer les lipides du surnageant contenant les extraits intracellulaires. Du

méthanol et de l'eau sont à nouveau ajoutés et les surnageants collectés. Ces surnageants sont lyophilisés pour retirer le méthanol et l'eau, puis re-suspendus dans du D<sub>2</sub>O (oxyde de deutérium, « eau lourde »), et lyophilisés à nouveau pour maximiser le contenu de <sup>1</sup>H dans l'eau. Les échantillons sont ensuite analysés en spectroscopie RMN du <sup>13</sup>C et du <sup>1</sup>H, ainsi qu'en HPLC.

L'HPLC a permis de mesurer les quantités d'acides aminés. Une phase mobile (constituée de méthanol et de tampon phosphate) entraîne l'échantillon qui traverse une phase stationnaire (du gel de silice). La vitesse de migration des molécules de l'échantillon dépend de leurs caractéristiques. L'acide alpha-amuinobutyrique est utilisé comme standard interne pour identifier les pics du spectre et donc les molécules d'intérêt.

### 6.3. La spectroscopie à résonance magnétique nucléaire

Lorsqu'un noyau (caractérisé par un « spin » et une charge) est placé dans un champ magnétique statique, il va entrer en précession, c'est-à-dire qu'il est en rotation autour de la direction du champ magnétique. Un noyau est en précession à une fréquence particulière (fréquence de Larmor) qui est déterminée par deux éléments : le ratio gyromagnétique qui est spécifique au noyau, et le champ magnétique externe dans lequel il est placé. L'orientation du noyau quand il est placé dans ce champ magnétique est dépendant du spin du noyau (qui est spécifique à ce dernier). Par exemple, le spin du <sup>13</sup>C est de ½, ce qui signifie que le noyau aura deux orientations, soit parallèle soit antiparallèle au champ magnétique. A l'équilibre thermique, il y a une différence entre les deux populations des deux états, avec un plus grand nombre dans l'état parallèle qui est un état de faible énergie. C'est la différence entre les deux populations de noyaux qui sont dans l'état de haute énergie (antiparallèle) et l'état de faible énergie (parallèle) qui donne naissance aux signaux du spectre RMN. Un champ de radiofréquence est appliqué sur l'échantillon (sous forme de pulse), ce qui va entraîner des transitions entre les deux états énergétiques. Quand l'échantillon est irradié (il a absorbé l'énergie) le nombre de spins dans l'état de haute énergie augmente, on appelle cet état la « résonance ». Quand les radiofréquences sont stoppées, les noyaux retrouvent l'équilibre (« relaxation ») selon un F.I.D. pour *Free Induction Decay* (décroissance libre de l'induction) qui est le signal détecté par le spectromètre. Selon l'environnement du noyau (liaison avec un

atome d'hydrogène par exemple), sa fréquence de Larmor (fréquence de précession) va varier. C'est ce qu'on appelle le déplacement chimique lorsque cette fréquence est comparée à standard.

### 6.4. Obtention des spectres et identification des pics

Les spectres étaient obtenus grâce à des paramètres différents. Pour la spectroscopie du  $^1\text{H}$ , l'angle d'impulsion était de 90°, le temps d'acquisition de 2,66 secondes, et le délai de relaxation de 10 secondes. Pour la spectroscopie du  $^{13}\text{C}$ , l'angle d'impulsion était de 30°, le temps d'acquisition de 1,65 secondes, et le délai de relaxation de 0,5 seconde. L'intégration des pics du spectre permet de mesurer les métabolites, leur identification se fait par rapport aux standards internes : le TSP (acide trimethylsilyl propanoïque) pour la spectroscopie du  $^1\text{H}$ , et l'éthylène glycol pour la spectroscopie du  $^{13}\text{C}$ .







CONTRIBUTION  
EXPERIMENTALE



# 1. Publication 1 : Evaluation des effets du carisbamate sur les altérations comportementales et cognitives dans le modèle lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal chez le Rat

Deux objectifs principaux ont motivé la mise en place de cette étude. Le premier était d'évaluer de façon aussi précise et large que possible les capacités comportementales et cognitives dans le modèle d'épilepsie lithium-pilocarpine chez le Rat. Bien que certaines données existent déjà, elles proviennent de différents groupes dont les protocoles et les souches varient, et elles ne concernent le plus souvent que l'évaluation de la mémoire spatiale à long-terme en piscine de Morris. Il était donc souhaitable de procéder à une évaluation la plus large possible effectuée « sous le même toit ». De plus, la mémoire à long-terme n'étant pas la seule fonction cognitive atteinte chez les patients qui souffrent d'ELT, nous avons souhaité en savoir davantage quant à l'altération du comportement en général, et d'autres capacités cognitives en particulier dans ce modèle. Le second objectif était l'évaluation de l'effet du carisbamate au niveau du comportement. Notre groupe avait précédemment montré (François et al., 2011) que ce traitement administré rapidement après le début de l'EdM induit par le lithium-pilocarpine, et pendant la période de latence, entraînait une neuroprotection importante et un changement de devenir épileptique (développement d'une épilepsie de type absence au lieu d'une ELT) chez une partie des rats. Etant donné l'importance des déficits en mémoire spatiale déjà connus chez les rats lithium-pilocarpine non-traités, il était très intéressant de connaître l'effet d'un changement de devenir épileptique sur les comorbidités associées à l'épilepsie.

Un groupe de rats a donc été traité avec le lithium-pilocarpine seulement pendant qu'un autre groupe recevait, en plus, le carisbamate (90 mg/kg) selon le protocole de l'étude de François et al (2011) (à partir d'une heure après le début de l'EdM, puis deux fois par jour pendant 6 jours supplémentaires). Deux mois après l'EdM, les animaux qui n'avaient pas présenté de crise motrice étaient considérés comme souffrant d'une épilepsie de type absence, tandis que

ceux qui présentaient des crises motrices étaient considérés comme souffrant d'une ELT. Une batterie de tests comportementaux a donc été mise en œuvre pour évaluer les capacités des animaux dans plusieurs domaines comportementaux et cognitifs.

Les animaux non-traités ont présenté des déficits sévères dans plusieurs domaines : locomotion (hyperactivité nocturne), anxiété (hypo-anxiété), mémoire spatiale à long-terme et de travail, et mémoire procédurale. Les animaux traités qui ont développé une ELT ont présenté les mêmes dysfonctionnements comportementaux et cognitifs que les rats non-traités. En revanche, les rats traités qui n'ont pas développé de crise convulsive n'ont pas non plus présenté de déficits dans les différentes tâches comportementales utilisées. L'ensemble des rats (traités ou non) qui ont développé une ELT ont présenté d'importantes lésions dans les cortex piriforme et entorhinal, dans l'hippocampe et l'amygdale, ainsi que dans le thalamus. Par contre, les rats traités n'ayant pas développé d'ELT ont bénéficié d'une neuroprotection massive dans ces différentes structures.

Ce travail a permis, dans un premier temps, d'élargir les connaissances disponibles sur les troubles comportementaux et cognitifs associés au modèle lithium-pilocarpine. En plus des déficits connus en mémoire spatiale à long-terme et de la modification du niveau d'anxiété, nous avons montré que la mémoire spatiale de travail et la mémoire procédurale sont également perturbées chez ces animaux. Par conséquent, dans ce modèle, il est question de déficits majeurs affectant de multiples facettes du fonctionnement cognitif. Dans un second temps, ce travail a permis de montrer que le carisbamate, lorsqu'il modifie le devenir épileptique (selon des mécanismes qui restent à identifier), empêche l'apparition des déficits comportementaux et cognitifs caractéristiques du modèle lithium-pilocarpine.

*Epilepsia*, 54(7):1203–1213, 2013  
doi: 10.1111/epi.12219

## FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH

# A comprehensive behavioral evaluation in the lithium–pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus

\*†Jean-Baptiste Faure, \*†Gladys Akimana, \*†José E. M. Carneiro, †Brigitte Cosquer, \*Arielle Ferrandon, †Karin Geiger, \*Estelle Koning, †Lorène Penazzi, †Jean-Christophe Cassel, and \*Astrid Nehlig

\*Faculty of Medicine, INSERM U 666, Strasbourg, France; and †Laboratory of Cognitive and Adaptive Neuroscience, CNRS-UDS UMR 7364, Strasbourg, France

### SUMMARY

**Purpose:** Administration of carisbamate during status epilepticus (SE) prevents the occurrence of motor seizures in the lithium–pilocarpine model and leads in a subpopulation of rats to spike-and-wave discharges characteristic of absence epilepsy. Widespread neuroprotection accompanied this change in seizure expression. To assess whether these carisbamate-induced changes affected comorbidity, we used a large battery of behavioral tests in rats that had developed temporal lobe or absence-like seizures.

**Methods:** Lithium–pilocarpine or saline was administered to 60 adult rats. Carisbamate (90 mg/kg) or diazepam and saline was given 1 h after SE onset, and repeated 8 h later and twice daily over 6 more days.

Rats were video-monitored for 2 months. Subsequently, locomotor activity, anxiety, and various types of memory were assessed.

**Key Findings:** In rats with motor seizures, treated or not with carisbamate, all features of behavior were impaired compared to controls. Rats exhibiting absence-like seizures after carisbamate treatment behaved as controls in all paradigms tested along with widespread neuroprotection.

**Significance:** Carisbamate treatment leading to absence-like instead of temporal lobe seizures impressively prevented behavioral comorbidities reported by patients with epilepsy as the most disabling.

**KEY WORDS:** Temporal lobe epilepsy, Lithium–pilocarpine, Carisbamate, Neuroprotection, Learning and memory.

Temporal lobe epilepsy (TLE) is one of the most deleterious forms of epilepsy. Its development is often marked by three steps: an initial insult classically appearing during infancy, a latent period with reorganizations and plasticity, and a chronic epileptic phase (Mathern et al., 1996; Pitkanen & Sutula, 2002). TLE is often refractory to antiepileptic drugs (Semah et al., 1998) and surgery is the only remaining option. A better strategy than acting on seizures would be to intervene before chronic seizure onset and to prevent epilepsy development and improve long-term outcome.

The lithium–pilocarpine model has been widely studied as status epilepticus (SE) model followed by a latent period before expression of chronic epilepsy (Curia et al., 2008). In this model, rats develop lesions affecting mainly the hippocampal formation, amygdala, thalamus, and piriform

cortex (Clifford et al., 1987; Persinger et al., 1993), associated with reorganizations such as mossy fiber sprouting (Mello et al., 1993). Behavioral studies reported that lithium–pilocarpine rats have long-term and working memory impairments (Persinger et al., 1993; Detour et al., 2005; Lenck-Santini & Holmes, 2008; Inostroza et al., 2011). Reduced anxiety (Detour et al., 2005; dos Santos et al., 2005; Inostroza et al., 2011) and increased locomotor activity (Persinger & Koren, 1998; Stewart & Leung, 2003) complete the behavioral syndrome.

We recently found that carisbamate has insult- and disease-modifying effects in lithium–pilocarpine rats (Francois et al., 2011). Carisbamate is a compound known to inhibit voltage-gated sodium channels (Liu et al., 2009) and to block action potentials in piriform neurons (Whalley et al., 2009). Administration of carisbamate (90 mg/kg) during the initial insult (i.e., 1 h after SE onset) and repeated over 7 days alleviated insult severity in a rat subpopulation and prevented the occurrence of motor spontaneous recurrent seizures (SRS). In 25–50% of the rats carisbamate treatment led to pharmacosensitive absence-like seizures with

Accepted April 8, 2013; Early View publication May 11, 2013.  
Address correspondence to Astrid Nehlig, Faculty of Medicine, INSERM U 666, 11 rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France. E-mail: nehliga@unistra.fr

Wiley Periodicals, Inc.  
© 2013 International League Against Epilepsy

1204

J.-B. Faure et al.

spike-and-wave discharges (SWDs) instead of temporal lobe seizures. This subpopulation with SWDs showed reduced brain damage in most limbic regions and limited mossy fiber sprouting (Francois et al., 2011).

Cognitive impairment is the most disabling comorbidity of epilepsy (Fisher et al., 2000) and constitutes one of the benchmarks of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke in epilepsy research (Kelley et al., 2009). Here we extended our previous work on early carisbamate-treatment effects on neuronal loss and disease expression to a comprehensive exploration of the behavioral functions known to be severely impaired in TLE patients and lithium-pilocarpine rats. Ten weeks after SE we tested four groups of rats with a broad battery of behavioral tasks: (1) controls not exposed to pilocarpine and carisbamate; (2) lithium-pilocarpine rats that did not receive carisbamate; and two groups of lithium-pilocarpine rats treated with carisbamate, (3) one developing motor seizures; and (4) one absence-like seizures, as previously reported (Francois et al., 2011). We first aimed at completing the knowledge on consequences of lithium-pilocarpine SE in rats. The second goal was to determine if the seizure expression change after early carisbamate administration was associated with behavioral changes.

## METHODS

### Animals

Sixty adult male Sprague-Dawley rats provided by Charles River Breeding Center (L'Abresle, France) were placed in individual cages under controlled conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12/12 h light/dark cycle, lights on at 7:00 a.m.) with water and food ad libitum. Experiments were performed in accordance with the rules of the European Community council directive of November 24, 1986 (86-609) and the French Department of Agriculture (87-848; License #67-97 for AN and 67-215 for JCC). The protocol was approved by the ethical Animal Research Committee Board of the University of Strasbourg (CREMEAS #AL/01/04/03/07). All efforts were made to reduce animal suffering and the number of animals used.

### Status epilepticus

Rats were injected with lithium (127 mg/kg; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, U.S.A.). About 20 h later they received 1 mg/kg methylscopolamine (Sigma-Aldrich) to limit pilocarpine peripheral effects. SE was induced 30 min later by the injection of pilocarpine (25 mg/kg; Sigma-Aldrich), and rats received a second injection of methylscopolamine (1 mg/kg) 30 min after SE onset. Controls received lithium and saline injections instead of pilocarpine.

### Carisbamate treatment

One hour and 9 h after SE onset, rats were randomly administered diazepam (2.5 and 1.25 mg/kg, respec-

tively; Roche, Meylan, France), or carisbamate (90 mg/kg; Johnson & Johnson Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, U.S.A.) dissolved in 45% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Acros Organics, Geel, Belgium). Diazepam allows enhancing survival without modifying SE characteristics at low dose (Morrisett et al., 1987). During the following 6 days, carisbamate-treated groups received two daily carisbamate injections (90 mg/kg). Diazepam-treated rats received saline instead of carisbamate. Five rats from the diazepam-lithium-pilocarpine group died.

The acute behavioral effects of treatments during SE were quantified 2 h after injection of diazepam or carisbamate with an in-house developed scale based on observations ranging from 0 to 4 with 0 = no effect; 1 = reduced seizure severity; 2 = calm with head bobbing; 3 = sedated; 4 = apathetic (Francois et al., 2011).

### Epileptogenesis and seizure control

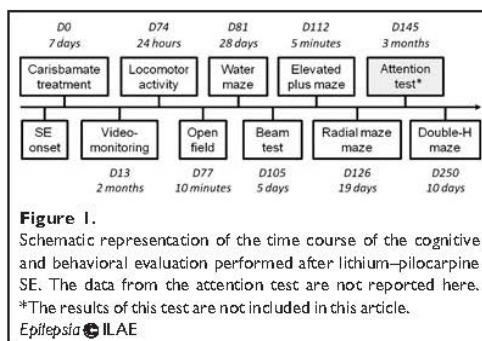
Daily video-recording for 10 h (7:00 a.m.–5:00 p.m.) started 1 week after SE and lasted for 8 weeks. After displaying at least one stage III motor forelimb clonus (Racine, 1972), rats were removed from video-monitoring. Every rat receiving diazepam developed motor SRS. After 8 weeks, rats without motor SRS were considered having absence-like seizures (Francois et al., 2011). In the present study, video-monitoring was favored over electroencephalography (EEG) recording because in a recent comparative study we noticed that latency to the first motor SRS is underestimated at most by 24–72 h by video-monitoring compared to EEG (Francois et al., 2011). Furthermore the large number of animals used (60 rats) did not allow easy EEG recording over a short period of time. In addition, we wanted to avoid any potential infection due to electrode insertion, since rats were kept for many months and exposed to various surroundings including water.

After video-monitoring, four groups were constituted: (1) controls ( $n = 12$ ), (2) diazepam-treated rats (DZP-TLE,  $n = 18$ ), (3) carisbamate-treated rats developing motor SRS (CRS-TLE,  $n = 17$ ), and (4) carisbamate-treated rats displaying absence-like seizures (CRS-ALE,  $n = 8$ ).

### Behavioral studies

Starting at 10 weeks after SE, animals were subjected to a large variety of behavioral tests (Fig. 1). To limit potential seizure effects on behavioral skills, rats were tested at least 2 h after the last motor SRS. Concerning CRS-ALE rats, absence-like seizures might have occurred shortly before and even during testing. However, concentration on a task usually prevents absence seizures from occurring. Moreover, CRS-induced absence-like seizures are more frequent during night than during day time (Francois et al., 2011) when testing was performed.





#### Elevated plus-maze test

Anxiety was assessed with a black acrylic glass classical plus-maze (Cassel et al., 2005). Rats were placed in the maze facing the same closed arm for a unique 5-min video-recorded session, during which the number of entries and time spent in each arm and on the platform were rated. Halogen lights provided a 30 and 10 lux illumination on open and closed arms, respectively. Some rats jumped out but were immediately placed back into the maze. We performed the statistical analysis excluding and including these rats.

#### Morris water maze

A circular pool (diameter 160 cm, height 60 cm) was half-filled with water ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) rendered opaque by powdered milk (Traissard et al., 2007). Visual cues were present in the room. A video-tracking system (Ethovision, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) recorded the distance swum and latency to reach the platform. Neon lights provided a 175 lux illumination on the apparatus.

**Spatial long-term memory procedure.** After a 3-day visible platform habituation to the maze (platform placed 1 cm above water surface and moved every day), the platform was immersed in the southwest quadrant for five consecutive days. Rats were given 4 trials per day from different starting points. The sixth day, the platform was removed for the probe trial and rats were placed in the pool for 60 s. This 5-day procedure is considered to test spatial learning and memory. The probe trial on the sixth day tests the strength of this memory.

**Visible platform procedure.** Next, rats were tested with a visible platform for 1 day. The platform was placed 1 cm above the water surface in a position different from the previous procedure, and rats were placed in four different starting points as in the long-term memory procedure. This procedure is considered to be sensitive to visual, sensorimotor, and motivation biases.

**Spatial working memory procedure.** During the nine following days the platform was moved every day and rats were given 2 trials/day to reach the platform from two equidistant starting points. This procedure is considered to test working memory.

#### Double-H maze

The apparatus was composed of a transparent acrylic glass maze formed by six parallel arms ( $160 \times 20$  cm) joined in their middle by a perpendicular-oriented fourth arm (Pol-Bodetto et al., 2011). Each arm was surrounded by 35 cm high walls, the whole shaped as two adjacent Hs (Fig. 4A). The maze was placed 80 cm above the floor in a room containing visual cues. The double-H was half-filled with water ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) rendered opaque by powdered milk. A platform (diameter 11 cm) was placed 2.5 cm underneath water surface at the end of the northwest (NW) arm (see Fig. 4C). The test consisted of four learning sessions of four trials each day ended by a probe trial on day 5, followed by another set of four learning sessions ended by another probe trial on day 10. The four learning trials were separated by 5 min. During these learning trials, the S arm was closed and rats were placed in the N arm facing the wall to force a strategy based on procedural memory. Rats were given a maximum of 60 s to reach the platform. Latency and distance swum to reach the platform and swim path of rats were video-recorded. For the probe trial, the platform was removed and all arms were open. Rats were placed in the maze for 60 s starting from NE arm to test the strength of procedural memory and the rats' capacity to shift to spatial strategy. Time spent in the NW arm (target arm) was assessed. The calculated chance level corresponded to 7.26 s. Neon lights provided a 190 lux illumination on the maze.

#### Histologic and immunohistochemical studies

Effect of carisbamate treatment on neuronal loss was assessed with anti-Neuronal Nuclear protein (NeuN). At the end of behavioral procedures, rats received an overdose of pentobarbital (150 mg/kg; CEVA, Libourne, France) and were perfused with paraformaldehyde. Brains were removed, post-fixed, and transferred to a sucrose solution. They were frozen and 40- $\mu\text{m}$  whole brain coronal sections were cut. The NeuN expression was revealed on free-floating sections. These were incubated with a primary mouse monoclonal antibody directed against NeuN (1:2,000; Millipore Corporation, Billerica, MA, U.S.A.) and then a biotinylated horse anti-mouse antibody (1:500; Vector Laboratories International, Burlingame, CA, U.S.A.) using diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich) for revelation. Effect of carisbamate on mossy fiber sprouting was assessed with Timm staining as detailed previously (Francois et al., 2011).

#### Quantification

A  $100\times$  computerized picture was taken on at least three sections per rat for each structure of interest. For anti-NeuN

1206

J.-B. Faure et al.

stained slices, quantifications were performed in the lateral septum (LS, bregma 0.48 mm), dorsolateral striatum (DLStr, bregma 0.48 mm), laterodorsal dorsomedial thalamus (LDDM, bregma 3.24 mm), dorsal hippocampus (dorsal hilus, CA1 and CA3 [dCA1 and dCA3], bregma 3.24 mm), basolateral amygdala (BLA, bregma 3.24 mm), dorsal and ventral piriform cortex (dPIR and vPIR, bregma 3.24 mm), ventral hippocampus (CA1 and CA3 [vCA1 and vCA3], bregma 5.40 mm), and dorsal and ventral entorhinal cortex (dENT and vENT, bregma 5.40 mm).

Neuronal density was assessed by a standardized two-dimensional (2D) grain count module (MCID software; Inter-Focus Imaging, Cambridge, United Kingdom), as described previously (Linard et al., 2010). Percentage of shrinkage compared to controls was measured for all structures explored: 50% in hilus in all groups, 32% in entorhinal cortex of DZP-TLE rats and 40% in piriform cortex of DZP-TLE rats. This percentage was used to correct for neuronal density.

Mossy fiber sprouting was evaluated in dorsal hippocampus according to the classical criteria established by Cavazos et al. (1991) and described previously in detail (Francois et al., 2011).

#### Statistical analyses

For most variables, repeated-measures two-way analysis of variance (ANOVA) was used. In contrast, analysis of video monitoring, home-cage activity, beam-walking test, open field, elevated plus-maze, double-H maze, neuronal density, and some parts of the Morris water maze were

performed using one-way ANOVA. The post hoc analysis was always performed using the Newman-Keuls test. One-sample Student's *t*-test was used when a group performance had to be compared to a standard reference (i.e., chance level).

## RESULTS

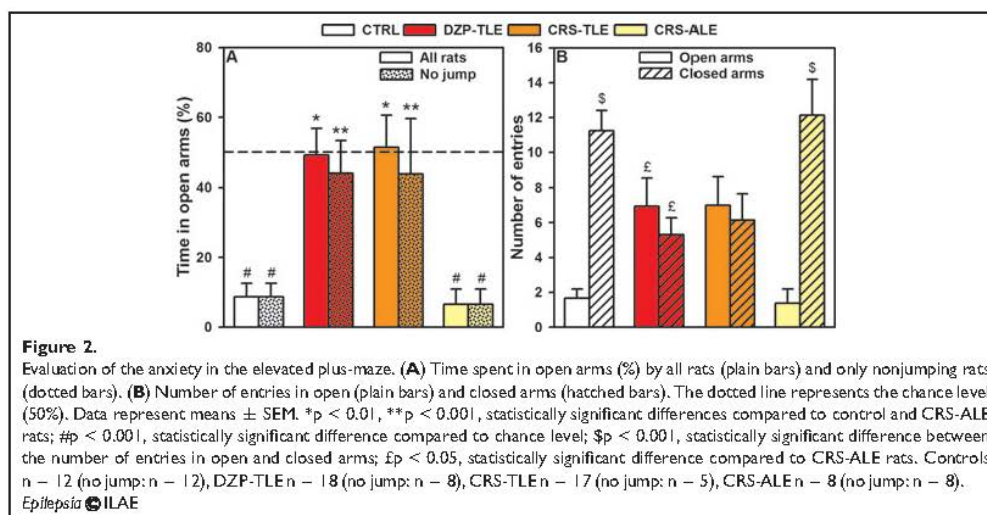
#### Status epilepticus and video-monitored motor SRS

At 2 h after drug injection all rats receiving DZP and some rats exposed to carisbamate reached a 1.6–1.8 behavioral score. Conversely, other carisbamate-treated rats showed almost no seizures, were sedated, or were apathetic (behavioral score of 3–3.5). Over 90% of rats with marked sedation developed absence-like seizures; as previously reported comparing behavioral and EEG analyses, the behavior of the rats during SE was as predictive of epileptic outcome as EEG changes (Francois et al., 2011).

CRS-TLE and DZP-TLE rats were hyperreactive when handled and aggressive, whereas CRS-ALE rats were calm. In addition, CRS-ALE rats expressed behavioral arrest and rhythmic vibrissae twitching easily noticed during long duration absence-like seizures resulting from carisbamate treatment (Francois et al., 2011).

#### Elevated plus-maze

Concerning the time spent by all rats in open arms (Fig. 2A), ANOVA revealed a group effect ( $F_{3,45} = 10.71$ ,  $p < 0.001$ ). DZP-TLE and CRS-TLE rats spent significantly more time in open arms than control and CRS-ALE rats ( $p < 0.001$ ). Performance of CRS-ALE rats did not differ



*Epilepsia*, 54(7):1203–1213, 2013  
doi: 10.1111/epi.12219



from controls. Control and CRS-ALE rats spent a shorter time than chance in open arms ( $p < 0.001$ ), whereas the time spent by DZP-TLE and CRS-TLE rats was at chance level. Statistical data were identical when all rats or only rats that did not jump out of the maze were included in the analysis.

Regarding the number of entries in open and closed arms performed by all rats (Fig. 2B), ANOVA indicated no significant group effect, but arm effect ( $F_{1,45} = 24.58$ ,  $p < 0.001$ ) and group  $\times$  arm interaction ( $F_{3,45} = 13.66$ ,  $p < 0.001$ ). Absence of group effect indicated that all rats displayed a similar number of entries in all arms, which reflects similar locomotor activity in all groups. Control and CRS-ALE rats ( $p < 0.001$ ) entered more closed than open arms, whereas DZP-TLE and CRS-TLE rats performed the same number of entries in all arms.

### Morris water maze

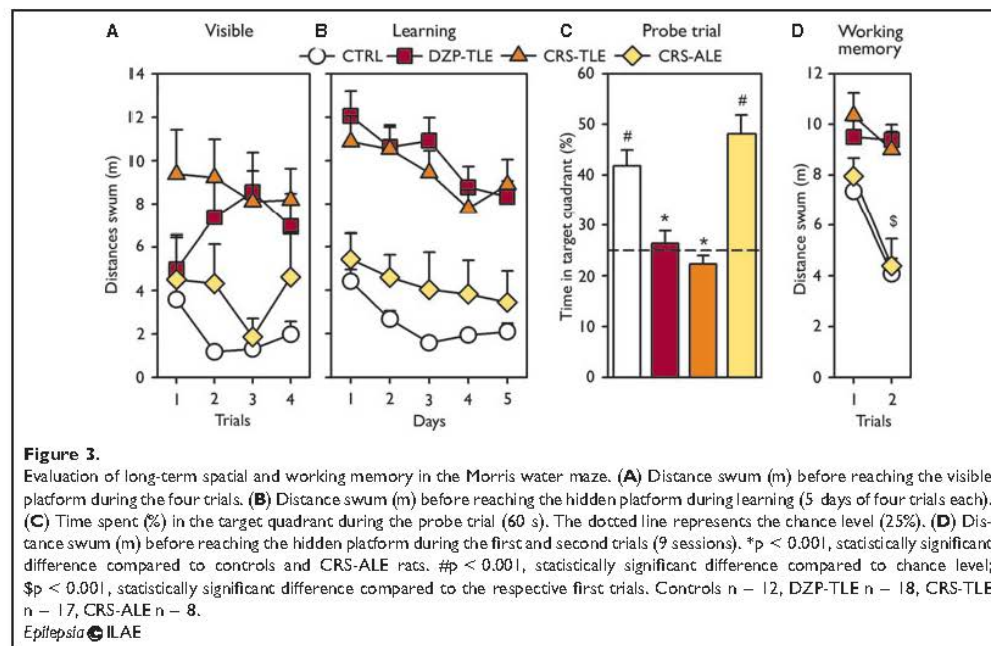
#### Visible platform task

The visible platform test (Fig. 3A) evaluates visual ability of the rats. The ANOVA of the four trials indicated a significant group effect ( $F_{3,51} = 7.39$ ,  $p < 0.001$ ) due to longer distance swum by DZP-TLE ( $p < 0.05$ ) and CRS-TLE rats ( $p < 0.005$ ) compared to controls. CRS-ALE rats did not differ from control and DZP-TLE rats. No significant trial effect and group  $\times$  trial interaction were revealed.

#### Long-term spatial learning and memory

In the fixed hidden platform paradigm performed over 5 days, spatial learning of platform location was evaluated (Fig. 3B). ANOVA showed that all groups decreased the distance swum over 5 days as confirmed by a significant day effect ( $F_{4,204} = 9.53$ ,  $p < 0.001$ ) and the absence of group  $\times$  day interaction. The significant day effect was due to decrease of the distance swum between days 1 and 4 ( $p < 0.05$ ). However the distance swum to reach the platform varied, as confirmed by a significant group effect ( $F_{3,51} = 20.22$ ,  $p < 0.001$ ). Control ( $254.1 \pm 18.5$  cm) and CRS-ALE rats ( $426.8 \pm 132.0$  cm) swam a shorter distance per trial than DZP-TLE ( $1013.8 \pm 76.0$  cm,  $p < 0.001$ ) and CRS-TLE rats ( $950.1 \pm 86.1$  cm,  $p < 0.001$ ).

Because motivational or motor biases could invalidate spatial learning evaluation, we rated the rats' velocity reflecting both biases. No significant difference was found between groups. The percentage of time spent in thigmotaxis (swimming at  $< 20$  cm from walls) could reflect anxiety or misunderstanding of the task. DZP-TLE ( $27.87 \pm 3.94\%$ ,  $p < 0.01$ ) and CRS-TLE rats ( $28.69 \pm 5.22\%$ ,  $p < 0.05$ ) spent more time in thigmotaxis than controls ( $4.62 \pm 1.25\%$ ). CRS-ALE rats ( $16.60 \pm 9.52\%$ ) did not differ from any group. Video-recorded path tracks indicated that DZP-TLE and CRS-TLE rats often swam in circles.



1208

J.-B. Faure et al.

Twenty-four hours later, during a 60 s probe trial (Fig. 3C), only control and CRS-ALE rats spent more time than chance in the target quadrant containing the platform during learning ( $p < 0.001$ ). ANOVA of the percentage of time spent in the target quadrant revealed a significant group effect ( $F_{3,51} = 24.29$ ,  $p < 0.001$ ) due to shorter time spent by DZP-TLE and CRS-TLE rats than control and CRS-ALE rats ( $p < 0.001$ ). No difference was observed between control and CRS-ALE rats.

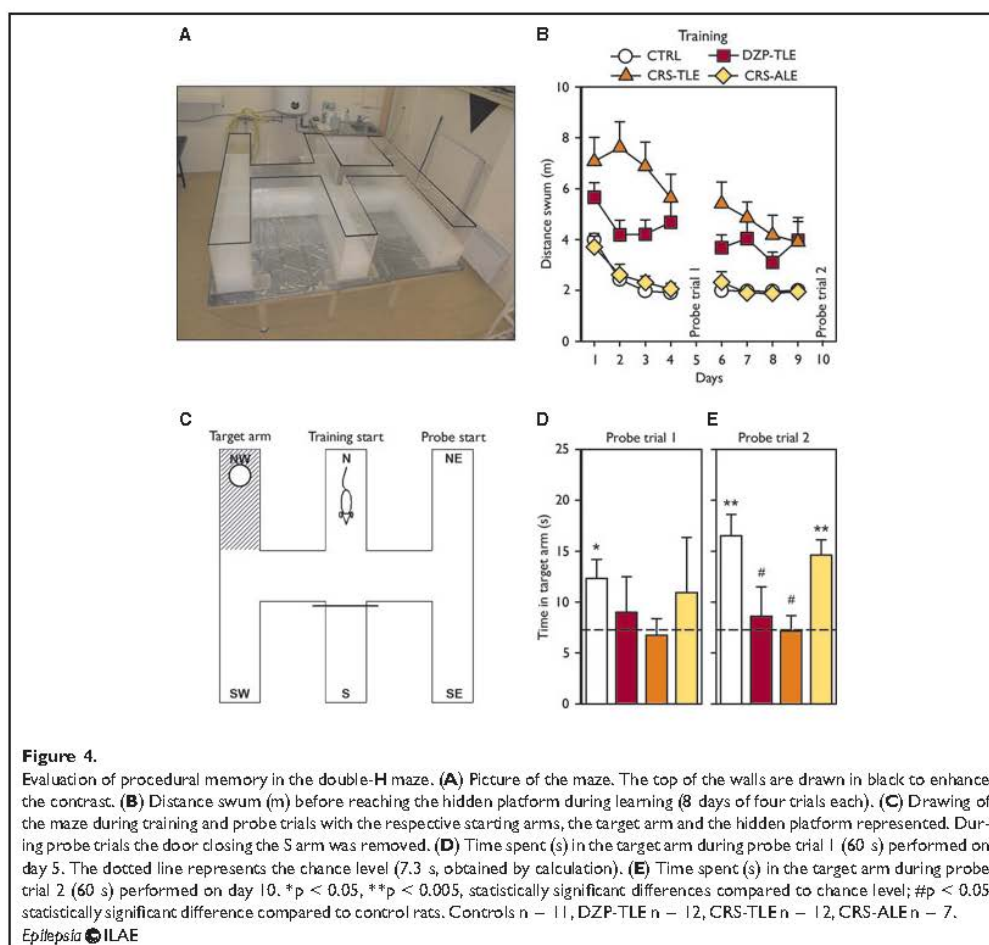
#### Spatial working memory

For the mean distance swum during the two trials (Fig. 3D), ANOVA revealed significant group ( $F_{3,51} = 9.91$ ,  $p < 0.001$ ) and trial effects ( $F_{1,51} = 30.76$ ,  $p < 0.001$ ), and

group  $\times$  trial interaction ( $F_{3,51} = 5.00$ ,  $p < 0.005$ ). Only control and CRS-ALE rats decreased their swimming distance in the second trial compared to the first one ( $p < 0.001$ ). During the first trial no group differed from another, whereas during the second trial DZP-TLE and CRS-TLE rats swam a significantly longer distance than control and CRS-ALE rats ( $p < 0.01$ ).

#### Double-H

ANOVA of the distance swum to reach the platform during learning (Fig. 4B) revealed a significant group effect ( $F_{3,38} = 15.57$ ,  $p < 0.001$ ) due to longer distance swum by DZP-TLE ( $419.1 \pm 42.0$  cm) and CRS-TLE rats ( $568.9 \pm 58.1$  cm) compared to control ( $228.0 \pm 4.5$  cm,



*Epilepsia*, 54(7):1203–1213, 2013  
doi: 10.1111/epi.12219

$p < 0.01$ ) and CRS-ALE rats ( $234.2 \pm 16.1$  cm,  $p < 0.005$ ). All groups improved performance similarly throughout learning, since ANOVA revealed a significant day effect ( $F_{7,266} = 8.02$ ,  $p < 0.001$ ) in the absence of group  $\times$  day interaction.

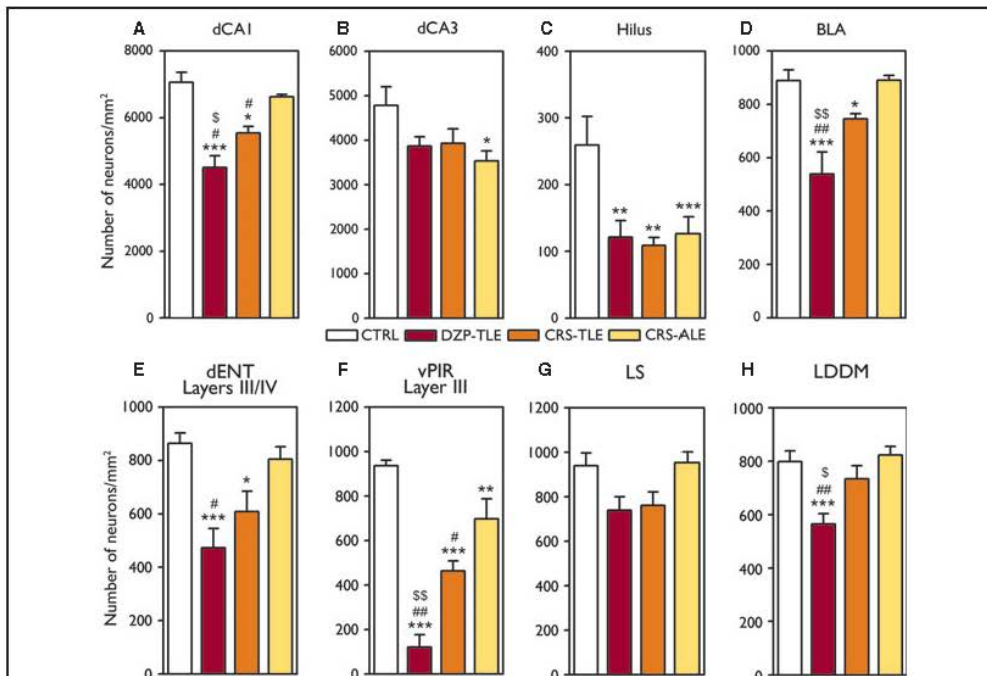
Probe trials were performed on days 5 and 10. Concerning time spent in the target arm (NW) during probe trial 1 (Fig. 4D), there was no group effect, although only controls ( $p < 0.05$ ) spent more time than chance in the target arm. During probe trial 2 (Fig. 4E), ANOVA revealed a significant group effect ( $F_{3,38} = 4.29$ ,  $p < 0.05$ ). DZP-TLE and CRS-TLE rats spent significantly less time in the target arm than controls ( $p < 0.05$ ). Only CRS-ALE and control rats spent more time than chance in the target arm ( $p < 0.005$ ).

## Histology

### Neuronal cell counting

Compared to controls, neuronal density was significantly reduced in DZP-TLE rats in dCA1, hilus, BLA, vENT layers III/IV, dPIR and vPIR, and LDDM (Fig. 5A-H). In ventral hippocampus, neuronal density decreased in vCA1 and vCA3 (data not shown;  $p < 0.05$ ). In DLStr, DZP-TLE rats did not display any significant change in neuronal density.

In CRS-TLE rats compared to controls, hilus, vCA1 and vCA3, vENT layers III/IV, dPIR layer II, and vPIR exhibited a reduction in neuronal density as dramatic as DZP-TLE rats. Conversely, in dCA1, BLA, and vPIR, neuronal density was larger than in DZP-TLE rats but remained significantly lower than in controls. In LS and LDDM,



**Figure 5.**

Neuronal density in the hippocampus, the amygdala, the entorhinal and piriform cortices, lateral septum, and laterodorsal thalamus. Number of neurons/mm<sup>2</sup> in dorsal CA1 (dCA1) (A), dorsal CA3 (dCA3) (B), the hilus of the dentate gyrus (C), the basolateral amygdaloid nucleus (BLA) (D), layers III/IV of the ventral entorhinal cortex (vENT) (E), layer III of the ventral piriform cortex (vPIR) (F), the lateral septal nucleus (LS) (G), and in the laterodorsal dorsomedial thalamic nucleus (LDDM) (H). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.005$ , statistically significant differences compared to control rats; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , \$\$\$ $p < 0.005$  statistically significant differences compared to CRS-ALE rats; \$ $p < 0.05$ , \$\$ $p < 0.01$ , statistically significant differences compared to CRS-TLE rats. Controls  $n = 6$ , DZP-TLE  $n = 8$ , CRS-TLE  $n = 7$ , CRS-ALE  $n = 4$ .

*Epilepsia* © ILAE



1210

J.-B. Faure et al.

neuronal density was no longer different from control levels (Fig. 5G–H).

In CRS-ALE rats, neuronal density returned to control levels in dCA1, BLA, dENT and vENT, dPIR layer III, vPIR layer II, LS, LDDM, and vCA3. In dCA3, hilus, dPIR layer II, vPIR layer III, and vCA1, neuronal density remained below control levels.

#### *Mossy fiber sprouting*

DZP-TLE ( $4.01 \pm 0.42$ ,  $p < 0.005$ ) and CRS-TLE rats ( $3.48 \pm 0.44$ ,  $p < 0.01$ ) showed higher Timm score than controls ( $0.77 \pm 0.36$ ). CRS-ALE rats ( $2.07 \pm 0.68$ ) reached also a higher score than controls but the difference was not significant ( $p = 0.09$ ). CRS-ALE rats displayed a lower Timm score than DZP-TLE rats ( $p < 0.05$ ), but the difference with CRS-TLE rats failed to reach significance ( $p = 0.07$ ). These results agree with our previous data (Francois et al., 2011).

## DISCUSSION

In line with previous studies in TLE rats (Persinger et al., 1993; Stafstrom et al., 1993; Letty et al., 1995; Persinger & Koren, 1998; Stewart & Leung, 2003; Detour et al., 2005; dos Santos et al., 2005; Frisch et al., 2007; Lenck-Santini & Holmes, 2008; Inostroza et al., 2011; Langer et al., 2011), we report here that DZP-TLE rats display widespread temporal lesions associated with severe behavioral impairments. These affected basal activity, anxiety, spatial memory, and procedural memory, as reported here for the first time. As shown by Francois et al. (2011) in carisbamate-treated rats starting 1 h after SE onset, CRS-TLE rats exhibited slight neuroprotection, developed motor seizures with behavioral impairments as dramatic as DZP-TLE rats, and CRS-ALE rats with large neuroprotection developed absence-like epilepsy translating into behavioral preservation.

#### **Status epilepticus**

Early after carisbamate injection, future CRS-ALE rats displayed weaker SE characteristics (sedation, no motor SRS), whereas future CRS-TLE rats still expressed motor SRS. Electrographic SE severity was alleviated 2 h after drug injection in CRS-ALE compared to DZP-TLE and CRS-TLE rats in which polyepileptiform discharges were frequent. This intergroup difference disappeared at 6 h after treatment (Francois et al., 2011). Total SE durations were not different between groups. Both behavioral and EEG changes point to an insult modification action of carisbamate that contributes to epilepsy expression change.

#### **DZP-TLE rats**

##### *Locomotion, novel environment habituation, and anxiety*

In accordance with present data (See supplemental data in Appendix S1.1), Persinger and Koren (1998) observed

nocturnal hyperactivity in lithium-pilocarpine rats for 25 days post-SE. We still recorded night hyperactivity at 10 weeks post-SE, suggesting more persistent effects. Stewart and Leung (2003) found both diurnal and nocturnal hyperactivity for 8 weeks post-SE, with return to baseline after 12 weeks.

The open field evaluates habituation to a novel environment, and is sometimes used as an anxiety test. In the open field, DZP-TLE, CRS-TLE, and CRS-ALE rats performed as controls (Appendix S1.3). All groups showed habituation, that is, reduced their locomotion over time. There was no clear difference in anxiety levels in this test between epileptic groups and controls, as assessed by the number of center crossings.

In TLE rats, decreased anxiety was reported in the elevated plus-maze (Detour et al., 2005; dos Santos et al., 2005; Brandt et al., 2007; Inostroza et al., 2011; Langer et al., 2011). It usually translates into longer time spent and higher number of entries in open arms. Reduced anxiety was confirmed here in DZP-TLE rats. Lesions in amygdala (Davis, 1992) and ventral hippocampus (McHugh et al., 2004) and inactivation of both ventral hippocampus and LS (Trent & Menard, 2010) have been linked to anxiety deregulations. Extended neuronal loss observed in these regions could underlie the decrease in anxiety in DZP-TLE rats.

Some authors reported “psychosis-like” behavior in lithium-pilocarpine rats because they jumped from the elevated plus-maze. Here, 55% of DZP-TLE and 70% of CRS-TLE rats jumped from the maze, whereas none of control and CRS-ALE rats did so. Whether this behavior reflects psychosis, hyperactivity, or disinhibition is difficult to discriminate.

##### *Spatial working memory*

Working memory allows processing items during a few seconds. Earlier studies found impaired working memory in TLE rats in the radial-arm maze (Persinger et al., 1993; Letty et al., 1995; Detour et al., 2005). Here, DZP-TLE rats also showed dramatic spatial working memory alteration in the radial-arm maze. Moreover, for the first time we also found working memory impairment in the Morris water maze.

In the visible platform condition, DZP-TLE rats did not find the platform as directly as controls, suggesting possible vision or motivation impairments. However, high swim velocity of DZP-TLE rats in the Morris water maze and appetency for food reinforcement similar to controls in the radial-arm maze do not suggest motivational problems. Furthermore, visual acuity was normal in an attentional task requiring perfect visual function, with only slight attention deficit in DZP-TLE and CRS-TLE rats (data not shown) that could slightly impact on behavior.

Thigmotaxis behavior has two possible explanations: raised anxiety or task misunderstanding (Whishaw et al., 1995; Devan et al., 1999). In the open field and elevated

plus-maze we rather found unchanged or lower anxiety level. Moreover, TLE rats often swam in circles, which is consistent with task misunderstanding by the rat seeking for an exit without learning anything. As a consequence, rats might be unable to process the complete task context.

In the radial-arm maze, rats can use their knowledge of the surrounding spatial configuration (allocentric strategy) or a strategy relying on repetition of angular choices (egocentric strategy). During no trial interruption training, both control and DZP-TLE rats did not show any preference for either strategy. Interrupting a testing session imposes a delay to the working memory system and makes egocentric strategies less efficient. In controls, such interruption led to a shift toward allocentric strategy. However, DZP-TLE rats were unable to make such a shift, indicating their inability to process the spatial configuration (See Appendix S1.5).

#### *Long-term spatial memory*

Long-term spatial memory includes learning and remembering a stable spatial representation (e.g., learning the location of a hidden platform in the Morris water maze). Most behavioral studies on TLE rats assessed long-term spatial memory in the Morris water maze (Frisch et al., 2007; Lenck-Santini & Holmes, 2008; Inostroza et al., 2011) and radial-arm maze (Persinger et al., 1993). Our results agree with literature, since during learning DZP-TLE rats swam a longer distance before reaching the platform. Furthermore, during the probe trial, they spent shorter time in the target quadrant than controls. Likewise, in both probe trials of the double-H maze, controls remembered platform location, whereas DZP-TLE rats neither remembered platform location during learning nor learned any automatism. DZP-TLE rats had marked neuronal loss in CA1 and entorhinal cortex, two regions containing place cells (O'Keefe & Dostrovsky, 1971) and grid cells (Hafting et al., 2005), respectively, which are thought to contribute to neuronal coding of spatial information. In addition, firing patterns of hippocampal place cells are altered in lithium-pilocarpine rats (Lenck-Santini & Holmes, 2008), which reinforces the potential role of global hippocampal dysfunction in behavioral impairments of DZP-TLE rats.

#### *Procedural memory*

Procedural memory integrates automatisms such as constant itineraries to reach a goal (i.e., go right to reach the platform). It is classically considered as requiring high number of trials and involves the dorsolateral striatum as its substrate (Packard & McGaugh, 1996). To our knowledge, procedural memory has been explored so far neither in TLE patients nor in TLE animal models. This is the first study assessing procedural memory in TLE rats. For this purpose, we used a procedural version of the Morris water maze (Cassel et al., 2007) and a novel testing device, the double-H maze, which is simpler than the Morris water maze (Pol-Bodetto et al., 2011). In both tasks, DZP-TLE rats displayed

clear deficits in procedural learning and memory, although the performance of DZP-TLE rats improved over learning trials, particularly in the double-H maze (See Fig. 4 and Appendix S1.4). Because DZP-TLE rats did not display any evidence of damage in dorsolateral striatum, damage to striatum-cooperating structures might be responsible for this deficit.

#### **CRS-TLE and CRS-ALE rats**

Altogether, behavioral performance of TLE rats, whether treated or not with carisbamate, was impaired to the same extent. In CRS-TLE rats, neuroprotection was limited compared to CRS-ALE rats, did not prevent the occurrence of TLE, and was insufficient to influence behavioral deficits.

The behavioral performance of CRS-ALE rats was remarkably similar to that of controls, in terms of anxiety, working, long-term spatial, and procedural memory. This preservation could result from large neuroprotection induced by carisbamate and/or from epilepsy type, absence-like instead of temporal lobe seizures. The protection provided by carisbamate in amygdala and ventral hippocampus could participate in prevention of anxiety changes occurring in TLE rats (Davis, 1992; McHugh et al., 2004; Trent & Menard, 2010). Dorsal hippocampus and entorhinal cortex were also protected, potentially contributing to learning scores and memory systems normalization (Morris et al., 1986; Dudchenko, 2004).

In CRS-ALE rats, the main features of absence epilepsy are present, that is, thalamocortical SWDs and response to clinically effective antiepileptic drugs (Francois et al., 2011). The main differences between CRS-ALE rats and genetic models of absence epilepsy are lesions in limbic regions of CRS-ALE rats. Such lesions are not found in genetic models or human absence epilepsy (Niedermeyer, 1996; Danober et al., 1998; Berg et al., 2010). Potential impact of absence epilepsy on behavior has been studied in two genetic strains of absence epilepsy, the Genetic Absence Epilepsy Rat from Strasbourg (GAERS) and the WAG/Rij. Compared to nonepileptic rats, GAERS and/or WAG/Rij rats showed no difference in spontaneous locomotor activity, feeding, social interactions, and avoidance learning, but decreased sucrose consumption, higher anxiety, increased immobility in a forced-swim test, and reduced long-term memory were noted (Coenen et al., 1991; Vergnes et al., 1991; Jones et al., 2008; Sarkisova & van Lujtelaar, 2011).

The limbic system is involved in SWD occurrence. Blood oxygen level-dependent magnetic resonance imaging in WAG/Rij rats (Nersesyan et al., 2004) and cerebral glucose utilization rates in GAERS (Nehlig et al., 1991) increase in thalamocortical structures expressing SWDs but also limbic regions and basal ganglia. Likewise, in childhood absence epilepsy, functional activity increases were recorded in all brain areas (Engel et al., 1985; Ochs et al., 1987). This indicates full participation of limbic regions in absence seizures



1212

J.-B. Faure et al.

and interdependence of temporal lobe and thalamocortical structures. The lesions remaining in some limbic regions of CRS-ALE rats (CA3, hilus, piriform, and entorhinal cortex) are likely indicative of functional changes within the limbic system that might no longer regulate the thalamocortical system, allowing the thalamocortical SWDs expression (Onat et al., 2013).

In conclusion, the current study confirms the profound deficits found in rats developing TLE. It also extends previous findings to procedural memory, affected to a dramatic extent. Despite slight neuroprotection, the behavior of TLE-CRS rats was as dramatically impaired as that of DZP-TLE rats. Finally, in CRS-ALE rats, behavioral functions were entirely preserved. These changes resulted from both insult and disease modification. It would be of interest to study further this compound with different patterns of administration to discriminate between the respective effect of insult and epileptogenesis modification and open new avenues in the search of antiepileptogenic compounds.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Ministry of Research, the French Institut National de la Science et de la Recherche Médicale (INSERM U 666), the French Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-UDS UMR 7364), and the University of Strasbourg. Carisbamate was a gift from Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, USA.

### DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

### REFERENCES

- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51:676–685.
- Brandt C, Glien M, Gastens AM, Fedrowitz M, Bethmann K, Volk HA, Potschka H, Loscher W. (2007) Prophylactic treatment with levetiracetam after status epilepticus: lack of effect on epileptogenesis, neuronal damage, and behavioral alterations in rats. *Neuropharmacology* 53:207–221.
- Cassel JC, Riegert C, Rutz S, Koenig J, Rothmaier K, Cosquer B, Lazarus C, Birlheller A, Jeltsch H, Jones BC, Jackisch R. (2005) Ethanol, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (ecstasy) and their combination: long-term behavioral, neurochemical and neuropharmacological effects in the rat. *Neuropsychopharmacology* 30:1870–1882.
- Cassel JC, Lazarus A, Birlheller A, Jackisch R. (2007) Spatial reference- (not working- or procedural-) memory performance of aged rats in the water maze predicts the magnitude of sulphuride-induced facilitation of acetylcholine release by striatal slices. *Neurobiol Aging* 28:1270–1285.
- Cavazos JE, Golarai G, Sutula TP. (1991) Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 11:2795–2803.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23:953–968.
- Coenen AM, Drinkenburg WH, Peeters BW, Vossen JM, van Luitelaar EL. (1991) Absence epilepsy and the level of vigilance in rats of the WAG/Rij strain. *Neurosci Biobehav Rev* 15:259–263.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M. (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143–157.
- Danover L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C. (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55:27–57.
- Davis M. (1992) The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* 15:353–375.
- Detour J, Schroeder H, Desor D, Nehlig A. (2005) A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia* 46:499–508.
- Devan BD, McDonald RJ, White NM. (1999) Effects of medial and lateral caudate-putamen lesions on place- and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* 100:5–14.
- dos Santos JG Jr, Longo BM, Blanco MM, Menezes de Oliveira MG, Mello LE. (2005) Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 1066:37–48.
- Dudchenko PA. (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 28:699–709.
- Engel J Jr, Lubens P, Kuhl DE, Phelps ME. (1985) Local cerebral metabolic rate for glucose during petit mal absences. *Ann Neurol* 17:121–128.
- Fisher RS, Vickrey BG, Gibson P, Hermann B, Penovich P, Scherer A, Walker S. (2000) The impact of epilepsy from the patient's perspective I. Descriptions and subjective perceptions. *Epilepsy Res* 41:39–51.
- Francois J, Germe K, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A. (2011) Carisbamate has powerful disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 61:313–328.
- Frisch C, Kudin AP, Elger CE, Kunz WS, Helmstaedter C. (2007) Amelioration of water maze performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced status epilepticus is negatively dose-dependent. *Epilepsy Res* 73:173–180.
- Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. (2005) Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 436:801–806.
- Inostroza M, Cid E, Brotons-Mas J, Gal B, Aivar P, Uzcategui YG, Sandi C, Menendez de la Prida L. (2011) Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS ONE* 6:e22372.
- Jones NC, Salzberg MR, Kumar G, Couper A, Morris MJ, O'Brien TJ. (2008) Elevated anxiety and depressive-like behavior in a rat model of genetic generalized epilepsy suggesting common causation. *Exp Neurol* 209:254–260.
- Kelley MS, Jacobs MP, Lowenstein DH. (2009) The NINDS epilepsy research benchmarks. *Epilepsia* 50:579–582.
- Langer M, Brandt C, Loscher W. (2011) Marked strain and substrain differences in induction of status epilepticus and subsequent development of neurodegeneration, epilepsy, and behavioral alterations in rats. [corrected]. *Epilepsy Res* 96:207–224.
- Lenck-Santini PP, Holmes GL. (2008) Altered phase precession and compression of temporal sequences by place cells in epileptic rats. *J Neurosci* 28:5053–5062.
- Letty S, Lerner-Natoli M, Rondouin G. (1995) Differential impairments of spatial memory and social behavior in two models of limbic epilepsy. *Epilepsia* 36:973–982.
- Linard B, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A, Raffo E. (2010) Ketogenic diet exhibits neuroprotective effects in hippocampus but fails to prevent epileptogenesis in the lithium-pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 51:1829–1836.
- Liu Y, Yohrling GJ, Wang Y, Hutchinson TL, Breneman DE, Flores CM, Zhao B. (2009) Carisbamate, a novel neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 83:66–72.

*Epilepsia*, 54(7):1203–1213, 2013  
doi: 10.1111/epi.12219

- Mathern GW, Babb TL, Leite JP, Pretorius K, Yeoman KM, Kuhlman PA. (1996) The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. *Epilepsy Res* 26:151–161.
- McHugh SB, Deacon RM, Rawlins JN, Bannerman DM. (2004) Amygdala and ventral hippocampus contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci* 118:63–78.
- Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM. (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34:985–995.
- Morris RG, Hagan JJ, Rawlins JN. (1986) Allocentric spatial learning by hippocampectomized rats: a further test of the “spatial mapping” and “working memory” theories of hippocampal function. *Q J Exp Psychol B* 38:365–395.
- Morrisett RA, Jope RS, Snead OC 3rd. (1987) Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Exp Neurol* 97:193–200.
- Nehlig A, Vergnes M, Marescaux C, Boyet S, Lannes B. (1991) Local cerebral glucose utilization in rats with petit mal-like seizures. *Ann Neurol* 29:72–77.
- Nersesyan H, Hyder F, Rothman DL, Blumenfeld H. (2004) Dynamic fMRI and EEG recordings during spike-wave seizures and generalized tonic-clonic seizures in WAG/Rij rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:589–599.
- Niedermeyer E. (1996) Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. *Clin Electroencephalogr* 27:1–21.
- Ochs RF, Gloor P, Tyler JL, Wolfson T, Worsley K, Andermann F, Diksic M, Meyer E, Evans A. (1987) Effect of generalized spike-and-wave discharge on glucose metabolism measured by positron emission tomography. *Ann Neurol* 21:458–464.
- O’Keefe J, Dostrovsky J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171–175.
- Onat FY, van Luijtelaar G, Nehlig A, Snead OC 3rd. (2013) The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Res* 103:111–123.
- Packard MG, McGaugh JL. (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65–72.
- Persinger MA, Koren SA. (1998) Persistent elevation of nocturnal activity in rodents following apparent recovery from lithium/pilocarpine-induced limbic seizures. *Percept Mot Skills* 86:1243–1248.
- Persinger MA, Bureau YR, Kostakos M, Peredery O, Falter H. (1993) Behaviors of rats with insidious, multifocal brain damage induced by seizures following single peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav* 53:849–866.
- Pitkanen A, Sutula TP. (2002) Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol* 1:173–181.
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC. (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res* 218:138–151.
- Racine RJ. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281–294.
- Sarkisova K, van Luijtelaar G. (2011) The WAG/Rij strain: a genetic animal model of absence epilepsy with comorbidity of depression [corrected]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:854–876.
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M. (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51:1256–1262.
- Stafstrom CE, Chronopoulos A, Thurber S, Thompson JL, Holmes GL. (1993) Age-dependent cognitive and behavioral deficits after kainic acid seizures. *Epilepsia* 34:420–432.
- Stewart LS, Leung LS. (2003) Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. *Epilepsy Behav* 4:153–160.
- Traissard N, Herbeaux K, Cosquer B, Jeltsch H, Ferry B, Galani R, Pemon A, Majchrzak M, Cassel JC. (2007) Combined damage to entorhinal cortex and cholinergic basal forebrain neurons, two early neurodegenerative features accompanying Alzheimer’s disease: effects on locomotor activity and memory functions in rats. *Neuropsychopharmacology* 32:851–871.
- Trent NL, Menard JL. (2010) The ventral hippocampus and the lateral septum work in tandem to regulate rats’ open-arm exploration in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 101:141–152.
- Vergnes M, Marescaux C, Boehrer A, Depaulis A. (1991) Are rats with genetic absence epilepsy behaviorally impaired? *Epilepsy Res* 9:97–104.
- Whalley BJ, Stephens GJ, Constanti A. (2009) Investigation of the effects of the novel anticonvulsant compound carisbamate (RWJ-333369) on rat piriform cortical neurones in vitro. *Br J Pharmacol* 156:994–1008.
- Whishaw IQ, Cassel JC, Jarrad LE. (1995) Rats with fimbria-fornix lesions display a place response in a swimming pool: a dissociation between getting there and knowing where. *J Neurosci* 15:5779–5788.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Appendix S1.** Effects of carisbamate treatment on locomotion, working and procedural memory.

## Supporting information: Effects of carisbamate treatment on locomotion, working and procedural memory

Supporting information:

- S1.1 Home-cage activity
- S1.2 Beam-walking test: sensorimotor coordination
- S1.3 Open field: habituation to a novel environment
- S1.4 Procedural memory procedure in the Morris water maze
- S1.5 Radial arm maze: working memory

### S1.1: Home-cage activity

#### *Methods*

Locomotor activity was recorded for 24h in a home cage containing a small amount of fresh sawdust. The first 3h (11.00a.m.-2.00p.m.) allowed habituation to the cage and room, and the following 21h (2p.m.-11a.m.) were divided in a lights on (2p.m.-7p.m. and 7a.m.-11a.m.) and a lights off-period (7p.m.-7a.m.). Two infrared beams directed on two photocells traversed the cage (4.5cm above the floor separated by 28cm). The number of crossings (interruption of the two beams successively) was monitored by a computer. Neon lights provided a 200 lux illumination on the cages.

#### *Results*

##### Habituation

During the first 3h of habituation (Fig. S1.1A), all groups behaved in the same way since no Group effect was revealed. The significant Hour effect ( $F_{(2,102)}=36.53$ ,  $p<0.001$ ) was due to the higher number of crossings during the first hour compared to the next two ones ( $p<0.001$ ). The activity of all rats dramatically decreased over the first hour and was similar during the following two hours.

##### Diurnal and nocturnal activity

During the subsequent 21h in the home-cage (Fig. S1.1B), the ANOVA of the number of cage crossings/h indicated significant Group ( $F_{(3,51)}=8.87$ ,  $p<0.001$ ) and Period effects, ( $F_{(1,51)}=160.87$ ,  $p<0.001$ ) and Group x Period interaction ( $F_{(3,51)}=12.49$ ,  $p<0.001$ ). Although diurnal activity did not differ among groups, nocturnal activity increased in DZP-TLE rats compared to other groups ( $p<0.005$ ). CRS-TLE rats displayed a higher number of cage crossings than CRS-ALE rats ( $p<0.05$ ).



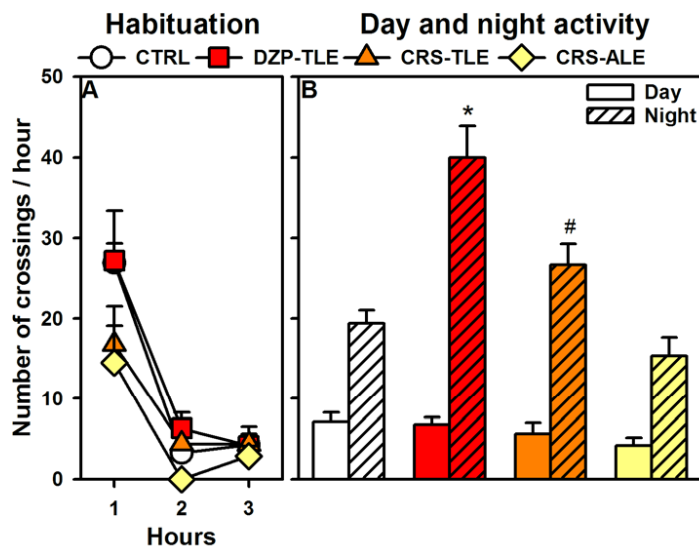


Fig. S1.1: Locomotor activity in the home-cage. A: Number of cage crossings/hour during the habituation period (3h). B: Number of cage crossings/hour during the day (plain columns) and night (hatched columns) periods (21h). Data represent means  $\pm$  S.E.M.

In all groups, nocturnal activity was significantly higher than diurnal activity ( $p < 0.01$ ). For nocturnal activity: \*  $p < 0.005$ , statistically significant difference compared to control, CRS-TLE and CRS-ALE rats; #  $p < 0.05$ , statistically different difference compared to CRS-ALE rats. Controls  $n=12$ , DZP-TLE  $n=16$ , CRS-TLE  $n=13$ , CRS-ALE  $n=8$ .

### S1.2: Beam-walking test: sensorimotor coordination

#### Methods

Sensory-motor coordination was tested on a wooden beam (200cm long and 2.5cm wide) placed 80cm above the floor and connected to the home cage, as described elsewhere (Cassel et al., 2005). Neon lights provided a 300 lux illumination on the beam.

#### Results

The ANOVA did not reveal a significant Group effect and no difference between groups was observed (data not shown).

### S1.3: Open field: habituation to a novel environment

#### Methods

Novel environment habituation was assessed in a wooden square (65 x 65 x 43cm) whose floor was divided in 25 equal squares and placed under a neon light (175 lux). The rat was placed in the center of the open field and the number of squares crossed and rearings were counted for 10min divided in five 2min blocks.

*Results*

Globally, all groups presented a decrease in their activity throughout the task, as confirmed by the ANOVA indicating a significant Block effect ( $F(4,204)=16.37, p<0.001$ ). This effect was due to a significant difference between most of the blocks. However, the ANOVA did not indicate a significant Group effect; as a consequence the groups did not differ from each other. Concerning the number of crossings in the center of the open field, even though DZP-TLE ( $33.44\pm 6.87$  crossings in 10min) and CRS-TLE ( $46.71\pm 8.73$  crossings in 10min) seemed to cross more the center than the two other groups, no group differed statistically significantly from controls ( $22.00\pm 4.19$  crossings in 10min).

**S1.4: Procedural memory procedure in the Morris water maze***Methods*

In the water maze, the platform was placed in the NE quadrant for eight consecutive days and rats were given four trials/day, all starting from the SE starting point. The ninth day, the platform was removed for the probe trial and the rat was placed in the pool for 60s at a different starting point (90° clockwise: SW). The eight-day procedure tests procedural learning and memory and the probe trial the strength of procedural memory and capacity to use spatial cues. Neon lights provided a 175 lux illumination on the water maze.

*Results*

During learning, there was a Group effect ( $F_{(3,50)}=49.55, p<0.001$ ) due to the longer distance swum/trial by UT-TLE and CRS-TLE rats compared to control and CRS-ALE rats ( $p<0.001$ ) (Fig. S1.4A). There was also a Session effect ( $F_{(7,350)}=3.48, p<0.005$ ) mainly due to a decrease of the distance swum. No Group x Session interaction was observed.

For the probe trial (Fig. S1.4B), the analysis concerned the latency to reach a virtual platform location (P1, position during learning or P2, platform position turned by 90° to the right). The ANOVA of the latency revealed significant Group ( $F_{(3,50)}=6.40, p<0.001$ ) and virtual Platform position effects ( $F_{(1,50)}=17.90, p<0.001$ ) but no Group x Platform position interaction. The post-hoc analysis indicated a higher latency to reach P2 compared to P1 only between control and CRS-ALE rats ( $p=0.05$ ).

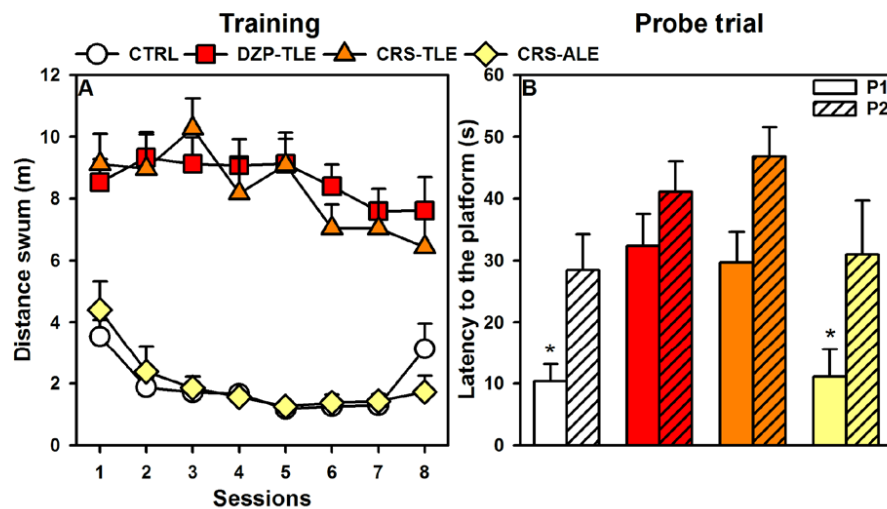


Fig. S1.4: Evaluation of procedural memory in the Morris water maze. A: Distance swum (m) before reaching the hidden platform during learning (eight sessions of four trials each). B: Latency (s) before reaching position 1 (P1) and position 2 (P2) during the probe trial (60 s). P1 was the position of the platform during learning, and P2 is P1 turned by a 90°-angle to the right.

\*  $p < 0.05$ , statistically significant difference compared to the P2 latency.

### S1.5: Radial-arm maze: working memory

#### Methods

For this task, the weight of the animals was reduced over 10 days and maintained at 85% of their free-feeding body weight. Rats were tested in a grey polyvinylchloride maze and pretrained for five days with food pellets (45mg, Bioserv, Thiais, France) as described by Jeltsch et al. (1994). Visual cues were available in the room. An error was considered when the rat went back in an arm already visited, and a session stopped when all arms had been visited or when 10min had elapsed.

After pretraining, two procedures were applied: 1) during the first eight days, spatial working memory was tested in a classical way (two sessions/day), and 2) on the last six days, the task was interrupted after rats had entered four times any arm: rats were withdrawn from the maze for 10s and replaced in front of the arm visited first. This modified procedure prevented non-spatial egocentric strategies and tested the capacity of the animals to shift towards spatial allocentric strategy (see Lehmann et al. (2003) for detailed analysis). Neon lights provided a 380 lux illumination on the radial arm maze.

#### Results

During no trial interruption learning (Fig. S1.5A), there was a Group effect ( $F_{(3,40)}=14.18$ ,  $p < 0.001$ ) due to higher number of errors/session of UT-TLE ( $8.5 \pm 1.1$  errors per session,  $p < 0.001$ ) and CRS-TLE rats ( $5.6 \pm 1.1$ ,  $p < 0.01$ ) compared to control ( $1.3 \pm 0.1$ ) and CRS-ALE

rats ( $1.8 \pm 0.3$ ). The ANOVA also revealed a Block effect ( $F_{(3,120)}=44.41$ ,  $p < 0.005$ ), but no Group x Block interaction, reflecting a comparable improvement of performance in all groups.

During trial interruption learning (Fig. S1.5A), there was a significant Group effect ( $F_{(3,40)}=20.96$ ,  $p < 0.001$ ) due to the higher number of errors in UT-TLE ( $8.4 \pm 1.2$ ,  $p < 0.001$ ) and CRS-TLE rats ( $6.1 \pm 0.7$ ,  $p < 0.001$ ) compared to control ( $1.1 \pm 0.2$ ) and CRS-ALE rats ( $1.0 \pm 0.2$ ). There was no significant Block effect or Group x Block interaction.

During no trial interruption learning (Fig. S1.5B), the ANOVA of the mean percentage of strategies revealed Group effect ( $F_{(3,40)}=10.87$ ,  $p < 0.001$ ) and Group x Strategy interaction ( $F_{(3,40)}=6.15$ ,  $p < 0.005$ ), but no Strategy effect. CRS-ALE rats preferred the allocentric strategy (centered on the environment,  $p < 0.05$ ) over the egocentric strategy (centered on the animal) while no preference was found in the other groups. During trial interruption learning (Fig. S1.5C), the ANOVA of the mean percentage of strategies revealed Group ( $F_{(3,40)}=15.20$ ,  $p < 0.001$ ) and Strategy effects ( $F_{(1,40)}=32.48$ ,  $p < 0.001$ ), and Group x Strategy interaction ( $F_{(3,40)}=23.48$ ,  $p < 0.001$ ). Only control and CRS-ALE rats had a preference for allocentric over egocentric strategy ( $p < 0.001$ ).

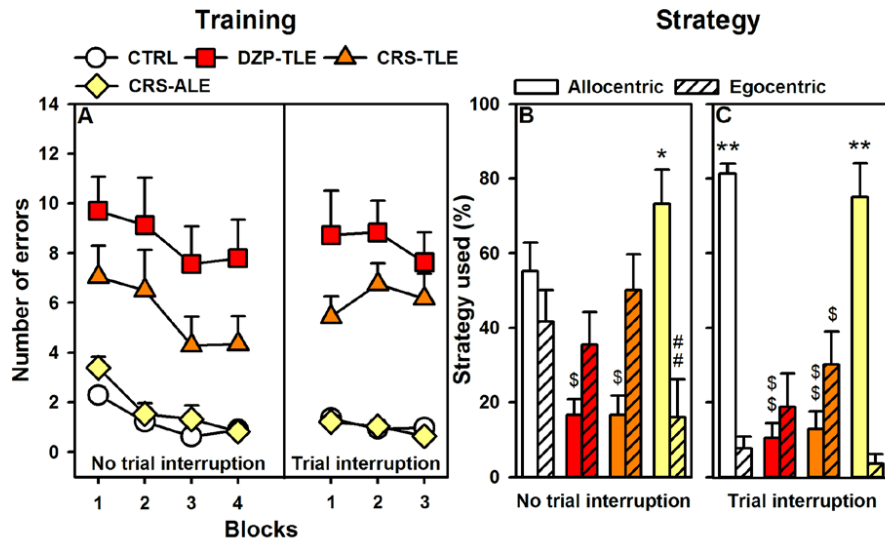


Fig. S1.5: Working memory in the radial-arm maze. A: Number of errors during no trial interruption training (four blocks of four sessions each) and trial interruption training (three blocks of four sessions). B: Strategy (% allocentric or egocentric) used to complete the task during no trial interruption training. C: Strategy (% allocentric or egocentric) used to complete the task during trial interruption training.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , statistically significant differences compared to egocentric strategy; ##  $p < 0.001$ , statistically significant differences compared to CRS-TLE rats, \$  $p < 0.05$ , \$\$  $p < 0.001$ , statistically significant difference compared to control and CRS-ALE rats.

#### References

Jeltsch H, Cassel JC, Neufang B, Kelche C, Hertting G, Jackisch R, Will B. (1994) The effects of intrahippocampal raphe and/or septal grafts in rats with fimbria-fornix lesions depend on the origin of the grafted tissue and the behavioural task used. *Neuroscience* 63:19-39.

Lehmann O, Grottick AJ, Cassel JC, Higgins GA. (2003) A double dissociation between serial reaction time and radial maze performance in rats subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the septal region. *Eur J Neurosci* 18:651-666.



## 2. Publication 2 : Evaluation des effets du carisbamate sur l'attention et les processus inhibiteurs et décisionnels dans le modèle lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal chez le Rat

L'objectif de ce travail était d'évaluer un ensemble de fonctions exécutives qui n'ont jamais été testées dans un modèle expérimental d'ELT : l'attention, les processus inhibiteurs et les processus décisionnels. Cette évaluation permettra d'élargir les connaissances sur les comorbidités présentes dans le modèle lithium-pilocarpine et de vérifier la présence des déficits attentionnels, des troubles de l'inhibition (impulsivité, persévérations) et décisionnels, déficits également observés chez les patients souffrant d'ELT. Le second objectif était de savoir si l'effet positif du carisbamate observé au niveau des comorbidités comportementales rapportées dans l'article précédent (déficits de mémoire spatiale, de mémoire procédurale, d'anxiété) pouvait aussi être mis en évidence au niveau des fonctions exécutives évaluées dans ce travail.

Les mêmes animaux que ceux utilisés dans la publication précédente ont donc été soumis au test de temps de réaction sérielle à cinq choix (*5-choice serial reaction time task*), une tâche basée sur le conditionnement opérant qui permet d'évaluer l'attention visuelle soutenue, l'impulsivité, la persévération et la prise de décision chez le Rat.

Les rats lithium-pilocarpine non-traités avec le carisbamate ont présenté des déficits d'attention visuelle associés à une tendance à l'impulsivité et à la persévération. De plus, les processus décisionnels étaient perturbés dans ce groupe. Au niveau histologique, les déficits d'attention n'ont pas pu être expliqués par des lésions dans des structures connues pour jouer un rôle dans cette fonction (noyau basal magnocellulaire ou noyau tegmental pédonculo-pontin), mais d'autres structures pourraient être impliquées dans ces déficits (hippocampe ventral, régions préfrontales, certains noyaux thalamiques). L'impulsivité pourrait être liée aux lésions du cortex infralimbique, ainsi qu'aux lésions de l'hippocampe ventral. Les

persévérations pourraient résulter de lésions des cortex orbitofrontal et prélimbique. Enfin, l'altération des processus décisionnels pourrait mettre en jeu le cortex orbitofrontal et l'hippocampe ventral.

Les animaux qui ont reçu du carisbamate à partir d'une heure après le début de l'EdM et qui n'ont pas développé d'ELT avaient un niveau de performance identique à celui des rats témoins. En revanche, lorsque le carisbamate ne permettait pas d'éviter l'apparition de l'ELT, les rats présentaient les mêmes déficits que les rats lithium-pilocarpine non-traités.

Ce travail est le premier à évaluer les capacités attentionnelles et le contrôle inhibiteur dans un modèle d'ELT. Ces fonctions cognitives étant également altérées chez les patients atteints d'ELT, il est d'intérêt de les étudier dans le modèle lithium-pilocarpine pour augmenter les connaissances disponibles sur les comorbidités caractérisant ce modèle. De plus, l'étude des groupes traités avec le carisbamate permet de vérifier que le traitement, lorsqu'il évite l'apparition de l'ELT, contribue également à maintenir les capacités attentionnelles et le contrôle inhibiteur à un niveau similaire à celui des rats témoins.



## FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH

## Attention and executive functions in a rat model of chronic epilepsy

\*†Jean-Baptiste Faure, \*†José E. Marques-Carneiro, \*†Gladys Akimana, \*Brigitte Cosquer, †Arielle Ferrandon, \*Karine Herbeaux, †Estelle Koning, \*Alexandra Barbelivien, †Astrid Nehlig, and \*Jean-Christophe Cassel

*Epilepsia*, \*\*(\*)1–10, 2014  
doi: 10.1111/epi.12549

### SUMMARY

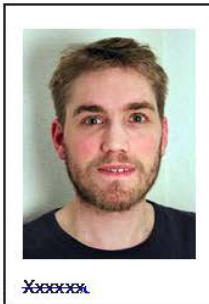
**Objective:** Temporal lobe epilepsy is a relatively frequent, invalidating, and often refractory neurologic disorder. It is associated with cognitive impairments that affect memory and executive functions. In the rat lithium-pilocarpine temporal lobe epilepsy model, memory impairment and anxiety disorder are classically reported. Here we evaluated sustained visual attention in this model of epilepsy, a function not frequently explored.

**Methods:** Thirty-five Sprague-Dawley rats were subjected to lithium-pilocarpine status epilepticus. Twenty of them received a carisbamate treatment for 7 days, starting 1 h after status epilepticus onset. Twelve controls received lithium and saline. Five months later, attention was assessed in the five-choice serial reaction time task, a task that tests visual attention and inhibitory control (impulsivity/compulsivity). Neuronal counting was performed in brain regions of interest to the functions studied (hippocampus, prefrontal cortex, nucleus basalis magnocellularis, and pedunculopontine tegmental nucleus).

**Results:** Lithium-pilocarpine rats developed motor seizures. When they were able to learn the task, they exhibited attention impairment and a tendency toward impulsivity and compulsivity. These disturbances occurred in the absence of neuronal loss in structures classically related to attentional performance, although they seemed to better correlate with neuronal loss in hippocampus. Globally, rats that received carisbamate and developed motor seizures were as impaired as untreated rats, whereas those that did not develop overt motor seizures performed like controls, despite evidence for hippocampal damage.

**Significance:** This study shows that attention deficits reported by patients with temporal lobe epilepsy can be observed in the lithium-pilocarpine model. Carisbamate prevents the occurrence of motor seizures, attention impairment, impulsivity, and compulsivity in a subpopulation of neuroprotected rats.

**KEY WORDS:** Temporal lobe epilepsy, Lithium-pilocarpine, Attention, Impulsivity/compulsivity, 5-CSRTT.



2 XXXXXXX

Accepted January 3, 2014.

\*Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), Faculty of Psychology, UMR 7364 University of Strasbourg – CNRS, Strasbourg, France; and †Faculty of Medicine, INSERM U 666, Strasbourg, France

Address correspondence to Jean-Christophe Cassel, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, UMR 7364 University of Strasbourg – CNRS, Faculty of Psychology, 12 rue Goethe, F 67000 Strasbourg, France. E-mail: jcassel@unistra.fr

Wiley Periodicals, Inc.

© 2014 International League Against Epilepsy

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a common neurologic disorder that causes partial seizures, which are frequently refractory to treatment<sup>1</sup> and consequently require surgery. Although TLE classically affects learning and memory capabilities, impairments of executive functions have also been reported.<sup>2</sup> Recently, attention deficits,<sup>3–6</sup> compulsive behavior,<sup>7–9</sup> and decision-making impairments<sup>10,11</sup> have become a topic of increasing interest in patients with TLE.

CE: Mary-Jane A.	WILEY
PE: Widya	
Dispatch: 22.1.14	1 2 5 4 9
No. of pages: 10	
Journal Code	Manuscript No.
E P I	

Cognitive dysfunctions have been characterized in the adult pilocarpine model of epilepsy,<sup>12–19</sup> but mostly in terms of working, long-term, and procedural memory deficits. Alterations of attention and inhibitory control have been reported recently in one single study.<sup>20</sup> The present study investigated sustained visual attention and impulsive/compulsive behavior in the lithium-pilocarpine model of TLE.

This study is of great interest because cognitive comorbidities, including attention deficits, are the main complaint of patients with TLE.<sup>21</sup> These comorbidities are also one benchmark of the National Institute of Neurological Disorders and Stroke.<sup>22</sup> We extended our approach to rats treated with carisbamate during status epilepticus (SE). Carisbamate is a potent voltage-gated sodium channel inhibitor.<sup>23</sup> When started 1 h after SE onset and administered for 7 days in a rat model of TLE, carisbamate treatment induces slight neuroprotection but does not prevent the occurrence of spontaneous recurrent motor seizures (SRS) in a subpopulation of rats. Other rats similarly treated, however, did not develop overt motor SRS, but were previously shown to display bilateral synchronous cortical spike-and-wave discharges (SWDs)<sup>24</sup> instead of TLE, which is accompanied by extended neuroprotection (possibly accountable for a reduction of SE severity) and preservation of most cognitive functions.<sup>19,24</sup> The study of attention in the latter group is relevant, as attention deficits have also been reported in human absence epilepsy.<sup>25</sup>

## METHODS

### Animals

The studies were performed on the 47 adult male Sprague-Dawley rats that had already undergone a battery of cognitive testing.<sup>19</sup> Rats were provided by Charles River Breeding Center (L'Abresle, France) and housed in individual cages (42 × 26 × 18 cm) under controlled conditions (22 ± 1°C, 12/12 h light/dark cycle, lights on at 7.00 a.m.) with water and food ad libitum. Experiments were performed in accordance with the rules of the European Community council directive of 22 September 2010 (2010-63) and the French Department of Agriculture (2013-118; License # 67-97 for AN and 67-215 for JCC). The protocol was approved by the ethical animal research committee board of the University of Strasbourg (CREMEAS # AL/01/04/03/07). The experiments were performed following the principles outlined in the ARRIVE guidelines and the Basel declaration (<http://www.basel-declaration.org>). The concept was considered when planning the experiments.

### Status epilepticus and treatment

From the 47 rats, 35 underwent lithium-pilocarpine SE. Twelve controls received lithium chloride and saline injections instead of pilocarpine. Among the 35 rats that underwent SE, 20 were treated for 7 days with carisbamate

delivered intraperitoneally (90 mg/kg, Johnson & Johnson Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, U.S.A.), twice daily, starting at 1 h after SE onset, whereas 15 received diazepam delivered intramuscularly (Roche, Meylan, France) instead of carisbamate on the first day of SE.<sup>19</sup>

To detect the occurrence of motor SRS, rats underwent 10 h daily video-recording (7.00 a.m. to 5.00 p.m.) starting 1 week after SE and lasting for 8 weeks, as described previously.<sup>19</sup>

At the end of the video-recording session, four groups of rats were constituted: (1) controls (n = 12), (2) diazepam-treated rats with TLE (DZP-TLE, n = 15), (3) carisbamate-treated rats with TLE (CRS-TLE, n = 12), and (4) carisbamate-treated rats with no motor seizures (CRS-NMS, n = 8).

### 5-Choice serial reaction time task

The 5-choice serial reaction time task (5-CSRTT) is an operant conditioning-based test that reliably evaluates visual attention, compulsive, and impulsive behavior.<sup>26</sup> The test was performed 5 months after SE onset. Using a food-restricted diet, the weight of all rats was reduced progressively over 10 days and maintained at 85% of its free-feeding value throughout the task. Eight nine-hole operant chambers (Bioseb, Chaville, France) were used in ventilated and sound-attenuated boxes in order to test visual attention (see Supporting Information 1 for graphical representation and pictures depicting the 5-CSRTT). Each aluminum chamber (25.2 × 28 × 24 cm) was fitted with a ceiling light. A curved wall contained nine circular holes (diameter 2.3 cm and 1.4 cm depth) placed 2.2 cm above the chamber floor. Each hole was equipped with an infrared light beam and photocell to detect nose pokes. Only five of the nine holes were used for training/testing, the others being masked by a guillotine trapdoor. The stimulus light was presented from the inside of a randomly selected hole (out of the five possibilities) with a defined duration and intensity. Presentation of the stimulus light in one hole indicated that the rat had to respond by doing a nose poke in that specific hole. A food magazine closed by a door located on the opposite wall at an equal distance from each hole automatically delivered food pellets (45 mg, TSE systems GmbH, Bad Homburg, Germany). Rats collected pellets by pushing a Perspex door that closed the magazine. All chambers were automatically controlled by a computer (Packwin, Panlab S.P., Cornella, Barcelona, Spain).

Briefly, each trial was initiated when the rat pushed the magazine door. The rat had to do a nose poke in the lighted hole (one of five holes pseudo-randomly lighted) to obtain a food pellet delivered in the food magazine: This behavior accounts for a correct response. When the rat did a nose poke in an unlighted hole, it obtained no food pellet and an incorrect response was recorded. If the rat did a nose poke before stimulus presentation, it did not obtain a food pellet and a premature response was recorded. The rat could also



1 persist in doing nose pokes, even after performing a correct  
2 response and without seeking for the food pellet already  
3 delivered in the magazine; this was recorded as a perseverative  
4 response.

5 After a training protocol described in detail elsewhere  
6 (see Supporting Information), the rats were given different  
7 challenges to assess visual attention. First, they were tested  
8 under standard conditions, that is, stimulus duration  
9 ( $SD$ ) = 0.5 s, and stimulus intensity ( $SI$ ) = 9 (arbitrary  
10 units, nine corresponding to maximal intensity). Then  $SI$   
11 was reduced from 9 (100% of maximum) to 2 (22% of maxi-  
12 mum). The rats were subsequently tested under a standard  
13  $SI$  condition ( $SI$  = 9), but  $SD$  was increased to 5 s. Data  
14 were taken from three consecutive sessions with stable per-  
15 formances under each condition. A session ended when 100  
16 trials were completed or when 30 min had elapsed.

#### 18 Histologic and immunohistochemical studies

19 The effect of carisbamate treatment on neuronal loss was  
20 assessed using immunohistochemical staining of anti-neu-  
21 ronal nuclear protein (NeuN) or anti-choline acetyltransfer-  
22 ase (ChAT) (for the nucleus basalis magnocellularis and  
23 pedunclopontine tegmental nucleus). Staining was per-  
24 formed on a series of randomly selected animals from each  
25 group.

26 Immunohistochemical procedures were previously  
27 reported in detail.<sup>19</sup> After perfusion, fixation and cryoprotection,  
28 the brains were frozen in isopentane ( $-35^{\circ}\text{C}$ ), and  
29  $40\ \mu\text{m}$  coronal sections were cut in a cryostat. Free-floating  
30 sections were rinsed and soaked in normal donkey serum  
31 (Biowest, Nuaille, France), and these were placed in the  
32 solution with the primary antibody: mouse monoclonal anti-  
33 body directed against NeuN (1:2000; Milipore, Molsheim,  
34 France) or goat polyclonal antibody directed against ChAT  
35 (1:1000; Chemicon International, Temecula, CA, U.S.A.).  
36 After rinsing, sections were incubated in the presence of a  
37 biotinylated horse anti-mouse antibody (1:500; Vector Lab-  
38 oratories International, Burlingame, CA, U.S.A.) or a bioti-  
39 nylated donkey anti-goat antibody (1:500; Chemicon  
40 International) for NeuN and ChAT staining, respectively.  
41 The sections were rinsed, incubated in a standard avidin-  
42 biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC, Vector  
43 Laboratories International), and exposed to a 3,3'-diam-  
44 inobenzidine tetrahydrochloride solution (Sigma-Aldrich).  
45 The sections were mounted on slides and coverslipped.

#### 47 Quantification

48 A 100 X computerized picture of each structure of interest  
49 was taken. For anti-NeuN-stained slices, quantifications  
50 were performed in attention- and inhibitory control-related  
51 structures: namely the dorsal and ventral hippocampus, and  
52 infralimbic, prelimbic, cingulate, and frontal and orbital  
53 cortices. For anti-ChAT-stained slices, quantifications were  
54 performed in the nucleus basalis magnocellularis and the  
55 pedunclopontine tegmental nucleus.

Neuronal counting was assessed using a standardized  
two-dimensional (2D) grain count module (MCID software,  
InterFocus Imaging, Cambridge, United Kingdom). The  
average nucleus density was determined in each brain struc-  
ture. Each structure was manually outlined by an observer  
blinded to the animal's treatment before computerized  
counting of the neurons was started. The section thickness  
was  $40\ \mu\text{m}$  and the interslice interval  $200\ \mu\text{m}$ . Neurons in  
each region of interest were counted twice in three sections  
of each animal, and the average of these measurements was  
considered for data analysis.

#### Statistical analyses

For most variables, one-way analysis of variance (ANO-  
VA) was performed. The post hoc analysis was always per-  
formed using the Newman-Keuls test when justified. A chi-  
square test was used to compare the difference between  
groups in terms of number of rats per group that completed  
the training in the 5-CSRTT. Regression analyses were per-  
formed to assess correlations between neuronal density or  
latency to the first motor SRS and behavioral performance.

## RESULTS

### Performance in the 5-CSRTT

The 5-CSRTT requires a long learning process over  
several phases. When a rat did not reach the performance  
corresponding to standard testing conditions (see Support-  
ing information) it was excluded from the task. The comple-  
tion rate was reached in 12 of 12 controls, 6 of 15 DZP-TLE  
rats, 8 of 12 CRS-TLE rats, and 7 of 8 CRS-NMS rats. The  
completion rate was significantly lower in DZP-TLE rats  
than in controls ( $\chi^2 = 10.80$ ,  $p < 0.001$ ) and CRS-NMS rats  
( $\chi^2 = 4.79$ ,  $p < 0.05$ ), but was not different from that of  
CRS-TLE rats. The completion rate in CRS-TLE rats also  
significantly differed from that of controls ( $\chi^2 = 4.80$ ,  
 $p < 0.05$ ).

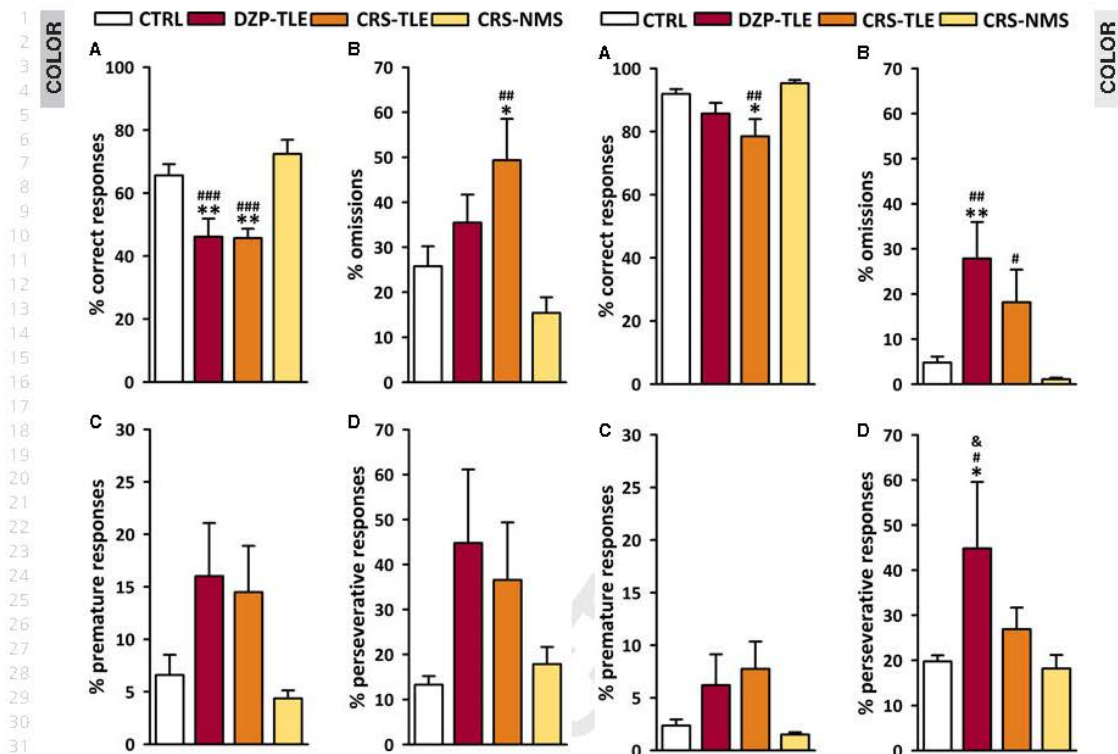
#### Basal attention assessment under standard conditions

( $SD = 0.5\ \text{s}$ ;  $SI = 9$ )

Under standard testing conditions, the ANOVA of the  
percentage of correct responses revealed a Group effect  
( $F_{3,29} = 10.17$ ,  $p < 0.001$ ), with a 30–37% decrease in  
DZP-TLE and CRS-TLE rats ( $p < 0.01$ ) compared to  
controls and CRS-NMS rats (Fig. 1A). The percentage of  
omissions (Fig. 1B) also differed among groups  
( $F_{3,29} = 5.20$ ,  $p < 0.01$ ), with a significant increase in CRS-  
TLE rats ( $p < 0.05$ ) compared to controls (+96%) and CRS-  
NMS rats (+221%). Both DZP-TLE and CRS-TLE rats  
showed a higher percentage of premature and perseverative  
responses (Fig. 1C and D) compared to control and CRS-  
NMS rats, although the differences were not significant.  
Magazine latency reached a mean value of  $1.3 \pm 0.1\ \text{s}$  in  
controls, and increased by 54–85% in the three other groups,  
although not significantly. The latency to perform a correct

4

J.-B. Faure et al.



**Figure 1.** 5-Choice serial reaction time task performance measured under standard conditions (SD = 0.5 s; SI = 9) in 12 controls, 6 DZP-TLE, 8 CRS-TLE, and 7 CRS-NMS rats. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01: statistically different from controls; ###p < 0.01, ####p < 0.001: statistically different from CRS-NMS rats. Epilepsia ILAE

**Figure 2.** 5-Choice serial reaction time task performance measured under longer stimulus duration (SD = 5 s; SI = 9) in 12 controls, 6 DZP-TLE, 8 CRS-TLE, and 7 CRS-NMS rats. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01: statistically significant differences from controls; #p < 0.05, ##p < 0.01: statistically different from CRS-TLE rats. Epilepsia ILAE

response was  $1.0 \pm 0.1$  s in controls, and was significantly increased in both TLE groups (30–40%,  $p < 0.05$ ).

#### Assessment of potential biases: effect of stimulus intensity or duration changes

Visual capacities of the rats were assessed by decreasing SI from 9 to 2. This change did not affect the four groups in different ways (for more details, see Supporting Information).

Motivation was tested by increasing stimulus duration from SD = 0.5 to SD = 5 s, in order to decrease the attentional demand. Globally, for the various parameters measured, all groups of rats improved their performance when SD increased from 0.5 s to 5 s.

When the SD was set at 5 s, the ANOVA of the percentage of correct responses (Fig. 2A) still revealed a signifi-

cant Group effect ( $F_{3,29} = 5.36$ ,  $p < 0.01$ ), mainly due to the slight decrease in CRS-TLE rats (15–18%) compared to controls ( $p < 0.05$ ) and CRS-NMS rats ( $p < 0.01$ ), whereas DZP-TLE rats no longer differed from controls. The ANOVA of omissions (Fig. 2B) indicated a significant Group effect ( $F_{3,29} = 6.21$ ,  $p < 0.01$ ), with a strong increase in DZP-TLE rats compared to control and CRS-NMS rats ( $p < 0.01$ ). CRS-TLE rats showed a significant increase only compared to CRS-NMS rats ( $p < 0.05$ ).

Inhibitory processes were assessed by recording premature and perseverative responses. Premature responses (Fig. 2C) were slightly increased in DZP-TLE and CRS-TLE rats compared to controls, although not significantly. The ANOVA of the percentage of perseverative responses (Fig. 2D) revealed a significant Group effect

( $F_{3,29} = 3.47$ ,  $p < 0.05$ ), due to an increase in DZP-TLE rats compared to the three other groups ( $p < 0.05$ ). In controls, mean magazine latency reached  $1.6 \pm 0.2$  s, and increased in DZP-TLE ( $2.4 \pm 0.3$  s) and CRS-TLE rats ( $5.0 \pm 2.8$  s), although not significantly. The latency to perform a correct response was  $1.3 \pm 0.1$  s in controls, and was significantly increased in both TLE groups (46.77%,  $p < 0.05$ ).

#### Assessment of neuronal loss

The density of ChAT-positive neurons in the nucleus basalis magnocellularis (Fig. 3A) and the pedunculopontine tegmental nucleus (data not shown) was not different among groups. For NeuN-positive neurons, no difference was observed between groups in the cingulate and motor cortices (data not shown). In prefrontal areas, namely prelimbic, infralimbic, and orbital cortices (Fig. 3B-D), density of NeuN-positive cells in CRS-NMS rats never significantly differed from controls. Conversely, in DZP-TLE and CRS-TLE rats, the number of neurons was reduced below the level of controls and CRS-NMS rats in prelimbic ( $p < 0.05$ ), infralimbic ( $p < 0.01$ ), and orbital cortices ( $p < 0.05$ ), but also in ventral hippocampal CA1 (Fig. 3E)

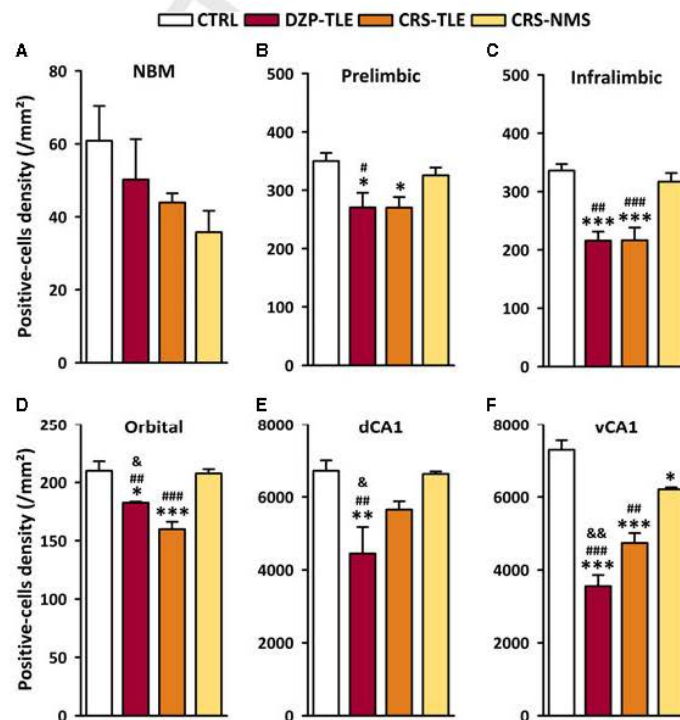
( $p < 0.01$ ); in the latter region, CRS-NMS rats differed from controls ( $p < 0.05$ ). In dorsal CA1 (Fig. 3F), only DZP-TLE rats significantly differed from all other groups ( $p < 0.05$ ).

#### Correlations between neuronal density or latency to the first motor SRS and behavioral performance

The regression analysis (Table 1) indicates that neuronal density in ventral CA1 ( $p < 0.01$ ) and CA3 ( $p < 0.01$ ) correlated positively with the percentage of correct responses (Fig. 4A). In addition, neuronal density in ventral CA1 correlated negatively with the percentage of omissions ( $p < 0.05$ , Fig. 4C), and the latency to perform a correct response ( $p < 0.05$ ). Neuronal density in dorsal ( $p < 0.01$ ) and ventral CA1 ( $p < 0.05$ ) correlated negatively with the percentage of perseverative responses, whereas in ventral CA3 it correlated negatively with the percentage of premature responses ( $p < 0.01$ ). Neuronal density in the infralimbic and orbital cortices ( $p < 0.05$ ) correlated positively with the percentage of correct responses (Fig. 4B), and negatively with the percentage of omissions ( $p < 0.05$ , Fig. 4D) and latency to perform a correct response ( $p < 0.05$ ). Neuronal density in the

COLOR

**Figure 3.** Density of ChAT-positive cells/mm<sup>2</sup> in the nucleus basalis magnocellularis (NBM) and of NeuN-positive cells/mm<sup>2</sup> in prelimbic, infralimbic, and orbital cortices, and in the dorsal (dCA1) and ventral CA1 regions (vCA1) of the hippocampus in seven controls, four DZP-TLE, five CRS-TLE, and five CRS-NMS rats. Statistically significant differences are indicated in bold: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ : different from controls; # $p < 0.05$ , ### $p < 0.01$ , #### $p < 0.001$ : different from CRS-NMS; & $p < 0.05$ , && $p < 0.01$ : different from CRS-TLE. *Epilepsia* © ILAE



*Epilepsia*, \*\*(\*) 1 10, 2014  
doi: 10.1111/epi.12549

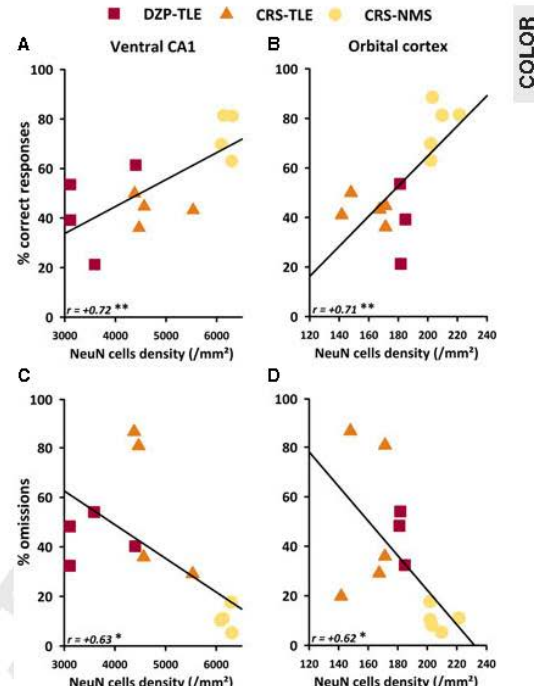


1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55

**Table 1. Correlations between neuronal density and behavioral performance in the 5-CSRTT under standard testing conditions in four DZP-TLE, five CRS-TLE, and five CRS-NMS rats in which reliable histologic data could be obtained**

	Prefrontal cortex	Infralimbic cortex	Orbital cortex	Cingulate cortex	Dorsal CA1	Dorsal CA3	Ventral CA1	Ventral CA3
% correct responses	$r = +0.38$	<b><math>r = +0.59^*</math></b>	<b><math>r = +0.71^{***}</math></b>	$r = +0.03$	$r = +0.48$	$r = -0.14$	<b><math>r = +0.72^{***}</math></b>	$r = +0.74^{***}$
% omissions	$r = -0.36$	<b><math>r = -0.61^{**}</math></b>	<b><math>r = -0.62^{**}</math></b>	$r = -0.14$	$r = -0.18$	$r = +0.05$	<b><math>r = -0.63^{**}</math></b>	$r = -0.44$
% premature responses	$r = -0.54$	<b><math>r = -0.61^{**}</math></b>	$r = -0.51$	$r = -0.19$	$r = -0.55$	$r = -0.06$	$r = -0.51$	<b><math>r = -0.74^{***}</math></b>
% perseverative responses	$r = +0.001$	$r = -0.06$	$r = -0.06$	<b><math>r = +0.27</math></b>	<b><math>r = -0.73^{***}</math></b>	$r = +0.14$	<b><math>r = -0.58^{**}</math></b>	$r = -0.56$
Magazine latency	$r = +0.27$	$r = +0.24$	$r = +0.11$	$r = -0.05$	$r = -0.07$	$r = -0.22$	$r = +0.05$	$r = +0.33$
Correct response latency	$r = -0.37$	<b><math>r = -0.67^{**}</math></b>	<b><math>r = -0.68^{**}</math></b>	$r = -0.17$	$r = -0.32$	$r = -0.27$	<b><math>r = -0.61^{**}</math></b>	$r = -0.31$

Statistically significant correlations are indicated in bold: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .



**Figure 4.** Correlations between neuronal densities in the ventral CA1 region or orbital cortex and the percentage of correct responses or omissions (under standard conditions) in four DZP-TLE, five CRS-TLE, and five CRS-NMS rats. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : statistically significant correlations. Epilepsia © ILAE

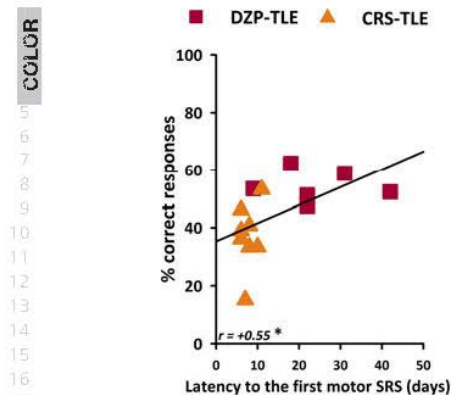
infralimbic cortex correlated negatively with the percentage of premature responses ( $p < 0.05$ ).

The latency to the first motor SRS (Fig. 5) correlated positively with the percentage of correct responses ( $p < 0.05$ ), but not with other parameters assessed in the 5-CSRTT.

**DISCUSSION**

This study assessed sustained visual attention capabilities in the lithium-pilocarpine animal model of chronic epilepsy. In lithium-pilocarpine rats that were able to reach the testing conditions after training, we found dramatic attention deficits that are in line with those described in patients with TLE,<sup>3-5</sup> and in a recent study in the lithium-pilocarpine model.<sup>20</sup> In addition, as we reported previously for a variety of memory functions,<sup>19</sup> rats treated with carisbamate that did not develop overt motor SRS performed like controls in the attentional task.

Epilepsia, \*\*(\*)1 10, 2014  
doi: 10.1111/epi.12549



**Figure 5.** Correlation between the latency to the first motor seizure and percentage of correct responses (under standard conditions) in eight DZP-TLE and six CRS-TLE rats. \* $p < 0.05$ : statistically significant correlation. *Epilepsia* ILAE

#### 5-CSRTT performance in the lithium-pilocarpine model (DZP-TLE rats)

The 5-CSRTT assesses sustained visual attention in rodents.<sup>26</sup> It is a complex task that requires the rat to learn a whole sequence of actions and needs a high level of focused attention to obtain a reward. To complete the training, the rat needs a functional learning and memory system. Once trained, the rat is rewarded when it maintains its attention along the task, inhibits ineffective actions, and makes adequate decisions.

In this study, DZP-TLE rats had difficulties learning the task, and some of them performed so poorly that they had to be excluded from training. It is possible that these animals did not understand the task, that is, the association between light, nose poke, and food reward. The rats that could be tested had reached the different criteria, meaning that they understood the task and that the deficits recorded are not related to operant conditioning learning dysfunctions but represent a true deficit in attention. In DZP-TLE rats, SE leads to extensive neuronal loss in hippocampus.<sup>19,24</sup> This loss could underlie the learning difficulties of these rats. Indeed, one study reported severe learning difficulties in rats that underwent hippocampal lesions before 5-CSRTT training, as was the case in the present situation.<sup>27</sup> In addition, in normal intact rats, a specific positive correlation was observed between [<sup>14</sup>C]deoxyglucose uptake in dorsal hippocampus and the percentage of correct responses,<sup>28</sup> confirming the involvement of the hippocampus in this learning and attention task.

A gross attention deficit is classically characterized by a reduced percentage of correct responses that can be associated with an increased percentage of omissions.<sup>26</sup> In the

current study, DZP-TLE rats displayed such a deficit, as also reported recently in the same model.<sup>20</sup> In part of their trials, they were unable to detect the correct hole, thereby committing a high proportion of incorrect responses, although the number of nose poke omissions was similar to that of controls. This deficit could reflect the incapacity of the rat to follow the tempo of the task at its most demanding level. To confirm that these effects were really attributable to attention and inhibitory control deficits, we analyzed the latency to the food magazine that is theoretically affected by an alteration of motivation or motor functions. In standard conditions, the magazine latency tended to increase in DZP-TLE rats compared to controls. Increasing stimulus duration from 0.5 s to 5 s revealed that when the attentional demand of the task was reduced, the difference in all parameters tested weakened between groups, hence indicating no major motivational bias. Moreover, there was no visual deficit in epileptic rats, since the reduction of light intensity of the stimulus did not affect epileptic rats more than controls.

Attention deficits have recurrently been associated with neuronal loss in the nucleus basalis magnocellularis, more specifically of cholinergic neurons.<sup>29,30</sup> However, in the current study, this structure was preserved in DZP-TLE rats that performed poorly in the 5-CSRTT. Damage to cingulate cortex<sup>31</sup> and pedunculo-pontine tegmental nucleus<sup>32</sup> has also been linked to attention impairments. There was no detectable neuronal loss in these regions. Neuronal loss was found in dorsal hippocampus, in which functional activity correlated with attentional performance in intact rats.<sup>28</sup> However, posttraining lesions in this region do not impact attention in already trained rats.<sup>33</sup> Therefore, dorsal hippocampus seems critical in the learning part of the task but not in attention performance per se. Here, TLE rats also exhibited neuronal loss in the ventral hippocampus. Of interest, lesions of the ventral hippocampus transiently impaired attention by decreasing choice accuracy.<sup>33</sup> In this context, we observed a positive correlation between neuronal density in ventral CA1 and CA3 and the percentage of correct responses, which is congruent with the involvement of the ventral hippocampus in choice accuracy in this task. In line with these data, patients with TLE exhibit impaired selective attention<sup>3,5</sup> (i.e., a reduced ability to detect a target stimulus among distracting stimuli) and impaired sustained attention<sup>4</sup> (i.e., a weaker ability to detect the presence of a target stimulus over times from 15 to 30 min). This reflects the concentration difficulty expressed by patients.<sup>21</sup> Furthermore, we tried to correlate the attention impairment with the latency to the first motor SRS and found the following: the earlier the occurrence of the first seizure, the worse the attentional performance. We can propose that an epileptic state starting earlier might result from more severe/deleterious SE, thereby leading to higher risk of and susceptibility to comorbidities.

The 5-CSRTT also provides an overview of inhibitory control and potentially decisional processes. Classically,



premature/impulsive behavior, that is, the incapacity to wait and postpone the action required to obtain a reward, is reported when animals do a nose poke before stimulus presentation. Perseverative/compulsive behavior is characterized by supplementary nose pokes after the initial one in the target hole.<sup>26</sup> In DZP-TLE rats, there was a tendency to impairment of inhibitory control characterized by impulsive, as previously reported,<sup>20</sup> and perseverative behavior. Infralimbic cortex and ventral hippocampal lesions found in these rats are known to induce impulsive behavior,<sup>31,33</sup> as also suggested here by the negative correlation between neuronal density in ventral CA3 and infralimbic cortex and the percentage of premature responses. Results are contradictory concerning this deficit in patients.<sup>9,34–36</sup> DZP-TLE rats also tended to display perseverative behavior. This function mainly relies on orbitofrontal<sup>31</sup> and prelimbic cortices,<sup>37</sup> two regions with neuronal loss in DZP-TLE rats. It is notable that neuronal density in these two cortical regions did not correlate with the percentage of perseverative responses, whereas neuronal density in the dorsal and ventral CA1 did. Perseverative/compulsive behavior, that is, the persistence of useless behavior, has been described in patients with epilepsy.<sup>7–9</sup> However, the increase of the percentage of perseverative responses can also result from the longer latency to correct responses observed in DZP-TLE rats. In this task, DZP-TLE rats showed a longer latency to a correct response after stimulus presentation, which could reflect slowing of decisional processes. An alternative possibility would be that motor functions were impaired. However, our previous studies on the same animals showed that this is not the case.<sup>19</sup> Orbital cortex and ventral hippocampus, which both exhibited neuronal loss in DZP-TLE rats, have recently been reported to play a role in decisional processes.<sup>38</sup> In the current study, neuronal density in infralimbic and orbital cortices, and in ventral CA1, was decreased in DZP-TLE rats, and was negatively correlated with the latency to perform correct responses, in accordance with decision-making deficits recently reported in patients with TLE.<sup>10,11</sup>

As reported previously, when carisbamate was administered during SE, it did not prevent motor SRS and promoted only slight neuroprotection, and CRS-TLE rats exhibited the same cognitive deficits as DZP-TLE rats.<sup>19</sup> In the 5-CSRTT, CRS-TLE rats showed strong attention impairments and longer latencies to perform a correct response, pointing to potential impairment of decisional processes as in DZP-TLE rats.

#### 5-CSRTT performance in CRS-NMS rats

Attentional deficits represent a serious comorbidity in patients with TLE. Sustained attention impairment has also been reported in patients with absence epilepsy,<sup>25</sup> and a diagnosis of attention deficit hyperactivity disorder was established in 26% of them.<sup>39</sup> In addition, parents have confirmed that 37.5% of children with absence

epilepsy had attention difficulties.<sup>38</sup> For these reasons, we looked at the consequences on attention of early carisbamate treatment (administered during SE and early latent period) shown previously to lead in some rats to bilateral synchronous cortical SWDs, as seen in absence epilepsy.<sup>24</sup>

In CRS-NMS rats reported to express SWDs, a typical feature of absence epilepsy, performance on the 5-CSRTT was normal in contrast to what we found in DZP-TLE and CRS-TLE rats. Attention was preserved and no sign of impulsive or compulsive behavior was recorded. Only two slight differences with controls were observed. First, CRS-NMS rats showed increased latency to perform a correct response, possibly indicating some weakening in decisional processes. Second, their performance decreased slightly when stimulus intensity was lowered. However, these differences did not impair the attentional and inhibitory functions, as these rats performed like controls under standard testing conditions. It is worth emphasizing that these data do not necessarily reflect the human absence epilepsy situation or the genetic models of absence epilepsy, in which no neuronal loss was reported.<sup>19,40</sup>

## CONCLUSION

In conclusion, we show here that pilocarpine-treated rats have attention impairment, perseverative behavior, and decision-making deficits that parallel those observed in patients with TLE. Further experiments are needed to clarify the link between these (and other) cognitive deficits and both neuronal loss in specific brain regions and pathway reorganizations.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Ministry of Research (doctoral fellowship to JBF), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U 666), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-UNISTRA UMR 7364), and the Université de Strasbourg (UNISTRA). Carisbamate was a gift from Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, U.S.A.

## DISCLOSURE

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

## REFERENCES

- Semah F, Picot MC, Adam C, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998;51:1256–1262.
- Hermann B, Seidenberg M, Lee EJ, et al. Cognitive phenotypes in temporal lobe epilepsy. *J Int Neuropsychol Soc* 2007;13:12–20.
- Helmstaedter C, Pohl C, Hufnagel A, et al. Visual learning deficits in nonresected patients with right temporal lobe epilepsy. *Cortex* 1991;27:547–555.



- 1 4. Fleck DE, Shear PK, Strakowski SM. A reevaluation of sustained  
2 attention performance in temporal lobe epilepsy. *Arch Clin*  
3 *Neuropsychol* 2002;17:399–405.
- 4 5. Bocquillon P, Dujardin K, Betrouni N, et al. Attention impairment in  
5 temporal lobe epilepsy: a neurophysiological approach via analysis of  
6 the P300 wave. *Hum Brain Mapp* 2009;30:2267–2277.
- 7 6. Hudson JM, Flowers KA, Walster KL. Attentional control in patients  
8 with temporal lobe epilepsy. *J Neuropsychol* 2013;?????:  
9 ?????-?????. Epub Jan 16. doi: 10.1111/jnp.12008
- 10 7. Giovagnoli AR. Relation of sorting impairment to hippocampal  
11 damage in temporal lobe epilepsy. *Neuropsychologia* 2001;39:140–  
12 150.
- 13 8. Oddo S, Solis P, Consalvo D, et al. Mesial temporal lobe epilepsy and  
14 hippocampal sclerosis: cognitive function assessment in Hispanic  
15 patients. *Epilepsy Behav* 2003;4:717–722.
- 16 9. Rzezak P, Fuentes D, Guimaraes CA, et al. Frontal lobe dysfunction in  
17 children with temporal lobe epilepsy. *Pediatr Neurol* 2007;37:176–  
18 185.
- 19 10. Delazer M, Zamarian L, Bonatti E, et al. Decision making under  
20 ambiguity in temporal lobe epilepsy: does the location of the  
21 underlying structural abnormality matter? *Epilepsy Behav*  
22 2011;20:34–37.
- 23 11. Yamano M, Akamatsu N, Tsuji S, et al. Decision-making in temporal  
24 lobe epilepsy examined with the Iowa gambling task. *Epilepsy Res*  
25 2011;93:33–38.
- 26 12. Persinger MA, Bureau YR, Kostakos M, et al. Behaviors of rats with  
27 insidious, multifocal brain damage induced by seizures following  
28 single peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav*  
29 1993;53:849–866.
- 30 13. Kubova H, Mares P, Suchomelova L, et al. Status epilepticus in  
31 immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and  
32 epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 2004;19:3255–3265.
- 33 14. Detour J, Schroeder H, Desor D, et al. A 5-month period of epilepsy  
34 impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object  
35 recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia*  
36 2005;46:499–508.
- 37 15. Dos Santos JG Jr, Longo BM, Blanco MM, et al. Behavioral changes  
38 resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine  
39 model of epilepsy. *Brain Res* 2005;1066:37–48.
- 40 16. Frisch C, Kudin AP, Elger CE, et al. Amelioration of water maze  
41 performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced  
42 status epilepticus is negatively dose-dependent. *Epilepsy Res*  
43 2007;73:173–180.
- 44 17. Zhou JL, Zhao Q, Holmes GL. Effect of levetiracetam on visual-spatial  
45 memory following status epilepticus. *Epilepsy Res* 2007;73:65–74.
- 46 18. Inostroza M, Cid E, Brotons-Mas J, et al. Hippocampal-dependent  
47 spatial memory in the water maze is preserved in an experimental  
48 model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS ONE* 2011;6:  
49 e22372.
- 50 19. Faure JB, Akimana G, Carneiro JE, et al. A comprehensive behavioral  
51 evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: effects of  
52 carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia*  
53 2013;54:1203–1213.
- 54 20. Pineda E, Jentsch JD, Shin D, et al. (Behavioral impairments in rats  
55 with chronic epilepsy suggest comorbidity between epilepsy and  
attention deficit/hyperactivity disorder. *Epilepsy Behav* 2013;?????:  
????-?????. doi:10.1016/j.yebeh.2013.10.004
21. Fisher RS, Vickrey BG, Gibson P, et al. The impact of epilepsy from  
the patient's perspective I. Descriptions and subjective perceptions.  
*Epilepsy Res* 2000;41:39–51.
22. Kelley MS, Jacobs MP, Lowenstein DH. The NINDS epilepsy research  
benchmarks. *Epilepsia* 2009;50:579–582.
23. Liu Y, Yohrling GJ, Wang Y, et al. Carisbamate, a novel  
neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action  
potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 2009;83:66–  
72.
24. Francois J, Germe K, Ferrandon A, et al. Carisbamate has powerful  
disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal  
lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 2011;61:313–328.
25. Levav M, Mirsky AF, Herault J, et al. Familial association of  
neuropsychological traits in patients with generalized and partial  
seizure disorders. *J Clin Exp Neuropsychol* 2002;24:311–326.
26. Robbins TW. The 5-choice serial reaction time task: behavioural  
pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology*  
2002;163:362–380.
27. Bratt AM, Stacey K, Chase RM, et al. Modelling attentional deficits in  
schizophrenia: hippocampal subfield lesions and performance of a 5-  
choice reaction time task in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*  
1995;5:324–325. Abstract.
28. Barbelivien A, Ruotsalainen S, Sirvio J. Metabolic alterations in the  
prefrontal and cingulate cortices are related to behavioral deficits in a  
rodent model of attention-deficit hyperactivity disorder. *Cereb Cortex*  
2001;11:1056–1063.
29. Lehmann O, Grottick AJ, Cassel JC, et al. A double dissociation  
between serial reaction time and radial maze performance in rats  
subjected to 192 IgG-saporin lesions of the nucleus basalis and/or the  
septal region. *Eur J Neurosci* 2003;18:651–666.
30. Harati H, Barbelivien A, Cosquer B, et al. Selective cholinergic  
lesions in the rat nucleus basalis magnocellularis with limited damage  
in the medial septum specifically alter attention performance in the  
five-choice serial reaction time task. *Neuroscience* 2008;153:72–83.
31. Chudasama Y, Passetti F, Rhodes SE, et al. Dissociable aspects of  
performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions  
of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in  
the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and  
compulsivity. *Behav Brain Res* 2003;146:105–119.
32. Inglis WL, Olmstead MC, Robbins TW. Selective deficits in  
attentional performance on the 5-choice serial reaction time task  
following pedunculopontine tegmental nucleus lesions. *Behav Brain*  
*Res* 2001;123:117–131.
33. Abela AR, Dougherty SD, Fagen ED, et al. Inhibitory control deficits  
in rats with ventral hippocampal lesions. *Cereb Cortex* 2013;23:1396–  
1409.
34. Rzezak P, Fuentes D, Guimaraes CA, et al. Executive dysfunction in  
children and adolescents with temporal lobe epilepsy: is the Wisconsin  
Card Sorting Test enough? *Epilepsy Behav* 2009;15:376–381.
35. de Oliveira GN, Kummer A, Salgado JV, et al. Suicidality in temporal  
lobe epilepsy: measuring the weight of impulsivity and depression.  
*Epilepsy Behav* 2011;22:745–749.
36. Garcia Espinosa A, Andrade Machado R, Borges Gonzalez S, et al.  
Wisconsin Card Sorting Test performance and impulsivity in patients  
with temporal lobe epilepsy: suicidal risk and suicide attempts.  
*Epilepsy Behav* 2010;17:39–45.
37. Chudasama Y, Muir JL. Visual attention in the rat: a role for the prefrontal  
cortex and thalamic nuclei? *Behav Neurosci* 2001;115:417–428.
38. Abela AR, Chudasama Y. Dissociable contributions of the ventral  
hippocampus and orbitofrontal cortex to decision-making with a  
delayed or uncertain outcome. *Eur J Neurosci* 2013;37:640–647.
39. Caplan R, Siddarth P, Stahl L, et al. Childhood absence epilepsy:  
behavioral, cognitive, and linguistic comorbidities. *Epilepsia*  
2008;49:1838–1846.
40. Depaulis A, van Luijckelaar G. Genetic models of absence epilepsy. In  
*Models of seizures and epilepsy*. Pitkanen A, Schwartzkroin PA,  
Moshé SL, et al. (Eds) U.S.A.: Elsevier Inc., Academic Press,  
2006:233–247.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** (A) Schema of the response possibilities in a trial in the 5-CSRTT. (B) Schematic representation of the 5-CSRTT apparatus. (C) Photographs of the 5-CSRTT apparatus.

**Figure S2.** 5-Choice serial reaction time task (5-CSRTT) performance measured under conditions of stimulus intensity decrement (SD = 0.5 s; SI = 9 and 2).

**Data S1.** Methods—5-Choice Serial Reaction Time Task (5-CSRTT).

10

**J.-B. Faure et al.**

1 **Data S2. Results**—The visual discrimination assessment:  
2 decrease of stimulus intensity (SI) (from SI = 9 to SI = 2;  
3 stimulus duration [SD] = 0.5 s).

4 **Table S2.** Percentage of premature and perseverative  
5 responses, as well as magazine and correct response laten-

cies (s) measured under conditions of decreased stimulus  
intensity (from SI = 9 to SI = 2; arbitrary units) in the  
6 5-CSRTT. 7

**Supporting information 1: Methods 5-Choice Serial Reaction Time Task (5-CSRTT)***Training protocol*

A long training period is required for the 5-CSRTT. It consists of several steps that are described in detail elsewhere (Harati et al., 2008). During the first three training phases, no hole was open. For the first phase, rats were placed for 15 min in the chambers with the ceiling light off and the magazine door removed. Fifteen pellets were freely available in the food magazine. During the second phase, the rats were placed for 20 min in the chambers with the ceiling light on and 20 pellets were randomly delivered to the magazine (according to a variable time schedule, mean: 1 min). During the third phase, the only change was that the magazine was equipped with a door. During the fourth phase, rats were placed for 30 min in the chambers in which the central hole (hole #5) was open and illuminated. Each nose poke in that hole was rewarded by one pellet delivered in the magazine. At least 50 nose pokes were required before the rats could move on to the next phase. After these first phases, five holes (# 1, 3, 5, 7, and 9) were open. Rats had to respond to a randomly presented visual stimulus in one of the five holes. Sessions started with the ceiling light on and automatic delivery of one pellet. Rats had to push the panel door to collect the pellet to start the first trial. After an inter-trial interval (ITI, 5 s), one of the five holes was randomly lighted for a determined stimulus duration (SD) that was fixed for a whole session. A nose poke in the lighted hole during SD or during the following limited hold period (LH, 5 s) was recorded as a correct response and rewarded by a pellet in the magazine. Each additional nose poke in any hole after a correct response was recorded simply as a perseverative response. A nose poke during the response period (SD + LH) in any other hole than the target hole was recorded as an incorrect response and punished by 5 s of darkness, called time-out. Any additional nose poke during this period restarted the 5 s time-out. No response during the response period (omission) or a nose poke

during the ITI (premature response) was also punished by a 5 s time-out. After a correct response or 5 s time-out, the next trial started when the rat pushed the door to the magazine giving access to a pellet or an empty magazine. A session ended when a rat made 100 trials or 30 min had elapsed. Initially, SD was equal to 45 s and was progressively reduced to 30, 15, 10, 5, 4, 3, 2, 1 and 0.5 s. The criterion to proceed to the following phase was at least 35 completed trials (correct + incorrect responses), 60% correct responses (number of correct responses / number of completed trials  $\times$  100) and less than 40% omissions (omissions / all trials except those with a premature response  $\times$  100). Rats that did not reach the previous criterion during training were excluded from the task. All rats that completed all training phases were tested. The percentage of premature responses (premature responses / trials started  $\times$  100), percentage of perseverative response (perseverative responses / correct responses  $\times$  100), correct response latency (correct latency), and latency to collect a pellet after a correct response (magazine latency) were also analyzed.

#### ***Behavioral challenges***

After three sessions with stable performance (consecutive sessions with no significant difference between sessions) at SD=0.5 s, rats were given different challenges to assess visual attention. First, stimulus intensity (SI) was reduced from SI=9 (100% of maximal intensity) to SI=2 (22% of maximal intensity). The rats were then tested in standard SI conditions (SI=9) but SD was increased to 5 s. Data were taken from three consecutive sessions with stable performances in each condition.

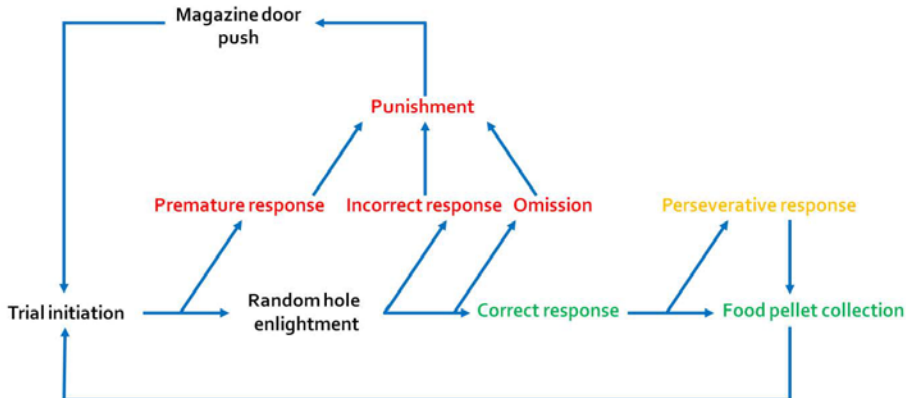


Figure S1A: Schema of the response possibilities in a trial in the 5-CSRTT.

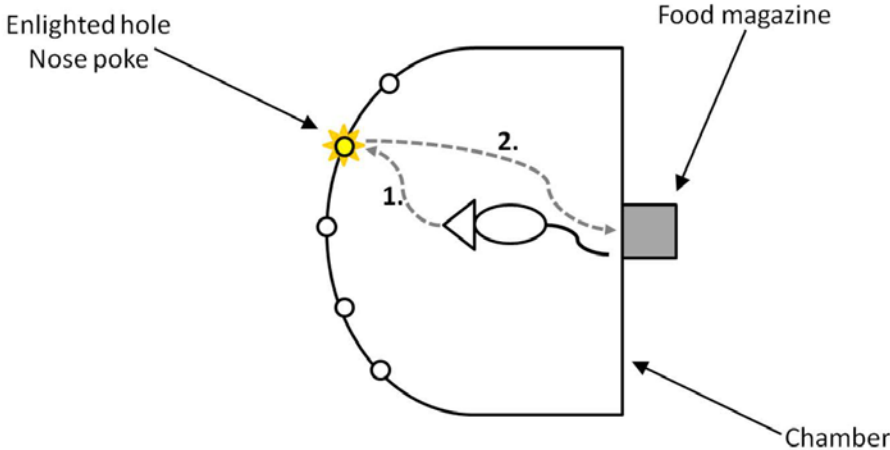


Figure S1B: Schematic representation of the 5-CSRTT apparatus.

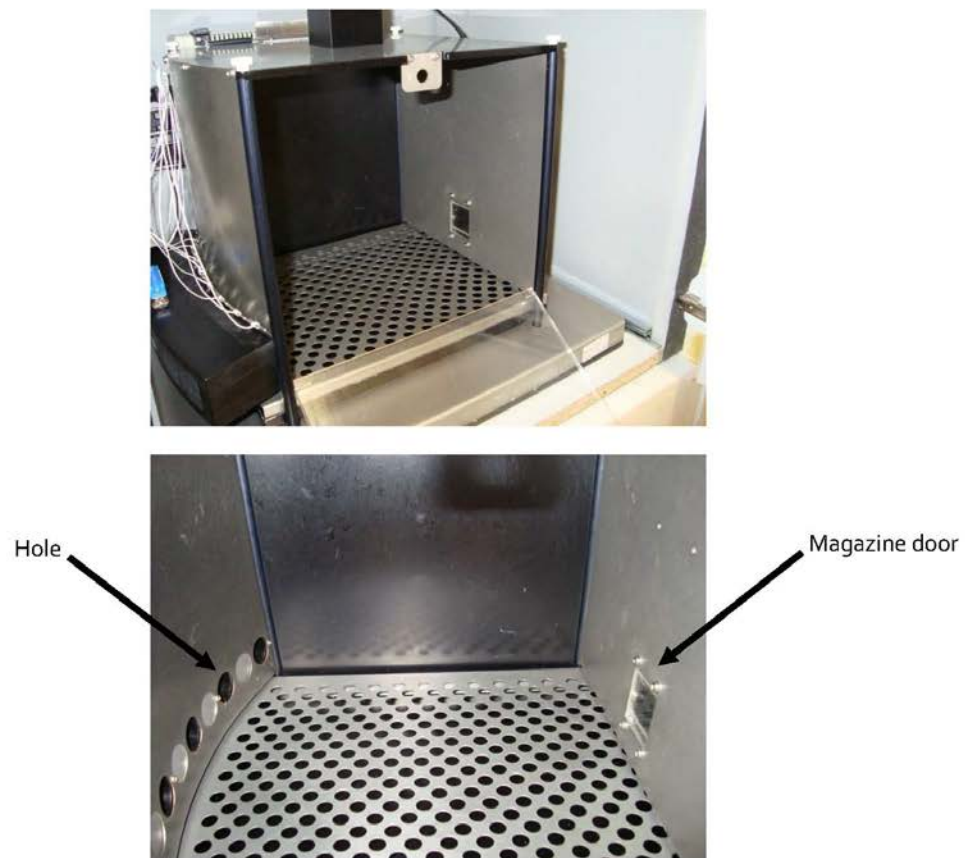


Figure S1C: Photographs of the 5-CSRTT apparatus.

Reference:

Harati H, Barbelivien A, Cosquer B, et al. Selective cholinergic lesions in the rat nucleus basalis magnocellularis with limited damage in the medial septum specifically alter attention performance in the five-choice serial reaction time task. *Neuroscience*. 2008;153:72-83.

**Supporting information 2: Results - The visual discrimination assessment: decrease of stimulus intensity (SI) (from SI = 9 to SI = 2; stimulus duration (SD) = 0.5 s)**

When the SI was decreased, the ANOVA of the correct responses (Fig. S2A) revealed significant Group ( $F_{3,29} = 12.70$ ,  $p < 0.001$ ) and Interaction ( $F_{3,29} = 3.22$ ,  $p < 0.05$ ) effects. At SI = 2, the percentage of correct responses was lower in CRS-TLE rats than in CRS-NMS rats ( $p < 0.05$ ). However, the reduction of light intensity affected CRS-TLE rats that slightly improved this percentage ( $p < 0.05$ ) and also CRS-NMS rats that slightly decreased their percentage of correct responses ( $p < 0.05$ ) at SI = 2 compared to SI = 9. The ANOVA of the percentage of omissions (Fig. S2B) only showed a significant Group effect ( $F_{3,29} = 3.40$ ,  $p < 0.05$ ) due to a higher percentage achieved by DZP-TLE and CRS-TLE rats ( $p < 0.05$ ) as compared to CRS-NMS rats. Concerning the other measures, the ANOVA of the percentage of premature and perseverative responses (Fig. S2C and D), and the latency to perform a correct response (Table S2) only showed significant Group effects ( $F_{3,29} = 3.62$ ,  $p < 0.05$ ;  $F_{3,29} = 4.57$ ,  $p < 0.01$ ;  $F_{3,29} = 4.44$ ,  $p < 0.05$ , respectively). For the percentage of premature responses, this effect was only due to a higher percentage in CRS-TLE rats compared to all other groups ( $p < 0.05$ ). Concerning perseverative responses, the percentage in DZP-TLE rats was higher than in control and CRS-NMS rats ( $p < 0.05$ ). The ANOVA effect of the latency to perform a correct response was due to longer latency in CRS-TLE rats than in CRS-NMS rats ( $p < 0.01$ ).



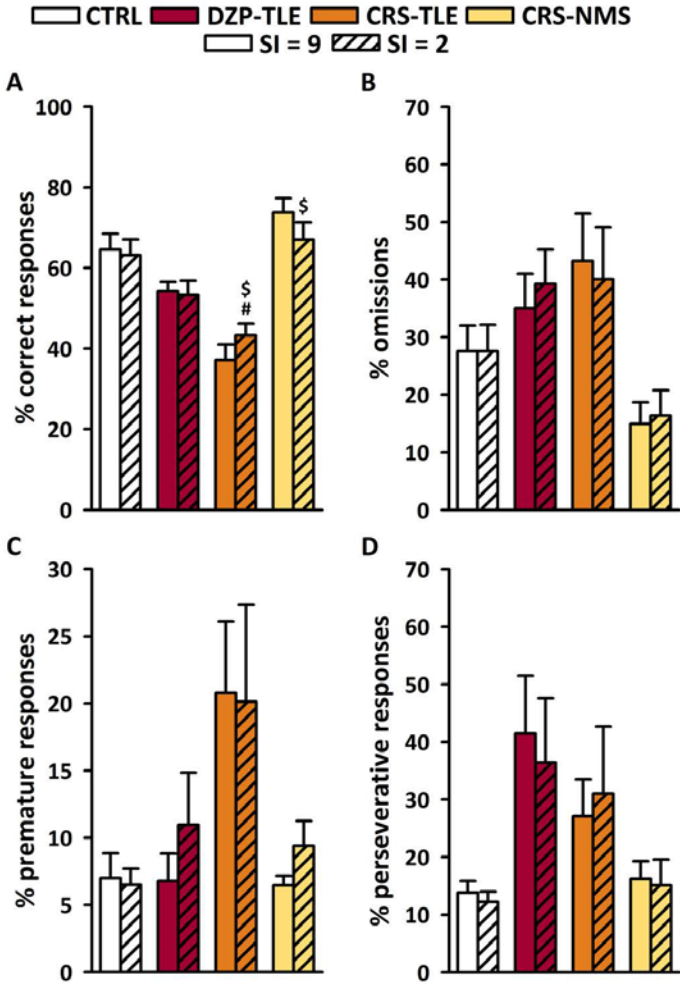


Figure S2: Five-choice serial reaction time task (5-CSRTT) performance measured under conditions of stimulus intensity decrement (SD = 0.5 s; SI = 9 and 2).

\* p < 0.05: different from controls; # p < 0.05: different from CRS-NMS; § p < 0.05: different from SI = 9.



Table S2: Percentage of premature and perseverative responses, as well as magazine and correct response latencies (s) measured under conditions of decreased stimulus intensity (from SI = 9 to SI = 2; arbitrary units) in the 5-CSRTT.

Group	Stimulus intensity	% premature responses	% perseverative responses	Magazine latency (s)	Correct response latency (s)
CTRL	9	7.0 ± 1.8	13.8 ± 2.0	1.3 ± 0.2	1.0 ± 0.07
	2	6.5 ± 1.2	12.2 ± 1.8	1.7 ± 0.4	1.0 ± 0.06
DZP-TLE	9	6.8 ± 2.0	41.5 ± 10.0	2.5 ± 0.4	1.0 ± 0.1
	2	11.0 ± 3.9	36.4 ± 11.2	2.5 ± 0.5	<b>1.3 ± 0.1<sup>§</sup></b>
CRS-TLE	9	20.8 ± 5.3	27.1 ± 6.4	2.1 ± 0.6	1.3 ± 0.2
	2	20.1 ± 7.2	31.1 ± 11.6	6.3 ± 4.1	1.3 ± 0.1
CRS-NMS	9	6.5 ± 0.7	16.3 ± 3.0	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.06
	2	9.4 ± 1.8	15.1 ± 4.5	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.08

The only significant difference is shown in bold: <sup>§</sup> p < 0.05; different from SI = 9.



### 3. Publication 3 : Evaluation des effets du carisbamate sur le métabolisme énergétique neuronal et astrocytaire dans le modèle lithium-pilocarpine d'épilepsie du lobe temporal chez le Rat

Cette étude avait pour objectif de connaître les caractéristiques métaboliques pendant la phase chronique des deux sous-populations de rats (avec crises motrices ou sans crise motrice) qui apparaissent après un traitement précoce par le carisbamate dans le modèle lithium-pilocarpine d'ELT. Le but était de vérifier si les améliorations dues à l'effet du traitement au niveau des crises, de la neuroprotection et du comportement dans une sous-population peuvent également se traduire au niveau du métabolisme dans le modèle lithium-pilocarpine.

Selon le même protocole que le travail précédent et l'étude de François et al (2011), une partie des rats été traitée avec le lithium-pilocarpine seulement et une autre partie était traitée, en plus, avec le carisbamate (90 mg/kg) à partir d'une heure après le début de l'EdM (puis neuf heures après), et ensuite deux fois par jour pendant 6 jours supplémentaires. Deux mois après l'EdM, les animaux qui n'avaient pas présenté de crise motrice étaient considérés comme souffrant d'une épilepsie de type absence, tandis que ceux qui présentaient des crises motrices étaient considérés comme souffrant d'une ELT. Suite à l'injection simultanée de [ $^{13}\text{C}$ ]glucose et [ $^{13}\text{C}$ ]acétate, le cerveau des rats était soumis à une fixation par micro-ondes puis certaines structures d'intérêt étaient prélevées (l'hippocampe, un ensemble de structures limbiques -amygdale, cortex piriforme et entorhinal-, le thalamus, et le cortex somatomoteur). Les échantillons ont été envoyés à Trondheim (Norvège) au groupe du Pr. Ursula Sonnewald afin que des analyses HPLC, et de spectroscopie à résonance magnétique nucléaire du  $^1\text{H}$ - et  $^{13}\text{C}$  soient réalisées.

Une perturbation métabolique neuronale a été observée chez les rats non-traités dans les structures limbiques (amygdale, et cortex piriforme et entorhinal) mais pas dans l'hippocampe à proprement parler. Ce déficit était réduit dans les deux sous-populations qui ont reçu du carisbamate. Par ailleurs, la principale différence qui a été observée entre les deux sous-populations de rats traités concerne le niveau de la glutamine (métabolisée dans les astrocytes) dans les structures limbiques. Tandis que les rats qui présentaient des crises motrices avaient un taux de glutamine réduit, ceux qui ne présentaient pas de crises motrices avaient un taux élevé. Enfin, les rats traités qui ne présentaient pas de crises motrices étaient les seuls à avoir un taux réduit de GABA dans le thalamus.

Cette étude a augmenté la précision des connaissances sur le métabolisme du modèle lithium-pilocarpine : les perturbations neuronales décrites dans la littérature sont en fait plutôt liées aux structures limbiques autres que l'hippocampe. Le métabolisme astrocytaire est perturbé uniquement chez les rats traités précocement avec le carisbamate dans l'hippocampe et la seule perturbation métabolique observée dans le thalamus concerne les rats qui ne présentent pas de crise motrice suite au traitement. Globalement, ce travail fournit quelques pistes qu'il sera nécessaire d'explorer pour mieux comprendre l'effet du carisbamate dans les deux sous-populations.



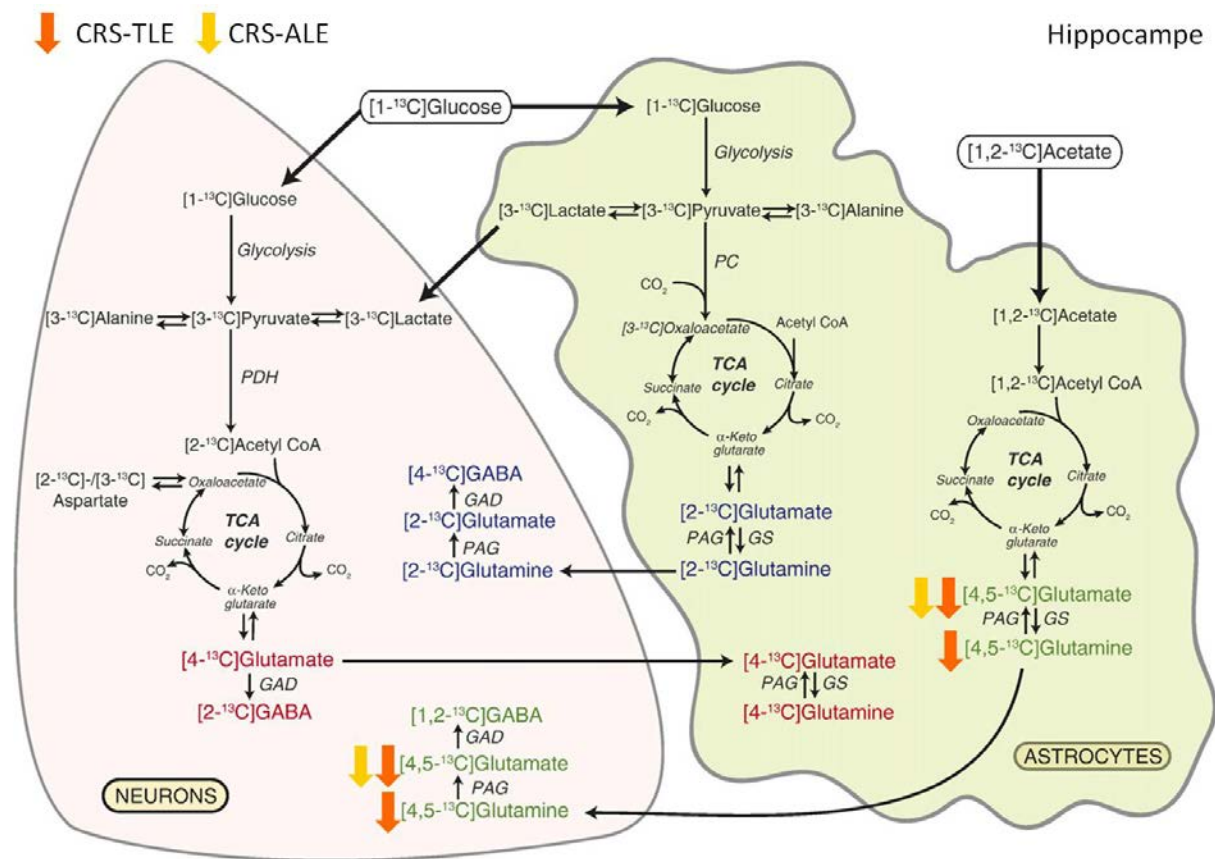


Figure 27 : Représentation schématique des perturbations métaboliques dans l'hippocampe pour les différents groupes (adapté de Melo et al., 2007)

Dans l'hippocampe (Figure 27), tandis que les deux groupes traités présentent une diminution du glutamate provenant du métabolisme de l'acétate dans les astrocytes, seul le groupe traité qui présente des crises motrices présente également une diminution de la glutamine provenant de la même origine.

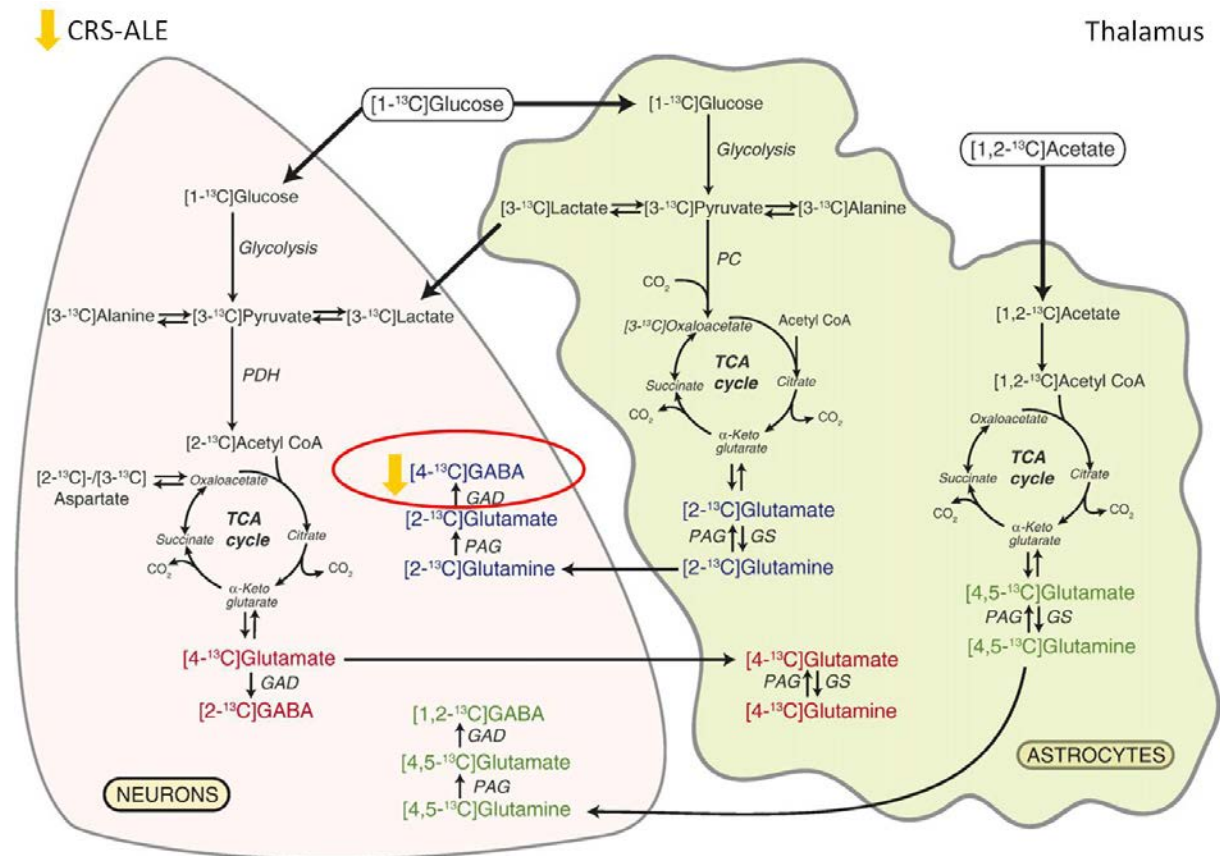


Figure 28 : Représentation schématique des perturbations métaboliques dans le thalamus pour les différents groupes (adapté de Melo et al., 2007)

Dans le thalamus (Figure 28), on observe uniquement une diminution du GABA provenant du métabolisme du glucose dans les astrocytes chez les rats qui ne présentent pas de crises motrices après traitement.

**Consequences of early carisbamate treatment on brain  
metabolism in the lithium-pilocarpine model: a  $^{13}\text{C}$  NMR  
study in rats**

Hadera Mussie G<sup>1</sup>, Faure Jean-Baptiste<sup>2,3</sup>, Berggaard Nina<sup>1</sup>, Tefera Tesfaye W<sup>1</sup>, Ferrandon Arielle<sup>2</sup>, Koning Estelle<sup>2</sup>, Nehlig Astrid<sup>2</sup>, Sonnewald Ursula<sup>1</sup>

**Authors affiliations:**

<sup>1</sup> Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and Technology, PO box 8905, MTFS, 7491 Trondheim, Norway.

<sup>2</sup> INSERM U 666; Faculty of Medicine; 11, rue Humann, 67085 Strasbourg Cedex, France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA); UMR 7364 University of Strasbourg – CNRS; Faculty of Psychology, 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France.

**Corresponding author:** Sonnewald Ursula, Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and Technology, PO box 8905, MTFS, 7491 Trondheim, Norway. E-mail: Ursula.sonnewald@ntnu.no

**Running title:** Metabolism after carisbamate treatment

**Key words:** temporal lobe epilepsy, carisbamate, metabolism, lithium-pilocarpine,  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy



**ABSTRACT**

Temporal lobe epilepsy is one of the most disabling and refractory neurological diseases. In the search for insult/disease modifying therapies, early carisbamate treatment alleviates neuronal loss in most structures and prevents the occurrence of motor spontaneous seizures in a subpopulation of lithium-pilocarpine rats. Here we explored metabolic patterns to clarify why some rats did not develop motor seizures after carisbamate treatment.

Status epilepticus (SE) was induced in adult rats treated with carisbamate from one and eight hours after SE onset, and twice a day during the six following days. Two months after SE , rats were injected with [1-<sup>13</sup>C]glucose and [1,2-<sup>13</sup>C]acetate (to monitor neuronal and astrocytic metabolism, respectively). The brains were fixed, dissected, and sampled for HPLC, <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-magnetic resonance spectroscopy analyses.

Confirming previous results in lithium-pilocarpine rats, neuronal metabolism was impaired in untreated rats. This impairment was less marked in all two carisbamate-treated rats. While no deficit was revealed for the untreated group, rats that received carisbamate had astrocytic metabolism perturbations. Among carisbamate-treated rats, those displaying motor seizures showed lower glutamine of astrocytic origin compared to controls, whereas rats with no motor seizures showed an increase in this metabolite.

These experiments revealed a clear difference between lithium-pilocarpine untreated and carisbamate-treated rats at the level of astrocytic metabolism. Major changes were recorded in limbic structures of all rat groups. In hippocampus and thalamus, changes were limited to carisbamate-treated rats with glutamate/glutamine of astrocytic origin affected in hippocampus and only GABA affected in thalamus.

## INTRODUCTION

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a disabling disease with a high percentage of pharmacoresistance (Semah et al., 1998). Limbic seizures and lesions (Margerison and Corsellis, 1966), mossy fiber sprouting (Sutula et al., 1989), and behavioral and cognitive impairments (for review, see Bell et al., 2011) are usual features observed in patients with TLE. Metabolic abnormalities also affect the patients mainly reflected by interictal hypometabolism (Ryvlin et al., 1991; O'Brien et al., 1997; Foldvary et al., 1999), and glutamate-glutamine cycle dysfunction (Aasly et al., 1999; Petroff et al., 2002).

The lithium-pilocarpine model reliably reproduces the main features of TLE (Curia et al., 2008) from lesion to seizures (Honchar et al., 1983; Clifford et al., 1987), behavior (Faure et al., 2013), and metabolism (Melo et al., 2005). In this model, early treatment with carisbamate (CRS), a potent voltage-gated Na<sup>+</sup> channel inhibitor (Liu et al., 2009), administered from one hour after status epilepticus (SE) onset leads to a high level of neuroprotection and the prevention of spontaneous recurrent motor seizures (SRS) in around half of the rats (François et al., 2011). This prevention is also accompanied by total preservation of behavioral and cognitive functions (Faure et al., 2013).

Given the powerful action of CRS, we wanted to know if the prevention of motor SRS was also accompanied by specific changes of neuronal and astrocytic metabolic pathways. To that aim, we injected lithium-pilocarpine rats, treated or not with carisbamate, with [1-<sup>13</sup>C]glucose — mainly metabolized in neurons — and [1,2-<sup>13</sup>C]acetate — exclusively taken up by astrocytes (Waniewski and Martin, 1998) — to assess distinctly neuronal and astrocytic metabolism, as well as neuron-astrocyte exchanges, using <sup>13</sup>C-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (for review, see Sonnewald and Kondziella, 2003).

## METHODS

### Animals

Thirty-two adult male Sprague-Dawley rats were provided by Charles River (L'Abresle, France) and were housed in individual cages (42 X 26 X 18 cm) under controlled conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 12/12 h light/dark cycle, lights on at 7.00 a.m.) with water and food *ad libitum*. Experiments were performed in accordance with the rules of the European Community Council directive of 22 September 2010 (2010-63) and the French Department of Agriculture (2013-118; License # 67-97 for AN and 67-215 for JCC). The protocol was approved by the ethical Animal Research Committee Board of the University of Strasbourg (CREMEAS # AL/100/103/02/13). The experiments were performed following the principles outlined in the ARRIVE guidelines and the Basel declaration (<http://www.basel-declaration.org>). The 3R concept has been considered when planning the experiments.

### Status epilepticus and treatment

From the 32 rats, 25 underwent lithium-pilocarpine SE. Lithium (127 mg/kg; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, U.S.A.) was administered i.p. about 20 h before methylscopolamine s.c. (1 mg/kg; Sigma-Aldrich) to alleviate peripheral effects. Pilocarpine hydrochloride (25 mg/kg) was administered s.c. 30 min later. Methylscopolamine (1 mg/kg) was administered again 30 min after SE onset. Among the 25 rats that underwent SE, 19 rats were treated starting 1 h and 9 h (i.p.) after SE, and then twice daily (s.c) for six additional days with carisbamate (90 mg/kg, Johnson & Johnson Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, USA) dissolved in 45% hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (Acros Organics, Geel, Belgium). Six rats only received diazepam i.m. (Roche, Meylan, France) 1 h and 8 h (2.5 and 1.25 mg/kg, respectively) after

SE onset to decrease mortality without altering SE. Seven controls received lithium chloride and saline injections instead of pilocarpine. One rat in the carisbamate-treated group and two rats in the diazepam-treated group died.

To detect the occurrence of motor convulsive spontaneous seizures, rats underwent 10 h daily video-recording (7.00 a.m. - 5.00 p.m.) starting one week after SE and lasting for eight weeks, as previously described (François et al., 2011). Rats were removed from video-recording when they displayed at least one stage III motor SRS according to the Racine scale (Racine, 1972). Rats that did not experience motor SRS at the end of the eight weeks recording sessions were considered having absence-like seizures (François et al., 2011).

At the end of the video-recording session, four groups of rats were constituted among a total of 29 rats: 1) controls (n = 7), 2) diazepam-treated rats with TLE (DZP-TLE, n = 4), 3) carisbamate-treated rats with TLE (CRS-TLE, n = 11), and 4) carisbamate-treated rats with absence-like epilepsy (CRS-ALE, n = 7).

### **Injection of labeled glucose and acetate, and brain dissection**

Two months after SE, the animals were injected i.p. with [1-<sup>13</sup>C]glucose (543 mg/kg, 0.3 mol/L solution) and [1,2-<sup>13</sup>C]acetate (504 mg/kg, 0.6 mol/L solution), 15 min later the rats were subjected to microwave fixation, 7 kW, 2 s (Püschner GmbH, Schanewede, Germany). Blood was collected freely flowing from the femoral artery. The brains were removed and the following areas were dissected: the whole hippocampus, limbic structures (amygdala, piriform and entorhinal cortex), and thalamus. The samples were weighed and stored at -40°C until extraction. Four animals (one in the control, two in the CRS-TLE and one in the CRS-ALE group) were discarded because of problems with injection and/or microwave fixation.

The samples were sent to the group of Pr. Ursula Sonnewald in Trondheim, Norway to perform all the following procedures.

### **Tissue extraction**

Methanol and  $\alpha$ -ABA (L-2-aminobutyric acid) were added and tissue was homogenized using a Vibra Cell sonicator (Model VCX 750, Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) followed by addition of water and chloroform. The samples were centrifuged at 3000 g at 4°C for 15 min and the supernatants were transferred to a new tube (tube 2) and stored in ice. Methanol, chloroform and water were again added to the remaining tissue and the tubes were centrifuged. The supernatants were again transferred to tube 2. Methanol, water and chloroform were re-added to tube 1 and tissue was extracted. Supernatants were collected. Water was also added to the tube 2 and the samples were centrifuged in order to separate the lipids from the supernatant containing the intracellular extracts. Additional water and methanol were added and supernatants were collected. Finally, the supernatants were lyophilized to remove water and methanol and re-suspended in D<sub>2</sub>O before being lyophilized once more in order to minimize the proton content of water. The tissue samples from all control, diazepam- and carisbamate-treated groups were analyzed using HPLC, <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy, and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy.

### **HPLC**

Amino acids were studied using HPLC (1100 series; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) followed by fluorescence detection. A liquid mobile phase (methanol and 10mM phosphate buffer, pH 7.1) passes through a column containing a stationary phase (silica gel). O-phthaldialdehyde was used as a derivatization agent for the amino acids. Amino acid

components were separated on a reverse phase column, Zorbax SBC18 column ( $4.6 \times 150$  mm<sup>2</sup>, 3.5-micron; Agilent Technologies) that is a non polar stationary phase in combination with a polar mobile phase. Gradient elution method, in which the mobile phase composition is changed, was used to elute mixture components from the stationary phase. To achieve optimal separation and faster elution of the nonpolar analytes, a gradient of two eluents were used: one was phosphate buffer (10 mM, pH 7.1) and the other one was methanol. Standards with different concentrations of  $\alpha$ -ABA (25  $\mu$ M) were run with the samples. Relevant peaks from the HPLC spectra were identified and integrated.  $\alpha$ -ABA was used as an internal standard for quantification. Amounts were corrected for the weight of the tissue.

### **<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy**

The amounts of isotopomers from metabolism of [ $1$ -<sup>13</sup>C]glucose and [ $1,2$ -<sup>13</sup>C]acetate and total amounts of selected metabolites were quantified using <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. Lyophilized brain tissue extracts were dissolved in 120  $\mu$ l D<sub>2</sub>O containing 99.0% trimethylsilyl propanoic acid (TSP) and 0.1% ethylene glycol as internal standards. The samples were transferred to SampleJet tubes ( $3.0 \times 103.5$  mm<sup>2</sup>) for insertion into the SampleJet autosampler (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany). All samples were analyzed using a QCI CryoProbe 600 MHz ultrashielded Plus magnet (Bruker BioSpin GmbH). <sup>1</sup>H-NMR spectra (Fig. 1) were obtained using: pulse angle of 90°, acquisition time of 2.66 s and a relaxation delay of 10 s. The number of scans was 128. Proton decoupled <sup>13</sup>C-NMR spectra (Fig. 2) were acquired with the following parameters: pulse angle of 300°, acquisition time of 1.65 s and a relaxation delay of 0.5 s. The number of scans was typically 10000.

### **Labeling patterns**

By simultaneous injection of [1-<sup>13</sup>C]glucose and [1,2-<sup>13</sup>C]acetate and performing NMR spectroscopy analysis of brain extracts, it is possible to study and obtain information about astrocytic and neuronal interactions in the same animal. Injection of [1-<sup>13</sup>C]glucose and [1,2-<sup>13</sup>C]acetate results in the efficient labeling of many metabolites. Label from [1-<sup>13</sup>C]glucose is quantified by analyzing the singlet peaks in different compounds while label from [1,2-<sup>13</sup>C]acetate is quantified by analyzing doublets in the NMR spectrum which reflect predominantly astrocytic metabolism. Glutamine is more labeled from [1,2-<sup>13</sup>C]acetate (doublet) than [1-<sup>13</sup>C]glucose (singlet); for glutamate and GABA, the opposite is true. N-acetylaspartate (NAA) in the C-6 position, alanine, lactate and succinate are mainly labeled from glucose. Taurine, creatine, and myoinositol are not labelled and result in singlets (Sonnewald & Kondziella, 2003).

### **Labeling pattern of [1-<sup>13</sup>C]glucose**

[1-<sup>13</sup>C]Glucose is converted via glycolysis into one molecule of [3-<sup>13</sup>C]pyruvate and one molecule of unlabelled pyruvate. [3-<sup>13</sup>C]Pyruvate is then either converted to [3-<sup>13</sup>C]lactate or [3-<sup>13</sup>C]alanine in the cytosol or converted into [2-<sup>13</sup>C]acetyl CoA by pyruvate dehydrogenase (PDH) in the mitochondria of both neurons and astrocytes. [2-<sup>13</sup>C]Acetyl CoA condenses with oxaloacetate and enters the TCA cycle. After several enzymatic reactions, [4-<sup>13</sup>C]α-ketoglutarate is formed and can be converted into [4-<sup>13</sup>C]glutamate, [4-<sup>13</sup>C]glutamine, and [2-<sup>13</sup>C]GABA. If [4-<sup>13</sup>C]α-ketoglutarate continues in the cycle, the <sup>13</sup>C label will be divided into equal parts of [2-<sup>13</sup>C] or [3-<sup>13</sup>C]succinate and then to [2-<sup>13</sup>C] or [3-<sup>13</sup>C]oxaloacetate which finally can give rise to [2-<sup>13</sup>C] or [3-<sup>13</sup>C]aspartate or [2-<sup>13</sup>C] or [3-<sup>13</sup>C]glutamate/glutamine and [3-<sup>13</sup>C] or [4-<sup>13</sup>C]GABA by condensing with unlabelled acetyl

CoA in the 2<sup>nd</sup> turn of the TCA cycle. In astrocytes, [3-<sup>13</sup>C]pyruvate can also be carboxylated by pyruvate carboxylase (PC) to [3-<sup>13</sup>C]oxaloacetate which can result in the formation of [2-<sup>13</sup>C]glutamate, [2-<sup>13</sup>C]glutamine and [4-<sup>13</sup>C]GABA (Sonnewald & Kondziella, 2003; Zwingmann & Leibfritz, 2003; Melo et al., 2007; Morken et al., 2013).

### **Labeling pattern of [1,2-<sup>13</sup>C]acetate**

[1,2-<sup>13</sup>C]Acetate is taken up by astrocytes and converted in to [1,2-<sup>13</sup>C]acetyl CoA which then enters in to the TCA cycle and gives rise to [4,5-<sup>13</sup>C]glutamate, [4,5-<sup>13</sup>C]glutamine and [1,2-<sup>13</sup>C]GABA. In the 2<sup>nd</sup> turn of the TCA cycle, labeling will lead to glutamate and glutamine equally labeled in either the [1,2-<sup>13</sup>C] or [3-<sup>13</sup>C] positions of glutamate/glutamine and [3-<sup>13</sup>C] or [4-<sup>13</sup>C] positions of GABA (Zwingmann & Leibfritz, 2003; Melo et al., 2007; Morken et al., 2013).

### **Data and statistical analysis**

TopSpin 3.0 software (Bruker BioSpin GmbH) was used to identify and integrate relevant peaks in the <sup>13</sup>C- and <sup>1</sup>H-NMR spectra. Quantification of metabolites was done from the integrals of the peak areas using TSP and ethylene glycol as internal standards for the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra, respectively. The total amounts (<sup>13</sup>C + <sup>12</sup>C) of glutamate, glutamine, GABA, aspartate, glutathione and taurine in the extracts were quantified using HPLC. Amounts from the <sup>1</sup>H spectra were corrected for the number of protons constituting the peak and for <sup>13</sup>C containing metabolites. <sup>13</sup>C-Labeled metabolites were corrected for nuclear Overhauser and relaxation effects. In addition, singlets in the <sup>13</sup>C spectra were corrected for 1.1% natural abundance of <sup>13</sup>C. When the metabolite was double-labeled, <sup>13</sup>C natural abundance was calculated as 1.1% × 1.1% of total metabolite amount. All amounts were corrected for tissue



weight and also were corrected for possible tissue loss during the extraction procedure using a factor derived from the known amount of  $\alpha$ -ABA added to the tissue and the actual amount of the final sample quantified by HPLC. All results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical differences between the groups were analyzed using ANOVA followed by LSD multiple comparison test. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Glycolytic activity

Concerning glucose (Fig. 3), the total amount was significantly increased ( $p < 0.05$ ) in the thalamus of DZP-TLE rats and decreased in the thalamus of CRS-ALE rats ( $p < 0.05$ ). No difference was obtained in hippocampus and limbic structures, despite a slightly higher concentration in DZP-TLE rats in the latter ones.

Lactate is derived from pyruvate by the action of lactate dehydrogenase. This enzyme tended to have a higher activity in DZP-TLE rats in hippocampus and limbic structures, although the difference between groups was not significant (Fig. 4).

Alanine is also derived from pyruvate by the action of alanine transaminase. The amount of total alanine (Fig. 5) was higher in DZP-TLE rats compared to CRS-treated rats in limbic structures, thalamus, and hippocampus although the difference was only significant in the latter structure ( $p < 0.05$ ). The quantity of [ $3\text{-}^{13}\text{C}$ ]alanine in the hippocampus was significantly lower in CRS-TLE and CRS-ALE rats than in control and DZP-TLE rats ( $p < 0.05$ ).

### Total metabolite amounts

#### $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy analysis

In hippocampus and limbic structures, the amounts of N-acetylaspartate (NAA, Fig. 6) were significantly reduced in DZP-TLE and CRS-TLE rats compared to controls and CRS-ALE rats ( $p < 0.05$ ). In thalamus, only DZP-TLE rats had a lower level of NAA compared to all groups ( $p < 0.05$ ). For the other metabolites (Tables 1-3), no significant difference was

revealed, except for significantly higher amounts of ATP+ADP in CRS-treated rats compared to controls in hippocampus ( $p < 0.05$ ), and an increase of A(M+D+T)P in CRS-TLE rats compared to controls and DZP-TLE rats in limbic structures while there was no difference in thalamus.

### HPLC analysis

The amounts of glutamate (Fig. 7) were significantly decreased in the three structures of DZP-TLE rats compared to controls and to CRS-ALE rats. In limbic structures and thalamus, glutamate levels were also significantly lower than in CRS-TLE rats. In hippocampus, glutamate concentration was significantly lower in CRS-ALE rats than in controls and in limbic structures, glutamate was decreased in CRS-TLE rats compared to control levels.

In hippocampus and limbic structures, glutamine concentration (Fig. 7) was significantly decreased in DZP- and CRS-TLE rats compared to CRS-ALE rats and increased in CRS-ALE rats compared to controls. No difference was recorded in thalamus.

The only significant differences observed for GABA (Fig. 7) were in thalamus where GABA showed decreased amounts in DZP-TLE and CRS-ALE rats compared to controls. The level of GABA was significantly higher in CRS-TLE rats compared to DZP-TLE and to CRS-ALE rats.

Levels of aspartate (Fig. 8) were significantly lower in DZP-TLE and CRS-TLE rats in all structures compared to controls ( $p < 0.05$ ), and to CRS-ALE rats.

Finally, glutathione (Fig. 8) was significantly lower in DZP-TLE compared to control and CRS-ALE rats in the three structures but the difference did not reach significance in thalamus. CRS-TLE rats tended to reach higher levels of glutathione compared to controls but the difference reached significance only in hippocampus.

**Isotopomers amounts derived from [1-<sup>13</sup>C]glucose**

Among the isotopomers derived from [1-<sup>13</sup>C]glucose and metabolized in neurons by PDH, [4-<sup>13</sup>C]glutamate (formed in neurons) and [4-<sup>13</sup>C]glutamine (synthesized in astrocytes from [4-<sup>13</sup>C]glutamate) showed the same pattern in limbic structures, hippocampus, and thalamus (Fig. 9). In limbic structures, a 45% significant reduction of the amounts of the two isotopomers were recorded in DZP-TLE rats compared to controls but this difference was only significant for [4-<sup>13</sup>C]glutamate ( $p < 0.05$ ). In CRS-TLE and CRS-ALE rats compared to DZP-TLE rats ( $p < 0.05$ ), the level of labeled glutamate was much better preserved but remained below the level of controls. The trends of changes were similar in hippocampus and thalamus but did not reach significance.

Concerning [2-<sup>13</sup>C]GABA (synthesized in neurons from [4-<sup>13</sup>C]glutamate), no significant difference was recorded in any structure.

Other isotopomers derived from [1-<sup>13</sup>C]glucose are primarily metabolized in astrocytes by PC and afterwards in neurons. This includes [2-<sup>13</sup>C]glutamate, [2-<sup>13</sup>C]glutamine, and [4-<sup>13</sup>C]GABA (Fig. 10). In limbic structures, the amounts of [2-<sup>13</sup>C]glutamate were significantly decreased in DZP-TLE rats (more than 50%,  $p < 0.05$ ), but also in CRS-TLE and CRS-ALE rats ( $p < 0.05$ ) compared to controls. A slight significant increase was only observed in CRS-TLE rats compared to DZP-TLE rats ( $p < 0.05$ ). No significant difference was reported for other structures.

[2-<sup>13</sup>C]Glutamine was also reduced in limbic structures of DZP-TLE rats but this difference did not reach significance, and no other difference was observed for this isotopomer. Concerning [4-<sup>13</sup>C]GABA, DZP-TLE and CRS-ALE rats displayed a significant decrease of amounts (around 50%) in limbic structures which was not the case in CRS-TLE rats that

reached levels of GABA similar to those of controls. The decrease in amounts in CRS-ALE rats was also recorded in thalamic structures ( $p < 0.05$ ).

### **Isotopomers amounts derived from [1,2-<sup>13</sup>C]acetate**

The isotopomers derived from [1,2-<sup>13</sup>C]acetate and mostly metabolized in astrocytes are [4,5-<sup>13</sup>C]glutamate, [4,5-<sup>13</sup>C]glutamine, and [1,2-<sup>13</sup>C]GABA (Fig. 11). Amounts of [4,5-<sup>13</sup>C]glutamate were only affected in hippocampus. In the latter structure, they were significantly reduced compared to controls in the two CRS-treated rats and the same tendency, though not significantly was observed in DZP-TLE rats. However, the differences observed in CRS-treated rats could be due to a lower [4,5-<sup>13</sup>C]glutamate enrichment percentage (Fig. 12)

[4,5-<sup>13</sup>C]glutamine was significantly decreased in CRS-TLE rats compared to controls and CRS-ALE rats in hippocampus and limbic structures. The same tendency was observed in thalamus where it did not reach significance. CRS-ALE rats showed a higher amount of this isotopomer in limbic structures compared to controls.

In the structures investigated, the amount of [1,2-<sup>13</sup>C]GABA was lower in all groups with epilepsy compared to controls, but these differences were not significant.

## DISCUSSION

The present study aimed at assessing the metabolic changes during the chronic phase of epilepsy (two months after SE) in rats treated with carisbamate early during SE and over the following week. These results, although correlative, bring significant data on the distinction between the two epilepsy forms (TLE and ALE) that appear after carisbamate treatment.

First neuronal metabolism, which has already been reported to be affected in the chronic phase of the lithium-pilocarpine model in rats (Melo et al., 2005) is also disturbed in all groups in our study. Yet this perturbation is mainly found in limbic structures (parahippocampal cortices and amygdala) rather than in hippocampus. Second, astrocytic metabolism is preserved in lithium-pilocarpine rats, as previously reported (Melo et al., 2005) but appears to be affected in carisbamate-treated rats: decreased in CRS-TLE rats and increased in CRS-ALE rats at the level of limbic structures. This result could be relevant to the distinct effect of carisbamate in the two subpopulations of rats, TLE and ALE, but will need further exploration to understand if it is a direct consequence of the early treatment, or a consequence of the epilepsy syndrome resulting from drug exposure.

### **Glycolytic activity**

DZP-TLE rats had increased amounts of glucose in thalamus only. Increase in glucose amounts reflects lower glucose consumption. Metabolic alteration or cellular loss can lead to reduction in glucose consumption. Melo et al. (2005) reported that lithium-pilocarpine rats have lower glucose consumption in hippocampal formation, in opposition to our results. This difference could be due to the duration of epilepsy because two different time scales were

applied. Melo et al. (2005) assessed metabolism one month after SE, whereas our study took place two months after SE. Another explanation for this difference could rely on the low number of samples analyzed in our study ( $n = 4$  DZP-TLE rats). Indeed, glucose consumption tended to be lower in DZP-TLE rats but the difference did not reach significance.

When rats were treated with carisbamate early during and after SE, glucose consumption was normalized in CRS-TLE rats. Despite the occurrence of motor SRS, the slight neuroprotection previously reported (François et al., 2011; Faure et al., 2013) could explain this normalization.

A more surprising result is the higher glucose consumption observed in CRS-ALE rats in thalamus. Given the occurrence of cortical spike-and-wave discharges in CRS-ALE rats (François et al., 2011), it is tempting to propose that increase in glucose consumption in thalamus is related to this epileptic absence-like activity. However, spontaneous absence epilepsy of genetic origin in the GAERS leads to increase in cerebral glucose uptake and metabolism in all brain structures (Nehlig et al., 1991). This difference in the extent of metabolic activation might account for the difference in the type of absence-like epilepsy recorded after early carisbamate treatment (lesions in hippocampus, piriform and entorhinal cortices) compared to that in GAERS (no overt lesions). This may explain why in this model, hypermetabolism is limited to thalamus but this will obviously require further investigation.

Alanine, which is formed from pyruvate (after glycolysis) through alanine transaminase, relates to glucose anaerobic metabolism which is the case also for lactate. The level of alanine and lactate follow the same profile as that of glucose in the different brain areas and the different groups of rats. This might reflect decreased availability of pyruvate for the entry into the TCA cycle in all brain regions of DZP-TLE rats. On the reverse, alanine and lactate are accumulating less in the thalamus of CRS-ALE rats than in controls, although not significantly. This is line with increased aerobic glucose utilization via the TCA cycle in that structure of CRS-ALE rats in thalamus.

**Total metabolite amounts**

Confirming the previous report (Melo et al., 2005) and according to studies in human patients (Cendes et al., 1993; Aasly et al., 1999; Petroff et al., 2002; Mueller et al., 2004) NAA amounts were reduced in DZP-TLE rats in hippocampus, limbic structures and thalamus, structures which showed neuronal loss in the lithium-pilocarpine model. Indeed, NAA reduction has been proposed to be a marker of neuronal loss and mitochondrial dysfunction, due to its selective presence in neurons, even though its reliability as neuronal marker remains debated (Vielhaber et al., 2008). NAA amounts were only slightly decreased in CRS-TLE rats in hippocampus and limbic structures, and completely normalized in CRS-ALE rats, supporting a correlation with neuroprotection in the present study. Furthermore the absence of reduction in adenosine-phosphate levels in DZP-TLE rats in hippocampus rules out a possible deficit in oxidative phosphorylation that is classically reflecting mitochondrial impairment. The two carisbamate-treated groups showed a higher level of adenosine-phosphate suggesting higher oxidative phosphorylation in these groups.

Glutamate amounts were decreased in DZP-TLE rats as previously reported (Melo et al., 2005), in accordance with neuronal loss in the structures assessed. CRS-TLE rats, which benefited a slight neuroprotection, showed normalization in hippocampus and thalamus, but not in limbic structures. This is coherent with the large neuronal loss affecting these areas. However, aspartate was reduced in all structures of CRS-TLE rats, reflecting a lower metabolism from glucose. CRS-ALE rats did not show these reductions, and the absence of motor SRS and neuronal loss alleviation also promoted increase in glutamine levels in hippocampus and limbic structures. This increase could reflect several changes: higher activity of glutamine synthetase, which is the enzyme converting glutamate to glutamine, higher uptake of glutamate by astrocytes, dysfunction of glutamine transporters allowing



entry of glutamine in neurons, or lower activity of phospho-activated glutaminase that converts glutamine to glutamate in neurons.

### **Glucose metabolism**

[4-<sup>13</sup>C]Glutamate (neuronal specific) is derived from [1-<sup>13</sup>C]glucose and pyruvate that enters the TCA cycle after action of pyruvate dehydrogenase. [4-<sup>13</sup>C]Glutamate was reduced in all groups in limbic structures only. This result is in accordance with Melo et al. (2005) that found the same reduction in hippocampal formation of lithium-pilocarpine rats. However, our results show that hippocampus is not affected. In the study of Melo et al. (2005) the hippocampus was measured as part of the hippocampal formation because at that time the sample size required for spectroscopic analysis was too large to allow measuring hippocampus alone. In limbic structures, glucose consumption in the TCA was reduced while oxidative phosphorylation did not seem to be affected, as suggested by high levels of adenosine phosphate. Thus, the reduced quantity of pyruvate entering the TCA could finally result in a decrease of “neuronal-specific” glutamate synthesis. In hippocampus and thalamus, synthesis of glutamate was normal in all groups while the total concentration of glutamate was decreased in all structures of DZP-TLE rats. This could relate to lower percentage of enrichment of this metabolite.

The decrease in [2-<sup>13</sup>C]glutamate (astrocytic specific), which is derived from [1-<sup>13</sup>C]glucose and pyruvate and enters the TCA cycle after pyruvate carboxylation, in all groups also leads to the hypothesis of a phospho-activated glutaminase deficit (a neuronal specific enzyme), or glutamine transporter impairment in all groups in limbic structures. However in hippocampus and thalamus the two isotopomers of glutamate derived from [1-<sup>13</sup>C]glucose were not affected in any group.

In GABAergic neurons the amounts of [4-<sup>13</sup>C]GABA, derived from pyruvate carboxylation, were reduced in limbic structures in DZP-TLE and CRS-ALE rats, and in thalamus in the latter group. In the limbic structures of DZP-TLE and CRS-ALE rats we cannot distinguish between a deficit in glutamate formation in GABAergic neurons leading to decrease in GABA formation from glutamine and a decrease in glutamic acid decarboxylase. How the lower GABA level in CRS-ALE rats in thalamus might relate to absence-like epilepsy needs further investigation.

### **Acetate metabolism**

[1,2-<sup>13</sup>C]Acetate derived isotopomers allow collecting data about astrocyte metabolism only. These isotopomers were never affected in DZP-TLE rats, confirming the previously published report (Melo et al., 2005) in lithium-pilocarpine rats.

Carisbamate treatment, whatever neuronal loss and epileptic fate, led to a decreased level of [4,5-<sup>13</sup>C]glutamate only in hippocampus. Quite interestingly, there is a clear opposition between levels of [4,5-<sup>13</sup>C]glutamine in limbic structures (low in CRS-TLE rats and high in CRS-ALE rats). This difference could reflect a low vs high activity of glutamine synthetase in astrocytes in CRS-TLE vs. CRS-ALE rats. Levels of [4,5-<sup>13</sup>C]glutamine were not affected in DZP-TLE rats.

A limiting technical aspect of <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy is the incapability to distinguish between intracellular and extracellular metabolites, and hence the technique does not always permit to clearly conclude on a particular impairment in a given metabolic process.

This study shows that neuronal metabolism is mainly impaired in the limbic structures of lithium-pilocarpine-treated rats, as previously reported (Melo et al., 2005). The situation is

similar in the limbic structures of the two carisbamate-treated groups. In hippocampus and thalamus, no significant metabolic alterations occurred in DZP-TLE rats were less marked. In both CRS-TLE and ALE rats, changes appeared to be rather of astrocytic origin in hippocampus and limited to GABA in thalamus of CRS-ALE rats. These results need to be further investigating to clarify the precise modifications related to each subpopulation after treatment.

**ACKOWLEGMENTS**

This work was supported by the French Ministry of Research, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U 666), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-UdS UMR 7364), and the Université de Strasbourg (UdS). Carisbamate was a gift from Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, L.L.C., Raritan, NJ, USA.

**DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST**

None of the authors has any conflict of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

**REFERENCES**

- Aasly J, Silfvenius H, Aas TC, Sonnewald U, Olivecrona M, Juul R, White LR (1999) Proton magnetic resonance spectroscopy of brain biopsies from patients with intractable epilepsy. *Epilepsy Res* 35:211-217.
- Bell B, Lin JJ, Seidenberg M, Hermann B (2011) The neurobiology of cognitive disorders in temporal lobe epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7:154-164.
- Cendes F, Caramanos Z, Andermann F, Dubeau F, Arnold DL (1997) Proton magnetic resonance spectroscopic imaging and magnetic resonance imaging volumetry in the lateralization of temporal lobe epilepsy: a series of 100 patients. *Ann Neurol* 42:737-746.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23:953-968.
- Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RS, Avoli M (2008) The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods* 172:143-157.
- Faure JB, Akimana G, Carneiro JE, Cosquer B, Ferrandon A, Geiger K, Koning E, Penazzi L, Cassel JC, Nehlig A (2013) A comprehensive behavioral evaluation in the lithium-pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia* 54:1203-1213.
- Foldvary N, Lee N, Hanson MW, Coleman RE, Hulette CM, Friedman AH, Bej MD, Radtke RA (1999) Correlation of hippocampal neuronal density and FDG-PET in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 40:26-29.

- Francois J, Germe K, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A (2011) Carisbamate has powerful disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 61:313-328.
- Honchar MP, Olney JW, Sherman WR (1983) Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220:323-325.
- Liu Y, Yohrling GJ, Wang Y, Hutchinson TL, Brenneman DE, Flores CM, Zhao B (2009) Carisbamate, a novel neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 83:66-72.
- Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 89:499-530.
- Melo TM, Nehlig A, Sonnewald U (2005) Metabolism is normal in astrocytes in chronically epileptic rats: a (13)C NMR study of neuronal-glia interactions in a model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1254-1264.
- Melo TM, Sonnewald U, Bastholm IA, Nehlig A (2007) Astrocytes may play a role in the etiology of absence epilepsy: a comparison between immature GAERS not yet expressing seizures and adults. *Neurobiol Dis* 28:227-235.
- Morken TS, Brekke E, Haberg A, Wideroe M, Brubakk AM, Sonnewald U (2013) Neuron-Astrocyte Interactions, Pyruvate Carboxylation and the Pentose Phosphate Pathway in the Neonatal Rat Brain. *Neurochem Res*.
- Mueller SG, Laxer KD, Cashdollar N, Flenniken DL, Matson GB, Weiner MW (2004) Identification of abnormal neuronal metabolism outside the seizure focus in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 45:355-366.

- Nehlig A, Vergnes M, Marescaux C, Boyet S, Lannes B (1991) Local cerebral glucose utilization in rats with petit mal-like seizures. *Ann Neurol* 29:72-77.
- O'Brien TJ, Newton MR, Cook MJ, Berlangieri SU, Kilpatrick C, Morris K, Berkovic SF (1997) Hippocampal atrophy is not a major determinant of regional hypometabolism in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 38:74-80.
- Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD (2002) Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia* 43:703-710.
- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.
- Ryvlin P, Cinotti L, Froment JC, Le Bars D, Landais P, Chaze M, Galy G, Lavenne F, Serra JP, Mauguier F (1991) Metabolic patterns associated with non-specific magnetic resonance imaging abnormalities in temporal lobe epilepsy. *Brain* 114 ( Pt 6):2363-2383.
- Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, Cavalcanti D, Baulac M (1998) Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 51:1256-1262.
- Sonnewald U, Kondziella D (2003) Neuronal glial interaction in different neurological diseases studied by ex vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. *NMR Biomed* 16:424-429.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26:321-330.
- Vielhaber S, Niessen HG, Debska-Vielhaber G, Kudin AP, Wellmer J, Kaufmann J, Schonfeld MA, Fendrich R, Willker W, Leibfritz D, Schramm J, Elger CE, Heinze HJ, Kunz WS (2008) Subfield-specific loss of hippocampal N-acetyl aspartate in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 49:40-50.

Waniewski RA, Martin DL (1998) Preferential utilization of acetate by astrocytes is attributable to transport. *J Neurosci* 18:5225-5233.

Zwingmann C, Leibfritz D (2003) Regulation of glial metabolism studied by <sup>13</sup>C-NMR. *NMR Biomed* 16:370-399.



## TABLES

Table 1: Measurement of various metabolites with HPLC in hippocampus.

	Controls	DZP- TLE	CRS-TLE	CRS-ALE	P-value
NAD+	0,10±0,05	0,11±0,06	0,27±0,06	0,28±0,06	0,076
NADH	0,31±0,06	0,28±0,08	0,15±0,06	0,13±0,06	0,116
NAD+ +NADH	0,41±0,01	0,40±0,02	0,42±0,01	0,41±0,01	0,796
AMP	0,25±0,08	0,23±0,10	0,34±0,05	0,36±0,07	0,580
ATP+ADP	0,70±0,34	0,82±0,35	2,09±0,34*	1,94±0,49*	0,036
A(M+D+T)P	0,96±0,39	1,06±0,42	2,43±0,36*	2,29±0,55*	0,046
<b>Hippocampus</b> Formate	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,257
Fumarate	0,11±0,02	0,16±0,05	0,10±0,03	0,07±0,01	0,167
Myoinositol	9,30±0,37	9,14±0,15	9,65±0,30	9,28±0,30	0,709
PhosCreat	1,01±0,44	1,07±0,54	2,33±0,50	2,37±0,46	0,105
Creatine	7,19±0,36	6,42±0,61	5,86±0,60	5,52±0,33	0,112
Total Creatine	8,21±0,20	7,49±0,44	8,19±0,30	7,89±0,25	0,382
Succinate	0,01	0,06±0,00	0,07±0,01	0,08±0,01	0,238

\* p &lt; 0.05: statistically different from controls.

Table 2: Measurement of various metabolites with HPLC in limbic structures.

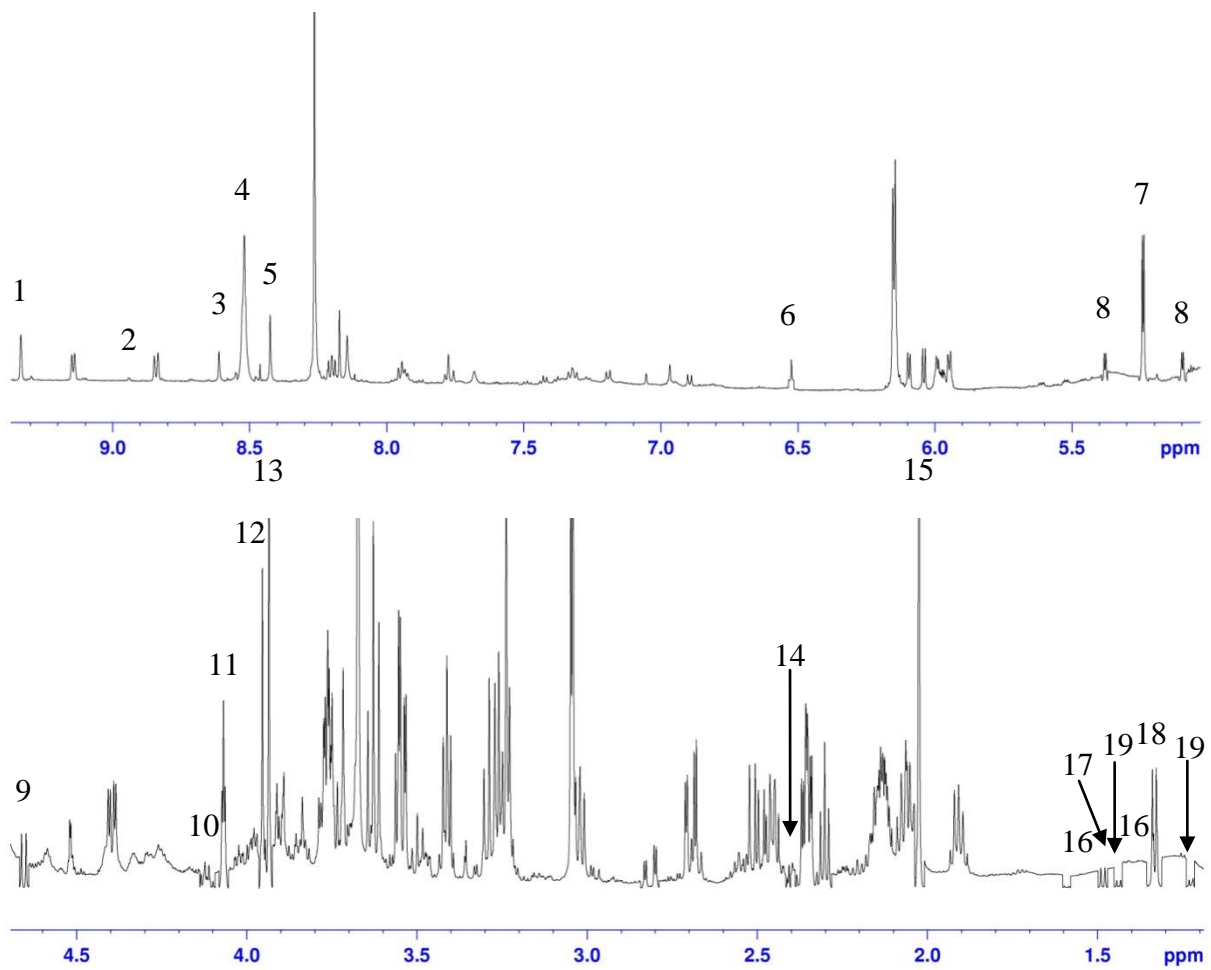
	<b>Controls</b>	<b>DZP-TLE</b>	<b>CRS-TLE</b>	<b>CRS-ALE</b>	<b>P-value</b>
NAD+	0,15±0,06	0,09±0,04	0,26±0,06	0,28±0,06	0,157
NADH	0,31±0,07	0,31±0,05	0,21±0,06	0,17±0,06	0,346
NAD+ +NADH	0,46±0,02	0,40±0,02	0,46±0,02	0,45±0,01	0,097
AMP	0,35±0,08	0,31±0,02	0,50±0,05	0,43±0,07	0,177
ATP	0,47±0,18	0,34±0,08	0,74±0,12	0,68±0,14	0,238
ADP	0,52±0,22	0,37±0,07 <sup>\$</sup>	1,37±0,19 <sup>*</sup>	1,07±0,31	0,028
<b>Limbic</b>					
<b>Structures</b>					
A(mdt)P	1,34±0,46	1,02±0,14	2,41±0,38	2,18±0,49	0,116
Formate	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,01	0,03±0,00	0,282
Fumarate	0,13±0,03	0,12±0,02	0,12±0,02	0,08±0,01	0,387
Myoinositol	10,92±0,55	11,16±0,48	11,57±0,38	11,26±0,17	0,658
PhosCreat	0,98±0,34	0,88±0,31	1,56±0,45	2,13±0,30	0,219
Creatine	6,51±0,66	5,69±0,76	6,16±0,69	5,23±0,29	0,530
Total Creatine	7,35±0,38	6,35±0,55	7,71±0,49	7,36±0,16	0,274
Succinate	0,06±0,01	0,06±0,01	0,16±0,12	0,08±0,00	0,795

\* p < 0.05: statistically different from controls, \$ p < 0.05: statistically different from CRS-TLE rats.

Table 3: Measurement of various metabolites with HPLC in thalamus.

	Controls	DZP-TLE	CRS-TLE	CRS-ALE	P-value
NAD+	0,16±0,07	0,11±0,08	0,30±0,06	0,33±0,06	0,144
NADH	0,33±0,08	0,32±0,08	0,17±0,07	0,10±0,06	0,164
NAD+ +NADH	0,49±0,02	0,43±0,03	0,47±0,02	0,42±0,02	0,171
AMP	0,12±0,05	0,09±0,04	0,35±0,19	0,21±0,04	0,594
ATP	0,55±0,08	0,64±#DIV/0!	0,71±0,04	0,66±0,10	0,736
ADP	1,27±0,34	1,35±#DIV/0!	1,66±0,03	1,42±0,23	0,775
A(mdt)P	1,03±0,50	0,59±0,45	1,54±0,40	1,94±0,48	0,347
<b>Thalamus</b> Formate	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,246
Fumarate	0,16±0,03	0,14±0,04	0,12±0,03	0,07±0,00	0,229
Myoinositol	9,28±0,35	8,87±0,40	9,24±0,23	8,28±0,41	0,116
PhosCreat	1,62±0,48	1,36±0,50	2,16±0,39	2,37±0,24	0,509
Creatine	6,61±0,51	6,01±0,67	6,06±0,57	4,99±0,26	0,291
Total Creatine	7,77±0,29	7,03±0,52	7,79±0,21	7,36±0,30	0,373
Succinate	0,08±0,01	0,08±0,01	0,19±0,08	0,08±0,01	0,465

## FIGURES



**Figure 1:** A typical <sup>1</sup>H-NMR spectrum from a thalamic sample. 1 = NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup>; 2 = NADH/NADPH; 3 = AMP; 4 = ADP+ATP; 5 = formate; 6 = fumarate; 7 = α-glucose; 8 = α-glucose satellites; 9 = β-glucose; 10 = lactate; 11 = myoinositol; 12 = phosphocreatine; 13 = creatine; 14 = succinate; 15 = N-acetyl aspartate (NAA); 16=alanine satellites; 17 = alanine; 18 = lactate; 19 = lactate satellites; ppm = parts per million. Note: for a better view, the peaks from 5-9.4 ppm were made larger relative to the peaks from 1.2-4.7 ppm.

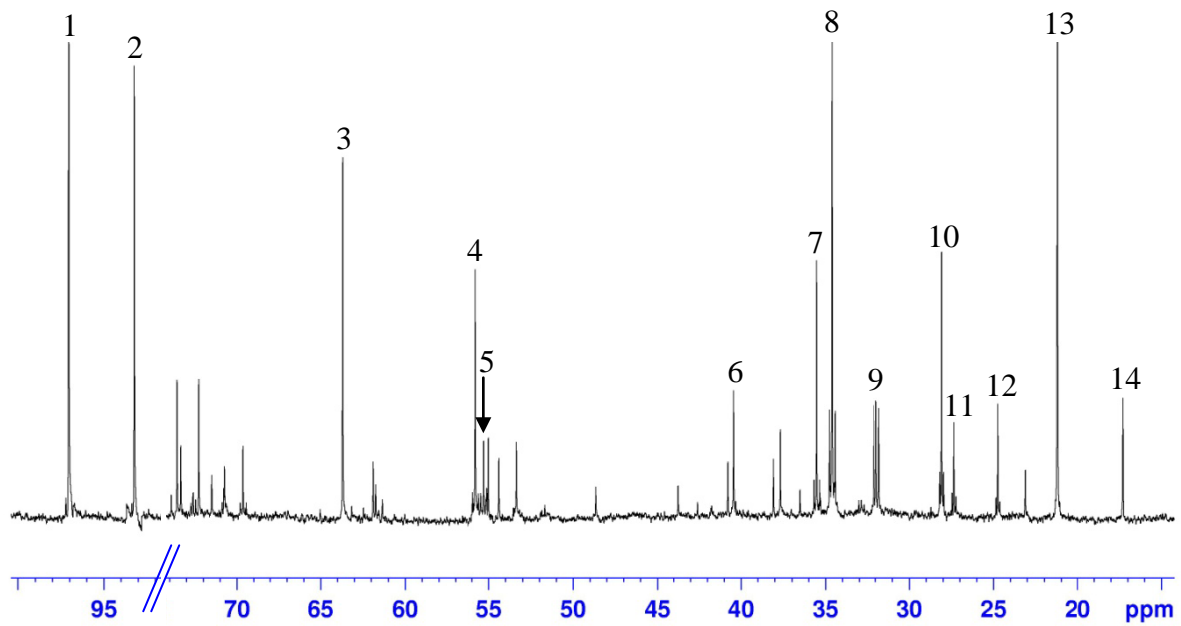


Figure 2: A typical  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum from a thalamic sample. 1 =  $\beta$ -glucose; 2 =  $\alpha$ -glucose; 3 = ethylene glycol (reference peak); 4 = glutamate C2; 5 = glutamine C2; 6 = GABA C4; 7 = GABA C2 + succinate; 8 = glutamate C4; 9 = glutamine C4; 10 = glutamate C3; 11 = glutamine C3; 12 = GABA C3; 13 = lactate C3; 14 = alanine; ppm = parts per million.

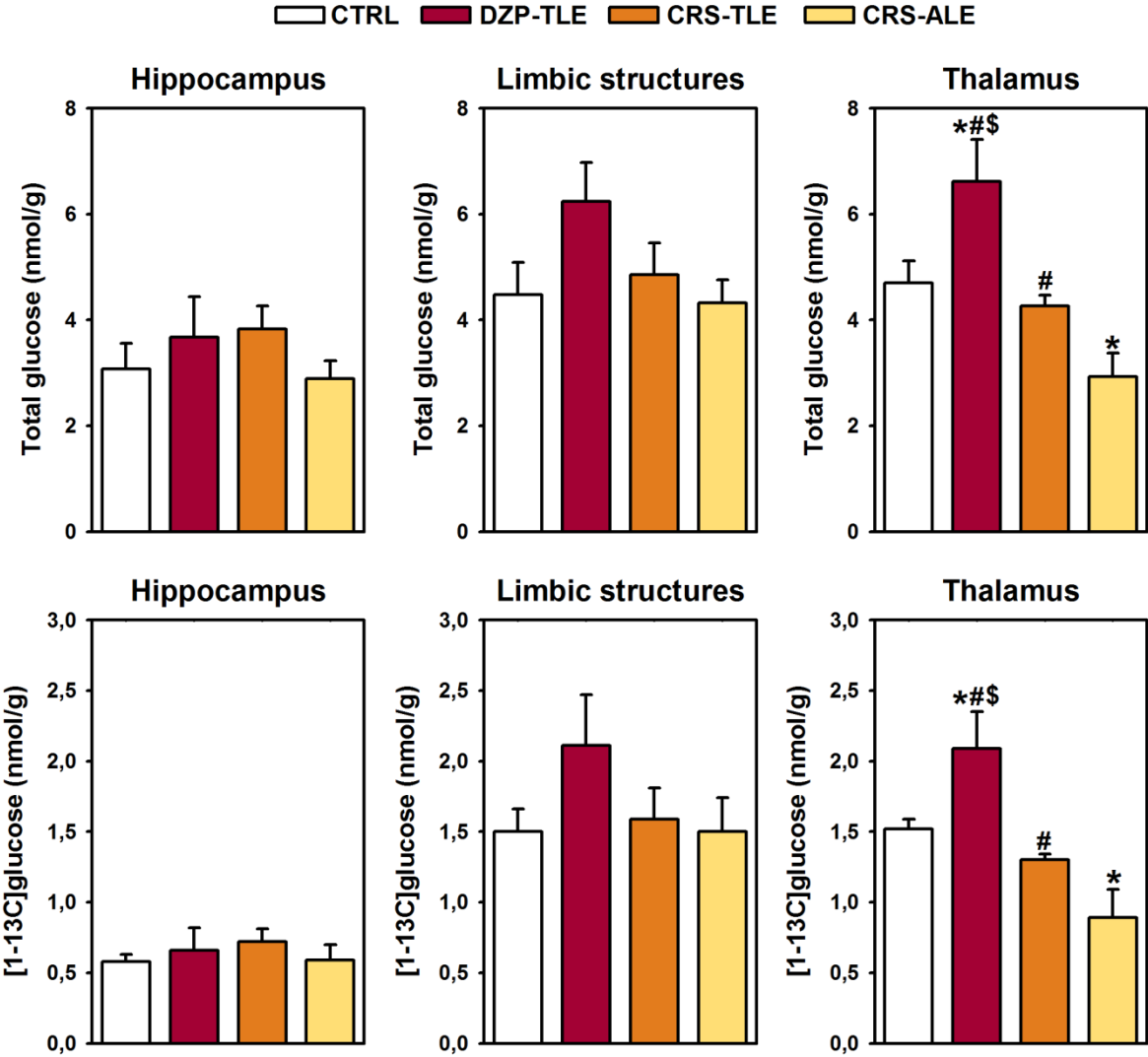


Figure 3: Amounts of total and [1-13C]glucose in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\* p < 0.05: statistically different from controls, # p < 0.05: statistically different from CRS-ALE rats, \$ p < 0.05: statistically different from CRS-TLE rats.

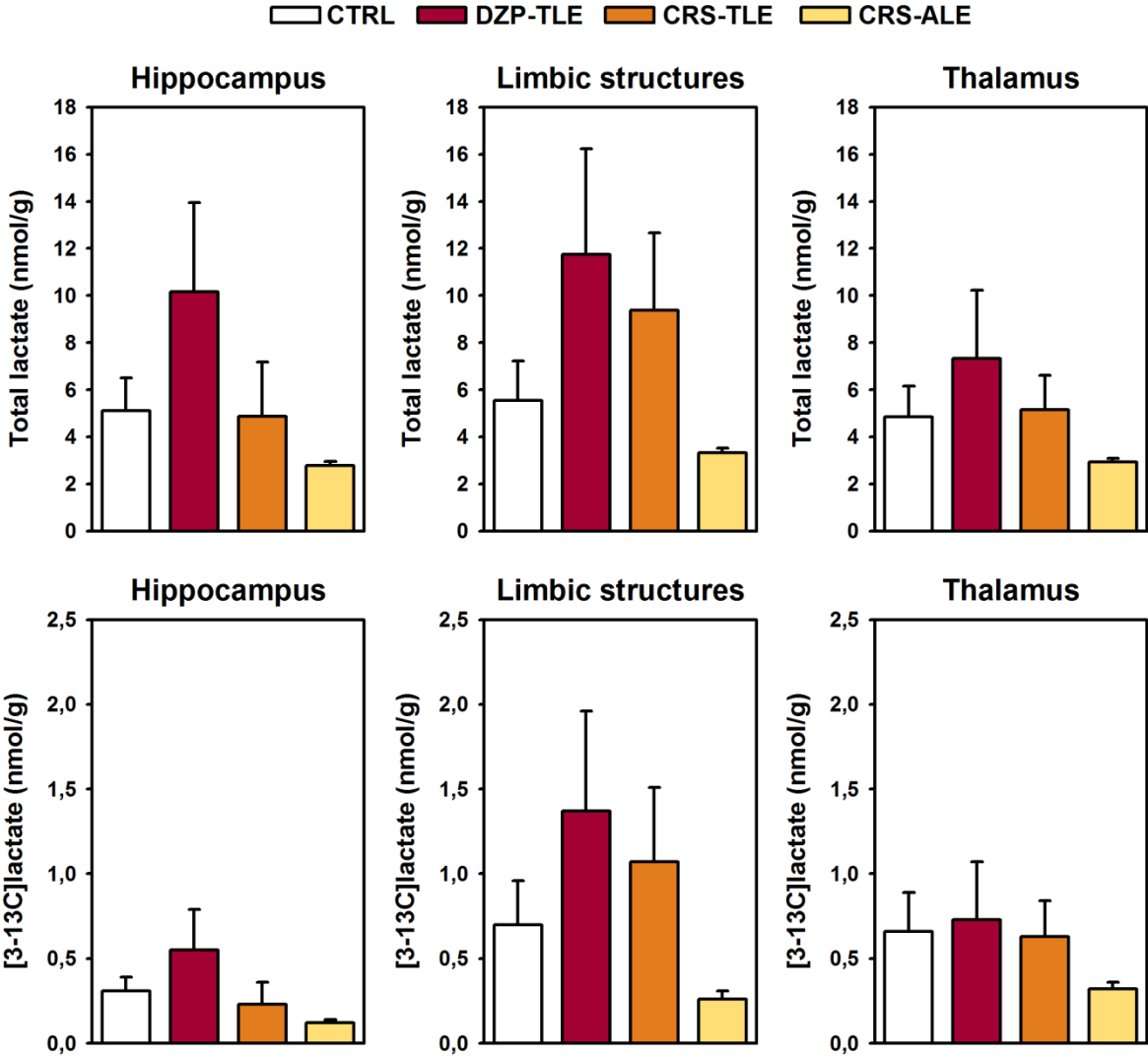


Figure 4: Amounts of total and [3-13C]lactate in hippocampus, limbic structures and thalamus.

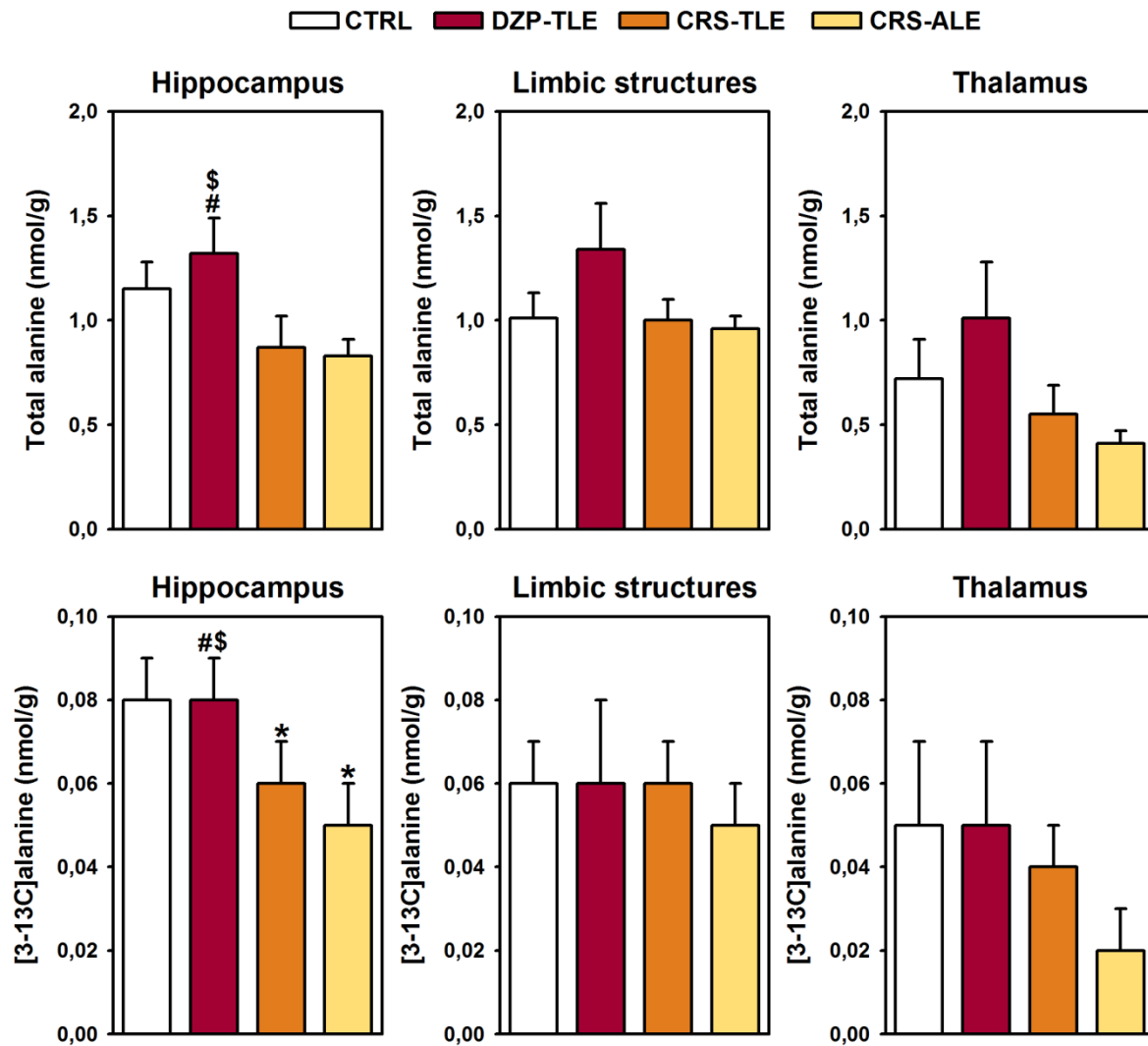


Figure 5: Amounts of total and [3-13C]alanine in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\*  $p < 0.05$ : statistically different from controls, #  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-ALE rats, \$  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-TLE rats.



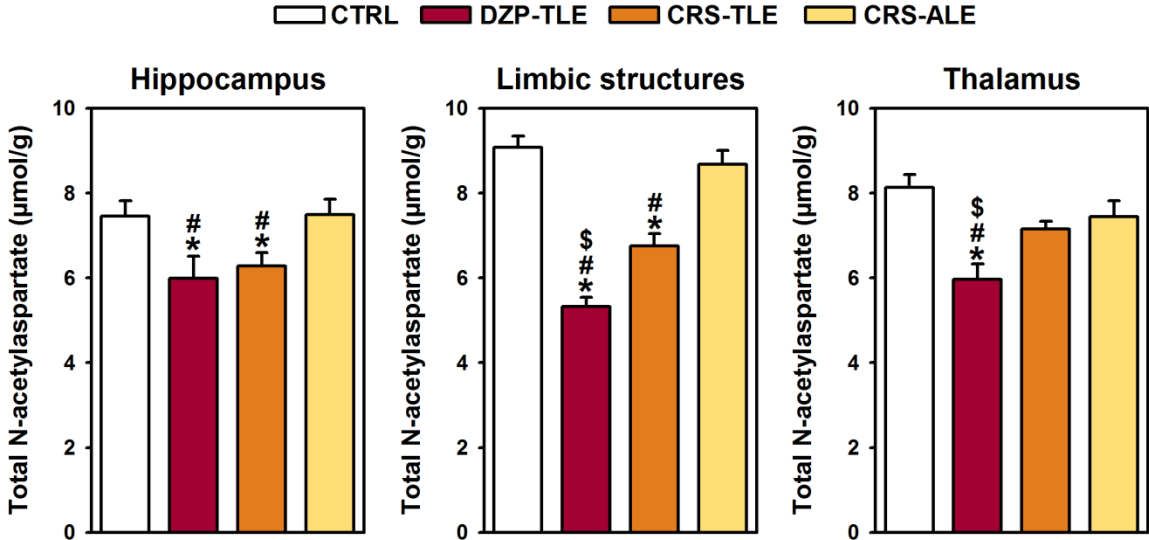


Figure 6: Amounts of N-acetylaspartate in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\* p < 0.05: statistically different from controls, # p < 0.05: statistically different from CRS-ALE rats, \$ p < 0.05: statistically different from CRS-TLE rats.

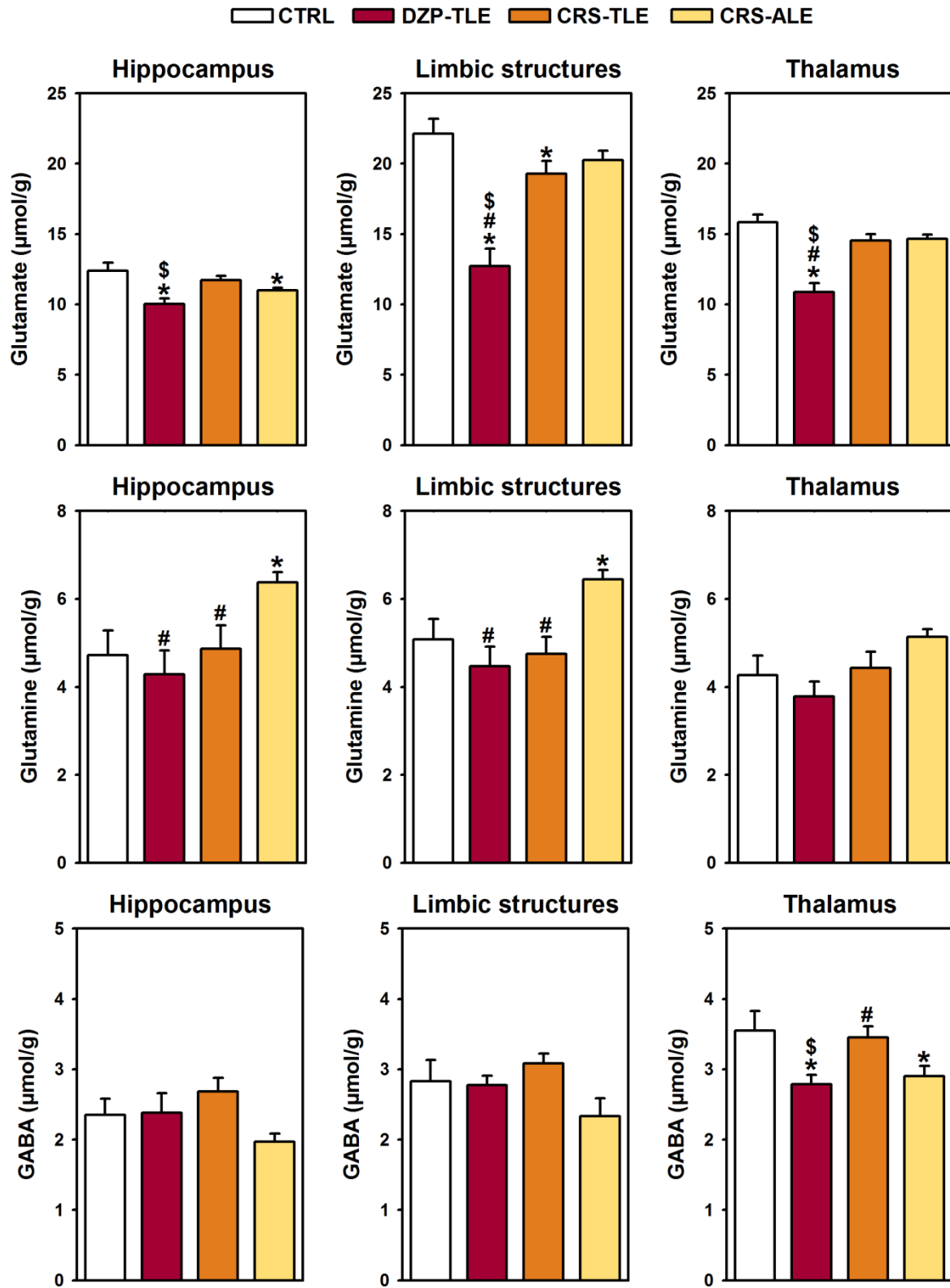


Figure 7: Amounts of glutamate, glutamine, and GABA in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\*  $p < 0.05$ : statistically different from controls, #  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-ALE rats, \$  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-TLE rats.

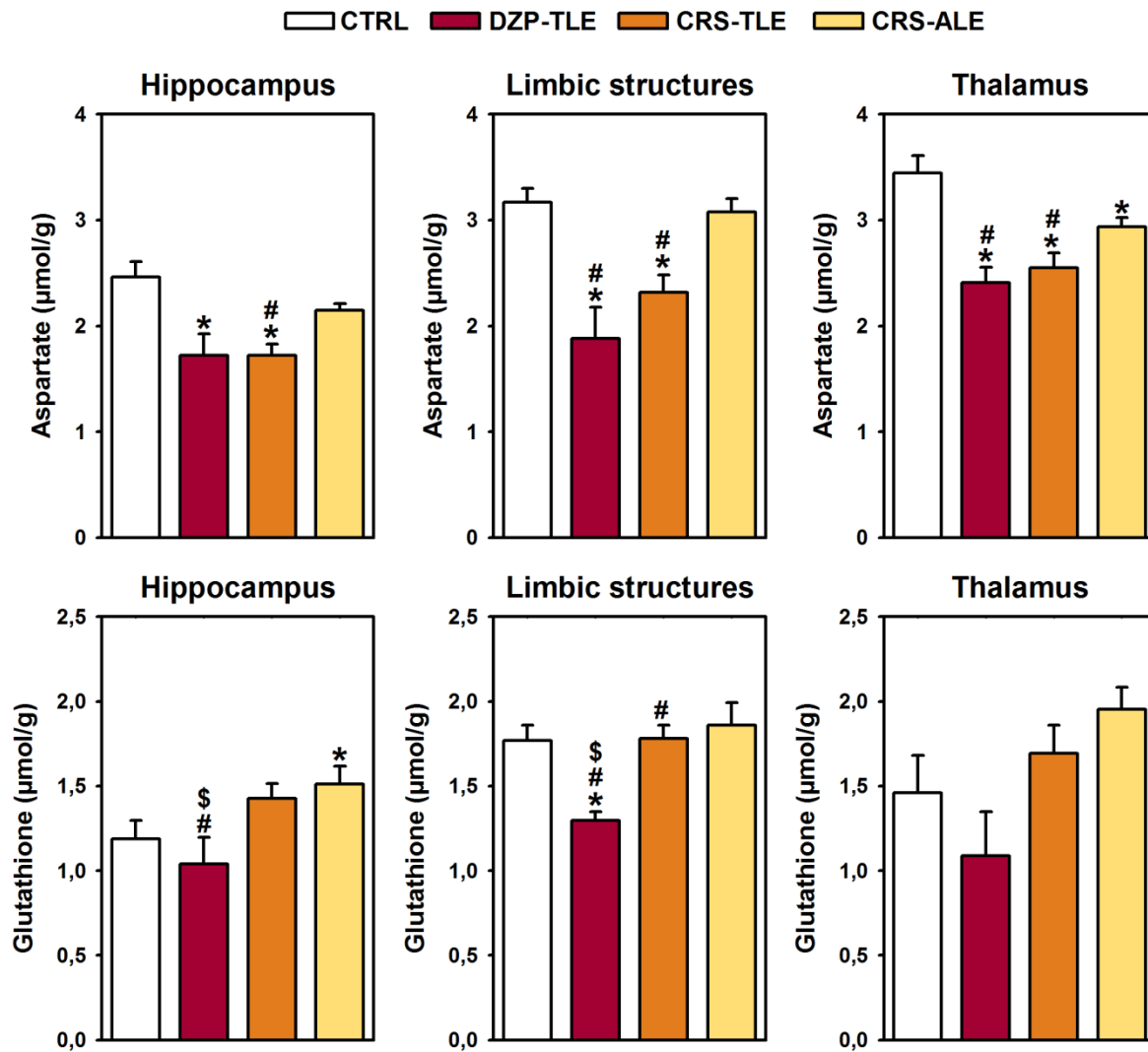


Figure 8: Amounts of aspartate, and glutathione in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\*  $p < 0.05$ : statistically different from controls, #  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-ALE rats, \$  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-TLE rats.

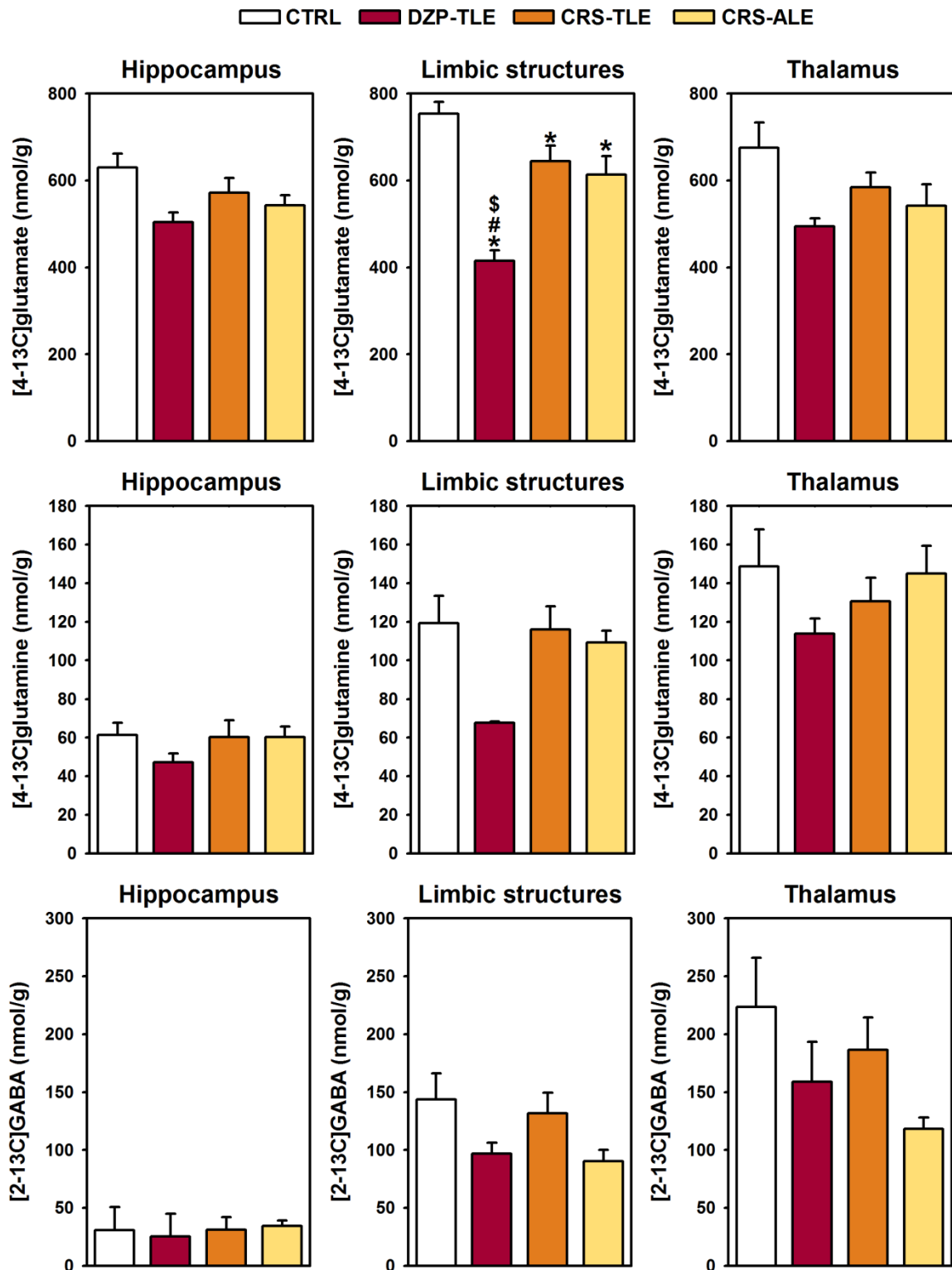


Figure 9: Amounts of [4-13C]glutamate, [4-13C]glutamine, and [2-13C]GABA (derived from [1-13C]glucose after pyruvate dehydrogenase) in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\*  $p < 0.05$ : statistically different from controls, #  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-ALE rats, \$  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-TLE rats.

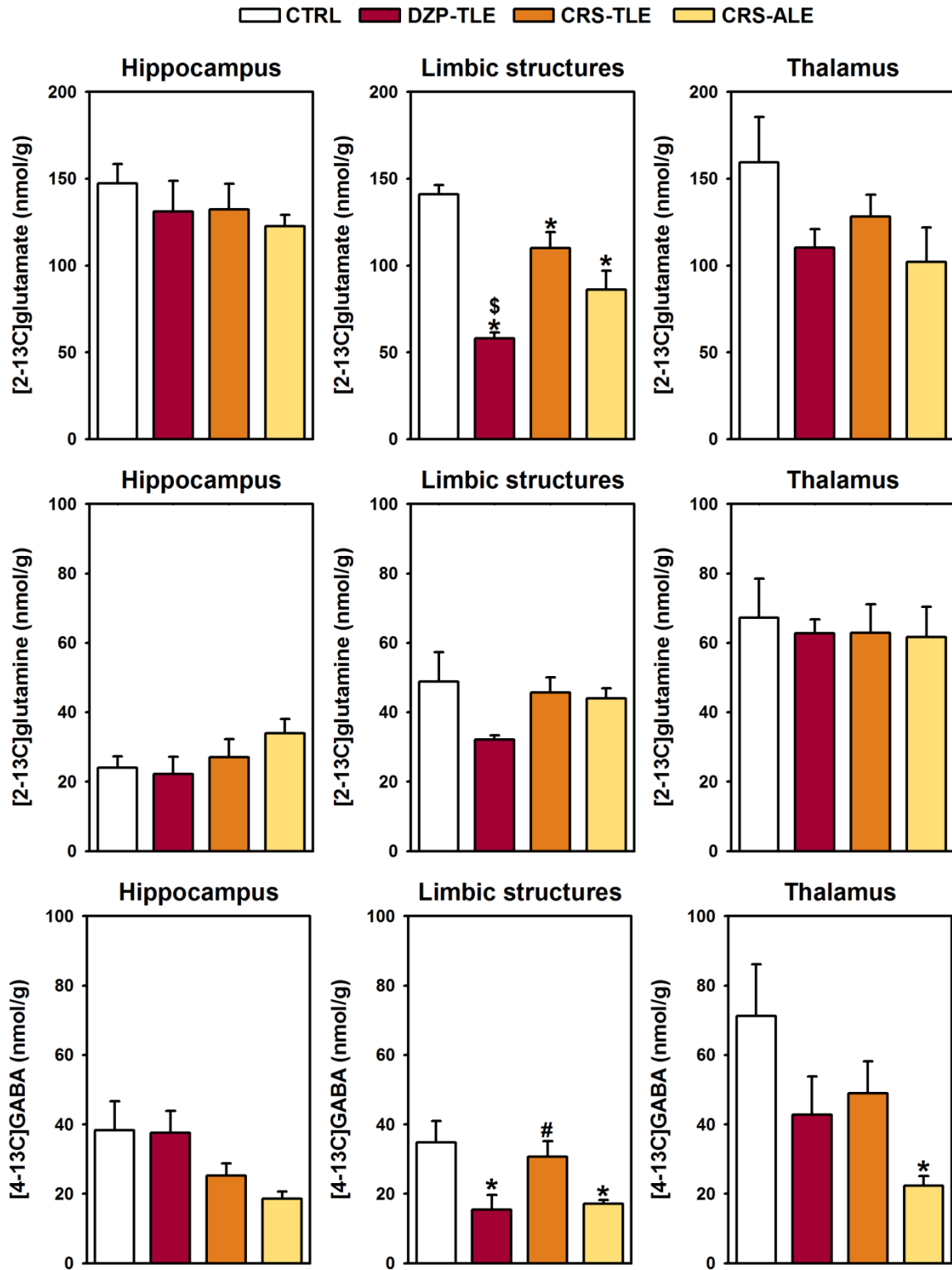


Figure 10: Amounts of [2-13C]glutamate, [2-13C]glutamine, and [4-13C]GABA (derived from [1-13C]glucose after pyruvate carboxylation) in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\*  $p < 0.05$ : statistically different from controls, #  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-ALE rats, \$  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-TLE rats.



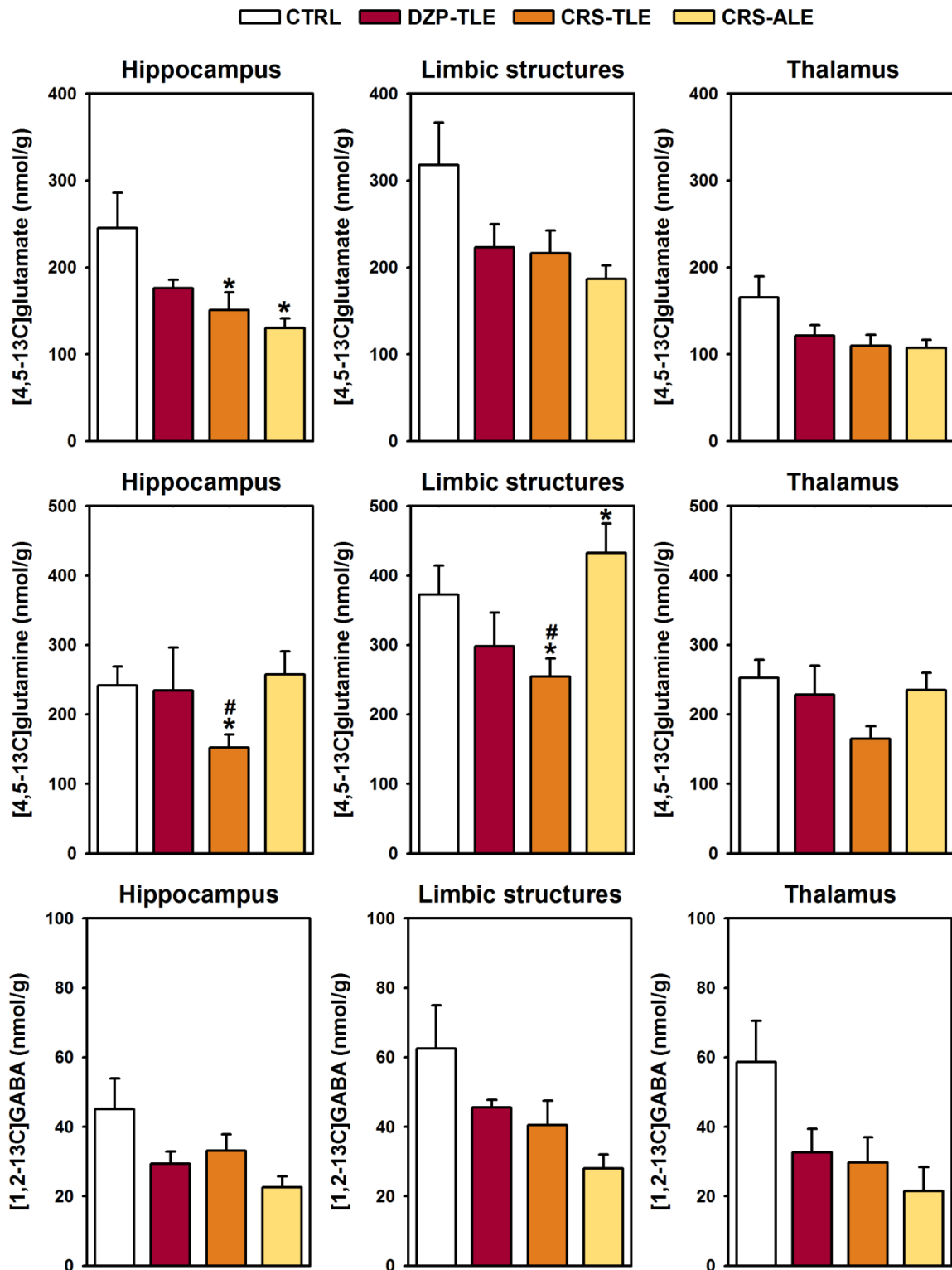


Figure 11: Amounts of [4,5-13C]glutamate, [4,5-13C]glutamine, and [1,2-13C]GABA (derived from [1,2-13C]acetate) in hippocampus, limbic structures and thalamus.

\*  $p < 0.05$ : statistically different from controls, #  $p < 0.05$ : statistically different from CRS-ALE rats.





# DISCUSSION

## DISCUSSION

### 1. Quels étaient les objectifs de cette thèse ?

Mon travail de thèse était motivé par plusieurs objectifs. Le premier d'entre eux était de disposer d'une connaissance aussi large et précise que possible des capacités comportementales et cognitives de rats du modèle lithium-pilocarpine pendant la phase chronique.

Cette première exploration a deux intérêts majeurs. D'une part, c'est la première fois qu'un modèle d'ELT est exploré aussi largement et avec ce degré de précision du point de vue comportemental et cognitif, au sein d'un seul et même laboratoire de surcroît. Jusqu'à présent, les études comportementales se cantonnaient à une seule fonction cognitive, ou à un petit groupe de fonctions. L'évaluation étendue des capacités comportementales permet, entre autres avantages, d'identifier les possibles déficits comportementaux de base (par exemple, un problème de motricité) qui pourraient expliquer une performance altérée dans les tests cognitifs qui nécessitent l'intégrité de ces comportements. Cette vérification permet d'augmenter la fiabilité et donc la portée des conclusions de l'évaluation comportementale et cognitive.

D'autre part, cette exploration permet de proposer une modélisation des troubles comportementaux et cognitifs des patients, grâce à un modèle d'ELT, de proposer une tentative d'explication de ces déficits, et de vérifier l'effet de traitements non pas uniquement au niveau des crises électrocliniques, mais aussi au niveau des comorbidités qui accompagnent l'ELT.

Le second objectif de mon travail était de connaître l'effet de l'administration du carisbamate pendant l'EdM et la phase latente sur les performances comportementales et cognitives des rats lithium-pilocarpine pendant la phase chronique. Etant donné les différences en termes d'épilepsie qui ont été précédemment observées par notre groupe dans les deux sous-populations traitées, à savoir celle des rats dits ELT et celle des rats qui ne présentent pas de crise motrice mais des décharges de pointes-ondes corticales (François et al., 2011), il est

## DISCUSSION

indispensable d'évaluer l'effet de ces modifications au niveau comportemental et cognitif pour connaître l'intérêt du traitement et son action sur les comorbidités de l'ELT.

Le troisième et dernier objectif de mon travail de thèse était d'évaluer la possibilité d'identifier un marqueur métabolique des différences entre les deux sous-populations qui se distinguent après l'administration du carisbamate. Les perturbations métaboliques neuronales ont été précédemment évaluées dans le modèle lithium-pilocarpine par notre groupe (Melo et al, 2005). Il est donc particulièrement intéressant de connaître l'effet du traitement et des différences entre les deux sous-populations au niveau du métabolisme neuronal et astrocytaire, ainsi qu'au niveau des échanges entre ces deux types cellulaires dans le cadre du cycle glutamate-glutamine.



## 2. Quels sont les résultats obtenus ?

### 2.1. Chez les rats lithium-pilocarpine non-traités

Les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse concernent tout d'abord les capacités comportementales et cognitives des rats lithium-pilocarpine pendant la phase chronique (publications 1 et 2).

Avant de commencer cette exploration, certaines fonctions comportementales et cognitives avaient déjà été étudiées. En ce qui concerne les comportements de base, Persinger et Koren (1998) avaient montré une hyperactivité nocturne pendant 25 jours après l'EdM suivie par une normalisation (dans le modèle lithium-pilocarpine). De leur côté, Stewart et Leung (2003) ont aussi constaté une augmentation de l'activité (cette fois diurne et nocturne) dans le modèle pilocarpine, et ceci jusqu'à 8 semaines après l'EdM, puis une normalisation à 12 semaines. Dans notre travail, les rats présentent une hyperactivité locomotrice nocturne et une activité diurne normale. Cette différence avec les données de la littérature pourrait s'expliquer de la façon suivante : Persinger et Koren (1998) n'ont observé l'activité des rats lithium-pilocarpine que jusqu'à 30 jours tandis que notre travail fournit un instantané de l'activité de ces rats 10 semaines après l'EdM. Il est possible que l'activité de ces animaux fluctue avec le temps. De plus, Persinger et Koren (1993) n'ont pas vérifié la présence de crises motrices. D'autre part, Stewart et Leung (2003) ont utilisé le modèle pilocarpine, ce qui peut expliquer les différences entre nos résultats et les leurs.

Par ailleurs, notre travail explore pour la première fois l'habituation à un nouvel environnement dans le modèle lithium-pilocarpine. Les autres groupes qui se sont intéressés à l'activité exploratoire n'ont pas étudié l'habituation puisqu'ils n'ont pas observé l'évolution de l'exploration à travers le temps (Kubova et al., 2004 ; dos Santos et al., 2005 ; de Sales Santos et al., 2010 ; Inostroza et al., 2012). Nous montrons donc pour la première fois que ce comportement de base n'est pas affecté dans le modèle lithium-pilocarpine. La coordination sensorimotrice fine, évaluée une fois encore pour la première fois dans ce modèle, est préservée chez les rats testés.

## DISCUSSION

La littérature décrit les rats des modèles pilocarpine et lithium-pilocarpine comme « hypo-anxieux » (Detour et al., 2005 ; dos Santos et al., 2005 ; Cardoso et al., 2009 ; Inostroza et al., 2011). Les résultats de notre travail confirment cette littérature. Néanmoins, Kubova et al. (2004) n'avaient pu tester les rats du modèle lithium-pilocarpine à cause de leur tendance à sauter du labyrinthe. Nous montrons dans notre travail que, même si certains animaux sautent du labyrinthe, ceux qui ne sautent pas passent autant de temps dans les branches ouvertes que dans les branches fermées du labyrinthe, reflétant une diminution de l'anxiété. Toutefois, cette diminution peut également être la conséquence d'une désinhibition comportementale (ou impulsivité) qui expliquerait le fait que ces rats aient tendance à sauter du labyrinthe malgré la hauteur.

Mise à part l'hyperactivité locomotrice nocturne qui est anormale, les autres comportements de base évalués ne sont pas perturbés dans le modèle lithium-pilocarpine, limitant ainsi leur impact négatif dans les autres tests, notamment cognitifs. A la lumière de l'hyperréactivité de ces animaux (au toucher, par exemple), leur performance dans le labyrinthe en croix surélevé peut conduire à deux conclusions : un faible niveau d'anxiété ou une désinhibition comportementale (saut depuis les branches ouvertes, par exemple).

Les fonctions mnésiques sont clairement les fonctions cognitives qui ont fait l'objet du plus grand nombre d'études dans les modèles pilocarpine et lithium-pilocarpine (Persinger et al., 1993 ; Rice et al., 1998 ; Kubova et al., 2004 ; Detour et al., 2005 ; dos Santos et al., 2005 ; Frisch et al., 2007 ; Zhou et al., 2007 ; Chauvière et al., 2009 ; Inostroza et al., 2011). Tous ces groupes ont montré des déficits d'apprentissage, et logiquement de mémoire spatiale à long-terme, ainsi que de reconnaissance spatiale. De plus, la mémoire spatiale de travail était également perturbée. En accord avec la littérature, notre travail confirme que les rats du modèle lithium-pilocarpine présentent un déficit d'apprentissage d'une localisation spatiale, et donc logiquement une absence de rappel de cette localisation à long-terme, ainsi qu'une perturbation de la mémoire spatiale de travail. La mémoire procédurale, qui est évaluée pour la première fois dans un modèle d'ELT, semble aussi être affectée, à moins qu'une fonction indispensable à des performances normales dans l'ensemble des protocoles que j'ai utilisés ne soit affectée (le déplacement dans un contexte spatial, par exemple).

## DISCUSSION

Enfin, les fonctions exécutives que sont l'attention visuelle soutenue, le contrôle inhibiteur et les processus décisionnels, et qui sont elles aussi évaluées pour la première fois dans un modèle d'ELT, sont perturbées dans ce modèle. En effet les rats ELT présentent un déficit attentionnel, une tendance à l'impulsivité et à la persévération, et un déficit décisionnel. Ces déficits peuvent limiter les conclusions portées sur les autres fonctions cognitives, notamment la mémoire spatiale, car elles nécessitent le bon fonctionnement de ces processus exécutifs (Kentros et al., 2004 ; Fenton et al., 2010).

### 2.2. Chez les rats traités par le carisbamate

Concernant l'effet du carisbamate (publications 1 et 2), l'application de ce traitement une heure et neuf heures après l'EdM, puis pendant six jours supplémentaires (à raison de deux injections par jour) permet d'empêcher l'apparition des crises convulsives chez environ la moitié des rats. L'étendue des lésions est alors nettement réduite dans cette sous-population (François et al., 2011), seuls le hile et CA3 étant encore assez fortement lésés. Je montre pour la première fois dans mon travail de thèse que ces effets au niveau des crises et de l'histopathologie se traduisent, dans ce groupe, par une préservation totale des capacités comportementales et cognitives évaluées (voir ci-dessus). Ce résultat est important, car c'est la seule étude qui, à l'heure actuelle, révèle l'effet bénéfique d'un traitement administré précocement à la fois sur les crises, les pertes cellulaires et les capacités comportementales et cognitives de façon chronique. En revanche, la seconde sous-population qui, après traitement, présente des crises convulsives et une neuroprotection peu étendue (François et al., 2011) ne bénéficie d'aucune amélioration comportementale et cognitive par rapport aux rats lithium-pilocarpine non traités.

### 2.3. Au niveau du métabolisme énergétique

En ce qui concerne les métabolismes neuronal et astrocytaire dans le modèle lithium-pilocarpine (publication 3), la seule étude présente dans la littérature à ce jour est celle de Melo et al. (2005). Le groupe avait montré dans le même modèle que les rats ELT

## DISCUSSION

présentaient une perturbation du métabolisme neuronal dans la formation hippocampique étendue (qui englobait l'hippocampe, les cortex entorhinal et piriforme, et l'amygdale, par contrainte technique), alors que le métabolisme astrocytaire n'était pas affecté. Les résultats que nous avons obtenus sont en accord avec la perturbation exclusivement neuronale du métabolisme. En revanche, ils précisent pour la première fois que l'atteinte métabolique concerne en fait uniquement des structures limbiques (cortex entorhinal et piriforme, et amygdale) autres que l'hippocampe, ce dernier ne présentant pas de perturbation métabolique chez les rats lithium-pilocarpine non-traités dans notre étude.

Au niveau du traitement par le carisbamate, nous avons plutôt mis en lumière un effet du traitement, qui est sans rapport avec le devenir épileptique des rats, par rapport à l'absence de traitement dans le modèle lithium-pilocarpine. Une légère diminution de l'atteinte neuronale dans les structures limbiques est en fait la seule amélioration due au traitement. La différence entre les rats qui développent une ELT et ceux qui ne développent pas de crise motrice (et présentent des décharges de pointe-ondes caractéristiques de l'épilepsie-absences) après le traitement par le carisbamate concerne le métabolisme du GABA, qui est un des neurotransmetteurs principaux de la boucle thalamocorticale. En effet, celui-ci est modifié uniquement chez les rats qui ne développent pas de crises motrices. Par ailleurs, la principale différence entre ces animaux et les rats GAERS (*Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg*) est la présence de lésions persistantes dans le système limbique (dans CA3, le hile, en dépit de la forte neuroprotection assurée par le carisbamate), ce qui n'est pas le cas pour les GAERS (Danober et al., 1998). Par ailleurs, il a été montré que le système limbique était également affecté pendant les crises d'absences des GAERS (Nehlig et al., 1991), et il a été proposé que le système limbique joue un rôle dans la régulation du système thalamocortical (Onat et al., 2013). De plus, l'hippocampe est anatomiquement connecté avec les noyaux réticulaires (Cavdar et al., 2008), dont les interneurons GABAergiques jouent un rôle majeur dans le maintien des décharges de pointes-ondes chez les GAERS (Danober et al., 1998). Tous ces éléments nous conduisent à faire l'hypothèse que les lésions qui persistent dans le système limbique malgré le traitement par le carisbamate dans le groupe qui ne présente pas de crise motrice pourraient sous-tendre l'apparition des décharges de pointes-ondes, et ne plus permettre au système limbique d'assurer ce rôle de régulateur.

## DISCUSSION

Toutefois, ces hypothèses doivent être nuancées, car l'activité électrophysiologique du thalamus n'a jamais été enregistrée au moment des décharges de pointes-ondes corticales bilatérales synchrones chez les rats qui ont reçu du carisbamate et qui n'ont pas développé de crise motrice. Il est donc possible que seul le cortex soit affecté par ces crises chez ces animaux. Il serait d'ailleurs particulièrement intéressant de procéder à des enregistrements profonds dans le thalamus pour y vérifier la présence de décharges de pointes-ondes, et leur potentielle synchronisation avec celles qui sont observées dans le cortex somatomoteur.

### 3. Qu'apporte la contribution expérimentale aux connaissances du modèle lithium-pilocarpine ?

Globalement, les comorbidités comportementales et cognitives qui résultent de l'EdM dans le modèle lithium-pilocarpine sont désormais plus précisément décrites (publications 1 et 2). Cependant leur interprétation se doit de rester prudente. En effet, les lésions sont très étendues dans ce modèle, touchant particulièrement l'hippocampe, les cortex piriforme et entorhinal, l'amygdale, le thalamus, ainsi que le manteau cortical (Clifford et al., 1987 ; Roch et al., 2002). De plus, de nombreuses fonctions comportementales sont perturbées dans ce modèle, comme le montre mon travail de thèse (publications 1 et 2). Par conséquent, il est difficile de conclure sur l'effet d'une lésion donnée sur tel ou tel comportement (on ne fait que corrélérer les deux éléments). Il est également difficile de contrôler l'effet des déficits attentionnels, par exemple, sur les performances en mémoire spatiale, étant donné l'impact de l'attention sur le système de navigation spatiale (Kentros et al., 2004 ; Fenton et al., 2010).

Dans le cadre de la recherche préclinique, il est néanmoins appréciable de connaître les fonctions comportementales qui sont dégradées dans ce modèle. Cela permet de vérifier dans quelle mesure le traitement évalué permet, parmi l'ensemble des comorbidités associées à l'ELT, d'éviter l'apparition de la totalité de ces déficits comportementaux ou seulement d'une partie d'entre eux. Cette donnée est d'autant plus importante que les comorbidités comportementales et cognitives sont au centre des plaintes des patients (Fisher et al., 2000) et font l'objet des recommandations du NINDS (Kelley et al., 2009).

En ce qui concerne le métabolisme dans le modèle lithium-pilocarpine, mon travail de thèse a permis de préciser les structures affectées par les perturbations métaboliques neuronales (publication 3). Le précédent article publié par notre groupe dans ce domaine (Melo et al., 2005) avait révélé que ces perturbations affectaient l'ensemble de la « formation hippocampique », voire plus, puisque l'amygdale et le cortex piriforme avaient été inclus sous cette appellation. Cependant, les limitations techniques, dues à un poids d'échantillon nécessaire plus élevé dans les conditions de ce premier travail, ne permettaient pas de distinguer l'hippocampe à proprement parler des cortex entorhinal et piriforme, et de

## DISCUSSION

l'amygdale. Mon travail de thèse (publication 3) a permis de faire cette distinction, du moins entre l'hippocampe et les autres structures limbiques précitées. Nous avons donc montré que les déficits du métabolisme neuronal affectaient en fait principalement ces « autres » structures limbiques (cortex entorhinal et piriforme, et amygdale) et non l'hippocampe.

Certains groupes se sont récemment opposés à propos de l'implication de l'hippocampe dans les crises du modèle pilocarpine (Harvey et Sloviter, 2005 ; Toyoda et Buckmaster, 2013). Dans ce contexte, les résultats que nous avons obtenus viennent supporter l'idée d'une implication des structures limbiques davantage que de l'hippocampe dans l'ELT provoquée par l'EdM lithium-pilocarpine. Toutefois, ces éléments ne remettent pas en cause la pertinence de l'utilisation du modèle lithium-pilocarpine pour modéliser l'ELT. En effet, l'ELT mésiale avec SH et l'ELT sans SH doivent être différenciées. Le modèle lithium-pilocarpine n'est certainement pas particulièrement indiqué pour modéliser l'ELT mésiale avec SH du fait des lésions qui ne sont pas circonscrites à l'hippocampe dans le modèle, alors qu'elles prédominent dans la pathologie humaine (Blümcke et al., 2013). Néanmoins, les lésions qui affectent l'ELT dans la définition la plus large ont également été retrouvées dans d'autres régions cérébrales que l'hippocampe à proprement parler (Margerison et Corsellis, 1966 ; Du et al., 1993 ; Bernasconi et al., 2003). Il en va de même pour l'origine électrophysiologique des crises : le groupe de Patrick Chauvel a montré que les crises pouvaient être déclenchées à partir du cortex entorhinal, par exemple (Bartolomei et al., 2005). Dans ce cadre, le modèle lithium-pilocarpine, bien que comportant des lésions extra-temporales et étant caractérisé par de nombreuses crises motrices (donc généralisées ou secondairement généralisées), a sa place pour modéliser l'ELT dans sa définition la plus large.

Il serait particulièrement bénéfique de réaliser une comparaison entre les différents modèles les mieux à même de modéliser telle ou telle forme d'ELT. Cela permettrait de ne pas faire l'amalgame de résultats obtenus à partir de modèles différents par certains aspects et semblables par d'autres (pour revue voir Sloviter, 2005).

## 4. Quel est l'effet du carisbamate sur l'épileptogénèse ?

L'effet d'un traitement dans un modèle évolutif (de l'EdM à la phase de latence, puis à la phase chronique) est déterminé par le moment où celui-ci est administré, en plus de ses qualités intrinsèques. Dans le protocole que nous avons appliqué, le traitement démarrait au cours de l'évènement initial, puis était poursuivi pendant 6 jours de façon à agir également sur la période de latence, qui précède l'apparition des crises motrices spontanées. Il faut toutefois avoir à l'esprit que les crises motrices peuvent être une expression tardive de l'ELT dans le modèle, et survenir plusieurs jours après des crises non-motrices focalisées dans l'hippocampe, et qu'on ne peut détecter qu'avec des enregistrements de l'activité électrique cérébrale.

Dans le cas où nous intervenons pendant la phase aiguë et la période de latence, il est clair que l'effet du carisbamate n'est pas « modificateur de pathologie » (*disease-modifying*) au sens de la définition de l'épileptogénèse par Robert Sloviter, mais également « modificateur de l'évènement initial » (*insult-modifying*). Selon Sloviter, l'épileptogénèse est « un processus fini qui conduit aux premiers événements épileptiformes spontanés et récurrents qui perturbent le comportement [...] de quelque manière que ce soit, qu'ils soient cliniquement observables ou non » (Sloviter, 2013). Sémantiquement, l'intervention pendant l'épileptogénèse pourra avoir un effet « préventif sur la pathologie » (*disease prevention*), tandis que seule l'intervention après le début de la pathologie pourra avoir un effet « modificateur de la pathologie ». En revanche, si nous décidions d'intervenir au-delà de la période de latence (nous n'avons pas vérifié la présence de crises infracliniques), alors il serait possible que le carisbamate ait aussi un effet « modificateur de la pathologie », selon la même définition de l'épileptogénèse. Ceci reste cependant à vérifier.

La difficulté réside dans le fait que nous ne savons pas si l'effet que nous avons observé est uniquement dû à l'intervention précoce qui modifie l'évènement initial (ici l'EdM), ou uniquement dû à la poursuite du traitement pendant 6 jours, ou à l'action du traitement pendant toute cette période. Dans cette dernière hypothèse, il faudrait admettre une combinaison des deux effets. Pour répondre à cette question, il serait indispensable d'administrer le carisbamate selon différents protocoles : 1) uniquement 1h après le début de l'EdM (ou tout autre délai pendant l'EdM) ; 2) une fois que l'EdM est terminé (soit



## DISCUSSION

spontanément, soit grâce à un autre agent pharmacologique) et jusqu'à l'apparition des « premiers événements épileptiformes spontanés et récurrents » enregistrés ; 3) une fois que ces « premiers événements » ont été observés. Dans tous les cas, les effets du traitement devraient être observés au cours de la « phase chronique » et lorsque le traitement n'est plus administré.

Dans notre cas, notre groupe a montré que l'EdM n'est pas modifié immédiatement après l'administration du carisbamate (François et al., 2011). La sévérité de l'EdM (mesuré par les événements épileptiformes) pendant les trois premières heures est semblable dans les différents groupes (celui qui a reçu une faible dose de diazépam selon notre protocole standard, et ceux qui ont reçu du carisbamate indépendamment de leur devenir épileptique). Ces premières heures sont celles où l'essentiel des lésions se mettent en place (Fujikawa, 1996). Une diminution de la sévérité intervient seulement à partir de deux heures après l'administration du carisbamate (soit trois heures après le début de l'EdM) dans le groupe qui ne présentera pas par la suite de crises motrices. D'après ces résultats, le carisbamate agit sur l'EdM en soi et a donc un effet « modificateur de l'événement initial ». Cet effet n'exclut pas la possibilité d'une action durant la phase de latence. Toutefois, une telle action est impossible à déterminer avec notre protocole puisque la diminution de la sévérité de l'EdM peut avoir un effet indirect sur les modifications se produisant pendant la phase de latence. L'effet « modificateur de l'événement initial » est tout de même intéressant en soi, tout particulièrement dans le cadre du traitement des EdM résistants au traitement chez l'humain (voir plus loin, la partie sur l'application du carisbamate comme traitement de l'EdM).

## 5. Comment expliquer la différence entre les effets comportementaux et métaboliques du carisbamate ?

La différence entre les effets du carisbamate aux niveaux comportemental et métabolique est particulièrement inattendue. Bien que le fonctionnement de la mémoire et des autres fonctions cognitives soit préservé (publications 1 et 2), les perturbations métaboliques persistent dans le groupe qui ne présente pas de crises motrices après le traitement (publication 3). Le comportement et le métabolisme sont deux mesures fonctionnelles (contrairement à l'histologie, par exemple). On pourrait donc s'attendre à ce qu'elles varient dans le même sens, tout du moins pour l'hippocampe qui a une implication particulière dans la mémoire spatiale. A l'inverse, l'hippocampe des rats qui ne développent pas de crises motrices ne bénéficie pas d'une prévention des perturbations métaboliques présentes dans le modèle lithium-pilocarpine. On peut donc proposer au moins deux explications : 1) ces perturbations métaboliques n'ont pas d'impact direct sur le fonctionnement de la structure au niveau cognitif, ou 2) ces perturbations métaboliques sont compensées par un autre mécanisme que nous ne connaissons pas, et qui permettrait de maintenir les performances cognitives. Ces possibilités nécessitent d'autres expériences pour comprendre d'une part le lien entre métabolisme et comportement, et d'autre part le lien entre métabolisme et antiépileptogénèse.

## 6. Vers l'application du carisbamate comme traitement de l'état de mal

Le carisbamate n'a pas obtenu d'autorisation de mise sur le marché en tant qu'AE du fait d'une absence de différence d'effet sur les crises partielles par rapport au placebo dans deux études multicentriques (Sperling et al., 2010 ; Halford et al., 2011), et ceci en contradiction avec les résultats d'une étude précédente à peine plus ancienne (Faught et al., 2008). Ce résultat négatif n'exclut toutefois pas le carisbamate comme potentiel traitement de l'EdM.

Chez l'humain, l'EdM super-résistant constitue une urgence neurologique caractérisée par des crises continues qui ne sont pas stoppées par les traitements successivement administrés (benzodiazépines en priorité, puis AE, puis anesthésie générale en dernier recours) ; ces crises vont durer 24 heures ou plus (pour revue voir Shorvon et Ferlisi, 2011). A ce stade, de nouveaux traitements sont nécessaires pour limiter les dommages irréremédiables causés par l'EdM, ainsi que les autres conséquences de ce dernier (Legriel et al., 2010).

Dans le modèle lithium-pilocarpine (François et al., 2011), le carisbamate s'est montré particulièrement efficace pour diminuer la sévérité de l'EdM dans une sous-population de rats alors qu'il n'avait été administré qu'une heure après son déclenchement. En conséquence, le carisbamate pourrait être administré selon différents protocoles (par exemple 15, 30 ou 45 minutes après le début de l'EdM, ou encore 1h, 2h, ...) dans un modèle d'EdM résistant, comme la stimulation des voies perforantes pendant deux heures chez l'animal vigile (Fisher et al., 2004), ce qui pourrait donner des indications sur son efficacité éventuelle dans la prévention des séquelles sévères de l'EdM.

## 7. Vers l'amélioration de la recherche préclinique de l'antiépileptogénèse

Une recherche bibliographique sur les traitements testés contre l'épileptogénèse dans les modèles animaux met à jour l'impressionnante variabilité des protocoles utilisés (voir la partie sur les traitements épileptogènes de l'introduction, uniquement pour les modèles pilocarpine et lithium-pilocarpine). C'est pour cette raison que l'ILAE et l'AES (*American Epilepsy Society*) ont récemment proposé des recommandations sur les pratiques méthodologiques pour uniformiser et améliorer la qualité de la recherche préclinique (Galanopoulou et al., 2013).

La première de ces recommandations, essentielle à la démarche expérimentale, est la rigueur méthodologique. La reproductibilité est indispensable à l'évolution d'un traitement, qui montrait des effets prometteurs dans le cadre d'une recherche préclinique, vers une potentielle application en clinique humaine. Pour cela, tous les détails de l'expérimentation doivent être fidèlement décrits dans les publications, ce qui n'est pas toujours le cas.

De façon à avoir une possibilité d'être par la suite testé chez l'humain, le traitement antiépileptogène doit être administré dans une fenêtre thérapeutique adéquate par rapport au décours de la maladie chez l'humain (par exemple, dans un délai après l'événement initial qui soit cliniquement réaliste).

De plus, l'enregistrement vidéo-EEG en continu est nécessaire dans les études de traitement antiépileptogène, de façon à évaluer le plus précisément possible l'apparition ou non des crises spontanées (motrices ou non), la sévérité, de même que la fréquence et la durée des crises lorsqu'elles se développent.

## 8. Conclusion

Le travail réalisé au cours de cette thèse m'a permis de préciser et d'approfondir les connaissances disponibles sur le modèle lithium-pilocarpine et sur un traitement antiépileptogène, le carisbamate. En effet, mon travail complète les connaissances sur les capacités comportementales et cognitives dans un modèle reconnu d'ELT, le modèle lithium-pilocarpine. Il montre, en outre, que la plupart des fonctions cognitives testées sont déficitaires.

De plus, même s'il s'agit uniquement du carisbamate, ce travail enrichit la connaissance de l'effet d'un traitement administré précocement après le début de l'EdM sur les déficits comportementaux et cognitifs observés dans le modèle lithium-pilocarpine. Il montre également que l'ensemble des déficits sont évités chez les rats qui ne développent pas de crises motrices.

Enfin, ce travail a permis de connaître l'effet de ce traitement au niveau du métabolisme neuronal et astrocytaire, et de montrer que la prévention des troubles comportementaux et cognitifs n'est pas nécessairement liée à un impact sur les fonctions métaboliques.





BIBLIOGRAPHIE

A

- Abrahams S, Morris RG, Polkey CE, Jarosz JM, Cox TC, Graves M, Pickering A (1999) Hippocampal involvement in spatial and working memory: a structural MRI analysis of patients with unilateral mesial temporal lobe sclerosis. *Brain Cogn* 41:39-65.
- Abrahams S, Pickering A, Polkey CE, Morris RG (1997) Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation. *Neuropsychologia* 35:11-24.
- Altshuler L, Rausch R, Delrahim S, Kay J, Crandall P (1999) Temporal lobe epilepsy, temporal lobectomy, and major depression. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 11:436-443.
- Andre V, Dube C, Francois J, Leroy C, Rigoulot MA, Roch C, Namer IJ, Nehlig A (2007) Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia* 48 Suppl 5:41-47.
- Andre V, Ferrandon A, Marescaux C, Nehlig A (2001a) Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 47:99-117.
- Andre V, Marescaux C, Nehlig A, Fritschy JM (2001b) Alterations of hippocampal GABAergic system contribute to development of spontaneous recurrent seizures in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11:452-468.
- Andre V, Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A (2003) Long-term pregabalin treatment protects basal cortices and delays the occurrence of spontaneous seizures in the lithium-pilocarpine model in the rat. *Epilepsia* 44:893-903.



**B**

- Babb TL, Lieb JP, Brown WJ, Pretorius J, Crandall PH (1984) Distribution of pyramidal cell density and hyperexcitability in the epileptic human hippocampal formation. *Epilepsia* 25:721-728.
- Babb TL, Pretorius JK, Kupfer WR, Crandall PH (1989) Glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons are preserved in human epileptic hippocampus. *J Neurosci* 9:2562-2574.
- Banerjee PN, Filippi D, Allen Hauser W (2009) The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. *Epilepsy Res* 85:31-45.
- Bankstahl JP, Hoffmann K, Bethmann K, Loscher W (2008) Glutamate is critically involved in seizure-induced overexpression of P-glycoprotein in the brain. *Neuropharmacology* 54:1006-1016.
- Baram TZ, Gerth A, Schultz L (1997) Febrile seizures: an appropriate-aged model suitable for long-term studies. *Brain Res Dev Brain Res* 98:265-270.
- Bartolomei F, Khalil M, Wendling F, Sontheimer A, Regis J, Ranjeva J-P, Guye M, Chauvel P (2005) Entorhinal cortex involvement in human mesial temporal lobe epilepsy: an electrophysiologic and volumetric study. *Epilepsia* 46:677-687.
- Bell BD (2012) Route learning impairment in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 25:256-262.
- Ben-Ari Y, Lagowska J, Tremblay E, Le Gal La Salle G (1979) A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* 163:176-179.

## BIBLIOGRAPHIE

- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, van Emde Boas W, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshe SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE (2010) Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 51:676-685.
- Berg AT, Langfitt J, Shinnar S, Vickrey BG, Sperling MR, Walczak T, Bazil C, Pacia SV, Spencer SS (2003) How long does it take for partial epilepsy to become intractable? *Neurology* 60:186-190.
- Bergin PS, Thompson PJ, Baxendale SA, Fish DR, Shorvon SD (2000) Remote memory in epilepsy. *Epilepsia* 41:231-239.
- Bernasconi N, Bernasconi A, Andermann F, Dubeau F, Feindel W, Reutens DC (1999) Entorhinal cortex in temporal lobe epilepsy: a quantitative MRI study. *Neurology* 52:1870-1876.
- Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Andermann F, Dubeau F, Arnold DL (2000) Morphometric MRI analysis of the parahippocampal region in temporal lobe epilepsy. *Ann N Y Acad Sci* 911:495-500.
- Bernasconi N, Bernasconi A, Caramanos Z, Antel SB, Andermann F, Arnold DL (2003) Mesial temporal damage in temporal lobe epilepsy: a volumetric MRI study of the hippocampus, amygdala and parahippocampal region. *Brain* 126:462-469.
- Bernhardt BC, Bernasconi N, Kim H, Bernasconi A (2012) Mapping thalamocortical network pathology in temporal lobe epilepsy. *Neurology* 78:129-136.
- Blaabjerg M, Zimmer J (2007) The dentate mossy fibers: structural organization, development and plasticity. *Prog Brain Res* 163:85-107.

## BIBLIOGRAPHIE

- Blake RV, Wroe SJ, Breen EK, McCarthy RA (2000) Accelerated forgetting in patients with epilepsy: evidence for an impairment in memory consolidation. *Brain* 123 Pt 3:472-483.
- Blakemore CB, Falconer MA (1967) Long-term effects of anterior temporal lobectomy on certain cognitive functions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 30:364-367.
- Blumcke I, Beck H, Nitsch R, Eickhoff C, Scheffler B, Celio MR, Schramm J, Elger CE, Wolf HK, Wiestler OD (1996) Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:329-341.
- Blumcke I, Schewe JC, Normann S, Brustle O, Schramm J, Elger CE, Wiestler OD (2001) Increase of nestin-immunoreactive neural precursor cells in the dentate gyrus of pediatric patients with early-onset temporal lobe epilepsy. *Hippocampus* 11:311-321.
- Blumcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, Bernasconi N, Bien CG, Cendes F, Coras R, Cross JH, Jacques TS, Kahane P, Mathern GW, Miyata H, Moshe SL, Oz B, Ozkara C, Perucca E, Sisodiya S, Wiebe S, Spreafico R (2013) International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia* 54:1315-1329.
- Bocquillon P, Dujardin K, Betrouni N, Phalempin V, Houdayer E, Bourriez JL, Derambure P, Szurhaj W (2009) Attention impairment in temporal lobe epilepsy: a neurophysiological approach via analysis of the P300 wave. *Hum Brain Mapp* 30:2267-2277.
- Bohbot VD, Kalina M, Stepankova K, Spackova N, Petrides M, Nadel L (1998) Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex. *Neuropsychologia* 36:1217-1238.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bonilha L, Elm JJ, Edwards JC, Morgan PS, Hicks C, Lozar C, Rumboldt Z, Roberts DR, Rorden C, Eckert MA (2010) How common is brain atrophy in patients with medial temporal lobe epilepsy? *Epilepsia* 51:1774-1779.
- Boon P, Raedt R, de Herdt V, Wyckhuys T, Vonck K (2009) Electrical stimulation for the treatment of epilepsy. *Neurotherapeutics* 6:218-227.
- Brandt C, Nozadze M, Heuchert N, Rattka M, Loscher W (2010) Disease-modifying effects of phenobarbital and the NKCC1 inhibitor bumetanide in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 30:8602-8612.
- Buckley NJ, Bonner TI, Brann MR (1988) Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain. *J Neurosci* 8:4646-4652.
- Buckmaster PS, Ingram EA, Wen X (2009) Inhibition of the mammalian target of rapamycin signaling pathway suppresses dentate granule cell axon sprouting in a rodent model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29:8259-8269.
- Buzsaki G, Moser EI (2013) Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nature neuroscience* 16:130-138.

C

- Cardoso A, Carvalho LS, Lukyanova EA, Lukyanov NV (2009) Effects of repeated electroconvulsive shock seizures and pilocarpine-induced status epilepticus on emotional behavior in the rat. *Epilepsy Behav* 14:293-299.
- Carli M, Robbins TW, Evenden JL, Everitt BJ (1983) Effects of lesions to ascending noradrenergic neurones on performance of a 5-choice serial reaction task in rats; implications for theories of dorsal noradrenergic bundle function based on selective attention and arousal. *Behav Brain Res* 9:361-380.
- Cassel R, Kelche C, Lecourtier L, Cassel JC (2012) The match/mismatch of visuo-spatial cues between acquisition and retrieval contexts influences the expression of response vs. place memory in rats. *Behav Brain Res* 230:333-342.
- Cavanagh JB, Meyer A (1956) Aetiological aspects of Ammon's horn sclerosis associated with temporal lobe epilepsy. *Br Med J* 2:1403-1407.
- Cavdar S, Onat FY, Cakmak YO, Yananli HR, Gulcebi M, Aker R (2008) The pathways connecting the hippocampal formation, the thalamic reuniens nucleus and the thalamic reticular nucleus in the rat. *J Anat* 212:249-256.
- Cendes F, Andermann F, Dubeau F, Gloor P, Evans A, Jones-Gotman M, Olivier A, Andermann E, Robitaille Y, Lopes-Cendes I, et al. (1993) Early childhood prolonged febrile convulsions, atrophy and sclerosis of mesial structures, and temporal lobe epilepsy: an MRI volumetric study. *Neurology* 43:1083-1087.
- Chauviere L, Rafrafi N, Thinus-Blanc C, Bartolomei F, Esclapez M, Bernard C (2009) Early deficits in spatial memory and theta rhythm in experimental temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29:5402-5410.

## BIBLIOGRAPHIE

- Cheung H, Kamp D, Harris E (1992) An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neuronal voltage-activated sodium channels. *Epilepsy Res* 13:107-112.
- Cholvin T, Loureiro M, Cassel R, Cosquer B, Geiger K, De Sa Nogueira D, Raingard H, Robelin L, Kelche C, Pereira de Vasconcelos A, Cassel JC (2013) The ventral midline thalamus contributes to strategy shifting in a memory task requiring both prefrontal cortical and hippocampal functions. *J Neurosci* 33:8772-8783.
- Chu K, Jung KH, Lee ST, Kim JH, Kang KM, Kim HK, Lim JS, Park HK, Kim M, Lee SK, Roh JK (2008) Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus. *Epilepsia* 49:1723-1732.
- Chwiej J, Janeczko K, Marciszko M, Czyzycki M, Rickers K, Setkiewicz Z (2010) Neuroprotective action of FK-506 (tacrolimus) after seizures induced with pilocarpine: quantitative and topographic elemental analysis of brain tissue. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 15:283-289.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF (1987) The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23:953-968.
- Crespel A, Rigau V, Coubes P, Rousset MC, de Bock F, Okano H, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Lerner-Natoli M (2005) Increased number of neural progenitors in human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 19:436-450.

**D**

- Danober L, Deransart C, Depaulis A, Vergnes M, Marescaux C (1998) Pathophysiological mechanisms of genetic absence epilepsy in the rat. *Prog Neurobiol* 55:27-57.
- De Herdt V, Boon P, Ceulemans B, Hauman H, Lagae L, Legros B, Sadzot B, Van Bogaert P, van Rijckevorsel K, Verhelst H, Vonck K (2007) Vagus nerve stimulation for refractory epilepsy: a Belgian multicenter study. *Eur J Paediatr Neurol* 11:261-269.
- de Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ, Spencer DD (1989) Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 495:387-395.
- de Sales Santos IM, Feitosa CM, de Freitas RM (2010) Pilocarpine-induced seizures produce alterations on choline acetyltransferase and acetylcholinesterase activities and deficit memory in rats. *Cellular and molecular neurobiology* 30:569-575.
- DeLorenzo RJ, Hauser WA, Towne AR, Boggs JG, Pellock JM, Penberthy L, Garnett L, Fortner CA, Ko D (1996) A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* 46:1029-1035.
- DeLorenzo RJ, Morris TA, Blair RE, Wallace M, Razvi B (2002) Topiramate is both neuroprotective and antiepileptogenic in the pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsia* 43 Suppl 7:1-351 (abstract).
- Deshpande LS, Nagarkatti N, Sombati S, DeLorenzo RJ (2008a) The novel antiepileptic drug carisbamate (RWJ 333369) is effective in inhibiting spontaneous recurrent seizure discharges and blocking sustained repetitive firing in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 79:158-165.
- Deshpande LS, Nagarkatti N, Ziobro JM, Sombati S, DeLorenzo RJ (2008b) Carisbamate prevents the development and expression of spontaneous recurrent epileptiform discharges and is neuroprotective in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 49:1795-1802.

## BIBLIOGRAPHIE

- Detour J, Elbayed K, Piotto M, Moussallieh FM, Nehlig A, Namer IJ (2011) Ultrafast in vivo microwave irradiation for enhanced metabolic stability of brain biopsy samples during HRMAS NMR analysis. *J Neurosci Methods* 201:89-97.
- Detour J, Schroeder H, Desor D, Nehlig A (2005) A 5-month period of epilepsy impairs spatial memory, decreases anxiety, but spares object recognition in the lithium-pilocarpine model in adult rats. *Epilepsia* 46:499-508.
- Dlugos DJ, Sammel MD, Strom BL, Farrar JT (2001) Response to first drug trial predicts outcome in childhood temporal lobe epilepsy. *Neurology* 57:2259-2264.
- Dong GZ, Kameyama K, Rincken A, Haga T (1995) Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. *J Pharmacol Exp Ther* 274:378-384.
- Dos Santos JG, Jr., Longo BM, Blanco MM, Menezes de Oliveira MG, Mello LE (2005) Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Res* 1066:37-48.
- Dreifuss S, Vingerhoets FJ, Lazeyras F, Andino SG, Spinelli L, Delavelle J, Seeck M (2001) Volumetric measurements of subcortical nuclei in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 57:1636-1641.
- Du F, Eid T, Lothman EW, Kohler C, Schwarcz R (1995) Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 15:6301-6313.
- Du F, Whetsell WO, Jr., Abou-Khalil B, Blumenkopf B, Lothman EW, Schwarcz R (1993) Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 16:223-233.



## BIBLIOGRAPHIE

### E

- Eastman CL, Verley DR, Fender JS, Stewart TH, Nov E, Curia G, D'Ambrosio R (2011) Antiepileptic and antiepileptogenic performance of carisbamate after head injury in the rat: blind and randomized studies. *J Pharmacol Exp Ther* 336:779-790.
- Eichenbaum H (2000) A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1:41-50.
- Einat H, Kofman O, Itkin O, Lewitan RJ, Belmaker RH (1998) Augmentation of lithium's behavioral effect by inositol uptake inhibitors. *J Neural Transm* 105:31-38.
- Elger CE, Helmstaedter C, Kurthen M (2004) Chronic epilepsy and cognition. *Lancet Neurol* 3:663-672.
- Ende GR, Laxer KD, Knowlton RC, Matson GB, Schuff N, Fein G, Weiner MW (1997) Temporal lobe epilepsy: bilateral hippocampal metabolite changes revealed at proton MR spectroscopic imaging. *Radiology* 202:809-817.
- Engel J, Jr. (1996) Introduction to temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 26:141-150.
- Engel J, Jr., McDermott MP, Wiebe S, Langfitt JT, Stern JM, Dewar S, Sperling MR, Gardiner I, Erba G, Fried I, Jacobs M, Vinters HV, Mintzer S, Kieburtz K (2012) Early surgical therapy for drug-resistant temporal lobe epilepsy: a randomized trial. *JAMA* 307:922-930.
- Eriksson KJ, Koivikko MJ (1997) Status epilepticus in children: aetiology, treatment, and outcome. *Developmental medicine and child neurology* 39:652-658.
- Errington AC, Stohr T, Heers C, Lees G (2008) The investigational anticonvulsant lacosamide selectively enhances slow inactivation of voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol* 73:157-169.

## BIBLIOGRAPHIE

Evans MS, Zorumski CF, Clifford DB (1990) Lithium enhances neuronal muscarinic excitation by presynaptic facilitation. *Neuroscience* 38:457-468.

**F**

- Fahrner A, Kann G, Flubacher A, Heinrich C, Freiman TM, Zentner J, Frotscher M, Haas CA (2007) Granule cell dispersion is not accompanied by enhanced neurogenesis in temporal lobe epilepsy patients. *Experimental neurology* 203:320-332.
- Faught E, Holmes GL, Rosenfeld WE, Novak G, Neto W, Greenspan A, Schmitt J, Yuen E, Reines S, Haas M (2008) Randomized, controlled, dose-ranging trial of carisbamate for partial-onset seizures. *Neurology* 71:1586-1593.
- Fedio P, Mirsky AF (1969) Selective intellectual deficits in children with temporal lobe or centrencephalic epilepsy. *Neuropsychologia* 7:287-300.
- Fenton AA, Lytton WW, Barry JM, Lenck-Santini PP, Zinyuk LE, Kubik S, Bures J, Poucet B, Muller RU, Olypher AV (2010) Attention-like modulation of hippocampus place cell discharge. *J Neurosci* 30:4613-4625.
- Fernandes MJ, Dube C, Boyet S, Marescaux C, Nehlig A (1999) Correlation between hypermetabolism and neuronal damage during status epilepticus induced by lithium and pilocarpine in immature and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:195-209.
- Fisher A, Wang X, Cock HR, Thom M, Patsalos PN, Walker MC (2004) Synergism between topiramate and budipine in refractory status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 45:1300-1307.
- Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46:470-472.
- Fisher RS, Vickrey BG, Gibson P, Hermann B, Penovich P, Scherer A, Walker S (2000) The impact of epilepsy from the patient's perspective I. Descriptions and subjective perceptions. *Epilepsy Res* 41:39-51.

## BIBLIOGRAPHIE

- Francois J, Boehrer A, Nehlig A (2008) Effects of carisbamate (RWJ-333369) in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS. *Epilepsia* 49:393-399.
- Francois J, Germe K, Ferrandon A, Koning E, Nehlig A (2011) Carisbamate has powerful disease-modifying effects in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacology* 61:313-328.
- Francois J, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A (2006) The combination of topiramate and diazepam is partially neuroprotective in the hippocampus but not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 72:147-163.
- French J, Smith M, Faught E, Brown L (1999) Practice advisory: The use of felbamate in the treatment of patients with intractable epilepsy: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. *Neurology* 52:1540-1545.
- French JA, Williamson PD, Thadani VM, Darcey TM, Mattson RH, Spencer SS, Spencer DD (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: I. Results of history and physical examination. *Annals of neurology* 34:774-780.
- Frisch C, Kudin AP, Elger CE, Kunz WS, Helmstaedter C (2007) Amelioration of water maze performance deficits by topiramate applied during pilocarpine-induced status epilepticus is negatively dose-dependent. *Epilepsy Res* 73:173-180.
- Fujikawa DG (1996) The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res* 725:11-22.
- Fujikawa DG (2005) Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy Behav* 7 Suppl 3:S3-11.

## BIBLIOGRAPHIE

Furtado Mde A, Braga GK, Oliveira JA, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N (2002) Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia* 43 Suppl 5:37-39.

**G**

- Gaillard WD, Fazilat S, White S, Malow B, Sato S, Reeves P, Herscovitch P, Theodore WH (1995) Interictal metabolism and blood flow are uncoupled in temporal lobe cortex of patients with complex partial epilepsy. *Neurology* 45:1841-1847.
- Galanopoulou AS, Kokaia M, Loeb JA, Nehlig A, Pitkanen A, Rogawski MA, Staley KJ, Whittemore VH, Edward Dudek F (2013) Epilepsy therapy development: technical and methodologic issues in studies with animal models. *Epilepsia* 54 Suppl 4:13-23.
- Gao F, Liu Y, Li X, Wang Y, Wei D, Jiang W (2012) Fingolimod (FTY720) inhibits neuroinflammation and attenuates spontaneous convulsions in lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rat model. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 103:187-196.
- Gleissner U, Helmstaedter C, Elger CE (1998) Right hippocampal contribution to visual memory: a presurgical and postsurgical study in patients with temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:665-669.
- Glikmann-Johnston Y, Saling MM, Chen J, Cooper KA, Beare RJ, Reutens DC (2008) Structural and functional correlates of unilateral mesial temporal lobe spatial memory impairment. *Brain* 131:3006-3018.
- Goffin K, Nissinen J, Van Laere K, Pitkanen A (2007) Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol* 205:501-505.
- Gould TD, Quiroz JA, Singh J, Zarate CA, Manji HK (2004) Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol Psychiatry* 9:734-755.
- Grabenstatter HL, Dudek FE (2008) A new potential AED, carisbamate, substantially reduces spontaneous motor seizures in rats with kainate-induced epilepsy. *Epilepsia* 49:1787-1794.

## BIBLIOGRAPHIE

Gunthorpe MJ, Large CH, Sankar R (2012) The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K<sup>+</sup> channel opener for the treatment of epilepsy. *Epilepsia* 53:412-424.

Guye M, Regis J, Tamura M, Wendling F, McGonigal A, Chauvel P, Bartolomei F (2006) The role of corticothalamic coupling in human temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology* 129:1917-1928.

**H**

- Haas CA, Dudeck O, Kirsch M, Huszka C, Kann G, Pollak S, Zentner J, Frotscher M (2002) Role for reelin in the development of granule cell dispersion in temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 22:5797-5802.
- Hader WJ, Tellez-Zenteno J, Metcalfe A, Hernandez-Ronquillo L, Wiebe S, Kwon CS, Jette N (2013) Complications of epilepsy surgery: a systematic review of focal surgical resections and invasive EEG monitoring. *Epilepsia* 54:840-847.
- Halford JJ, Ben-Menachem E, Kwan P, Ness S, Schmitt J, Eerdekens M, Novak G (2011) A randomized, double-blind, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and tolerability of adjunctive carisbamate treatment in patients with partial-onset seizures. *Epilepsia* 52:816-825.
- Hallcher LM, Sherman WR (1980) The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem* 255:10896-10901.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM (1997) Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13311-13316.
- Harvey AS, Berkovic SF, Wrennall JA, Hopkins IJ (1997) Temporal lobe epilepsy in childhood: clinical, EEG, and neuroimaging findings and syndrome classification in a cohort with new-onset seizures. *Neurology* 49:960-968.
- Harvey BD, Sloviter RS (2005) Hippocampal granule cell activity and c-Fos expression during spontaneous seizures in awake, chronically epileptic, pilocarpine-treated rats: implications for hippocampal epileptogenesis. *J Comp Neurol* 488:442-463.
- Hauser WA, Annegers JF, Rocca WA (1996) Descriptive epidemiology of epilepsy: contributions of population-based studies from Rochester, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 71:576-586.



## BIBLIOGRAPHIE

- Helmstaedter C, Pohl C, Hufnagel A, Elger CE (1991) Visual learning deficits in nonresected patients with right temporal lobe epilepsy. *Cortex* 27:547-555.
- Henry TR, Chupin M, Lehericy S, Strupp JP, Sikora MA, Sha ZY, Ugurbil K, Van de Moortele PF (2011) Hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: findings at 7 T(1). *Radiology* 261:199-209.
- Hermann BP, Bayless K, Hansen R, Parrish J, Seidenberg M (2005) Cerebellar atrophy in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy & behavior : E&B* 7:279-287.
- Hermann BP, Seidenberg M, Schoenfeld J, Davies K (1997) Neuropsychological characteristics of the syndrome of mesial temporal lobe epilepsy. *Archives of neurology* 54:369-376.
- Hesdorffer DC, Logroscino G, Cascino G, Annegers JF, Hauser WA (1998) Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. *Ann Neurol* 44:908-912.
- Honchar MP, Olney JW, Sherman WR (1983) Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220:323-325.
- Hort J, Brozek G, Mares P, Langmeier M, Komarek V (1999) Cognitive functions after pilocarpine-induced status epilepticus: changes during silent period precede appearance of spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia* 40:1177-1183.
- Houser CR (1990) Granule cell dispersion in the dentate gyrus of humans with temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 535:195-204.
- Houser CR, Miyashiro JE, Swartz BE, Walsh GO, Rich JR, Delgado-Escueta AV (1990) Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. *J Neurosci* 10:267-282.

## BIBLIOGRAPHIE

- Huang X, Zhang H, Yang J, Wu J, McMahon J, Lin Y, Cao Z, Gruenthal M, Huang Y (2010) Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. *Neurobiol Dis* 40:193-199.
- Hudson JM, Flowers KA, Walster KL (2013) Attentional control in patients with temporal lobe epilepsy. *J Neuropsychol*. 2013. Epub Jan 16. doi: 10.1111/jnp.12008.
- Hudson LP, Munoz DG, Miller L, McLachlan RS, Girvin JP, Blume WT (1993) Amygdaloid sclerosis in temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol* 33:622-631.

**I**

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1981) Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 22:489-501.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy (1989) Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 30:389-399.

ILAE (1997) ILAE Commission Report. The epidemiology of the epilepsies: future directions. International League Against Epilepsy. *Epilepsia* 38:614-618.

Inostroza M, Cid E, Brotons-Mas J, Gal B, Aivar P, Uzcategui YG, Sandi C, Menendez de la Prida L (2011) Hippocampal-dependent spatial memory in the water maze is preserved in an experimental model of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS One* 6:e22372.

Inostroza M, Cid E, Menendez de la Prida L, Sandi C (2012) Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS One* 7:e38959.

**J**

- Javidan M (2012) Electroencephalography in mesial temporal lobe epilepsy: a review. *Epilepsy research and treatment* 2012:637430.
- Jones DM, Esmail N, Maren S, Macdonald RL (2002) Characterization of pharmacoresistance to benzodiazepines in the rat Li-pilocarpine model of status epilepticus. *Epilepsy Res* 50:301-312.
- Jope RS, Gu X (1991) Seizures increase acetylcholine and choline concentrations in rat brain regions. *Neurochem Res* 16:1219-1226.
- Jope RS, Morrisett RA, Snead OC (1986) Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol* 91:471-480.
- Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK (2006) Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 23:237-246.
- Jutila L, Ylinen A, Partanen K, Alafuzoff I, Mervaala E, Partanen J, Vapalahti M, Vainio P, Pitkanen A (2001) MR volumetry of the entorhinal, perirhinal, and temporopolar cortices in drug-refractory temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1490-1501.

**K**

- Kelley MS, Jacobs MP, Lowenstein DH (2009) The NINDS epilepsy research benchmarks. *Epilepsia* 50:579-582.
- Kentros CG, Agnihotri NT, Streater S, Hawkins RD, Kandel ER (2004) Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron* 42:283-295.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS, National Comorbidity Survey R (2003) The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 289:3095-3105.
- Klitgaard HV, Matagne AC, Vanneste-Goemaere J, Margineanu DG (2001) Effects of prolonged administration of levetiracetam on pilocarpine-induced epileptogenesis in rat. *Epilepsia* 42 Suppl 7:1-304 (abstract).
- Knowlton RC, Laxer KD, Klein G, Sawrie S, Ende G, Hawkins RA, Aassar OS, Soohoo K, Wong S, Barbaro N (2001) In vivo hippocampal glucose metabolism in mesial temporal lobe epilepsy. *Neurology* 57:1184-1190.
- Korff CM, Scheffer IE (2013) Epilepsy classification: a cycle of evolution and revolution. *Curr Opin Neurol* 26:163-167.
- Kubova H, Mares P, Suchomelova L, Brozek G, Druga R, Pitkanen A (2004) Status epilepticus in immature rats leads to behavioural and cognitive impairment and epileptogenesis. *Eur J Neurosci* 19:3255-3265.
- Kwan P, Brodie MJ (2000) Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med* 342:314-319.

## BIBLIOGRAPHIE

### L

- Lecourtier L, Antal MC, Cosquer B, Schumacher A, Samama B, Angst MJ, Ferrandon A, Koning E, Cassel JC, Nehlig A (2012) Intact neurobehavioral development and dramatic impairments of procedural-like memory following neonatal ventral hippocampal lesion in rats. *Neuroscience* 207:110-123.
- Lee CY, Lee ML, Shih CC, Liou HH (2011) Carisbamate (RWJ-333369) inhibits glutamate transmission in the granule cell of the dentate gyrus. *Neuropharmacology* 61:1239-1247.
- Legriel S, Azoulay E, Resche-Rigon M, Lemiale V, Mourvillier B, Kouatchet A, Troche G, Wolf M, Galliot R, Dessertaine G, Combaut D, Jacobs F, Beuret P, Megarbane B, Carli P, Lambert Y, Bruneel F, Bedos JP (2010) Functional outcome after convulsive status epilepticus. *Critical care medicine* 38:2295-2303.
- Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA (1990) Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 14:511-517.
- Leite JP, Cavalheiro EA (1995) Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Res* 20:93-104.
- Lendt M, Helmstaedter C, Elger CE (1999) Pre- and postoperative neuropsychological profiles in children and adolescents with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 40:1543-1550.
- Lippert B, Metcalf BW, Jung MJ, Casara P (1977) 4-amino-hex-5-enoic acid, a selective catalytic inhibitor of 4-aminobutyric-acid aminotransferase in mammalian brain. *Eur J Biochem* 74:441-445.
- Litt B, Esteller R, Echaz J, D'Alessandro M, Shor R, Henry T, Pennell P, Epstein C, Bakay R, Dichter M, Vachtsevanos G (2001) Epileptic seizures may begin hours in advance of clinical onset: a report of five patients. *Neuron* 30:51-64.

## BIBLIOGRAPHIE

- Liu Y, Yohrling GJ, Wang Y, Hutchinson TL, Brenneman DE, Flores CM, Zhao B (2009) Carisbamate, a novel neuromodulator, inhibits voltage-gated sodium channels and action potential firing of rat hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 83:66-72.
- Liu YW, Curtis MA, Gibbons HM, Mee EW, Bergin PS, Teoh HH, Connor B, Dragunow M, Faull RL (2008) Doublecortin expression in the normal and epileptic adult human brain. *Eur J Neurosci* 28:2254-2265.
- Longo BM, Mello LE (1997) Blockade of pilocarpine- or kainate-induced mossy fiber sprouting by cycloheximide does not prevent subsequent epileptogenesis in rats. *Neurosci Lett* 226:163-166.
- Loscher W (2002) Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* 16:669-694.
- Loscher W, Brandt C (2010) Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research. *Pharmacol Rev* 62:668-700.
- Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH, McIntosh TK (1992) Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* 12:4846-4853.
- Lynch BA, Lambeng N, Nocka K, Kensel-Hammes P, Bajjalieh SM, Matagne A, Fuks B (2004) The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9861-9866.

**M**

- Ma L, Cui XL, Wang Y, Li XW, Yang F, Wei D, Jiang W (2012) Aspirin attenuates spontaneous recurrent seizures and inhibits hippocampal neuronal loss, mossy fiber sprouting and aberrant neurogenesis following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Brain Res* 1469:103-113.
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- Magloczky Z, Wittner L, Borhegyi Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF (2000) Changes in the distribution and connectivity of interneurons in the epileptic human dentate gyrus. *Neuroscience* 96:7-25.
- Main MJ, Cryan JE, Dupere JR, Cox B, Clare JJ, Burbidge SA (2000) Modulation of KCNQ2/3 potassium channels by the novel anticonvulsant retigabine. *Mol Pharmacol* 58:253-262.
- Mamidi RN, Mannens G, Annaert P, Hendrickx J, Goris I, Bockx M, Janssen CG, Kao M, Kelley MF, Meuldermans W (2007) Metabolism and excretion of RWJ-333369 [1,2-ethanediol, 1-(2-chlorophenyl)-, 2-carbamate, (S)-] in mice, rats, rabbits, and dogs. *Drug Metab Dispos* 35:566-575.
- Margerison JH, Corsellis JA (1966) Epilepsy and the temporal lobes. A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. *Brain* 89:499-530.
- Marinho MM, de Sousa FC, de Bruin VM, Vale MR, Viana GS (1998) Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem Int* 33:299-306.
- Marques CM, Caboclo LO, da Silva TI, Noffs MH, Carrete H, Jr., Lin K, Lin J, Sakamoto AC, Yacubian EM (2007) Cognitive decline in temporal lobe epilepsy due to unilateral hippocampal sclerosis. *Epilepsy Behav* 10:477-485.



## BIBLIOGRAPHIE

- Mathern GW, Adelson PD, Cahan LD, Leite JP (2002) Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. *Prog Brain Res* 135:237-251.
- Mathern GW, Babb TL, Vickrey BG, Melendez M, Pretorius JK (1994) Traumatic compared to non-traumatic clinical-pathologic associations in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy research* 19:129-139.
- Meldrum BS, Chapman AG (1999) Basic mechanisms of gabitril (tiagabine) and future potential developments. *Epilepsia* 40 Suppl 9:S2-6.
- Mello LE, Cavaleiro EA, Tan AM, Kupfer WR, Pretorius JK, Babb TL, Finch DM (1993) Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia* 34:985-995.
- Melo TM, Nehlig A, Sonnewald U (2005) Metabolism is normal in astrocytes in chronically epileptic rats: a <sup>13</sup>C NMR study of neuronal-glia interactions in a model of temporal lobe epilepsy. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:1254-1264.
- Melo TM, Sonnewald U, Bastholm IA, Nehlig A (2007) Astrocytes may play a role in the etiology of absence epilepsy: a comparison between immature GAERS not yet expressing seizures and adults. *Neurobiol Dis* 28:227-235.
- Meyer A, Beck E (1955) The hippocampal formation in temporal lobe epilepsy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 48:457-462.
- Meyer A, Falconer MA, Beck E (1954) Pathological findings in temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 17:276-285.
- Mihaly A, Bozoky B (1984) Immunohistochemical localization of extravasated serum albumin in the hippocampus of human subjects with partial and generalized epilepsies and epileptiform convulsions. *Acta Neuropathol* 65:25-34.

## BIBLIOGRAPHIE

- Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 12:239-260.
- Motte J, Fernandes MJ, Baram TZ, Nehlig A (1998) Spatial and temporal evolution of neuronal activation, stress and injury in lithium-pilocarpine seizures in adult rats. *Brain Res* 793:61-72.
- Mueller SG, Suhy J, Laxer KD, Flenniken DL, Axelrad J, Capizzano AA, Weiner MW (2002) Reduced extrahippocampal NAA in mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 43:1210-1216.
- Mueller SG, Trabesinger AH, Boesiger P, Wieser HG (2001) Brain glutathione levels in patients with epilepsy measured by in vivo (1)H-MRS. *Neurology* 57:1422-1427.
- Muhlert N, Grunewald RA, Hunkin NM, Reuber M, Howell S, Reynders H, Isaac CL (2011) Accelerated long-term forgetting in temporal lobe but not idiopathic generalised epilepsy. *Neuropsychologia* 49:2417-2426.

## BIBLIOGRAPHIE

### N

- Nadam J, Navarro F, Sanchez P, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot JM, Morales A, Ryvlin P, Bezin L (2007) Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 25:412-426.
- Nagao T, Alonso A, Avoli M (1996) Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. *Neuroscience* 72:399-408.
- Nathanson NM (1987) Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. *Annu Rev Neurosci* 10:195-236.
- Natsume J, Bernasconi N, Andermann F, Bernasconi A (2003) MRI volumetry of the thalamus in temporal, extratemporal, and idiopathic generalized epilepsy. *Neurology* 60:1296-1300.
- Neal EG, Chaffe H, Schwartz RH, Lawson MS, Edwards N, Fitzsimmons G, Whitney A, Cross JH (2008) The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 7:500-506.
- Nehlig A, Vergnes M, Marescaux C, Boyet S, Lannes B (1991) Local cerebral glucose utilization in rats with petit mal-like seizures. *Ann Neurol* 29:72-77.
- Nehlig A, Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD (2004) Selective uptake of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular <sup>14</sup>C-trajectory combined with immunohistochemistry. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1004-1014.
- Ngugi AK, Kariuki SM, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander JW, Newton CR (2011) Incidence of epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurology* 77:1005-1012.
- Nissinen J, Halonen T, Koivisto E, Pitkanen A (2000) A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. *Epilepsy Res* 38:177-205.

## BIBLIOGRAPHIE

Novak GP, Kelley M, Zannikos P, Klein B (2007) Carisbamate (RWJ-333369).  
Neurotherapeutics 4:106-109.

## BIBLIOGRAPHIE

### O

- O'Brien TJ, Newton MR, Cook MJ, Berlangieri SU, Kilpatrick C, Morris K, Berkovic SF (1997) Hippocampal atrophy is not a major determinant of regional hypometabolism in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 38:74-80.
- Oddo S, Solis P, Consalvo D, Giagante B, Silva W, D'Alessio L, Centurion E, Saidon P, Kochen S (2003) Mesial temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis: cognitive function assessment in Hispanic patients. *Epilepsy Behav* 4:717-722.
- Olton DS, Samuelson RJ (1976) Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J Exp Psychol: Animal Behav Proc* 2:97-116.
- Onat FY, van Luijtelaaar G, Nehlig A, Snead OC, 3rd (2013) The involvement of limbic structures in typical and atypical absence epilepsy. *Epilepsy Res* 103:111-123.
- Ono T, Moshe SL, Galanopoulou AS (2011) Carisbamate acutely suppresses spasms in a rat model of symptomatic infantile spasms. *Epilepsia* 52:1678-1684.
- Ormandy GC, Song L, Jope RS (1991) Analysis of the convulsant-potentiating effects of lithium in rats. *Exp Neurol* 111:356-361.
- Oyegbile TO, Bayless K, Dabbs K, Jones J, Rutecki P, Pierson R, Seidenberg M, Hermann B (2011) The nature and extent of cerebellar atrophy in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 52:698-706.
- Oyegbile TO, Dow C, Jones J, Bell B, Rutecki P, Sheth R, Seidenberg M, Hermann BP (2004) The nature and course of neuropsychological morbidity in chronic temporal lobe epilepsy. *Neurology* 62:1736-1742.

**P**

- Paradiso B, Marconi P, Zucchini S, Berto E, Binaschi A, Bozac A, Buzzi A, Mazzuferi M, Magri E, Navarro Mora G, Rodi D, Su T, Volpi I, Zanetti L, Marzola A, Manservigi R, Fabene PF, Simonato M (2009) Localized delivery of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor reduces spontaneous seizures in an epilepsy model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7191-7196.
- Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 24:525-529.
- Pereira AG, Portuguese MW, da Costa DI, Azambuja LS, Marroni SP, da Costa JC, Pereira-Filho AA (2011) Route learning performance: is it a hippocampus function? *Cognitive and behavioral neurology : official journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology* 24:4-10.
- Persinger MA, Bureau YR, Kostakos M, Peredery O, Falter H (1993) Behaviors of rats with insidious, multifocal brain damage induced by seizures following single peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol Behav* 53:849-866.
- Persinger MA, Koren SA (1998) Persistent elevation of nocturnal activity in rodents following apparent recovery from lithium/pilocarpine-induced limbic seizures. *Percept Mot Skills* 86:1243-1248.
- Petralia RS, Wang YX, Wenthold RJ (1994a) The NMDA receptor subunits NR2A and NR2B show histological and ultrastructural localization patterns similar to those of NR1. *J Neurosci* 14:6102-6120.

## BIBLIOGRAPHIE

- Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ (1994b) Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* 14:667-696.
- Petroff OA, Errante LD, Rothman DL, Kim JH, Spencer DD (2002) Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus. *Epilepsia* 43:703-710.
- Petroff OA, Pleban LA, Spencer DD (1995) Symbiosis between in vivo and in vitro NMR spectroscopy: the creatine, N-acetylaspartate, glutamate, and GABA content of the epileptic human brain. *Magn Reson Imaging* 13:1197-1211.
- Pitkanen A, Lukasiuk K (2011) Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. *Lancet Neurol* 10:173-186.
- Polascheck N, Bankstahl M, Loscher W (2010) The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 224:219-233.
- Pol-Bodetto S, Jeltsch-David H, Lecourtier L, Rusnac N, Mam-Lam-Fook C, Cosquer B, Geiger K, Cassel JC (2011) The double-H maze test, a novel, simple, water-escape memory task: acquisition, recall of recent and remote memory, and effects of systemic muscarinic or NMDA receptor blockade during training. *Behav Brain Res* 218:138-151.

**R**

- Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32:281-294.
- Rajna P, Clemens B, Csibri E, Dobos E, Geregely A, Gottschal M, Gyorgy I, Horvath A, Horvath F, Mezofi L, Velkey I, Veres J, Wagner E (1997) Hungarian multicentre epidemiologic study of the warning and initial symptoms (prodrome, aura) of epileptic seizures. *Seizure* 6:361-368.
- Rho JM, Donevan SD, Rogawski MA (1994) Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: opposing effects on N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acidA receptors. *Ann Neurol* 35:229-234.
- Rho JM, Stafstrom CE (2012) The ketogenic diet: what has science taught us? *Epilepsy Res* 100:210-217.
- Rice AC, Floyd CL, Lyeth BG, Hamm RJ, DeLorenzo RJ (1998) Status epilepticus causes long-term NMDA receptor-dependent behavioral changes and cognitive deficits. *Epilepsia* 39:1148-1157.
- Rigau V, Morin M, Rousset M-C, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, Picot M-C, Baldy-Moulinier M, Bockaert J, Crespel A, Lerner-Natoli M (2007) Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology* 130:1942-1956.
- Rigoulot MA, Koning E, Ferrandon A, Nehlig A (2004) Neuroprotective properties of topiramate in the lithium-pilocarpine model of epilepsy. *J Pharmacol Exp Ther* 308:787-795.
- Rocca WA, Sharbrough FW, Hauser WA, Annegers JF, Schoenberg BS (1987) Risk factors for generalized tonic-clonic seizures: a population-based case-control study in Rochester, Minnesota. *Neurology* 37:1315-1322.



## BIBLIOGRAPHIE

Roch C, Leroy C, Nehlig A, Namer IJ (2002) Magnetic resonance imaging in the study of the lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in adult rats. *Epilepsia* 43:325-335.

Rogawski MA, Loscher W (2004) The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nat Rev Neurosci* 5:553-564.

**S**

- Sanchez-Gistau V, Pintor L, Sugranyes G, Bailles E, Carreno M, Donaire A, Boget T, Setoain X, Bargallo N, Rumia J (2010) Prevalence of interictal psychiatric disorders in patients with refractory temporal and extratemporal lobe epilepsy in Spain. A comparative study. *Epilepsia* 51:1309-1313.
- Sander JW (2003) The epidemiology of epilepsy revisited. *Curr Opin Neurol* 16:165-170.
- Sano K, Malamud N (1953) Clinical significance of sclerosis of the cornu ammonis: ictal psychic phenomena. *AMA archives of neurology and psychiatry* 70:40-53.
- Schumacher A, de Vasconcelos AP, Lecourtier L, Moser A, Cassel JC (2011) Electrical high frequency stimulation in the dorsal striatum: Effects on response learning and on GABA levels in rats. *Behav Brain Res* 222:368-374.
- Schwarcz R, Zaczek R, Coyle JT (1978) Microinjection of kainic acid into the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 50:209-220.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE (2000) An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia* 41 Suppl 1:S3-9.
- Shatskikh T, Zhao Q, Zhou JL, Holmes GL (2009) Effect of topiramate on cognitive function and single units from hippocampal place cells following status epilepticus. *Epilepsy Behav* 14:40-47.
- Shinnar S, Glauser TA (2002) Febrile seizures. *J Child Neurol* 17 Suppl 1:S44-52.

## BIBLIOGRAPHIE

- Shorvon S, Ferlisi M (2011) The treatment of super-refractory status epilepticus: a critical review of available therapies and a clinical treatment protocol. *Brain* 134:2802-2818.
- Sloviter RS (2005) The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes rendus biologiques* 328:143-153.
- Sloviter RS (2008) Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the "latent period" and other concepts. *Epilepsia* 49 Suppl 9:85-92.
- Sloviter RS, Bumanglag AV (2013) Defining "epileptogenesis" and identifying "antiepileptogenic targets" in animal models of acquired temporal lobe epilepsy is not as simple as it might seem. *Neuropharmacology* 69:3-15.
- Sloviter RS, Zappone CA, Bumanglag AV, Norwood BA, Kudrimoti H (2007) On the relevance of prolonged convulsive status epilepticus in animals to the etiology and neurobiology of human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48 Suppl 8:6-10.
- Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y (1997) NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 121:1171-1179.
- Sperk G (1994) Kainic acid seizures in the rat. *Prog Neurobiol* 42:1-32.
- Sperling MR, Greenspan A, Cramer JA, Kwan P, Kalviainen R, Halford JJ, Schmitt J, Yuen E, Cook T, Haas M, Novak G (2010) Carisbamate as adjunctive treatment of partial onset seizures in adults in two randomized, placebo-controlled trials. *Epilepsia* 51:333-343.
- Stefan H, Feichtinger M, Pauli E, Schafer I, Eberhardt KW, Kasper BS, Hopp P, Buchfelder M, Huk J, Paulus W (2001) Magnetic resonance spectroscopy and histopathological findings in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 42:41-46.

## BIBLIOGRAPHIE

- Stefani A, Calabresi P, Pisani A, Mercuri NB, Siniscalchi A, Bernardi G (1996a) Felbamate inhibits dihydropyridine-sensitive calcium channels in central neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 277:121-127.
- Stefani A, Spadoni F, Siniscalchi A, Bernardi G (1996b) Lamotrigine inhibits Ca<sup>2+</sup> currents in cortical neurons: functional implications. *Eur J Pharmacol* 307:113-116.
- Stewart LS, Leung LS (2003) Temporal lobe seizures alter the amplitude and timing of rat behavioral rhythms. *Epilepsy Behav* 4:153-160.
- Suchomelova L, Baldwin RA, Kubova H, Thompson KW, Sankar R, Wasterlain CG (2006) Treatment of experimental status epilepticus in immature rats: dissociation between anticonvulsant and antiepileptogenic effects. *Pediatric research* 59:237-243.
- Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L (1989) Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 26:321-330.
- Sztriha L, Gururaj AK, Bener A, Nork M (2002) Temporal lobe epilepsy in children: etiology in a cohort with new-onset seizures. *Epilepsia* 43:75-80.
- Szyndler J, Wierzba-Bobrowicz T, Skorzevska A, Maciejak P, Walkowiak J, Lechowicz W, Turzynska D, Bidzinski A, Plaznik A (2005) Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 81:15-23.

**T**

- Tagliatela M, Ongini E, Brown AM, Di Renzo G, Annunziato L (1996) Felbamate inhibits cloned voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels from human and rat brain. *Eur J Pharmacol* 316:373-377.
- Toth K, Eross L, Vajda J, Halasz P, Freund TF, Magloczky Z (2010) Loss and reorganization of calretinin-containing interneurons in the epileptic human hippocampus. *Brain* 133:2763-2777.
- Toyoda I, Bower MR, Leyva F, Buckmaster PS (2013) Early Activation of Ventral Hippocampus and Subiculum during Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *J Neurosci* 33:11100-11115.
- Trenite DG, French JA, Hirsch E, Macher JP, Meyer BU, Grosse PA, Abou-Khalil BW, Rosenfeld WE, van Gerven J, Novak GP, Parmeggiani L, Schmidt B, Gibson D, Guerrini R (2007) Evaluation of carisbamate, a novel antiepileptic drug, in photosensitive patients: an exploratory, placebo-controlled study. *Epilepsy Res* 74:193-200.
- Turski L, Cavalheiro EA, Czuczwar SJ, Turski WA, Kleinrok Z (1987) The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents. *Pol J Pharmacol Pharm* 39:545-555.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983a) Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9:315-335.
- Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L (1983b) Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia* 39:1408-1411.

V

- Van Paesschen W, Connelly A, Johnson CL, Duncan JS (1996) The amygdala and intractable temporal lobe epilepsy: a quantitative magnetic resonance imaging study. *Neurology* 47:1021-1031.
- van Vliet EA, da Costa Araujo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA (2007) Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology* 130:521-534.
- Voltzenlogel V, Despres O, Vignal JP, Steinhoff BJ, Kehrli P, Manning L (2006) Remote memory in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 47:1329-1336.
- von Bohlen Und Halbach O (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 329:409-420.

W

- Wee KS, Zhang Y, Khanna S, Low CM (2008) Immunolocalization of NMDA receptor subunit NR3B in selected structures in the rat forebrain, cerebellum, and lumbar spinal cord. *J Comp Neurol* 509:118-135.
- Weniger G, Ruhleder M, Lange C, Irle E (2012) Impaired egocentric memory and reduced somatosensory cortex size in temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. *Behav Brain Res* 227:116-124.
- Wenzel A, Scheurer L, Kunzi R, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1995) Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A, 2B, 2C and 2D in rat brain. *Neuroreport* 7:45-48.
- Whalley BJ, Stephens GJ, Constanti A (2009) Investigation of the effects of the novel anticonvulsant compound carisbamate (RWJ-333369) on rat piriform cortical neurones in vitro. *Br J Pharmacol* 156:994-1008.
- Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M (2001) A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med* 345:311-318.
- Wieser HG (1998) Epilepsy surgery: past, present and future. *Seizure* 7:173-184.
- Wilkinson H, Holdstock JS, Baker G, Herbert A, Clague F, Downes JJ (2012) Long-term accelerated forgetting of verbal and non-verbal information in temporal lobe epilepsy. *Cortex* 48:317-332.
- Williams PA, Wuarin JP, Dou P, Ferraro DJ, Dudek FE (2002) Reassessment of the effects of cycloheximide on mossy fiber sprouting and epileptogenesis in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neurophysiology* 88:2075-2087.
- Williamson PD, French JA, Thadani VM, Kim JH, Novelly RA, Spencer SS, Spencer DD, Mattson RH (1993) Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal

## BIBLIOGRAPHIE

scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and pathology. *Ann Neurol* 34:781-787.

Willow M, Gono T, Catterall WA (1985) Voltage clamp analysis of the inhibitory actions of diphenylhydantoin and carbamazepine on voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 27:549-558.

Wong HK, Liu XB, Matos MF, Chan SF, Perez-Otano I, Boysen M, Cui J, Nakanishi N, Trimmer JS, Jones EG, Lipton SA, Sucher NJ (2002) Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *J Comp Neurol* 450:303-317.



## BIBLIOGRAPHIE

### Y

- Yamada M, Basile AS, Fedorova I, Zhang W, Duttaroy A, Cui Y, Lamping KG, Faraci FM, Deng CX, Wess J (2003) Novel insights into M5 muscarinic acetylcholine receptor function by the use of gene targeting technology. *Life Sci* 74:345-353.
- Yao C, Doose DR, Novak G, Bialer M (2006) Pharmacokinetics of the new antiepileptic and CNS drug RWJ-333369 following single and multiple dosing to humans. *Epilepsia* 47:1822-1829.

## BIBLIOGRAPHIE

### Z

Zhang Z, Lu G, Zhong Y, Tan Q, Yang Z, Liao W, Chen Z, Shi J, Liu Y (2009) Impaired attention network in temporal lobe epilepsy: a resting FMRI study. *Neurosci Lett* 458:97-101.

Zhou JL, Zhao Q, Holmes GL (2007) Effect of levetiracetam on visual-spatial memory following status epilepticus. *Epilepsy Res* 73:65-74.





**EFFETS METABOLIQUES ET COMPORTEMENTAUX A LONG  
TERME DE L'ADMINISTRATION PRECOCE DE CARISBAMATE  
DANS LE MODELE « LITHIUM-PILOCARPINE » CHEZ LE RAT**

Résumé

L'épilepsie du lobe temporal (ELT) est une pathologie neurologique sévère dont le fort taux de pharmacorésistance nécessite de nouveaux traitements. Le modèle lithium-pilocarpine modélise les caractéristiques et le développement de l'ELT. L'administration du carisbamate au début de l'épileptogénèse empêche l'apparition de l'ELT dans une sous-population de rats et la remplace par une épilepsie de type absence (ETA).

L'évaluation cognitive effectuée durant la phase chronique a permis de distinguer les deux sous-populations : le groupe épilepsie de type absence ne développe pas le déficit cognitif sévère observé dans le modèle lithium-pilocarpine. La spectroscopie du  $^{13}\text{C}$  n'a pas révélé de différence métabolique majeure entre les deux sous-populations traitées, qu'elles développent une ELT ou une ETA.

Ce travail souligne que l'administration précoce de carisbamate peut transformer l'ELT en une épilepsie moins sévère et fortement améliorer les comorbidités cognitives qui accompagnent l'ELT.

**Mots-clés :** Epilepsie du lobe temporal, Etat de mal, Epileptogénèse, Modèle lithium-pilocarpine, Carisbamate, Comportement, Mémoire, Métabolisme

LONG TERM METABOLIC AND BEHAVIORAL EFFECTS OF EARLY CARISBAMATE ADMINISTRATION IN  
THE RAT LITHIUM-PILOCARPINE MODEL

Summary

Temporal lobe epilepsy (TLE) is a severe neurological disease with a high refractory rate, which requires new treatments. The lithium-pilocarpine model allows reproducing human TLE features and development. Carisbamate administration at epileptogenesis onset prevents TLE incidence in a rats' subpopulation, which is substituted by absence-like epilepsy (ALE).

Behavioral and cognitive assessment performed during chronic period allowed differentiating the two subpopulations: ALE group did not develop the severe cognitive impairment shown in the lithium-pilocarpine model.  $^{13}\text{C}$  spectroscopy did not show major metabolism difference between the two treated subpopulations, whatever they develop TLE or ALE.

This work demonstrates that early carisbamate administration can induce a shift from TLE in a less severe epilepsy form, and can strikingly improve TLE-related cognitive comorbidities.

**Keywords:** Temporal lobe epilepsy, Status epilepticus, Epileptogenesis, Lithium-pilocarpine model, Carisbamate, Behavior, Learning and memory, Metabolism