



HAL
open science

Mécanisme anti-inflammatoire endogène dans un modèle d'épilepsie focale du lobe temporal

Emma Zub

► **To cite this version:**

Emma Zub. Mécanisme anti-inflammatoire endogène dans un modèle d'épilepsie focale du lobe temporal : Rôle de l'annexine A1. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. hal-02983103

HAL Id: hal-02983103

<https://ephe.hal.science/hal-02983103>

Submitted on 29 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École Pratique
des Hautes Études



**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE
ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES**

Sciences de la Vie et de la Terre

Mémoire présenté par :

ZUB Emma

Pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**Mécanisme anti-inflammatoire endogène dans un
modèle d'épilepsie focale du lobe temporal :
Rôle de l'annexine A1**

Présenté et soutenu le 27 octobre 2020, devant le jury suivant :

Présidente : Dr. Gwenaëlle CATHELIN (EPHE, Bordeaux)

Rapporteur : Dr. Antoine DEPAULIS (GIN, Grenoble)

Examinatrice : Dr. Frédérique SCAMPS (INM, Montpellier)

Tutrice pédagogique : Dr. Nadine MESTRE-FRANCES (EPHE, Montpellier)

Tuteur scientifique et directeur d'équipe : Dr. Nicola MARCHI

Thématique de l'équipe de recherche : Recherche cérébrovasculaire et gliale

Laboratoire d'accueil : Institut de Génomique Fonctionnelle 141 rue de la Cardonille, 34090
Montpellier

Préface

Ce mémoire représente pour moi la fin d'une longue reconversion professionnelle que j'ai amorcée à l'âge de 33 ans. En effet, en 2015, j'ai décidé que le travail que j'effectuais à cette époque ne me convenait plus sur un plan intellectuel et en projection de carrière. J'ai donc pris l'initiative de démissionner et de faire un bilan de compétence. Après une période de recul et de réflexion sur mon futur, j'ai donc décidé de m'inscrire à l'IUT pour reprendre mon parcours scientifique. J'ai donc intégré le DUT génie biologie directement en deuxième année grâce à mon parcours scolaire. Après l'avoir obtenu, c'est naturellement que j'ai continué avec la Licence Professionnelle Biologie Analytique et Expérimentale. Ces deux années ont été très enrichissantes, stimulantes mais aussi intenses et fatigantes pour moi car, en parallèle, j'ai aussi connu des rebonds dans ma vie personnelle. J'ai intégré l'équipe de Nicola Marchi dès mon premier stage de formation. Son parcours professionnel, son esprit d'équipe ainsi que sa vision du travail m'ont poussé à continuer mon chemin avec lui le plus longtemps possible car je m'y reconnaissais parfaitement. Intégrer la recherche scientifique a été une révélation pour moi sur le plan carriériste et quant à mes souhaits d'évolution. J'aime cette sensation de toujours apprendre et de pouvoir envisager une redirection en continu grâce à la diversité des thèmes que le milieu de la recherche propose. Je vais donc vous présenter ici un projet qui m'a été confié pendant ma deuxième année de CDD à l'institut de génomique fonctionnelle.

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Docteur Nicola MARCHI, chef de l'équipe que j'ai intégrée depuis le début de mon parcours dans la recherche. Il m'a donné toute sa confiance et son savoir-faire, ce qui m'a permis de m'épanouir dans ce milieu. Je remercie aussi Benoit Girard, qui m'a formé à mes débuts en chirurgie et m'a beaucoup conseillé. Mes remerciements se tournent aussi vers toute l'équipe du Docteur Julie Perroy, avec qui nous avons collaboré. Je tiens à remercier les enseignants de l'EPHE, qui ont fait preuve d'une grande patience et se rendent disponible dans les moments de doutes. Je remercie particulièrement Frédéric De Bock, mon mentor, il m'a motivé tout au long de ces deux années, m'a conseillé et a fait preuve d'une grande patience dans les moments qui m'ont semblé les plus difficiles. Je remercie Marine Blaquière, Wendy Klément, Etienne Audinat, membres de mon équipe sur qui il a toujours été possible de compter.

Je remercie profondément toute l'équipe d'ADV iExplore, les zootechniciens de l'animalerie avec qui j'ai passé de longues heures et plus particulièrement Karim Mesbah et Elodie, responsable de la plateforme qui ont toujours été réactif à nos demandes en matière d'expérimentation.

Je remercie enfin mes enfants, Léon et Nola, qui sont mon moteur au quotidien et à qui je dédie ce mémoire.

Table des matières

I- Introduction.....	7
1.1 - L'épilepsie en 2020 : contexte général.....	7
1.2 - Classification et diagnostic des crises épileptiques.....	8
1.2.1 - Les crises généralisées.....	9
1.2.2 - Les crises partielles.....	9
1.2.3 - Traitement et recherche	10
1.3 - Physiologie et anatomie du système cérébral.....	11
1.3.1 - Anatomie et organisation de la région hippocampique chez la souris	11
1.3.2 - Rôle de la neuro inflammation et l'unité neuro vasculaire dans l'épilepsie.....	12
1.3.3 - Mécanisme et Voie endogène anti-inflammatoire.....	13
1.3.4 - Expression d'annexine A1 dans le cerveau humain épileptique	16
1.4 - Problématiques de recherche.....	17
II- Matériels et méthodes.....	18
2.1 - Méthodes générale.....	18
2.2 - Le modèle animal	19
2.3 - Définition des produits nécessaires à la procédure expérimentale :.....	20
2.3.1 - L'acide kaïnique et les récepteurs kaïnate (KAR).....	20
2.3.2 - Anesthésiques utilisés.....	21
2.4 - Définition du site d'injection du kaïnate par méthode de stéréotaxie	21
2.5 - Définition des outils de suivi et de surveillance EEG	23
2.5.1- Préparation et Pose des Electrodes pour le suivi électroencéphalographique	23
2.5.2 - Système filaire d'EEG et vidéosurveillance	24
2.6 - Protocole Test pharmacologique <i>in vivo</i> : annexine A1	25
2.7 - Prélèvements des tissus cérébraux chez la souris et analyses biochimiques.....	26
2.7.1- Exsanguination	27
2.7.2 - RT-qPCR	28

2.7.3 - Western blot.....	29
2.7.4 - Prélèvement sanguin test ELISA corticostérone et ANXA1	30
2.7.5 - Immunohistochimie	30
2.8 - Statistiques	31
III- Résultats	32
3.1 - Réponse anti inflammatoire durant la progression des crises	32
3.2 - Traitement pharmacologique dans un modèle murin de TLE.....	41
3.2.1 - Traitement pendant les crises chroniques	41
3.2.2 - Traitement pendant l'épileptogenèse	44
3.3 - Marquage cellulaire.....	48
IV-Discussion.....	49
Référence.....	53
Annexe : Données de RTqPCR.....	58

Abréviations

AI	Anti inflammatoire
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CCL	Chemokine Ligants
CCR	Chemokine Receptor
Ctx	Cortex
Il	Interleukine
EEG	Electroencéphalogramme
FCD	Dysplasies corticales focales
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GR	Glucocortisone
KAR	Kainate Récepteur
IP	Intra-péritonéale
IV	Intra-veineuse
TLE	Temporal lobe epilepsiy
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
RT-qPCR	Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction
SE	Status epilepticus
SNC	Système Nerveux Central
SRS	Spontaneous Recurrent Seizure
TBI	Traumatic brain injury
TLE	Temporal lobe epilepsy

I- Introduction

1.1 - L'épilepsie en 2020 : contexte général

Environ soixante-dix millions de personnes sont atteintes d'épilepsie dans le monde. Deux millions quatre cent mille personnes sont diagnostiquées chaque année et 80% des malades vivent dans des pays en voie de développement. (OMS, www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy, 2018). Cette maladie représente 0.6% de la mortalité mondiale. En France, l'épilepsie est l'affection neurologique la plus fréquente après la migraine et concerne environ 1 % de la population (Thurman et al. 2011). Il s'avère que les traitements antiépileptiques, les frais médicaux et les absentéismes de travail liés à la maladie représentent un coût important du PIB dans certains pays. Cela engendre un besoin important de solutions thérapeutiques plus efficaces sur le long terme et de diagnostics précoces. On dénombre à l'heure actuelle environ 1/3 de malades dit réfractaires aux traitements antiépileptiques qui existent sur le marché (fig.1). Ces patients voient leur qualité de vie dégradée avec un risque accru de dégradation psychosociale, ou d'accident entraînant des blessures mortelles. Le contournement de cette pharmaco résistance est un enjeu majeur dans la prise en charge de l'épilepsie de nos jours.



Figure 1. [www. Inserm.fr](http://www Inserm.fr)

L'épilepsie, ensemble de maladies, vient du verbe grec *epilēpsis* désignant une attaque par surprise. Elle correspond à un ensemble de symptômes et diffère selon le type de crise ou « *seizure* ». C'est un désordre neurologique chronique évoluant par crises récurrentes, dont beaucoup de mécanismes sont encore étudiés à ce jour. Les crises sont caractérisées par des décharges anormales, excessives, transitoires et hyper synchrones de populations de neurones plus ou moins étendues (Jacobs et al. 2009). A l'échelle cellulaire, cela correspond à un déséquilibre entre neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) et inhibiteurs (GABA). Résultat

de ce déséquilibre, les récepteurs du glutamate se réactivent plus facilement, favorisant ainsi la pérennisation de l'épilepsie.

Une crise épileptique se propage ou non en partant d'un foyer qui se situe dans une zone du cerveau. Le point de départ initial et l'extension de la crise au sein d'un réseau définissent la symptomatologie, ce qui explique la diversité des aspects cliniques. On parle aujourd'hui de réseaux plus complexes du fait des modifications structurelles et fonctionnelles caractérisées par la plasticité neuronale. La maladie, à proprement parler, se caractérise par la répétition spontanée ou provoquée de crises isolées ou répétées dans le cas d'une atteinte cérébrale.

1.2 - Classification et diagnostic des crises épileptiques

En 2010, l'ILAE (*International League Against Epilepsy*) propose une nouvelle classification (*Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy 1989, Berg et al. 2010*) : les épilepsies génétiques, les épilepsies structurales, métaboliques, symptomatiques (un accident vasculaire cérébral, un traumatisme ou une tumeur cérébrale) ou encore les épilepsies de causes inconnues (*Moshé et al. 2015*).

De nos jours, la classification des crises est encore controversée, cependant, il est possible de les classer en deux groupes majeurs distincts : les crises généralisées et les crises partielles ou focales. On distingue dans les crises focales, deux types de syndromes : les dysplasies corticales focales, dues le plus souvent à des malformations au cours du développement et les épilepsies du lobe temporal (TLE) généralement localisées dans l'hippocampe. Ces dernières sont la plupart du temps la cause d'une sclérose. Quand l'un de ces deux types d'épilepsie devient réfractaire au traitement, une chirurgie est proposée quand celle-ci est possible. Un classement des résultats post opératoires a été proposé par Jérôme Engel, « The Engel Epilepsy Surgery Outcome Scale ». Ce classement permet de distinguer les patients qui rechutent ou non et avec quelle intensité (*tab 1*).

Classement Engel

Classe I : exempts de crises invalidantes	Ia sans crise depuis la chirurgie
	Ib crises partielles simples non invalidantes
	Ic certaines crises invalidantes après la chirurgie mais sans crises invalidantes pendant au moins 2 ans.
	Id convulsions généralisées avec arrêt des anti épileptiques uniquement
Classe II : crises invalidantes rares	II a crises rares
	II b crises invalidantes rares

	II c plus que des crises rares depuis au moins 2 ans
	II d crises nocturnes uniquement
Classe III : amélioration intéressantes	III a réduction des crises utiles
	III b intervalles sans crise correspondant a plus de la moitié de la période de suivi mais pas moins de 2 ans
Classe IV : aucune amélioration valable	IV a aucune amélioration valable
	IV b pas de changement appréciable
	IV c aggravation des crises

Tableau 1. Classement Engel

1.2.1 - Les crises généralisées

Les crises généralisées proviennent simultanément des deux hémisphères cérébraux. Leur sémiologie clinique se caractérise par des signes moteurs plus ou moins visibles et des troubles de la conscience. Les signes moteurs peuvent être i) cloniques (secousses musculaires répétées), ii) toniques (contractions musculaires soutenues), iii) tonico-cloniques (succession de phases cloniques et toniques), iiiii) atonique (interruption du tonus musculaire), iv) myoclonique (contraction musculaire brutale et involontaire). Les troubles de la conscience sont de durées variables, (quelques secondes à quelques minutes) selon le type de crise.

1.2.2 - Les crises partielles

Les crises partielles ou focales prennent naissance dans une zone bien localisée, appelée foyer épileptogène, le plus souvent l'hippocampe (TLE) ou des zones du cortex (FCD) (*Moshé et al. 2015*). Les crises sont représentées par une série de signes ou symptômes cliniques qui correspondent aux régions atteintes. On distingue les crises partielles simples des crises partielles complexes.

Les crises partielles simples sont évoquées quand les décharges restent confinées dans le cortex somatosensoriel, amygdale ou hippocampe. Elles se traduisent par des hallucinations, des pertes de mémoires, des troubles émotionnels, des paresthésies unilatérales ou encore des états de rêves et sensations de déjà-vu.

Les crises partielles complexes, elles, se caractérisent par des signes plus observables comme un arrêt d'interaction sociale, une modification du comportement et une activité motrice avec ou sans automatisme. Leur origine n'est pas exclusivement temporale. Pour ces dernières, seul l'électroencéphalogramme, associé à de l'imagerie permet de cibler et localiser le foyer.

1.2.3 - Traitement et recherche

Au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle, des efforts considérables ont été consacrés au développement de nouveaux médicaments anti-épileptiques (*Ghaffarpour et al. 2013*). Le premier traitement découvert fut le bromure de potassium (un anticonvulsif dont l'action est d'entrer en compétition avec les ions chlorure dans la transmission GABAergique et ainsi provoquer une hyperpolarisation). Il y eu différentes vagues de développement de médicaments antiépileptiques (première, deuxième et troisième génération). Parmi les mécanismes d'action les plus importants, on retrouve : le blocage du canal sodique présynaptique (*locosamide, phénitoïde*), les modulateurs positifs aux GABA (*tiagabine, valproate de sodium*) ou encore les bloqueurs du canal calcium (*ethosuximide, gabapentin*). Il est parfois nécessaire d'associer plusieurs molécules pour avoir un réel effet thérapeutique.

L'épilepsie du lobe temporal mésial, présente des crises partielles simples ou complexes à l'EEG. C'est actuellement une des formes qui montre le plus de résistance face aux antiépileptiques existants (environ 30%). Une stratégie pour contourner cette résistance doit être mise en place. Avec les connaissances actuelles, il a été montré que la maladie ne se limite pas à de simples décharges électriques neuronales mais que tous les autres composants cellulaires du cerveau entrent en jeu dans le mécanisme. C'est pourquoi la neuro inflammation et la barrière hémato-encéphalique sont étudiées de près. En particulier, l'association entre une pharmacologie anti-inflammatoire et une pharmacologie anti-épileptique a été suggéré comme nouvelle piste pour contourner la pharmaco résistance dans cette maladie.

Des modèles animaux permettent d'étudier les différents types de crise en reproduisant les manifestations clinico-biologiques (*Depaulis et al. 2015*) comme la mise en place d'une épilepsie focale précédée d'une crise généralisée tonico-clonique, *status epilepticus* (SE), plus communément appelé état de mal épileptique. Un des modèles préclinique les plus utilisé est basé sur l'induction d'une crise épileptique chez la souris par une injection intra-hippocampique d'acide kaïnique (*Riban et al.2002*). L'acide kaïnique est un agoniste spécifique des récepteurs glutamatergiques avec une activité pro-convulsivante puissante (*Olney, et al, 1974*). L'injection provoque des lésions neuronales, de la neuro inflammation et un remaniement vasculaire cérébral dans l'hippocampe, conduisant ainsi, après une période de latence, à la création d'un foyer épileptogène. Ces mêmes animaux développent par la suite des crises spontanées focales avec un foyer épileptique défini (*fig 2*).

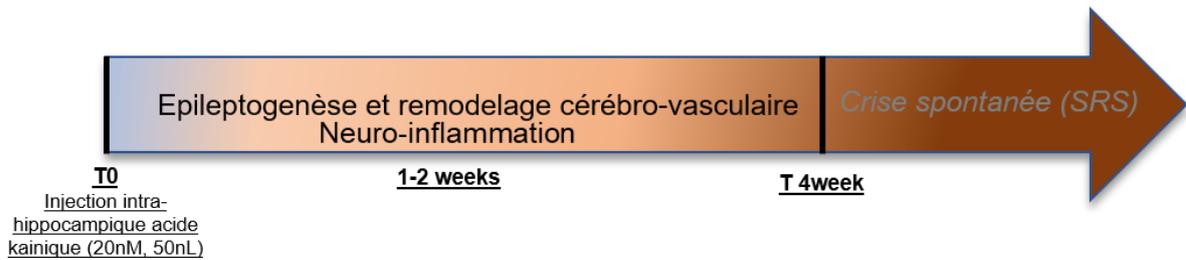


Figure 2. Décours temporel du modèle animal souris de l'épilepsie du lobe temporal (TLE)

D'autres modèles animaux d'épilepsie sont répertoriés (Depaulis et al. 2015) : celle-ci peut être induite par l'injection de pilocarpine, par l'hyperthermie, par la toxine tétanique ou encore par stimulations électriques. Mais le modèle kainate présenté ci-dessus est le plus pertinent pour notre étude car il regroupe toutes les caractéristiques spécifiques de l'épilepsie du lobe temporal.

1.3 - Physiologie et anatomie du système cérébral

Au vu de notre étude focalisée sur l'épilepsie du lobe temporal, il est important de connaître la physiologie de l'hippocampe et les différents circuits neuronaux qui peuvent générer des crises spontanées.

1.3.1 - Anatomie et organisation de la région hippocampique chez la souris

L'hippocampe fait partie du télencéphale chez les mammifères. C'est une région, bilatérale, comportant le gyrus denté (GD) en forme de banane qui fait face à la corne d'Amon (CA) et constitue une boucle avec le subiculum et le cortex entorhinal. On trouve dans l'hippocampe des couches de neurones pyramidaux, le stratum radiatum, le stratum moléculaire et les neurones granulaires du GD. L'information arrive par le cortex entorhinal et se dirige vers les neurones granulaires du GD à travers le faisceau perforant (fig.3) (a), elle se propage par les fibres moussues vers les neurones pyramidaux de CA3 (fig.3) (b) et enfin, elle arrive au CA1 par les collatérales de Schaffer (fig.3) (c). Les deux hippocampes sont liés entre eux par la Fimbria.

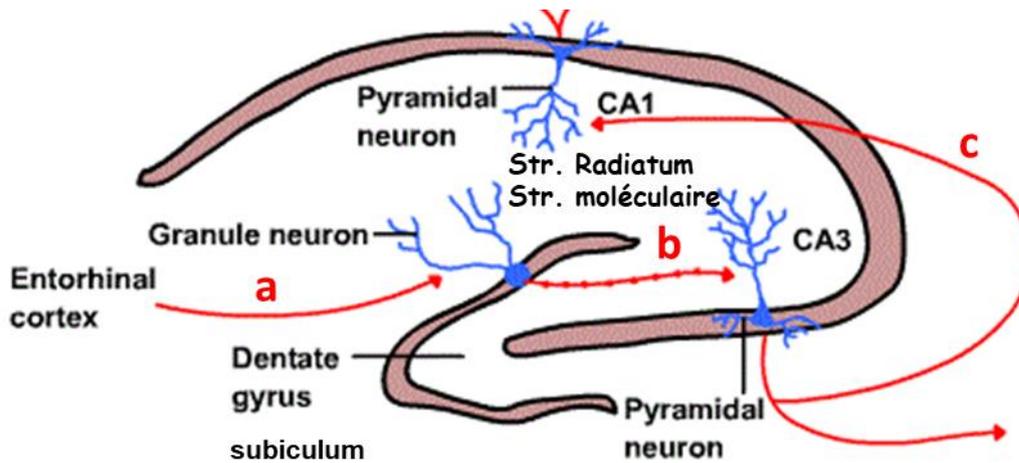


Figure 3. Schéma du circuit neuronal dans l'hippocampe chez la souris.

1.3.2 - Rôle de la neuro inflammation et l'unité neuro vasculaire dans l'épilepsie

Unité neuro glio vasculaire

Dans le cerveau, on retrouve, en dehors des neurones, les cellules gliales (astrocytes et microglies), les cellules endothéliales et les péricytes (fig.4). Elles partagent un rôle structurel et plusieurs fonctions physiologiques, comme l'homéostasie, garantie par les astrocytes, le contrôle de l'inflammation assuré par les microglies et les astrocytes. Le contrôle de la perméabilité à l'interface cérébraux-vasculaire est encadré par les cellules endothéliales associées aux péricytes.

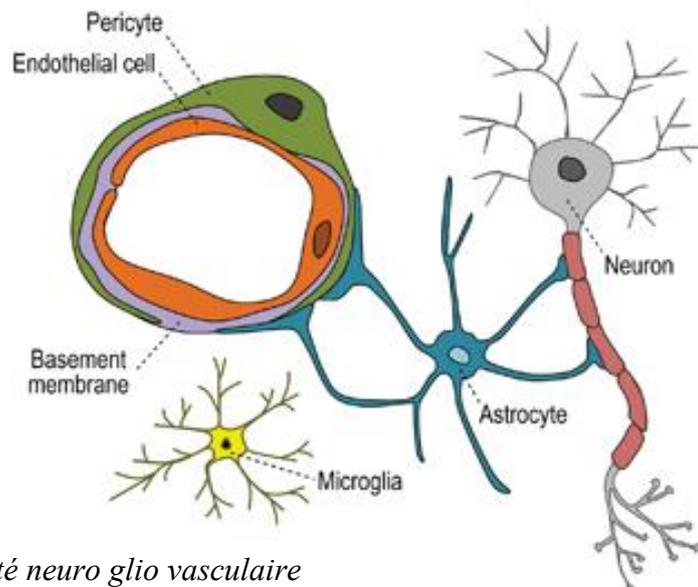


Figure 4. Schéma d'unité neuro glio vasculaire

(https://www.researchgate.net/figure/Diagram-of-the-neurovascular-unit-The-neurovascular-unit-represents-an-interactive_fig1_275363150)

Neuro-inflammation

L'inflammation est un processus réactionnel de défense qui est primordial pour assurer le maintien de l'intégrité du «soi». Durant une crise épileptique, il y a une surproduction d'agents pro-inflammatoires tel qu'Il-1b, TNF α , IL6 par les cellules gliales (microglie, astrocytes) (Vezzani *et al.*, 2005, 2011) mais aussi par les cellules endothéliales qui sécrète une chimiokine ligand 2 (CCL2) (Bozzy *et al.*, 2016). CCL2 stimule l'expression des molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium favorisant ainsi la migration des leucocytes circulants dans le cerveau. L'Il-6 produite par les cellules gliales, pendant les crises, va induire le recrutement des monocytes sanguins (vezzani *et al.*, 2005). Ces monocytes sont pourvus de récepteurs (CCR2) qui sont activés par les CCL2. L'attraction de ces monocytes entraîne la réaction inflammatoire et la perte homéostatique de la barrière. Après le passage de la BHE, le gradient interstitiel des facteurs chimiotactiques inflammatoires permet la migration cellulaire par mouvements amiboïdes jusqu'au site inflammatoire. Les chimiokines sont aussi capables de modifier la perméabilité de la BHE par un phénomène d'altération des protéines de jonction entre les cellules endothéliales (Stamatovic *et al.* 2005). De plus, la microglie, qui est une cellule immunitaire résidente dans le SNC, est une cellule dynamique qui s'adapte rapidement (Davalos *et al.* 2005) et répond à des chimiokines et autres transmetteurs neuronaux libérés notamment durant les décharges épileptiques. Cette activation de la microglie va générer la libération d'autres cytokines qui vont contribuer à modifier l'activité des réseaux neuronaux. Tous ces phénomènes font entrer le tissu local dans une boucle vicieuse inflammation/crise (*fig. 6*).

1.3.3 - Mécanisme et Voie endogène anti-inflammatoire

Il existe des voies endogènes de compensation de l'inflammation : réponse immunitaire provoquée par l'arrivée d'un événement local ou systémique, lui-même enclenché par la libération de molécules pro-inflammatoires. Dans le cas de l'épilepsie, il est admis que la résolution du mécanisme inflammatoire est imparfaite. Les agonistes du récepteur aux glucocorticoïdes (GC) (*dexaméthasone, méthylprednisolone cortisone*) sont utilisés en thérapie complémentaire d'antiépileptique dans certains cas d'épilepsies, notamment infantiles (Marchi *et al.*, 2011). Bien qu'efficaces, ils entraînent, à long terme, des effets secondaires néfastes, ce qui les limite en terme de traitement au long cours. Il est donc nécessaire de contourner ce phénomène. La voie anti inflammatoire endogène en aval de la libération des GC implique une famille de protéines, les annexines. A savoir que cette famille

est composée de 14 gènes codant pour 14 protéines dont les rôles sont variables. Nous allons étudier l'annexin A1.

L'annexine A1 ou encore lipocortine-1 est une protéine anti-inflammatoire endogène. Sa synthèse est induite par les glucocorticoïdes, ceux-ci vont activer le gène ANXA1 (fig. 5) situé sur le chromosome 9 chez l'humain et déclencher la traduction en ARNm pour la synthèse de la protéine. Sa taille est de 37kDa. Elle est autocrine ou paracrine et son rôle permet

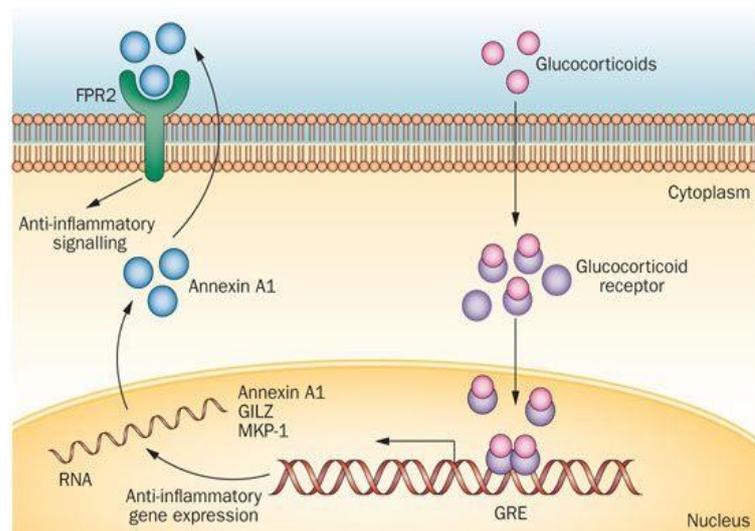


Figure 5. Signalisation cellulaire d'ANXA1 (yang et al., 2013)

l'inhibition de la phospholipase A2 empêchant la biosynthèse de médiateurs de l'inflammation comme les leucotriènes ou encore les prostaglandines (Cristante et al. 2013). La molécule se lie au récepteur cellulaire FPR2 pour induire un message anti inflammatoire (fig.5). Elle a aussi un effet inhibiteur de l'adhérence et de la migration des neutrophiles dans le SNC. De plus, elle régule positivement l'antagoniste au récepteur de l'interleukine-1 et négativement CCR2 (Bozzi et al 2016). L'annexine A1 endogène libérée par les microglies joue aussi un rôle protecteur des neurones. Des doses d'annexine A1 exogènes en I.V. se sont avérés bénéfiques dans d'autres maladies du SNC comme la sclérose en plaque sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Cristante et al. 2013), ou encore sur la dysfonction vasculaire cardiaque et rénale découlant du diabète de type I. (Purvis et al. 2015).

L'équipe dans laquelle je travaille s'est donc demandée s'il était envisageable d'analyser les voies pro et anti inflammatoire avec un focus sur l'annexine A1.

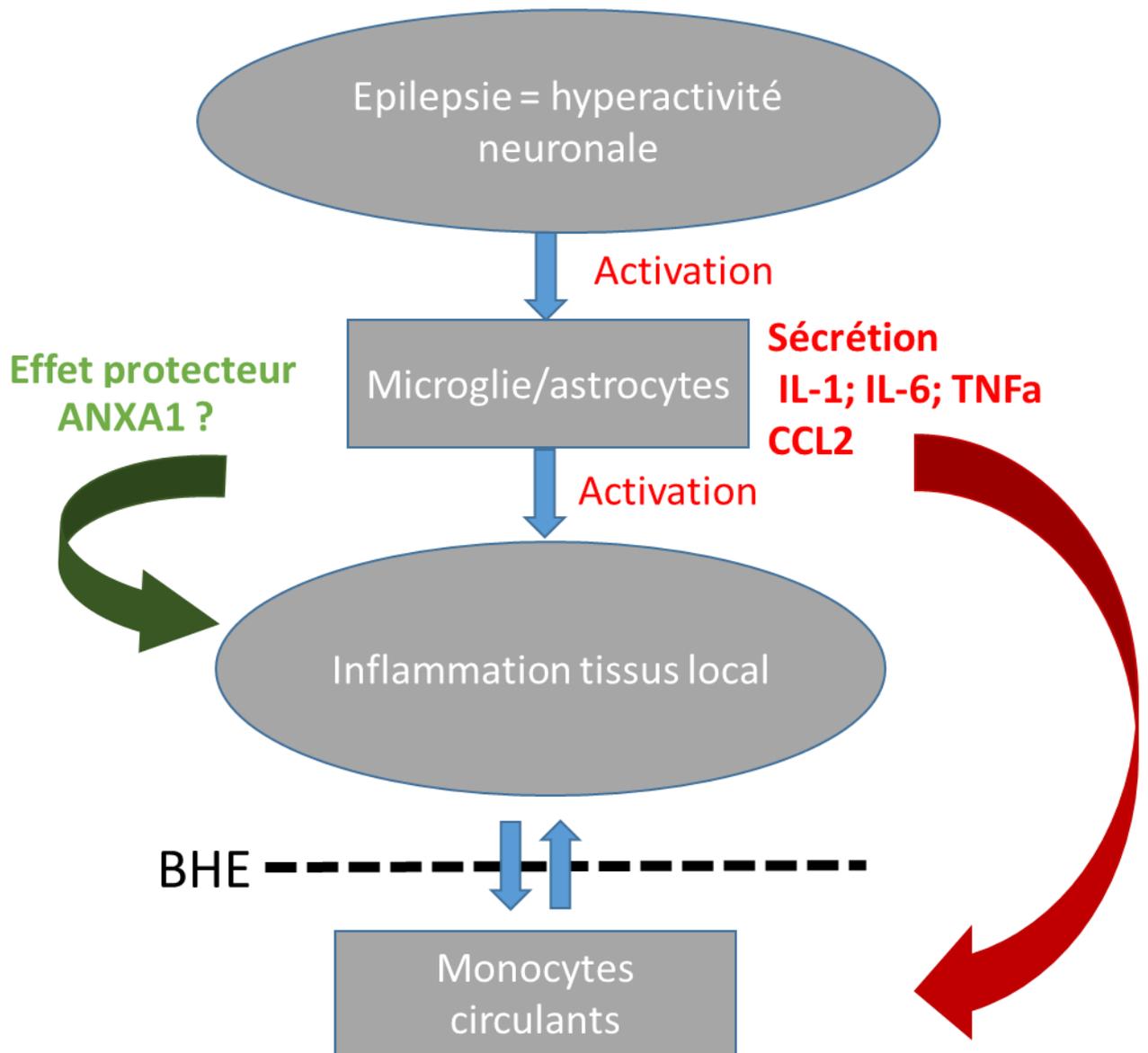


Figure 6. Hypothèse : déséquilibre pro/anti inflammatoire durant les crises d'épilepsies.

1.3.4 - Expression d'annexine A1 dans le cerveau humain épileptique

Des données indiquent qu'il y a une dérégulation de l'expression d'annexine A1 dans des tissus humains de dysplasie corticales (fig. 7-8). Ces données nous ont encouragé à explorer le profil spatiotemporel d'expression chez un modèle murin d'épilepsie.

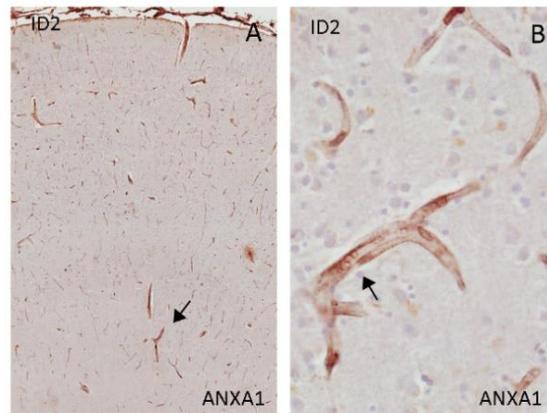


Figure 7. Localisation immunohistochimique d'annexine A1 dans des échantillons de cortex humain sains (A, B). Intense immunoréactivité autour des vaisseaux sanguins et noter la présence de cellules périvasculaires. (Flèche) Bar : A : 480 μ m ; B : 50 μ m.

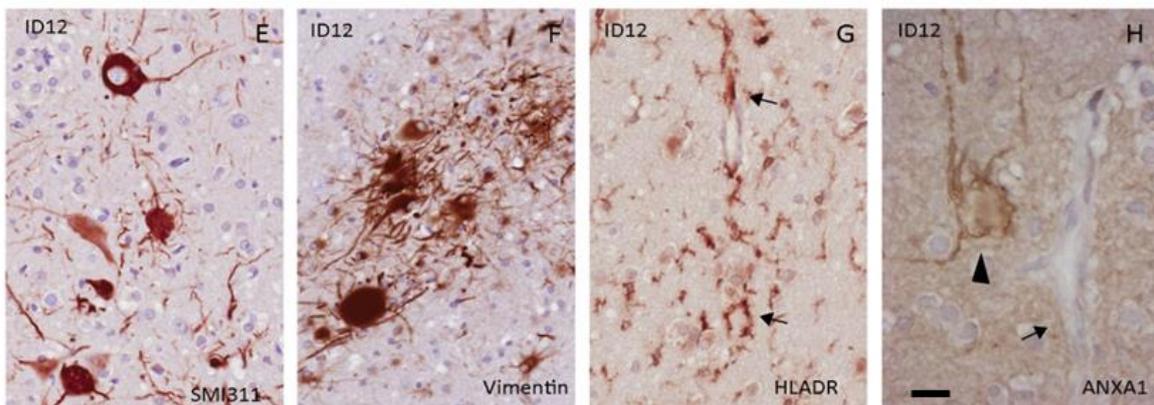


Figure 8. Dans le FCD de type IIB, présence de neurones dysmorphiques (E), de cellules de ballon (F), de microglie HLA positives (G), perte d'immunoréactivité d'annexine A1 (H flèche). Bar : E, F, G : 50 μ m ; H : 55 μ m. Tissus dont la gravité des crises a été évaluée selon la classification d'Engel

1.4 - Problématiques de recherche

En sachant que l'annexine A1, dans le cerveau humain, n'accompagne plus le processus anti inflammatoire, nous cherchons donc à comprendre les mécanismes sous-jacents.

Quatre questions se sont présentées à nous :

- Quel est le profil temporel de la voie anti inflammatoire annexine/GR pendant l'épileptogénèse et les crises spontanées ?
- Quel est le profil temporel de l'inflammation pendant l'épileptogénèse et les crises spontanées ?
- L'équilibre pro/anti inflammatoire est-il maintenu ?
- Est-ce que l'apport d'annexine A1 exogène peut améliorer la pathophysiologie inflammatoire et modifier la progression des crises dans le modèle utilisé ?

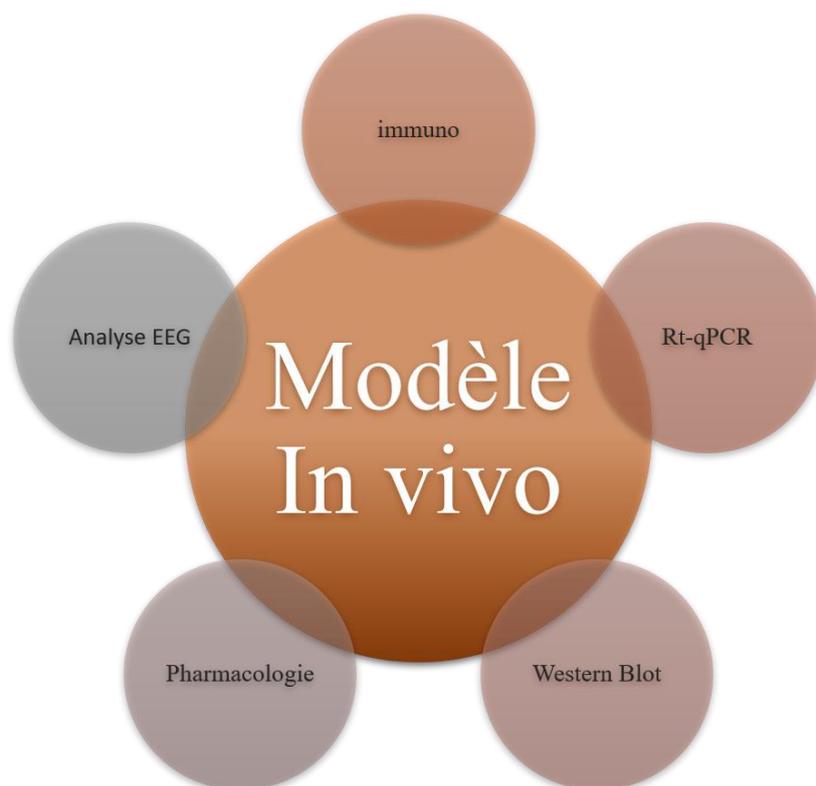
Pour essayer de répondre à ces questions, il nous a semblé nécessaire, en premier lieu, d'évaluer le fonctionnement du mécanisme endogène anti-inflammatoire en situation de physiopathologie. Nous avons utilisé un modèle animal d'épilepsie du lobe temporal avec suivi longitudinal et analyses biochimiques (RT-qPCR, Western blot) sur des séries de souris au décours temporel, afin d'observer la présence d'annexine A1 et l'activation du récepteur des glucocorticoïdes. Nous avons donc établi, avec notre collaborateur, des stratégies d'observations des différents acteurs biologiques, dans le contexte de la mise en place et du maintien des crises épileptiques. Suivant ces résultats, nous avons tenté une approche *in vivo* sur le même modèle pour étudier d'éventuels changements physiologiques de la maladie grâce à un apport exogène de la protéine recombinée annexine A1. Nous avons suivi la mise en place de l'épilepsie grâce à des analyses vidéo et d'électroencéphalographie.

II- Matériels et méthodes

2.1 - Méthodes générale

Expérimentation sur un modèle animal

Le modèle animal est le pilier central de cette étude car de lui découlent toutes les analyses (*cf graph.*).



Graphique des expérimentations de l'étude

Mon rôle central dans ce projet a été la mise en place du modèle *in vivo*, la génération de groupes d'animaux pour les analyses en qPCR, en Western blot et en immunohistochimie (dissection et congélation de aires cérébrales, perfusion), la microchirurgie cérébrale, les monitoring EEG à long terme, l'analyse des données d'EEG pendant l'étude pharmacologique. J'ai travaillé sur la souris que j'ai rendue épileptique par le procédé d'une injection intracérébrale d'un agoniste aux récepteurs du glutamate, l'acide kaïnique (*Nadler, 1981*). Quand je suis arrivée en stage dans l'équipe, le modèle n'était pas encore utilisé en routine. C'est un étudiant en thèse qui le mettait en place avec la collaboration de l'équipe du Docteur Depaulis de l'Institut de Neurosciences de Grenoble. Ainsi j'ai fortement contribué à sa mise en place dans notre laboratoire. J'ai donc commencé à me former à la chirurgie et je suis devenue progressivement autonome en me procurant une lignée de souris et mon matériel. Je vous présente donc le protocole établi dès mon arrivée au laboratoire.

2.2 - Le modèle animal

Le modèle d'épilepsie focale (TLE) par injection de kaïnate intra-hippocampale se fait sur des souris C57BL/6J adultes. Nous avons travaillé sur des mâles âgés de 8 semaines (25 à 30 g) logés dans des cages individuelles avec nourriture, eau *ad libitum* et maintenus dans un cycle lumière/obscurité de 12h. Toutes les expérimentations ont été effectuées conformément aux règles de la directive du comité européen du 24 novembre 1986 (86/609/CEE) et toutes les procédures ont été approuvées par la structure locale du bien-être animal ainsi que par les comités d'éthiques de nos instituts et soumises à saisines. Tous les efforts ont été fournis pour minimiser la souffrance animale et respecter la règle des 3R. Deux séries de 25 animaux au décours temporel modèles TLE (5 /groupe avec groupe SHAM, 24h, 72h, 1 semaine, 4 semaines) (*fig.9*) sont utilisées pour la RT-qPCR, une autre série de 60 animaux pour le Western blot (10/groupe avec groupe SHAM, 24h, 72h, 1 semaine, 4 semaines, 8 semaines), et deux séries de 20 animaux (10 par groupe SHAM + Traités) pour les tests pharmacologiques. Une série de 10 animaux pour tester la molécule pharmacologique à un dosage supérieur.

Nous avons également utilisé 5 souris NG2DsRed (dont les péricytes expriment une fluorescence rouge) pour visualiser la réactivité des péricytes lors des crises spontanées et faire l'immunohistochimie (*Klement et al.,2018*).

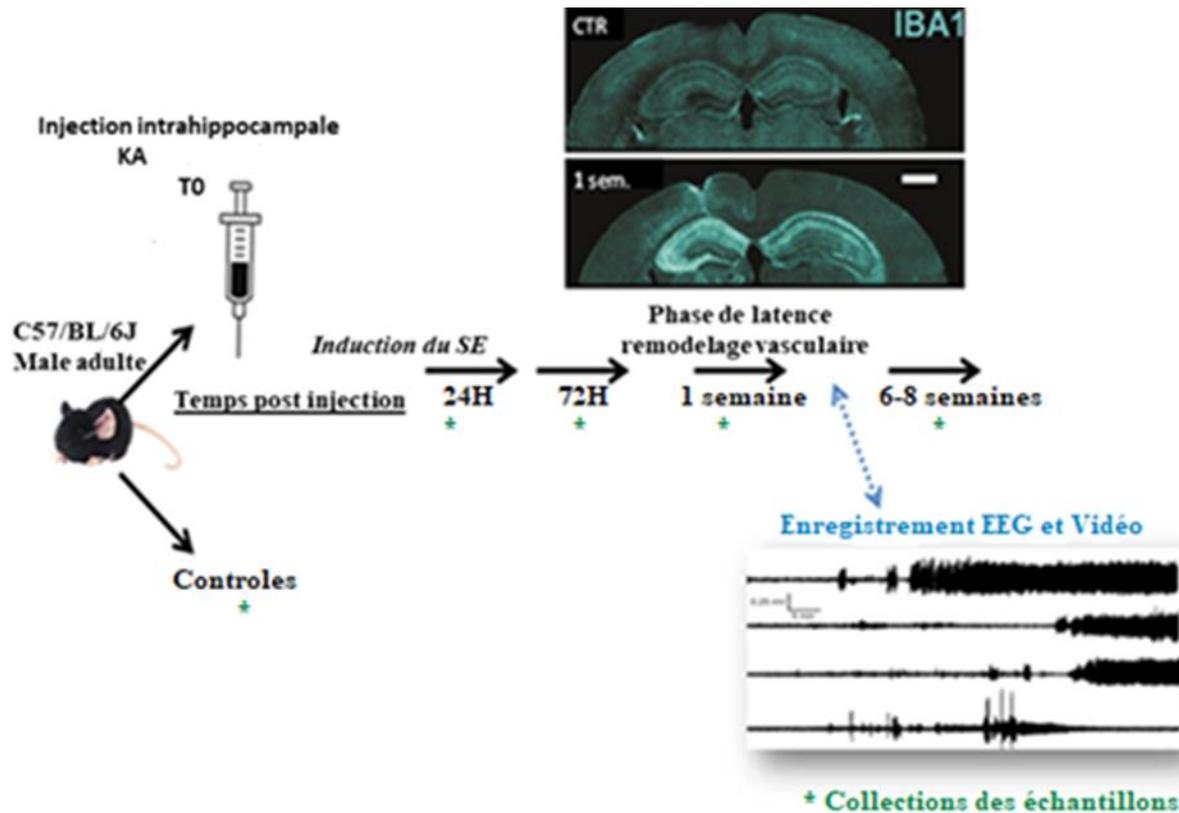


Figure 9. Déroulement temporel du modèle expérimental avec des « times points » à 24h, 72h, 1 semaine et 6 semaines.

2.3 - Définition des produits nécessaires à la procédure expérimentale :

2.3.1 - L'acide kaïnique et les récepteurs kaïnate (KAR)

Dans le SNC, on trouve de nombreux récepteurs kaïnate (KAR), ionotropiques du glutamate qui permettent la régulation de la transmission synaptique et augmentent l'excitabilité neuronale. Il existe 5 sous-unités (GluK1 à GluK5) qui s'assemblent différemment pour donner des récepteurs fonctionnels dont ceux possédant GluK2 qui entrent en compte dans la mise en place du modèle TLE (Crépel et Mulle, 2015). Le kaïnate est connu pour l'induction de crises comportementales et électrophysiologiques se rapprochant de l'épilepsie de lobe temporal chez l'homme. Une forte concentration de kaïnate déterminée (20 mM) permet l'activation massive des KAR qui sont perméables aux cations et activateurs rapides de décharges neuronales, d'où la mise en place de la maladie. (Crépel et Mulle, 2015).

2.3.2 - Anesthésiques utilisés

Le Chloral Hydrate :

Cet anesthésique est utilisé en thérapeutique depuis de nombreuses années comme sédatif, hypnotique ou analgésique. C'est la métabolisation en trichloroéthanol qui permet son action en activant les récepteurs GABAergiques. Sa toxicité systémique (foie et système digestif) est prononcée mais ne présente pas de biais pour notre durée d'expérience. Nous l'utilisons pour les injections de kaïnate intra-hippocampique car contrairement aux autres anesthésiques, il présente le plus d'avantages dans ce type de modèle (*Twele et al. 2016*). C'est un anesthésique plus faible que la kétamine, il est nécessaire d'y ajouter un sédatif, la xylazine, pour s'assurer que la souris sera dans des conditions optimales d'anesthésie.

La xylazine : agoniste des récepteurs adrénergiques α_2 du système nerveux central et du cœur, diminue la libération de sodium et inhibe le système nerveux sympathique donc diminue la nociception, le tonus musculaire et la vigilance et induit une bradycardie.

Les souris ont été anesthésiées par injection IP de chloral hydrate (400 mg/kg) soit 10 μ l/g d'animal associé à la xylazine (4 mg/kg). Après vérification du seuil de narcose des souris (atteinte du stade 3 par le pincement de la patte), elles ont été placées sur appareil stéréotaxique (*fig. 10*) avec une vérification de l'axe horizontal du crâne. Après avoir appliqué de la Bétadine, une incision sur la peau du crâne est effectuée pour faire apparaître les sutures avant et arrière de la boîte crânienne (*fig. 11*), le périoste est retiré grâce à un coton tige imbibé de sérum physiologique stérile. Une craniotomie est effectuée au niveau du site d'injection après repérage par coordonnées stéréotaxiques. Cette craniotomie est réalisée à l'aide d'une fraise de dentiste ($\Theta = 0.6$ mm) cette manipulation est délicate car il y a un risque de détérioration des méninges et de l'arachnoïde avec saignement important. Un rinçage au sérum physiologique est nécessaire pour refroidir la zone chauffée par la rotation de la fraise et limiter ainsi les dommages cérébraux superficiels.

2.4 - Définition du site d'injection du kaïnate par méthode de stéréotaxie

Nous avons utilisé un appareil de marque KOPF Instruments Model 902 (*fig.10*). Sur l'appareil de stéréotaxie, des verniers placés sur des règles fixes permettent de déterminer la position du bregma (*fig. 11*) et de se déplacer en 3D. La précision de l'appareil est de 0.1 mm. Cette précision permet de faire des injections avec une bonne reproduction quant à la cible.

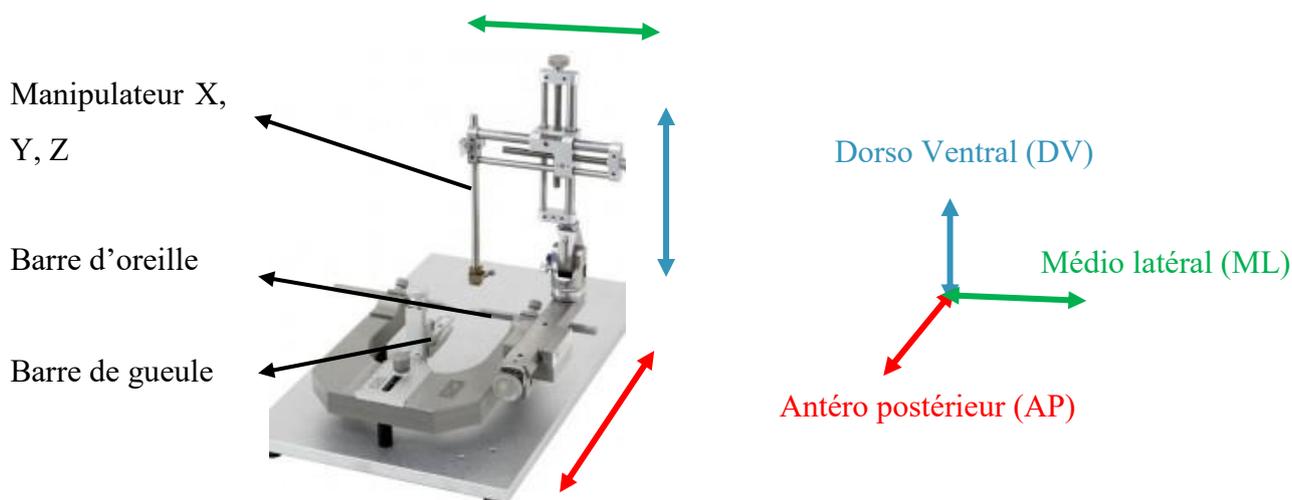


Figure 10. Cadre stéréotaxique KOPF pour rongeur

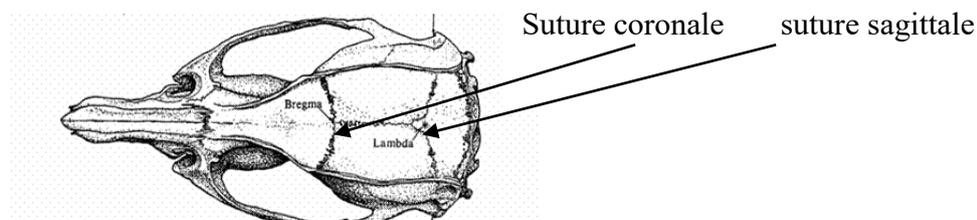


Figure 11. Surface dorsale du crâne montrant les points de référence du plan horizontal, bregma et lambda

Le site d'injection se situe dans l'hippocampe dorsal droit [antéropostérieur (AP), 2 mm ; médiolatéral (ML), 1,5 mm ; dorsoventral (DV), 2 mm] avec le bregma comme référence (*Paxinos et Franklin, 2001*). En utilisant une seringue de 10 μ L (nanofil seringue WPI) et une aiguille 33G ou diamètre de 210 μ m (NF33BV-2 WPI), une injection avec 50 nl d'une solution à 20 mM de kaïnate (Sigma) dans NaCl à 0,9% (c'est-à-dire, 1 nmol) est effectuée. Chaque injection a été réalisée pendant une minute à l'aide d'une micropompe UMP3 et d'un contrôleur Micro4 (WPI). La seringue a été laissée en place pendant deux minutes supplémentaires pour limiter le reflux. La validation de l'injection est vérifiable en effectuant une nouvelle injection hors cerveau car il est important de noter que le kaïnate peut entraîner des cristaux de sels qui bouchent l'aiguille. A ce stade, les souris sont, si besoin, implantées avec une électrode de suivi EEG (voir ci-dessous). Dans le cas contraire, (les séries utilisées en biochimie), la peau est refermée à l'aide de colle chirurgicale et les animaux sont surveillés en post opératoire avec observation comportementale de la présence de *Status epilepticus*

(mouvements cloniques asymétriques, écart clonique de la tête, rotation sur eux-mêmes, immobilisation prolongée observée après réveil, absence de nid pendant 24 h). Les animaux ne présentant pas les signes de SE sont retirés de l'étude.

2.5 - Définition des outils de suivi et de surveillance EEG

2.5.1- Préparation et Pose des Electrodes pour le suivi électroencéphalographique

A la suite de l'injection, une électrode bipolaire que je fabrique manuellement est implantée au niveau du site d'injection. A partir de deux fils isolés torsadés en tungstène de petit diamètre (0.05'), deux autres fils soudés qui sont reliés à des vis (Pinnacle 0.10'' EEG screws, USA) encreées sur le crâne et en contact avec la surface du cortex pour former des électrodes (fig 12). L'électrode bipolaire permet l'enregistrement de l'EEG local, dans l'hippocampe sur une zone très limitée pour avoir un signal le plus net possible. Les autres électrodes permettent l'enregistrement de l'EEG cortical global. Un dernier fil en argent implanté au niveau du cervelet sert d'électrode de référence. Le tout est relié à un connecteur préfabriqué (Pinnacle 6-pin connector, USA,) enfin fixé et isolé avec du ciment acrylique dentaire (Palladur).

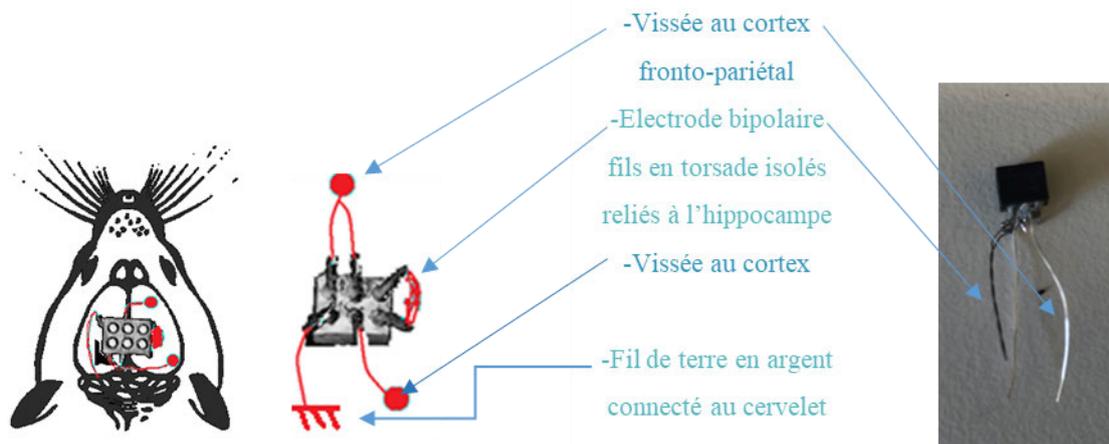


Figure 12. Schéma de positionnement d'implant filaire pour analyse EEG.

Seuls les animaux montrant des signes caractéristiques post-injection (pour rappel : mouvements cloniques asymétriques, écart clonique de la tête, rotation, immobilisation prolongée observée après réveil, absence de nid pendant 24 h) sont retenus pour le monitoring de l'épilepsie.

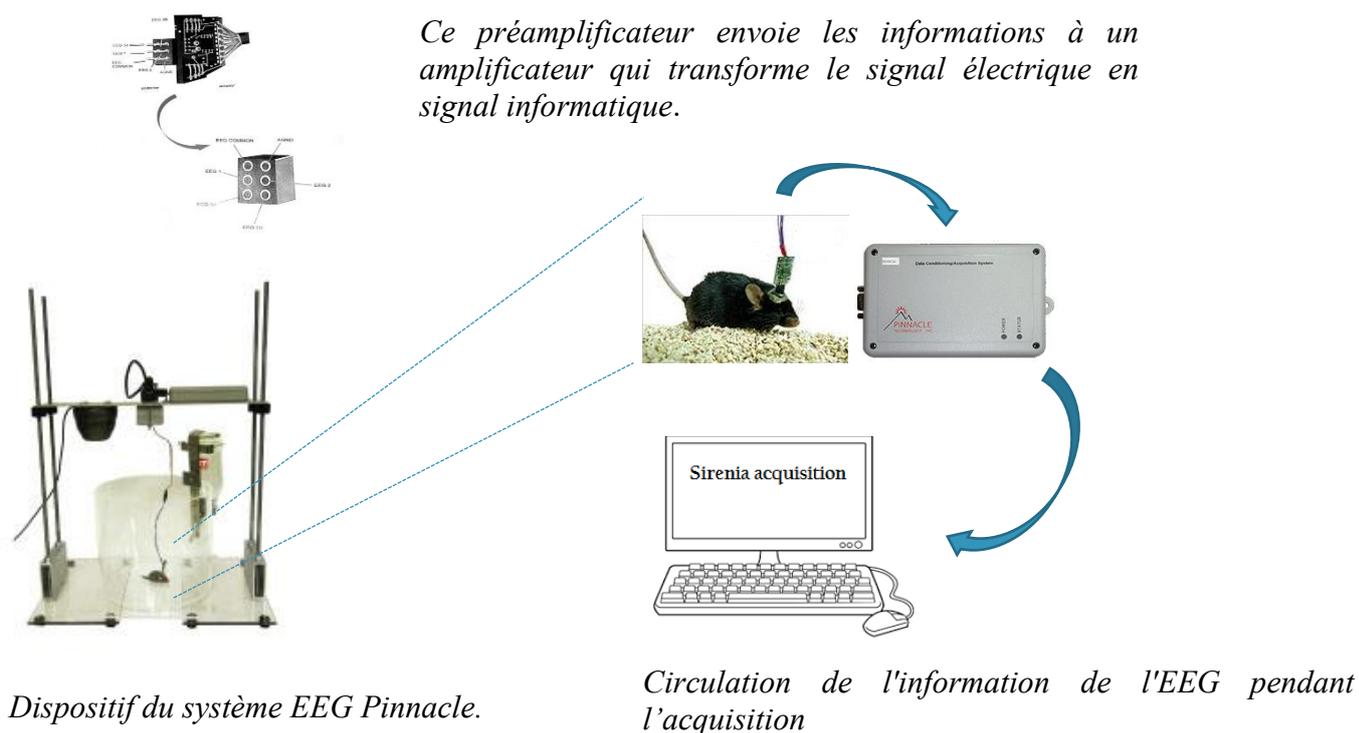
2.5.2 - *Système filaire d'EEG et vidéosurveillance*

L'EEG est un appareil constitué de deux entités: des senseurs (les électrodes décrites précédemment et un amplificateur. Les enregistrements débutent au moins deux semaines après le protocole d'injection de kaïnate, conformément à notre modèle. Le système de senseurs et le connecteur doivent être fiables à long terme: une bonne cicatrisation est nécessaire pour une manipulation sans risque d'arrachement de l'implant. Les souris sont libres de leurs mouvements pour pouvoir suivre la progression des crises d'épilepsie, tous les enregistrements ont été effectués avec une période d'adaptation d'une heure dans la boîte d'enregistrement. Chaque enregistrement est comptabilisé sur deux heures avec des souris au repos ou actives.

L'examen des vidéos a été effectué pour éliminer les artefacts liés à l'animal et au dispositif EEG (grattage, mastication ou sommeil). L'acquisition des données est faite avec le logiciel « Sirenia Acquisition » (*fig. 13*). Pour chaque souris, la durée de la progression des crises a été déterminée grâce aux logiciels « Sirenia Seizures », qui permet l'élimination des artefacts et la sélection de la période à analyser, et « Neuroscore », pour la définition et la quantification de chaque crise, suivants des paramètres établis en amont.

Les paramètres d'acquisition sont: fréquence d'acquisition à 200 Hz (nombre de points enregistrés sur une seconde) / gain de 100 (amplification du signal), filtre à 25 Hz (acquisition des ondes cérébrales inférieures à 25 Hz car les spikes à observer sont de l'ordre de 1-6Hz. Nous enlevons ainsi, tous les bruits extérieurs qui sont en général au-dessus de 50Hz). Suivant le protocole pharmacologique établi, nous effectuons plusieurs sessions d'enregistrements un jour /semaine. Les données sont exprimées en temps de crise/heure, puis en nombre de « spikes » /crises/h.

Figure 13. Schéma des canaux des électrodes et du préamplificateur (EEG)



2.6 - Protocole Test pharmacologique *in vivo* : annexine A1

En collaboration avec l'équipe du Dr Solito E. de l'université Queen Mary à Londres, le traitement administré est une protéine annexine A1 recombinante fournie à une concentration mère de 2,1 mg/ml. J'ai effectué une préparation extemporanée d'une solution à une concentration fille de 1 µg/100 µl avec un tampon (40 mM HEPES, 140 mM NaCl + H₂O) conservé à 4°C pendant une semaine. Ce mélange permet de conserver la stabilité de la protéine jusqu'à son injection. Cette dose a fait l'objet de précédentes études ou elle a été validée pour d'autres pathologies comme les atteintes vasculaires en cas de diabète de type 1 (Solito *et al.* 2018) ou encore sur les plaques d'athérosclérose (Kusters *et al.* 2015).

Les souris ont reçu une dose de 1 µg d'annexine A1 en injection intrapéritonéale ou le même volume de NaCl 0.9% pour les contrôles (sham).

Une série de 20 souris avec un traitement à l'annexine A1 ou NaCl 0.9% en phase d'épileptogénèse, la première injection trois heures après le début du SE pour que celui-ci s'installe dans des conditions pathologiques. Par la suite, une injection quotidienne pendant une semaine est effectuée puis un jour/deux pendant 15 jours (fig.14).

Une autre série de 6 souris traitées et de 4 SHAM a été effectuée dans les mêmes conditions avec une dose de 10 μ g.

La deuxième série de vingt souris a été traitée à l'annexine A1 après quatre semaines post SE quotidiennement pendant 15 jours au dosage de 1 μ g (fig.14).

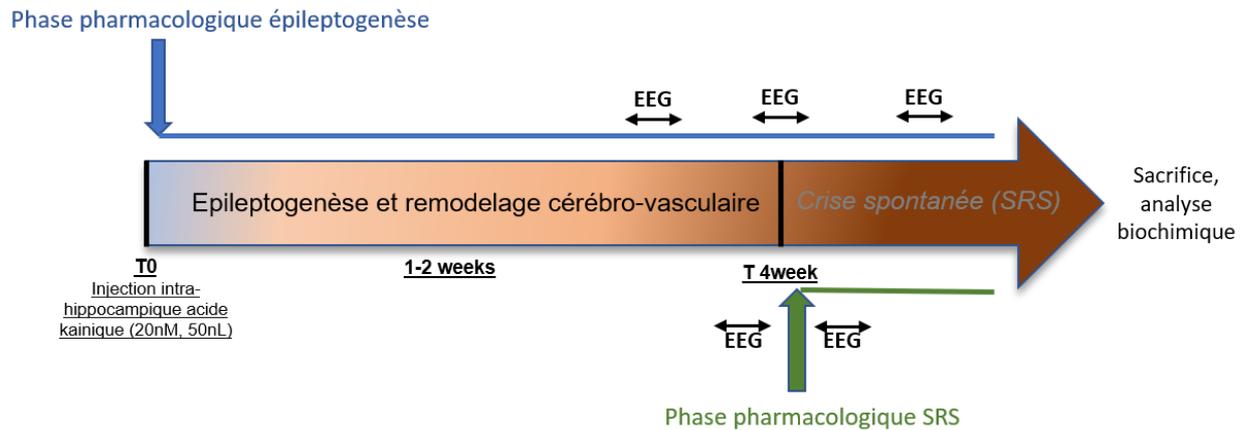


Figure 14. Axe de suivi et d'étude pharmacologique avec l'annexine A1 recombinée à 1 μ g/J

2.7 - Prélèvements des tissus cérébraux chez la souris et analyses biochimiques

Il a fallu des séries différentes de souris pour chaque analyse.

Ces prélèvements ont été effectués sur des séries de souris modèle TLE, sacrifiées par décapitation pour les analyses de Western blot et de sang. (8-10 souris / conditions avec comme conditions : CTR, 24 h post SE, 72 h post SE, 1 semaine post SE, 4 semaines post SE et 8 semaines post SE).

Une autre série de souris TLE, a été réservée à la RTqPCR, (5 souris/conditions). Les prélèvements ont été effectués après injection de pentobarbital en I.P. suivi d'une perfusion intracardiaque de PBS à 4°C pour nettoyer les tissus du sang qui pourrait générer des interférences avec les éléments recherchés dans les tissus.

Une dissection du cerveau est effectuée, sur support à 4°C, pour distinguer les différentes zones à analyser, notamment, l'hippocampe sur lequel nous avons distingué l'hippocampe ventral et dorsal.

Enfin, le sacrifice des souris traitées à l'annexine A1 en SRS est précédé d'une injection I.P. de pentobarbital, puis perfusion intracardiaque de PBS pour exsanguination. Par la suite, l'extraction du cerveau est faite, puis celui-ci est plongé dans le PFA 4% pendant 24 h.

2.7.1- Exsanguination

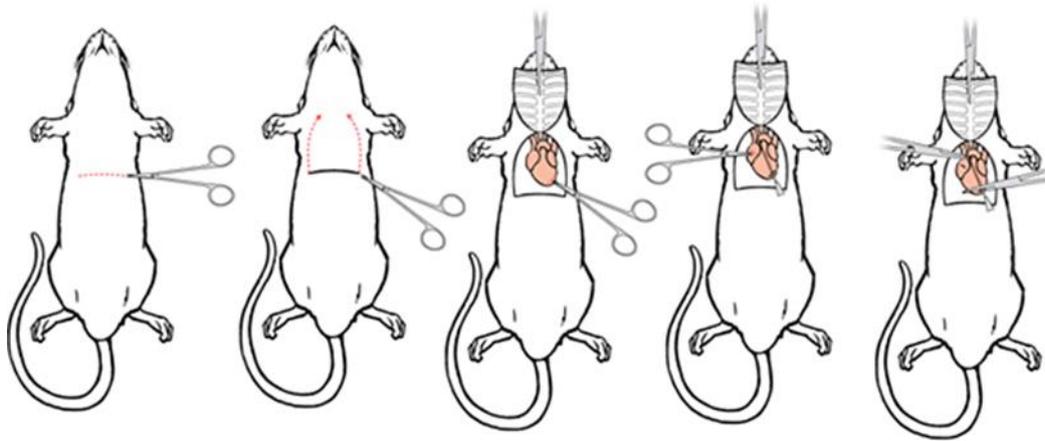


Figure 15. Méthode de dissection pour perfusion intracardiaque

La souris est injectée en I.P. avec une dose de pentobarbital (80 mg/kg) et le test du retrait de la patte est effectué pour vérifier la profondeur d'anesthésie.

La souris est fixée par les pattes sur un plan de travail adapté puis la procédure de dissection effectuée (fig.15) Une aiguille de calibre 26G vient piquer l'apex pour entrer dans le ventricule gauche. Une incision dans l'oreillette droite va permettre l'évacuation du sang après mise en route d'une pompe péristaltique réglée à 80 mm Hg. Il est nécessaire d'ajuster manuellement l'orientation de l'aiguille pour optimiser la perfusion qui va durer environ 5 minutes. Une perfusion efficace est contrôlée grâce à la perfusion du foie et à l'arrivée de liquide clair à la sortie de l'oreillette.

Une fois la perfusion terminée, la tête est coupée avec des ciseaux adaptés, tous les muscles du cou restants sont retirés pour exposer la base du crâne. Par la suite, il faut procéder à une découpe s'étendant jusqu'à la bordure distale de la surface du crâne postérieure et des deux côtés pour retirer le crâne et le cervelet. Faire glisser les ciseaux délicatement le long de la surface interne du crâne vers le haut jusqu'à la bordure distale frontale du crâne. Ecarter à l'aide des ciseaux les deux partis du crâne au niveau frontal pour mettre à nu le cerveau.

A l'aide d'une spatule, « taquiner » le cerveau au-dessus d'un flacon rempli à 10 X le volume du cerveau en PFA 4% pour le faire basculer à l'intérieur. Le flacon est placé à 4°C pendant 24 h.

2.7.2 - RT-qPCR

Les tissus cérébraux utilisés pour les RTqPCR sont: le cortex pariétal ipsilatéral et controlatéral, l'hippocampe ipsilatéral et controlatéral.

Les tissus sont suspendus dans 350 µl de tampon RTL (Qiagen, Venlo) associé à 1% de βmercapto-ethanol. Nous avons utilisé des tubes «Lysing Matrix D Fast Prep» (MP Biomedicals, Santa Ana, USA) pour la lyse des tissus. Le lysat est ensuite passé sur des colonnes QIAshedder (Qiagen, Venlo) et centrifugé. L'ARN total est extrait à l'aide du kit d'isolement RNeasy Mini RNA (Qiagen, Venlo) et sa pureté garantie par le kit RNase-free DNase (Qiagen, Venlo). La concentration en ARN de chaque échantillon a été mesurée sur un Nanodrop 2000c (Thermo fisher Scientific, USA). Un microgramme d'ARN total est transcrit (RT) grâce au kit de synthèse d'ADNc (Roche, USA) et suivant les instructions du fabricant. La qPCR est réalisée dans un volume de 5 µl contenant 10 ng d'ADNc, 500 nmol/l d'amorces (tab.2) et 2,5 µl de SYBR Green PCR Master Mix (Roche, USA) dans des plaques 384 puits en duplicate.

Le programme utilisé est de 45 cycles de dénaturation à 95°C pendant 10 sec, un recuit à 60°C 10 sec suivi d'un allongement à 72°C 15 sec sur un appareil LightCycler 480 (Roche, USA).

Après amplification, les courbes de fusion sont évaluées pour garantir la présence d'un seul produit. Chaque plaque a été munie d'un calibre d'ARN pour générer une courbe standard de l'efficacité des amorces. Les niveaux d'ADNc ont été quantifiés par la méthode comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les valeurs du Ct gène cible ont été normalisées avec les valeurs du Ct d'un gène de ménage GAPDH (glycéraldéhyde 3-phosphatedehydrogenase).

Gene name	Gene code	Specie	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (5' - 3')	Product lenght
Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	Pdgfrb	Mouse	TGTGCAGTTGCCTTACGACT	CAGGTGGGGTCCAAGATGAC	235
Tumor necrosis factor	Tnf / TNF-a	Mouse	GCTGAGCTCAAACCTGGTA	CCGGACTCCGAAAGTCTAA	119
Annexin A1	Anxa1	Mouse	TGATACAGATGCCAGGGCTTT	TCCGCAAAGAAAAGCTGGAGT	243
fomyl peptide receptor 1	Fpr1	Mouse	TCTCCCCCTGGACCAAAGAT	GCAAAGGACGGCTGGATTTG	183
FK506 binding protein 5	Fkbp5	Mouse	GTCCAAAGCCTCAGAGTCGTTC	AGCCTTTCTCATTGGCACTGTC	137
hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	Hsd11b1	Mouse	CTCCAGAAGGTAGTGTCTCGC	CCTTGACAATAAATTGCTCCGCA	106
Trans membrane protein 119	Tmem119	Mouse	GCATGAAGAAGGCCTGGAC	CTGGGTAGCAGCCAGAATGT	61
Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 12	P2ry12	Mouse	CGGTACTTATCTGCTAACTAGCTTTGA	TTGGTAATTGTAGTTGCTTATGTTTTTC	94
Hexosaminidase B	Hexb	Mouse	TTGGCAAGAAGTTTTTGATGA	TTCCACACTTCGACTACTGTGC	63
Chemokine (C-C motif) ligand 2	Ccl2	Mouse	CAGGTCCCTGTCTATGCTTCT	TTGAGCTTGGTGACAAAACTACAG	209
Chemokine (C-C motif) ligand 12	Ccl12	Mouse	CCATCAGTCTCAGGTATTGG	CTTCGGGACGTGAATCTTCT	95
Intercellular adhesion molecule 1	Icam1	Mouse	AAGGTGGTTCTTCTGAGCGG	TCCAGCCGAGGACCATACAG	185
Vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	Mouse	TGGAGGTCTACTCATTCCCTGA	GGTGGGGATGAAGGTCGTTT	227
Tight junction protein 1	Tjp1 /ZO-1	Mouse	CAGAGCCCTCCGATCATTCC	GGCTGACGGGTAATCCACA	249
Glial fibrillary acidic protein	Gfap	Mouse	GGCTCGTGTGGATTTGGAGA	TGCTCGTATTGAGTGCAGAA	190

Tableau 2. Amorces utilisées pour les gènes cibles

2.7.3 - Western blot

Je tiens à signaler que cette partie et la suivante ont été effectuées en collaboration avec l'équipe de Laurent Givalois, (Inserm U1198), sur des séries d'échantillons de souris TLE que nous avons réalisées et fournies pour qu'ils procèdent aux analyses par Western blot dans leur laboratoire.

Les analyses sont réalisées sur les hippocampes ipsilatéraux et controlatéraux de souris modèle TLE prélevés et immédiatement congelés en azote liquide, puis conservés à -20°C. (Conditions : CTR, 24 h post SE, 72 h post SE, 1 semaine post SE, 4 et 8 semaines post SE).

Les échantillons sont soniqués (VibraCell, USA) dans un tampon de lyse et centrifugés à 4°C. Les surnageants sont recueillis et la concentration totale en protéines est mesurée grâce au kit BCA (ThermoFisher Scientific, France). Soixante microgrammes de protéines sont utilisés pour l'analyse en Western blot. Les échantillons sont séparés à l'aide d'un gel SDS-polyacrylamide (12%) et transférés sur une membrane PVDF (Merk-Millipore, France). La membrane est incubée pendant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire choisi (*tab.3*), rincée puis incubée 2 h avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort. L'activité peroxydase est révélée avec le réactif de chimioluminescence ECL (Luminata-crecendo, Merk). L'intensité de la luminescence est quantifiée à l'aide du logiciel Fiji et la protéine β -tubuline est utilisée comme contrôle de charge pour toutes les expérimentations.

Protéine concernée	poids moléculaire(kDA)	Hôte	Dilution
Anticorps primaire Western Blot			
Annexin A1 (<i>ThermoFischer</i>)	35	Rabbit	1/1000
GFAP (<i>Sigma-Aldrich</i>)	55	mouse	1/2000
GR (<i>Cell Signaling/Ozyme</i>)	95	rabbit	1/1000
pGR (<i>Cell Signaling/Ozyme</i>)	95	rabbit	1/1000
Iba1 (<i>Wako Chem.,Osaka</i>)	17	rabbit	1/750
β -tubuline (<i>Sigma-Aldrich</i>)	50	mouse	1/7500
Anticorps secondaire			
Goat anti-rabbit IgG	(<i>Sigma-Aldrich</i>)		1/2000
Goat anti-mouse IgG	(<i>Sigma-Aldrich</i>)		1/2000

Tableau 3. Anticorps utilisés pour les Western Blot

2.7.4 - Prélèvement sanguin test ELISA corticostérone et ANXA1

Le sang est prélevé par décapitation et récupéré dans un tube EDTA (environ 250 µl). Celui-ci est centrifugé à 1.500G à 4°C et le plasma conservé à -20°C. Les concentrations en corticostérone et annexine A1 sont dosées avec un kit ELISA (enzo-life sciences, USA) sur 10 µl de plasma dilué au 1/40 avec un tampon de dosage. La sensibilité du test est de 6,6 et 7,8%. Les plaques ELISA sont incubées la nuit avec un anticorps de capture de 20 µg/ml (Ac monoclonal de souris généré en interne) dans un tampon de bicarbonate (25 mM NaHCO₃, 25 mM Na₂CO₃, pH 9,6). La plaque est ensuite lavée 3X avec ce même tampon et bloquée dans un tampon de blocage (0,1% de BSA, PBS) pendant 1 h à 37°C. 100 µl d'échantillons sont chargés et incubés 1 h à 37°C puis lavés 5X avec du tampon de lavage (0,9% NaCl, 0,05% Tween-20, H₂O). Les puits sont incubés avec 1 µg/ml d'anticorps de détection (lapin polyclonal anti-Anxa1, UK) 1 h à 37°C. Après 5 lavages, des immunocomplexes sont détectés en ajoutant l'IgG de chèvre anti-lapin avec la phosphatase alcaline conjuguée pendant 30 min. Après 5 lavages, un substrat, le phosphate p-nitrophenyle (Sigma Aldrich, UK) est ajouté et laissé 30 min pour le développement complet de la réaction colorimétrique. La plaque est ensuite lue par absorbance à 405 nm et corrigée à 540 nm comme longueur d'onde de référence sur un spectrofluorimètre (Tecan Infinite M200Pro, Autriche).

2.7.5 - Immunohistochimie

Nous avons utilisé les cerveaux fixés (4% PFA) après sacrifice de la série d'animaux utilisée pour la pharmacologie *in vivo* SRS. Des souris NG2DsRed (dont les péricytes expriment une fluorescence rouge) ont également été utilisées pour visualiser la réactivité des péricytes au SRS (Klement *et al.* 2018).

Des coupes cérébrales de 30 µm sont réalisées sur un Vibratome puis rincées 3 X 10 min dans du PBS. Elles sont ensuite incubées dans une solution de blocage (20% horse sérum, 0,3% triton, PBS) pendant 1 h. Une incubation sur la nuit à 4°C est effectuée avec l'anticorps primaire (*tab.4*). Les coupes sont lavées 3X 10 min au PBS et incubées 2 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire adapté (*tab.4*). Les coupes sont ensuite rincées et montées entre lame et lamelle à l'aide d'un Vectashield DAPI pour observation ultérieure en microscopie à fluorescence.

Protéine concernée	Hôte	Dilution
Anticorps primaire IHC		
IBA1 (Wako)	Rabbit	1/1000
GFAP (Abcam)	Chicken	1/300
PDGFR β (Abcam)	Rabbit	1/100
DAPI (Vector laboratories)	Vectashield	[DAPI]= 1,5 μ g/ml
Anticorps secondaire		
IBA1 et PDGFR β (Jackson)	Donkey anti-Rabbit Cy3	1/500
GFAP (Jackson)	Donkey anti-chicken Alexa fluor488	1/500

Tableau 4. Anticorps utilisés pour les immunohistochimies

2.8 - Statistiques

Les analyses ont été effectuées à l'aide de GraphPad Prism 6.0. Les données ont été analysées à l'aide de tests paramétriques (one way Anova) ou non paramétriques (Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis) en fonction de la distribution de normalité (Shapiro-Wilcox). Significativité: < 0,05. En ce qui concerne les corrélations, nous avons utilisé le coefficient de corrélation « pearson's r » sur le logiciel Origin.

III- Résultats

3.1 - Réponse anti inflammatoire durant la progression des crises

Nous avons cherché tout d'abord à mettre en évidence le couple anti inflammatoire endogène annexine A1/glucocorticoïdes. Ce couple est en équilibre constant avec les acteurs pro-inflammatoires dans un état physiologique normal. Nous avons donc cherché des dysfonctions de cet équilibre dans un état pathophysiologique pour mettre en évidence les conséquences qui en découlent. Les modifications biochimiques et cérébrales ont ensuite été intégrées au processus fonctionnel chez la souris avec apport exogène d'annexine A1 pour observer une éventuelle modification pendant une analyse d'électroencéphalographie.

Nous voulions tester l'activation du récepteur GR (balance anti-inflammatoire). Pour ces raisons, nous avons quantifié en Western blot, la forme phosphorylée du récepteur et calculé le ratio entre la forme phosphorylée et totale. Sur les Western blots, on peut voir une augmentation de phosphoGR et GR transitoire à 72 h côté ipsilatéral (foyer épileptique du modèle), puis une diminution significative à long terme (1 semaine, 4 semaines et 8 semaines) (*fig. 16, 17A*). Du plus, nous avons quantifié un marqueur d'inflammation (balance pro-inflammatoire), la GFAP, qui est la protéine acide fibrillaire gliale présente sur les astrocytes. On observe une augmentation de celle-ci à 72h, 1 semaine, 4 semaines et 8 semaines (*fig. 16*). La phosphorylation de GR (*fig. 17A*) et le rapport des protéines PhosphoGR/GR (*fig 17B*) diminue pendant l'épileptogenèse et pendant la phase chronique d'apparition des crises récurrentes spontanées. Ces observations indiquent que la fonctionnalité de cette voie est altérée. En aval de la signalisation de GR et de la carence en phosphorylation du récepteur, annexine A1 reste à un niveau basal (*fig.18B*) tout au long du suivi. Ceci peut suggérer un déficit de réponse anti-inflammatoire endogène de l'annexine A1 tandis que l'inflammation progresse comme le montre l'augmentation de la protéine astrocytaire GFAP (*fig.18A*).

A

right (R):epileptic foci
left (L): contralateral

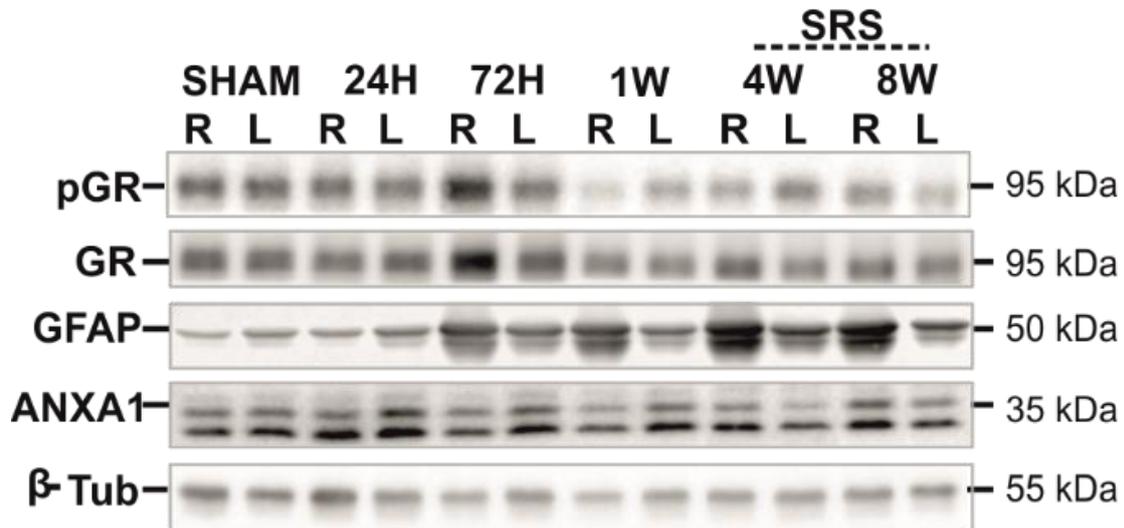


Figure 16. Observation de la fonctionnalité du couple annexine annexin A1-GR et activation astrocytaire (GFAP) dans l'hippocampe ipsi R (foie épileptique) et contra-latéral L pendant la progression des crises expérimentales in vivo. Annexine A1 bande1: protéine de base ; bande2: protéine avec modification post traductionnelle (Les deux bandes sont quantifiées). β -Tub: protéine de référence avec une constante quantitative.

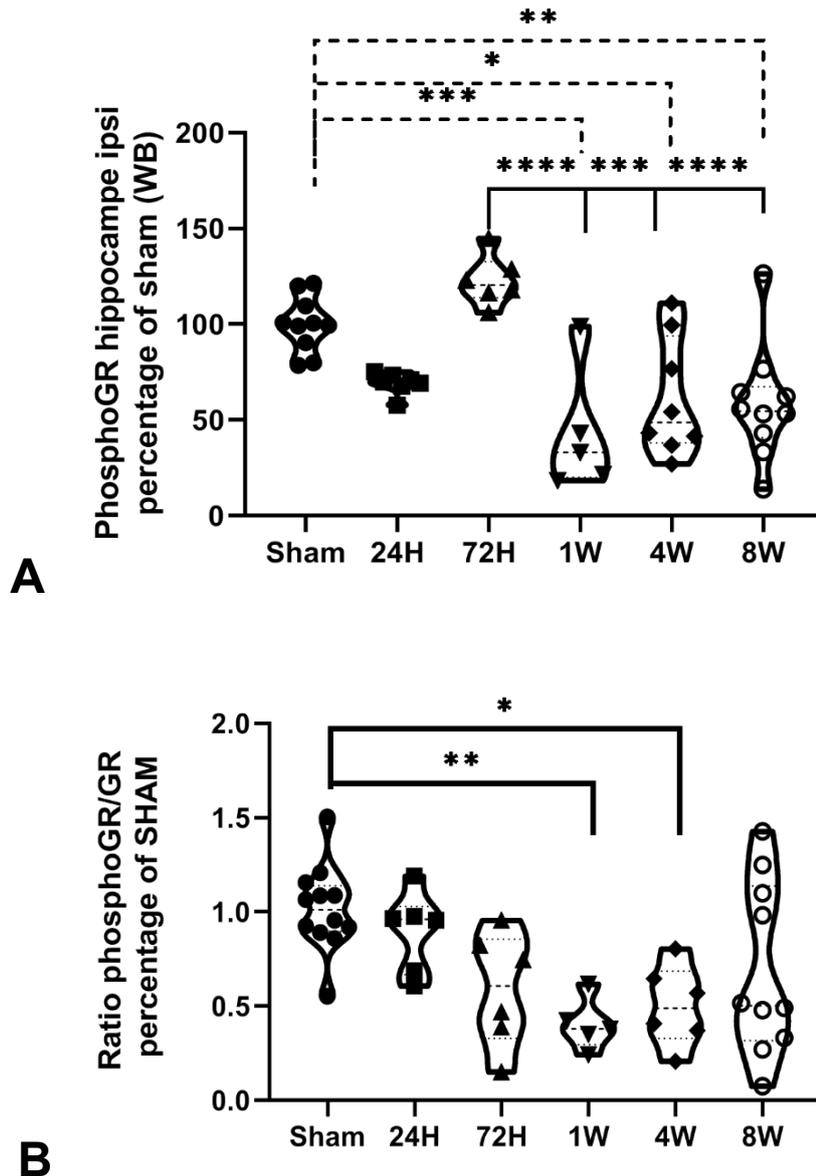


Figure 17. Western blot de la quantité de GR phosphorylé(A) pourcentage rapporté aux sham et de son rapport au GR(B). Analyses effectuées sur un décours temporel entre 24h et 8 semaines post kainate sur les hippocampes ipsi (R). Les données ont passé le test « Shapiro-Wilk » pour la normalité, et ensuite, un one way Anova pour la comparaison avec le test «Tuckey's multiple comparison test ». Chaque point représente l'hippocampe d'un animal $n = 12, 6, 6, 5, 6, 10$. Significativité : p value * = < 0.05, ** = < 0,01 *** = <0.001 **** = < 0.0001.

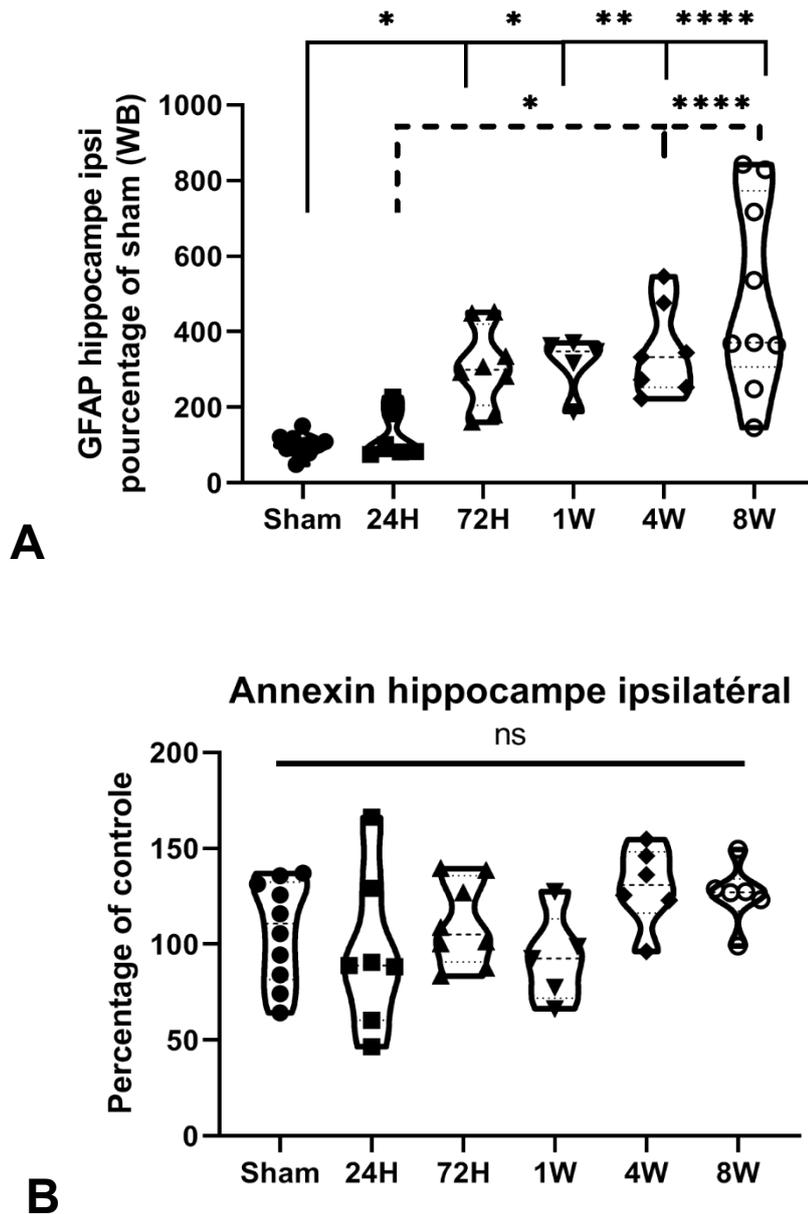


Figure 18. Résultats Western blot de la quantité de GFAP(A) et d'annexine A1 (B) dans l'hippocampe ipsilatéral et rapporté aux Sham durant l'évolution de la maladie. Chaque point représente l'hippocampe d'un animal. Les données ont passé le test « shapiro-wilk » pour la normalité, et ensuite un one-way Anova, avec un «Tuckey' multiple comparison» test Annexine: $n = 10, 7, 8, 5, 6, 6$; GFAP : $n = 12, 6, 8, 5, 7, 9$. Significativité : p value * = < 0.05, ** = < 0,01 *** = <0.001 **** = < 0.0001.

Avec les données de Western blot, nous avons tenté de mettre en évidence une corrélation entre les niveaux d'expression des protéines pro et anti inflammatoires qui sont équilibrés à un niveau basal, comme entre annexine A1 et GFAP sur les contrôles (fig. 19, sham en noir).

L'augmentation progressive de l'expression de la GFAP durant la maladie n'est pas accompagnée d'une augmentation d'annexine A1. En comparant les hippocampes ipsi- et contro-latéraux (*fig.19A, B*), on note une inclinaison de l'équilibre en faveur de l'inflammation (*fig.19 A* points rouges dans la zone colorée en rose). Dans l'hippocampe contralatéral, région caractérisée pour la propagation des crises dans ce modèle, on note une tendance similaire pendant l'épileptogénèse et les crises chronique (SRS).

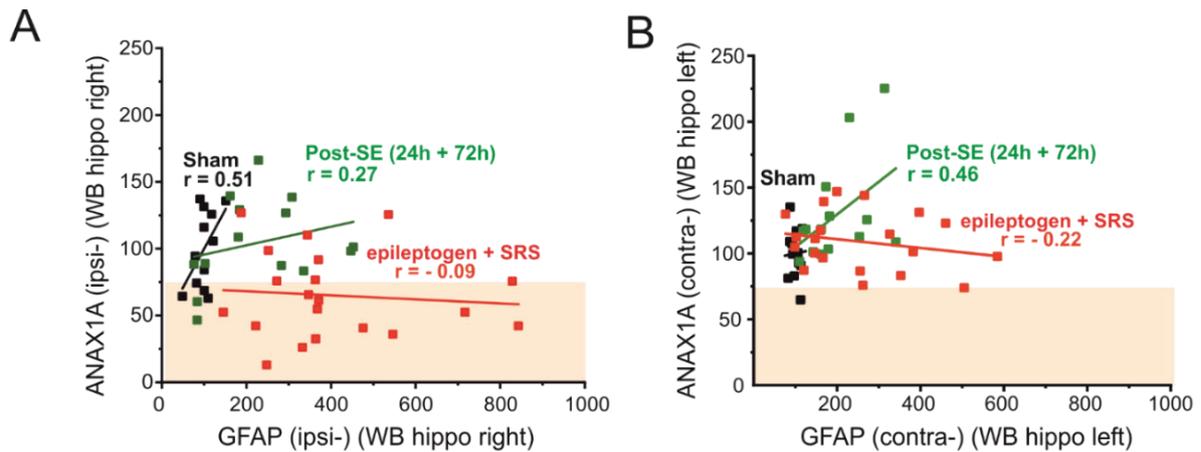


Figure 19. Rapport de l'activation astrocytaire et de l'Annexine endogène (concentration protéique). Observation d'un déséquilibre en faveur de l'inflammation dans le foyer ainsi que dans l'hippocampe contralatéral. (Pearson correlation coefficient $n=12$ Sham ; $n=14$ 24+72h ; $n = 20$ épileptogénèse+SRS).

Ensuite, nous avons utilisé la technique q-PCR pour quantifier des facteurs solubles de l'inflammation en particulier la cytokine TNF α , et les chimiokines CCL2, CCL12. Ces 3 molécules ont été l'objet de plusieurs études et ont été suggérées comme des acteurs importants dans l'épilepsie (*Vezzani et al, 2011*). Nous avons aussi quantifié la molécule anti inflammatoire annexine A1. Les résultats présentés (*fig.20*), montrent qu'il y a une réactivité à 24 h pour ces 3 facteurs avec un retour à la normal après 72 h. La traduction d'annexine A1, quant à elle, ne varie pas aussi significativement pour suivre l'évolution des chimiokines à 24 h (*fig.21*). On peut tout de même voir une légère tendance à la hausse à partir de 24 h avec maintien de cette tendance.

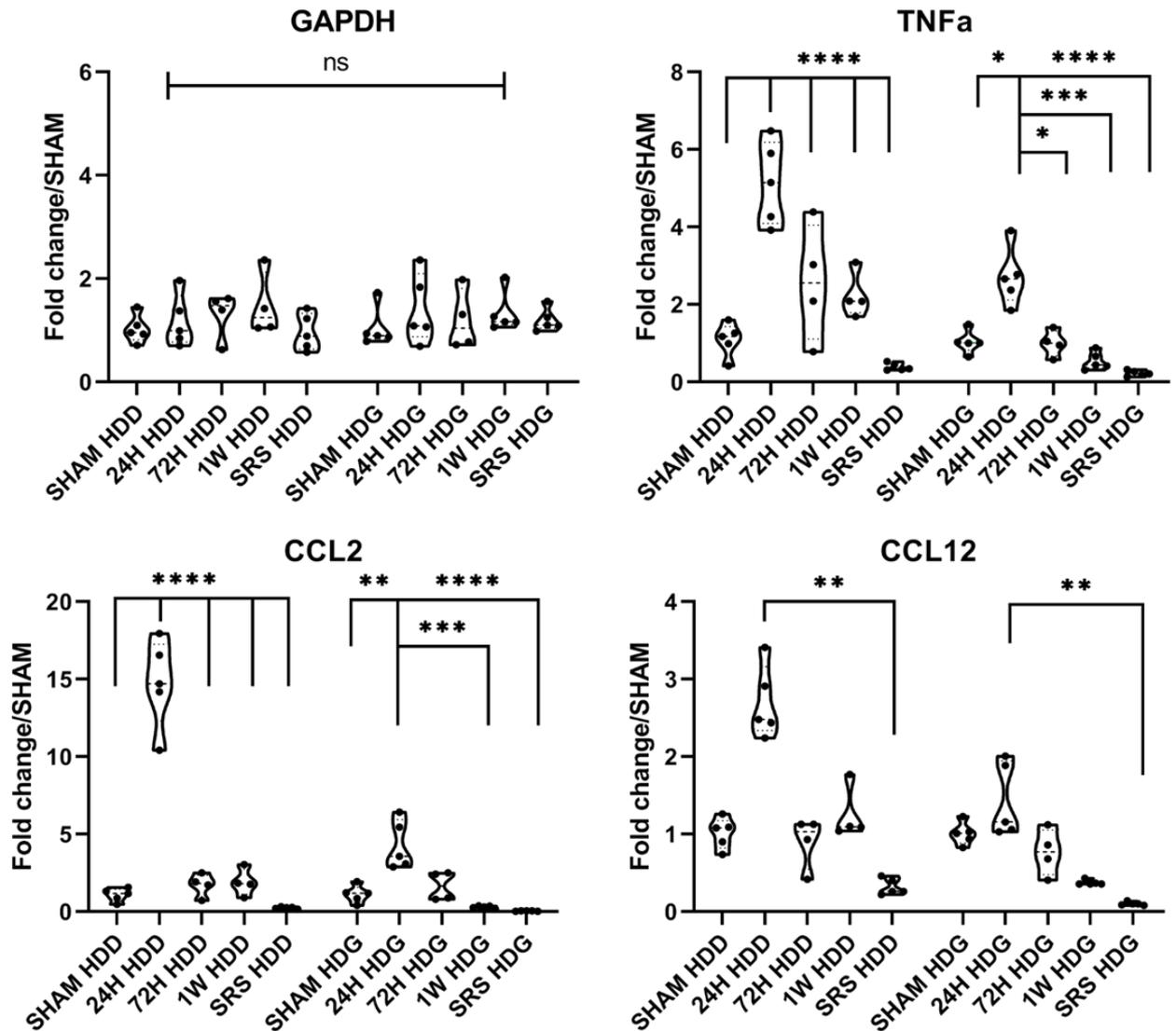


Figure 20. Données CT-value qPCR rapportées à la moyenne des sham sur les facteurs solubles de l'inflammation. GAPDH: gène de ménage ; TNFa, CCL2 et CCL12. Un point par hippocampe de souris; $n = 5$. Les données ont passé le test «shapiro-wilk» pour la normalité, puis «one-way Anova» test. CCL12 a échoué au test de normalité, a donc été analysé avec un «Kruskal-wallis» en non paramétrique pour la significativité. P value: * = < 0.05, ** = < 0,01 *** = <0.001 **** = < 0.0001.

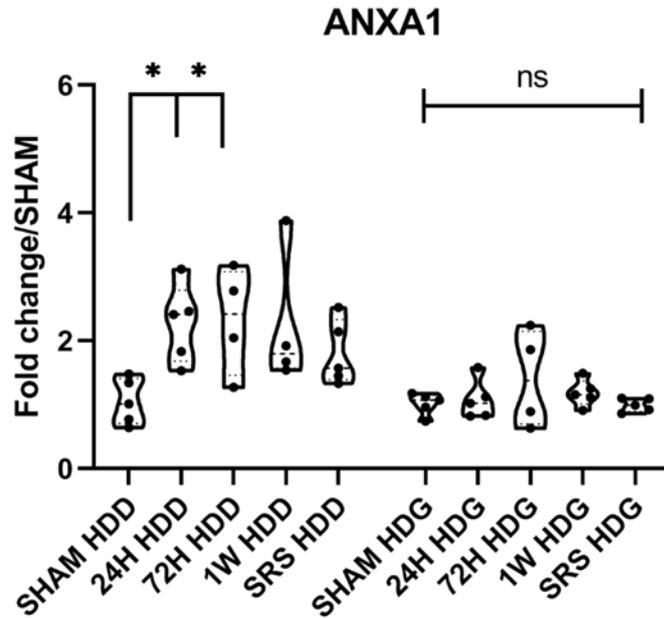


Figure 21. Données CT-value rapportées aux sham de l'annexine A1. Un point par hippocampe de souris ; $n = 5$. Les données ont passé le test «shapiro-wilk» pour la normalité, puis un «one-way Anova» pour la significativité. P value: * = < 0.05 , ** = $< 0,01$ *** = < 0.001 **** = < 0.0001 .

Nous avons quantifié d'autres marqueurs d'inflammation. Toutes les données collectées sont répertoriées en annexe 1.

ANXA1 a aussi été corrélé à l'expression des transcrits des protéines inflammatoires solubles CCL2, CCL12 ou encore TNF α . La figure 21 (A, B, C) montre une balance annexine A1-facteurs pro-inflammatoires, encore une fois, altérée surtout dans l'hippocampe ipsilatéral (foyers épileptiques) par rapport au Sham. Nous avons effectué la même corrélation sur les hippocampes contro-latéraux (fig.21 A1-B1-C1) et cela a montré des changements en particulier en post SE. Ce résultat montre qu'il n'y a pas de surproduction d'annexine A1 en fonction de l'augmentation des facteurs pro inflammatoire pendant l'épileptogénèse ou en chronique.

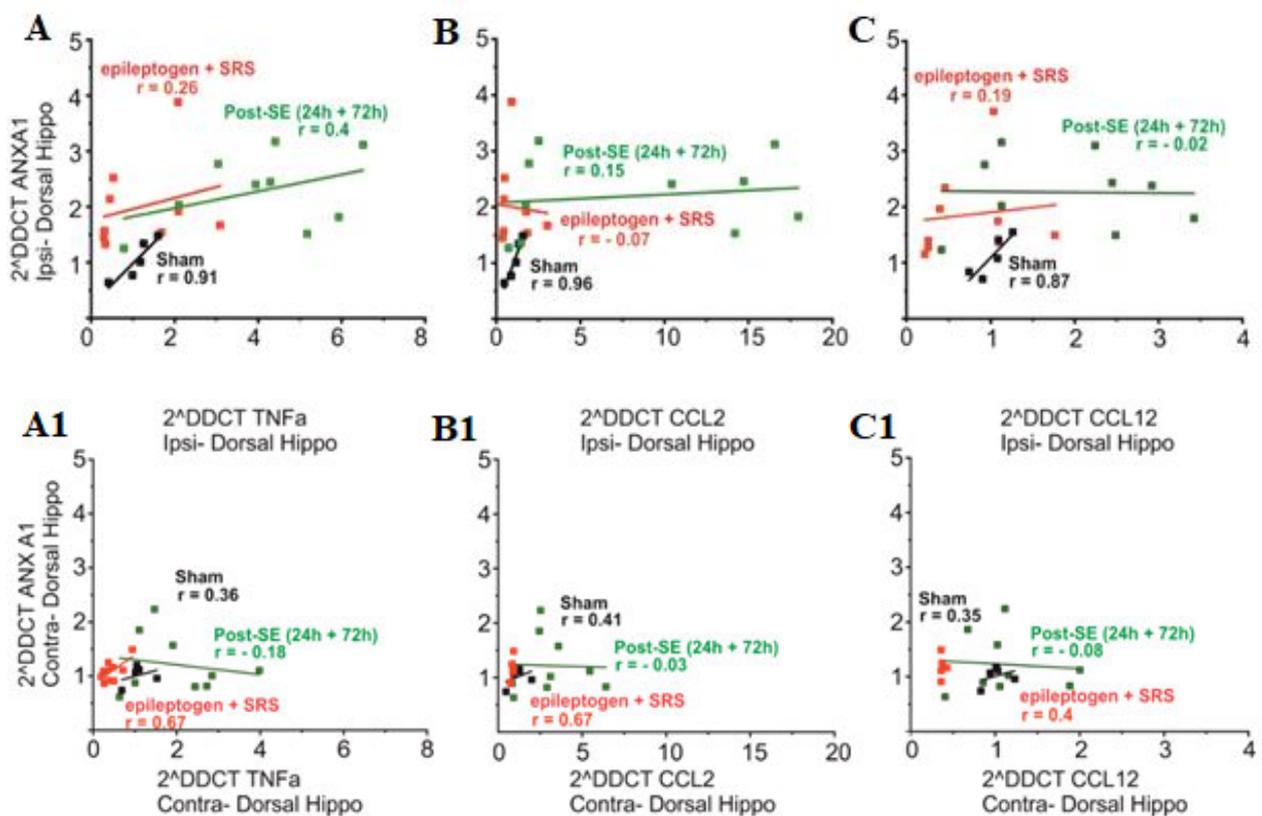


Figure 21. Mise en évidence d'un déséquilibre des acteurs anti et pro-inflammatoires pendant le post SE et en crises chroniques dans l'hippocampe ipsi (A-B-C) et contra (A1-B1-C1) latérale. Rapport entre les différents acteurs pro-inflammatoire (expression d'ARNm). («Pearson correlation coefficient» Sham: n=5, Post-SE: n=9, Epileptogénèse + SRS: n=9).

L'annexine A1 peut être relarguée par les cellules du système immunitaire périphérique en condition pathologique. Pour cette raison, nous avons cherché à doser l'annexine A1 dans le sang avec un test Elisa pendant la progression de l'épilepsie. En parallèle, la corticostérone, activateur endogène du récepteur GR, est dosée.

L'Annexine A1 sanguine (fig.22 B) et la corticostérone ont augmenté transitoirement à 24h après le SE (fig. 22 A) et retrouvé un niveau basal pendant l'épileptogénèse et les crises chroniques. Le comptage des cellules blanches montre un changement typique des effets anti-inflammatoires de la corticostérone avec une diminution des lymphocytes T circulants (fig.23 A) et une augmentation des neutrophiles (fig.23 B). L'augmentation des monocytes (fig.23 C) soutient l'état pro inflammatoire existant pendant l'épileptogénèse. L'ensemble de ces résultats indique un déficit du mécanisme anti-inflammatoire annexine A1-GR pendant l'épilepsie *in vivo*.

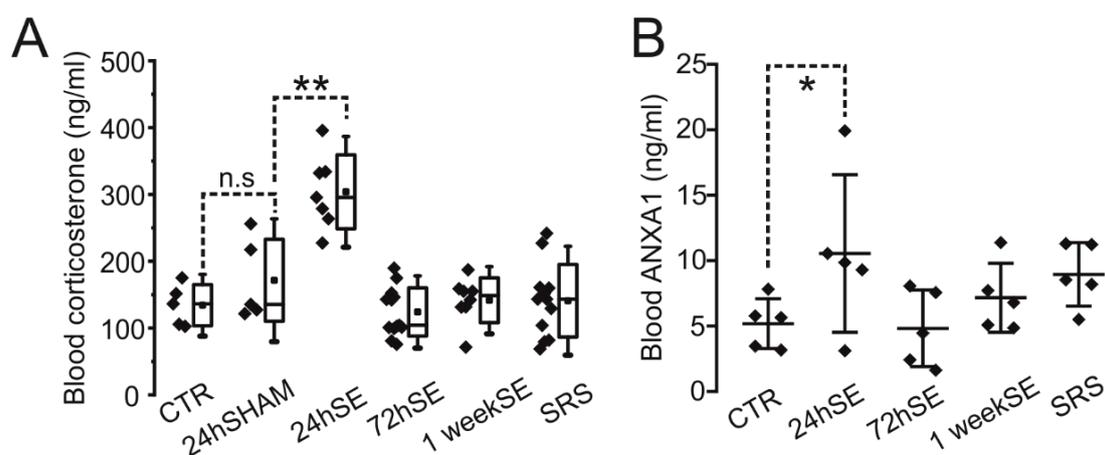


Figure 22. Taux sanguins de corticostérone (A) et d'annexine A1 (B) durant la progression des crises chez la souris. Chaque point représente un animal A: $n = 5, 5, 7, 10, 8, 10$; B: $n = 5$ test «one way Anova». P value: * = < 0.05 , ** = $< 0,01$ *** = < 0.001 **** = < 0.0001 .

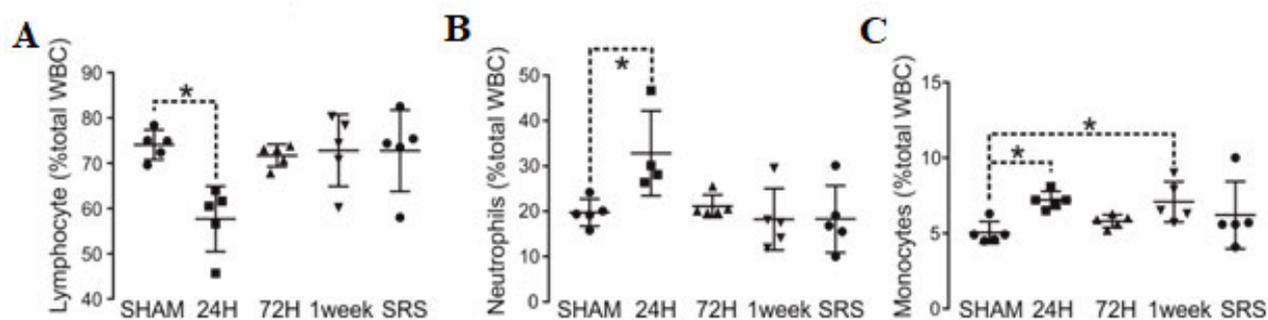


Figure 23. Comptage des cellules blanches périphériques au décours temporel du modèle TLE $n = 5$, test «kruskal-wallis». P value : * = < 0.05 , ** = $< 0,01$ *** = < 0.001 **** = < 0.0001 .

3.2 - Traitement pharmacologique dans un modèle murin de TLE

3.2.1 - Traitement pendant les crises chroniques

Avec ces résultats, nous avons décidé d'administrer de l'annexine A1 recombinante pour stimuler les mécanismes anti-inflammatoires endogènes et étudier l'impact sur la physiopathologie des crises in vivo (*fig.24*). Des doses d'annexine A1 exogènes choisies se sont avérées bénéfiques dans d'autres maladies du SNC comme la sclérose en plaque. (*Cristante. et al. 2013*), ou encore sur la défaillance de la micro vascularisation rénale découlant du diabète de type I. (*Purvis. et al. 2018*). Bien que l'on observe une variabilité des résultats sur les animaux traités, l'administration d'annexine A1 a réduit le temps total de crises au mois de 30-40% (post – pre traitement) en SRS dans 5 animaux sur 10 par rapport à des animaux contrôles (*fig.24B*). En général, ce traitement a été bénéfique chez 7 souris/10, alors qu'un traitement à la solution saline dévoile un moindre bénéfice (3 souris /7) (*fig.24B*). On observe qu'aucune souris Sham ne va au-delà d'une diminution de 30-40% du temps total de crise. Un exemple de variation d'amplitude et de durée de bouffée de crises est illustré en *fig.25A, A1*. On peut voir après zoom sur zone, que celle-ci comporte moins de décharges caractéristiques d'une crise pendant le traitement à l'annexine A1 que sans le traitement.

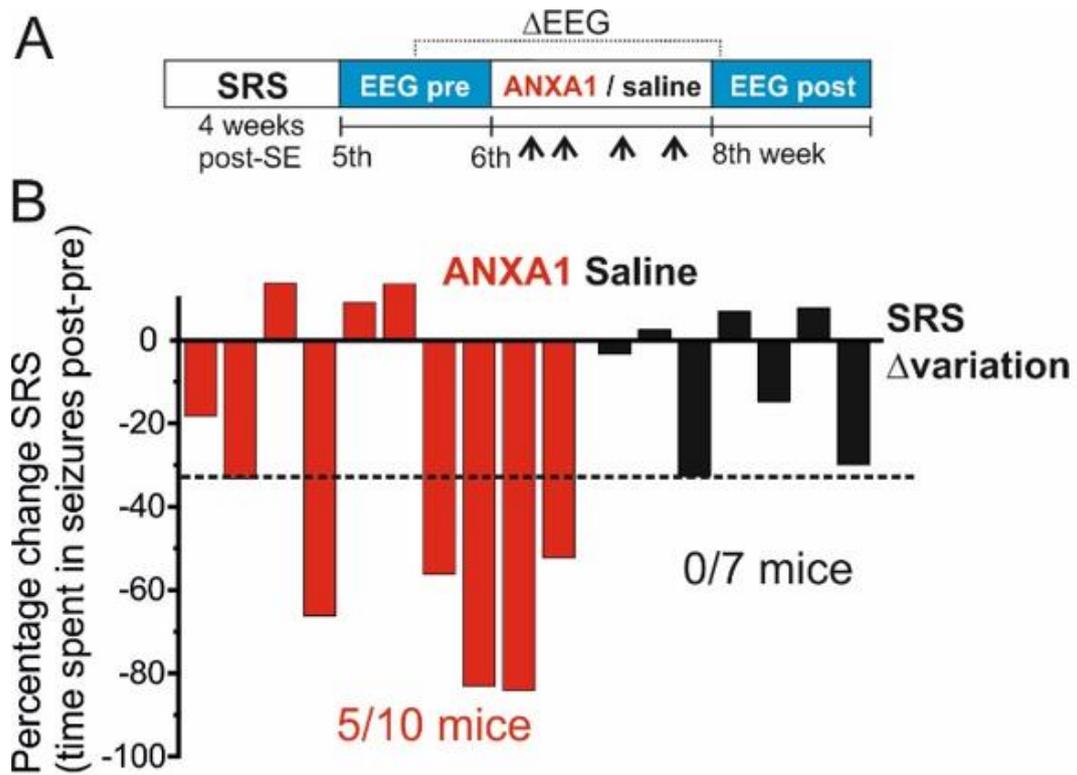


Figure 24. Schéma de l'administration d'annexine A1 recombinée dans les crises spontanées chroniques *in vivo* : Analyses Electro-encéphalographiques. Décours et suivi temporel de la pharmacologie (A), Histogramme du pourcentage de variation du temps de crise dans chaque souris (B).

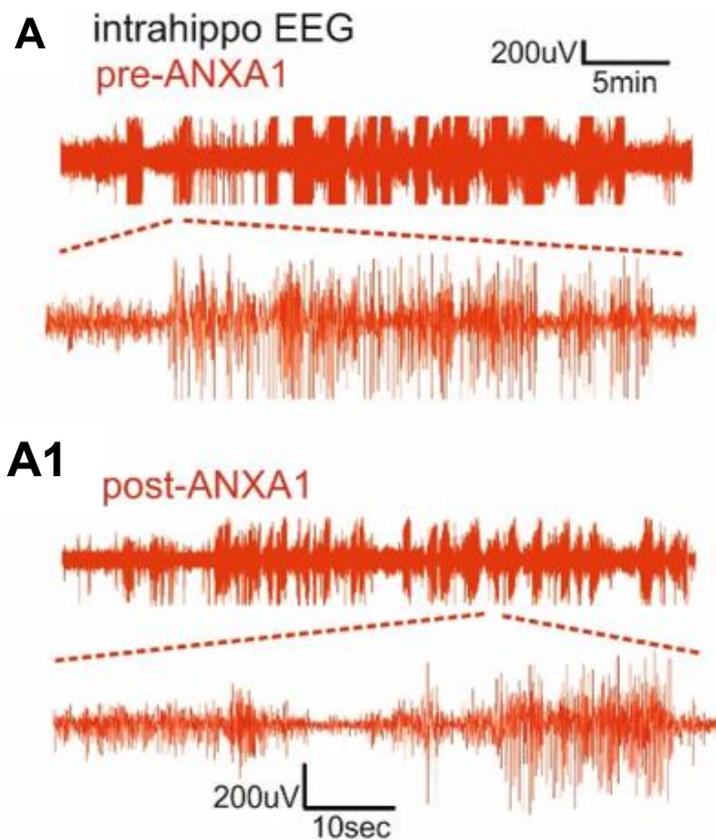


Figure 25. Exemple d'EEG montrant des tracés enregistrés avant et pendant le traitement annexine A1 durant la phase chronique avec agrandissement d'une zone de crise (A, A1)

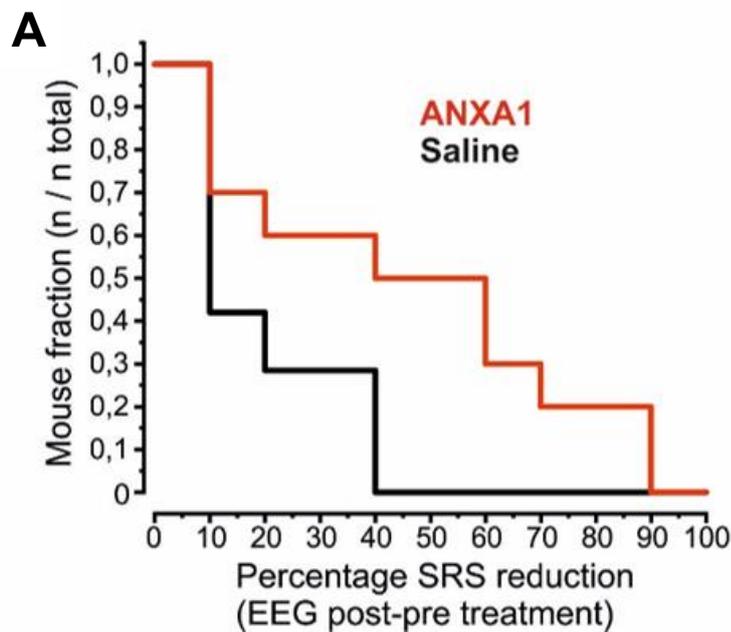


Figure 26. Courbe de survie de kaplan-meier (A) définissant le pourcentage de temps de réduction des crises.

3.2.2 - Traitement pendant l'épileptogénèse

Nous avons aussi évalué si l'annexine A1 administrée pendant l'épileptogénèse exerce des effets modificateurs des crises en SRS (*fig.27 A*). Après 3 semaines d'administration d'annexine A1 recombinante en IP, 7 souris sur 9 traitées présentent des durées d'activités inférieures à 10 min/h, contre 3 souris/9 dans le groupe contrôle (*fig.27 A1, A2*). La durée de 10 minutes a été choisie arbitrairement grâce à l'expérience que nous avons du modèle. Ces résultats sont reconnaissables visuellement sur l'EEG et une différence notable entre un EEG de souris Sham et de souris traitées à l'annexine A1. Cet EEG a été effectué pendant le traitement à l'annexine A1, soit semaine 3 post SE (*fig 27A et 28*). A la fin du traitement à 4 et 6 semaines, on constate une progression équivalente dans les deux groupes après arrêt du traitement. Dans un essai pilote, on a testé un dosage d'annexine A1 plus élevé (*fig. 29*). Dix microgrammes d'annexine A1 en traitement sur l'épileptogénèse dans les mêmes conditions (qu'avec le traitement à 1 µg) montre une tendance à la diminution du temps de crise à 3 semaines et cette tendance disparaît définitivement à 7 semaines. Avec une observation des animaux pendant mes interventions pour les injections d'annexine A1, je n'ai observé aucune différence de comportement entre le groupe traité et le groupe sham. De plus, aucun effet secondaire lié au poids n'a été observé durant le traitement (*tab. 5*).

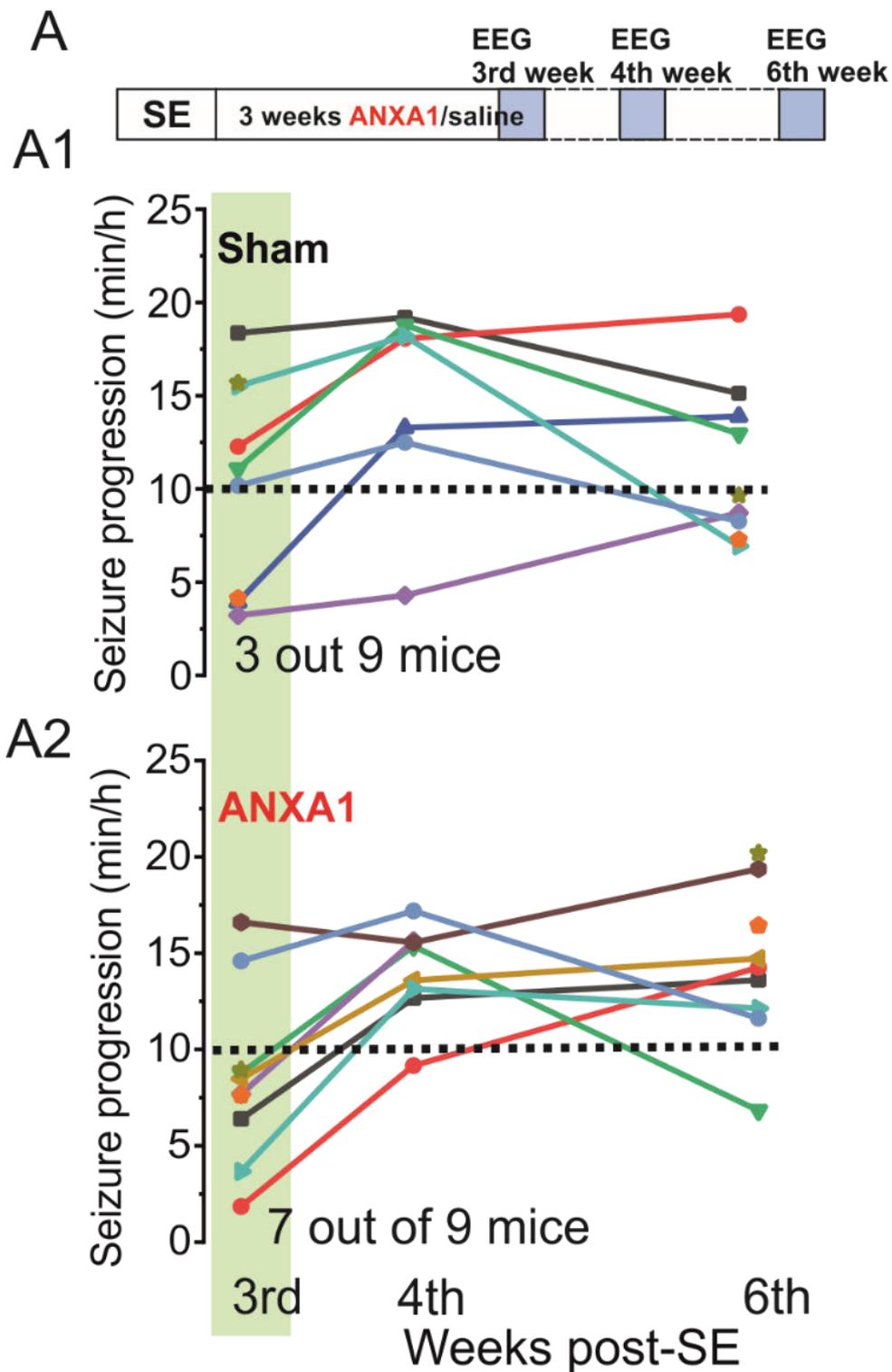
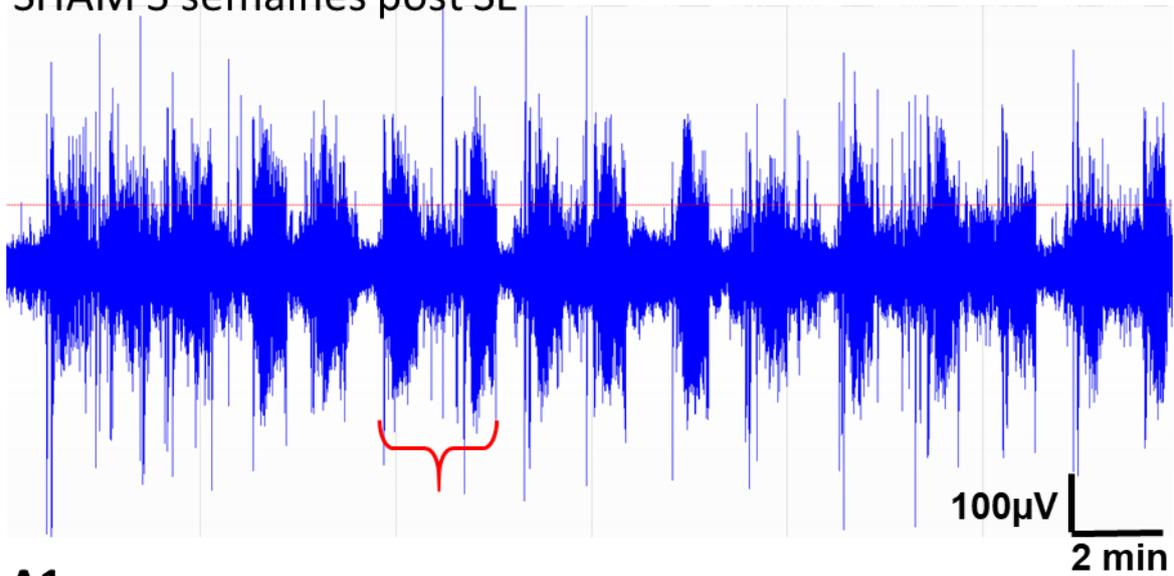


Figure 27. Administration d'annexine A1 durant l'épileptogénèse et conséquence sur l'EEG durant le SRS in vivo (A). Décours et suivi temporel de la pharmacologie de chaque souris, progression des crises durant l'épileptogénèse en min/h (A1 ; A2)

A Intra-hippo EEG
SHAM 3 semaines post SE



A1
ANXA1 3 semaines post SE

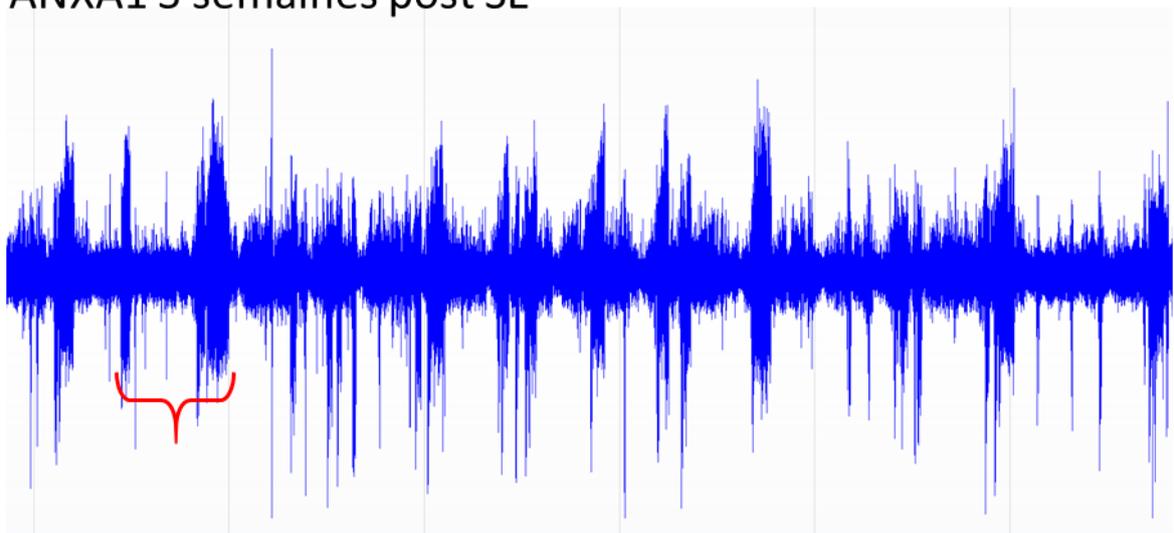


Figure 28. Exemple de tracés EEG (Neuroscore) de souris en intra hippocampale pendant le traitement en phase épiléptogénèse. Nombres de bouffées de crises moins nombreuses chez la souris traitée annexine A1 à l'EEG par rapport au groupe Sham, 3 semaines post SE.

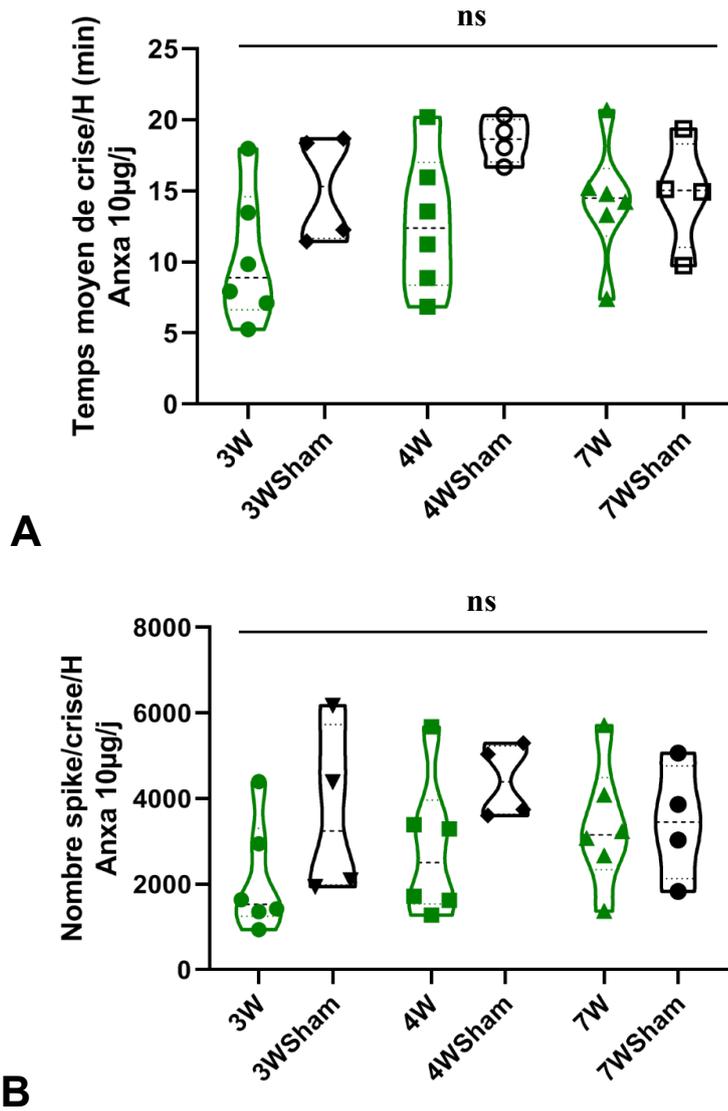


Figure 29. Quantification et comparaison du temps moyen de crises (A) et du nombre de spikes/h (B) durant les crises avec une pharmacologie annexine A1 recombinée à un dosage de 10 µg/jour entre animaux traités et Sham. (Traité en vert n = 6 ; SHAM en noir n = 4), test statistique non paramétrique Mann-Whitney.

	Epileptogénèse		SRS	
Poids souris en g	J0	J+8	J0	J+ 35
SHAM (NaCl)	22,3± 1	23,8± 1,1	23,4± 1,3	27,9± 1,2
Anxa-1	22,3± 0,8	24,7± 1,3	24,5± 1,7	27,9± 2,3

Tableau 5. Variation du poids des souris pendant le traitement annexine A1 recombiné vs NaCl en I.P 1µg/J. n = 10

3.3 - Marquage cellulaire

Sur des souris traitées par l'annexine A1 exogène, nous avons voulu observer si cet apport pouvait améliorer l'état des tissus durant la phase chronique (*fig. 30*).

Le traitement annexine A1 n'améliore pas la fibrose hippocampique glio-vasculaire au stade chronique dans le foie épileptique. La réduction des crises chroniques ne s'accompagne pas d'une inversion de l'état fibrotique de l'hippocampe au niveau péri-vasculaire indiquant que, dans ce modèle expérimental, les modifications multicellulaires installées au stade chronique sont permanentes et irréversibles.

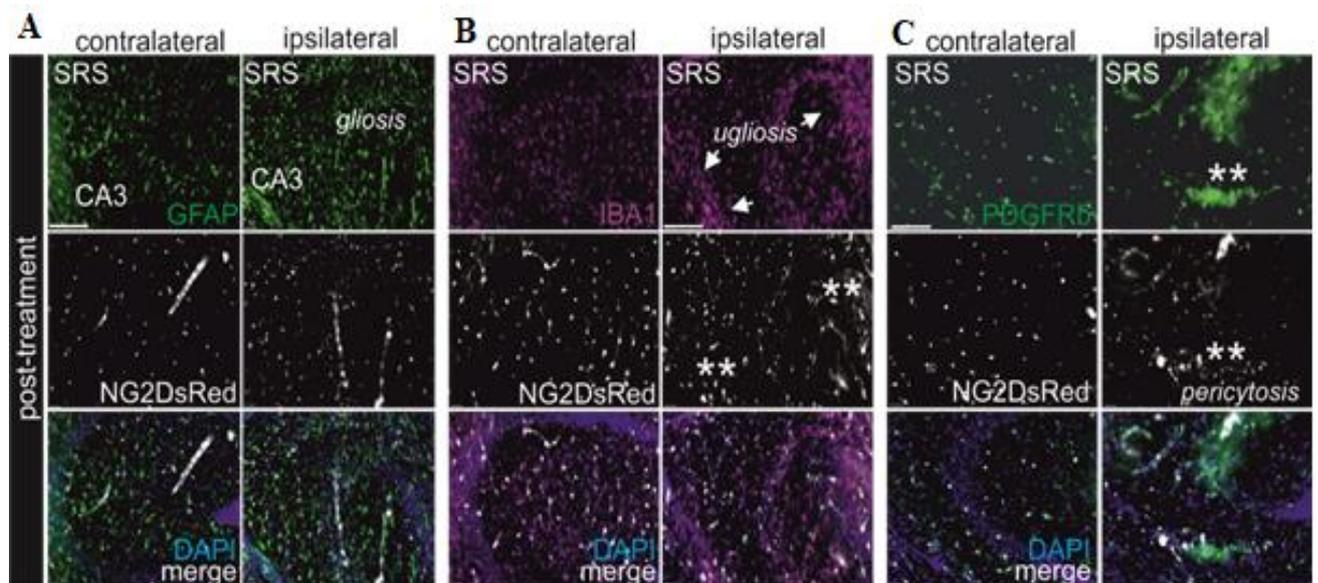


Figure 30. Exemple d'immunohistochimie de la zone CA3 des hippocampes en post traitement Annexine A1. NG2Dsred pericytes (blanc), en vert les astrocytes, en violet la microglie. Dysmorphie péricytaire, activation microgliale et astrocytose en hippocampe ipsilatéral.

IV-Discussion

Les traitements antiépileptiques sont une nécessité absolue pour permettre de contrôler la maladie. Beaucoup d'études précliniques utilisant des modèles animaux essaient de découvrir de nouvelles molécules à visée antiépileptique grâce au processus de «screening» (Löschner, 2017). A ce jour, en discutant avec des médecins, nous savons que des patients (des enfants) répondent aux traitements associant les glucocorticoïdes aux antiépileptiques (Marchi et al., 2011). Il a aussi été montré que des maladies auto-immunes comme les lupus ou la sclérose en plaque peuvent engendrer des crises épileptiques souvent résistantes aux traitements classiques du fait d'un contexte inflammatoire. Les anti-inflammatoires stéroïdiens provoquent, au long cours, des effets secondaires délétères pour le patient. Plusieurs études cliniques sont encore à ce jour réalisées (Xinran Maria Xiang, MD 2020, *clinical trials*). Ce sont des études à petites échelles, toujours très localisées et souvent adaptées à la situation d'un certain type de patients. Il manque cruellement de données cliniques globales. De ce fait, la balance bénéfices/risques est encore trop déséquilibrée l'acceptation d'un poly traitement par le corps médical. Par cette étude, nous avons cherché à pouvoir contourner une prise de glucocorticoïdes grâce à la stimulation d'une voie endogène connue pour produire des effets anti-inflammatoires et ainsi augmenter le bénéfice dans la balance. Nous savons qu'un système endogène existe pour limiter la perte d'homéostasie tissulaire dans le cerveau. En cas d'inflammation sévère et chronique, une réponse du système est cruciale. L'annexine A1 est induite par les glucocorticoïdes et active une voie de signalisation anti inflammatoire par le biais du récepteur FRP2 que l'on sait présent dans les cellules immunitaires et dans le système nerveux central (Perretti et al, 2009). Il est avéré que la perte de protection anti-inflammatoire a déjà été démontrée dans la sclérose en plaque, l'accident vasculaire cérébral ou encore l'hémorragie intracérébrale (Cristante et al, 2013 ; Wang et al, 2017 ; Gussenhoven et al, 2019).

Dans nos conditions expérimentales, les taux d'annexine A1 au niveau sanguin et cérébral ne changent pas pendant l'épileptogénèse et la période des crises chroniques, indiquant un dysfonctionnement de cette voie anti-inflammatoire endogène. Une étude a associé l'inactivation de l'annexine A1 à une augmentation de la perméabilité de la BHE et à une réponse pro-inflammatoire exagérée (Roviezzo et al., 2002). Nous avons constaté une augmentation rapide mais transitoire de corticostérone dans le sang ainsi que de l'annexine A1 en post SE. Une modification des leucocytes est aussi trouvée au niveau sanguin et le

maintien des monocytes fait allusion à une inflammation persistante. Une hypothèse suggère que l'annexine A1 agit différemment sur le système immunitaire inné et adaptatif (*Trentin et al., 2015*). Elle régule à la hausse l'antagoniste des récepteurs de l'interleukine-1 et à la baisse CCR2 (*Perretti et al. 2009 et 2015*), cohérent avec les taux d'ARNm de CCL2 et CCL12 trouvés dans notre étude, et directement impliqué dans la physiopathologie des crises (*Vezzani, et al., 2011*). La littérature montre que ANXA1 régule négativement certaines cytokines pro-inflammatoires comme Il-4, Il-13 (*Perretti et D'Acquisto, 2009*) ou encore Il-6 (*Yang et al. 2006 et 2009, (Peshavariya et al 2013)*), tandis que certaines maladies, dont le diabète type I (*Purvis et al. 2018*), peuvent induire l'expression d'ANXA1 comme signalisation autocrine du FRP2 comme mécanismes de rétroaction et de protection. L'annexine A1 s'ajoute à une liste de points d'entrées pharmacologiques visant à réduire l'inflammation. Cette liste comprenant déjà le récepteur de facteur de croissance dérivé des plaquettes bêta (PDGFR β) (*Klement et al, 2019*), le bloqueur de l'interleukine-1 Anakinra (*Clarkson et al, 2019; DeSena et al., 2018*), le Losartan et la Rapamycine (*Van Vliet et al., 2012*).

Dans cette étude, une évaluation de l'efficacité du système annexine/GR est effectuée sur un modèle animal d'épilepsie focale. Une perte d'efficacité est avérée, montrant une balance pro/anti-inflammatoire détériorée avec une baisse de rapport phosphoGR/GR et l'augmentation de GFAP pendant l'épileptogénèse et les crises chroniques. Des modifications de ces voies sont également observables dans l'hippocampe controlatéral où l'on sait que l'activité des crises se propage. La littérature met en évidence l'activation des astrocytes et de la microglie et une angiogénèse pendant la progression des crises (*Klement et al., 2018 et 2019*). Nous émettons l'hypothèse que cette perte de fonctionnalité du système annexine A1 / GR pourrait participer à l'inflammation non contrôlée entraînant une gliose et une cicatrisation glie-péricytaire avec une accumulation de collagènes ectopiques.

In fine, nous avons cherché à connaître les effets thérapeutiques d'un apport exogène d'annexine sur notre modèle d'épilepsie focale. Nous avons constaté une tendance à la baisse de la durée de crises globales, mais avec encore une forte variabilité inter-individus présente. Ces expériences nous ont apporté des informations très intéressantes, notamment sur les modifications de l'activité électrique durant le traitement. En effet, on peut observer une augmentation de périodes interictals et une disparité de la répétition de celles-ci par rapport aux contrôles.

Des efforts dans le développement de modèles animaux sont faits depuis des dizaines d'années. Beaucoup d'études cherchent à découvrir de nouvelles molécules antiépileptiques, mais sans prendre en compte le côté inflammatoire de la maladie (Löscher, 2017). Il serait intéressant, dans un modèle animal, de pouvoir associer et tester les traitements antiépileptiques et anti-inflammatoire

Il est évident que les variabilités dues au dispositif EEG et à l'atteinte de la BHE dans notre étude sont primordiales à prendre en compte. Une preuve de concept pourrait être apportée en injectant directement l'annexine dans l'hippocampe dorsal ipsilatéral. En effet, on peut s'interroger sur le passage de la molécule via la BHE en conditions pathologiques. Dans notre étude, nous n'avons pas montré d'amélioration ou de changement de morphologie du tissu cicatriciel de l'hippocampe en ipsi latéral entraîné par les crises et le kaïnate. Nous proposons l'hypothèse que l'annexine A1 agirait donc en interférant dans la production de facteurs solubles pro-inflammatoires (Yang et al., 2006 et 2009) plutôt qu'en réparant les modifications cellulaires, irréversibles dans ce modèle. Il aurait été pertinent d'observer la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique *in vivo* grâce à une injection d'évans blue ou de fluorescéine avant sacrifice afin d'observer une éventuelle amélioration de son intégrité sur les souris traitées avec l'annexine A1 exogène en comparaison aux contrôles. Il a été montré, en effet, que l'annexine A1 recombinée, *in vitro*, sur des cellules endothéliales humaines co-cultivées avec des péricytes régulait l'intégrité de la BHE (Park et al. 2016). Récemment, des études ont prouvé un effet bénéfique de cette protéine sur les complications micro-vasculaires cardiaques et rénales engendrées par des maladies comme le diabète de type I (Purvis et al, 2019).

Il se peut que le modèle kaïnate que nous utilisons soit trop agressif et complètement irréversible quant aux modifications engendrées sur la zone hippocampique ipsilatérale. Notre modèle murin reste tout de même un très bon modèle pour l'observation et la caractérisation de l'épilepsie focale. Sur le plan moléculaire, il peut apporter de nombreuses informations en dehors du foyer épileptique, dans l'hippocampe ventral, en controlatéral ou au niveau cortical (étude en cours dans l'équipe). L'hippocampe qui finit par être sclérosé donne aussi des informations précieuses sur l'état physiologique, mais avec une inflammation provoquée par l'injection de kaïnate (Nadler., 1981). La reproduction des modifications inflammatoires dues seulement à la répétition de crise n'est pas juxtaposable à la réalité de la maladie chez l'homme avec ce modèle. Un modèle rat Kindling (Sato et al., 1990) compléterait nos

résultats car il permettrait d'associer cet apport d'annexine A1 à un traitement anti-épileptique (Twele et al. 2016). Ce modèle rat est également un très bon modèle de TLE résistantes aux médicaments et pourrait permettre de mettre en évidence une amélioration symptomatique et physiologique par association d'annexine A1 exogène. D'autres voies pro-inflammatoires ont été étudiées dans l'épilepsie. Il1- β joue un rôle central dans l'épilepsie (Ravizza et al., 2008) et on sait qu'il y a aussi une forte augmentation de l'expression des molécules d'adhésion I-CAM, V-CAM qui engendrent l'entrée des monocytes circulant dans le SNC (Venazzi et Granata, 2005). Il est donc essentiel de bien comprendre la voie annexine et sa relation avec les différents acteurs pro-inflammatoires pour ensuite obtenir des nouvelles stratégies pharmacologiques.

Critique et Amélioration des protocoles expérimentaux

En chirurgie :

J'ai choisi d'intégrer la xylazine au protocole d'anesthésie car le chloral-hydrate seul ne suffisait pas à atteindre le seuil de narcose nécessaire. J'ai également amélioré la procédure d'implantation d'électrode EEG notamment en retirant les vis corticales, non adaptées à la souris car conçues pour le rat initialement, celles-ci étaient utilisées pour maintenir en place l'implant. Elles sont source d'inflammation car, trop longues, elles peuvent pénétrer profondément dans le cortex et ainsi engendrer des cicatrices corticales non désirées. J'ai remplacé par des fils d'argent juste posés en surface puis collés au crâne. La colle, liée au ciment dentaire, permet la bonne fixation de l'implant.

En électroencéphalographie :

Lors de l'analyse des enregistrements EEG, nous observons une variabilité entre les animaux en termes de ligne de base. Ce phénomène peut être dû à une oxydation de l'électrode ou encore à une fibrose s'installant entre les deux fils torsadés. Pour remédier à ce problème, je peux, lors de mes prochaines chirurgies, décaler de quelques μm les deux extrémités des électrodes pour éviter ce phénomène. En ce qui concerne la variabilité du temps de crises de chaque souris, c'est une variabilité interindividuelle normale dans ce modèle.

En Histologie

La tentative de marquer annexine A1 chez la souris en immunohistochimie n'a pas pu être réalisée. En effet, aucun protocole fiable n'existe dans la littérature. Il nous est donc impossible de savoir si l'annexine agit principalement sur le foyer ou en diffusion dans tout le tissu.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en première auteur dans FASEB Journal en 2019 : <https://documentcloud.adobe.com/link/review?uri=urn:aaid:scds:US:396fdcab-db9e-40b2-b9ee-a93cca58ac31>

Référence

- Berg A. T., Berkovic S. F., Brodie M. J., Buchhalter J., Cross J. H., van Emde Boas W., Scheffer, I. E. (2010). *Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. Epilepsia, 51(4), 676–685.*
- Bozzi Y, and Caleo M. (2016). *Epilepsy, Seizures, and Inflammation: Role of the C-C Motif Ligand 2 Chemokine.* DNA and Cell Biology, 35(6), 257–260. doi:10.1089/dna.2016.3345
- Clarkson, BD, LaFrance-Corey R G, Kahoud R J, Farias-Moeller R, Payne ET, &Howe CL. (2019). *Functional deficiency in endogenous interleukin-1 receptor antagonist in patients with febrile infection-related epilepsy syndrome (FIREs).* Annals of Neurology.
- Crépel, V., & Mulle, C. (2015). *Physiopathology of kainate receptors in epilepsy. Current Opinion in Pharmacology, 20, 83–88.* d
- Cristante E, McArthur S, Maur, C, Maggioli E, Romero IA, Wylezinska-Arridge MCouraud PO, Lopez-Tremoleda J, Christian HC, Weksler BB, Malaspina Aand Solito E. (2013) *Identification of an essential endogenous regulator of blood-brain barrier integrity, and its pathological and therapeutic implications.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 832-841
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman DR., Dustin ML. Gan, WB. (2005). *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nature Neuroscience, 8(6), 752–758.*
- Depaulis A., S. Hamelin et al. (2015) *Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding.* Revue neurologique 171 (2015) 217 –226
- DeSena AD, Do T, Schulert GS. (2018) *Systemic autoinflammation with intractable epilepsy managed with interleukin-1 blockade.* J Neuroinflammation. 2018 Feb 9; 15(1):38
- Garbelli R, Munari C., De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Galli C, Brammerio M, Mai R, Battaglia G, and Spreafico R. (1999) *Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immunohistochemical study.* Brain pathology 9, 445-461
- Ghaffarpour M, Pakdaman H, Hossein Harirchian M, Ghelichnia Omrani HA, Ghabaee M, Zamani B, Bahrami P, Siroos B. (2013). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the new AEDs: A review article.* Iranian Journal of Neurology. 12(4), 157–165.

- Gussenhoven R, Klein L, Ophelders D, Habets DHJ, Giebel B, Kramer B W, Schurgers LJ, Reutelingsperger CPM, and Wolfs T. (2019) *Annexin A1 as Neuroprotective Determinant for Blood-Brain Barrier Integrity in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy*. *J Clin Med* 8
- Jacobs MP, Leblanc GG, Brooks-Kayal A, Jensen FE, Lowenstein DH., Noebels JL., Spencer DD., Swann JW. (2009). *Curing epilepsy: Progress and future directions*. *Epilepsy Behavior*. 14, 438–445.
- Klement W, Blaquiere M, Zub E, deBock F, Boux F, Barbier E, Marchi N. (2019) *A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity*. *Epilepsia*.
- Klement W, Garbelli R, Zub E, Rossini L, Tassi L, Girard B., Blaquière M., Bertaso F., de Bock F., Marchi, N. (2018). *Seizure progression and inflammatory mediators promote pericytosis and pericyte-microglia clustering at the cerebrovasculature*. *Neurobiology of Disease*, 113, 70–81.
- Kusters, D. H. M., Chatrou, M. L., Willems, B. A. G., De Saint-Hubert, M., Bauwens, M., van der Vorst, E., ... Reutelingsperger, C. P. M. (2015). *Pharmacological Treatment with Annexin A1 Reduces Atherosclerotic Plaque Burden in LDLR^{-/-} Mice on Western Type Diet*. *PLOS ONE*, 10(6),
- Löscher W. (2017). *Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs*. *Neurochemical Research*, 42(7), 1873–1888.
- Marchi N., Granata T, Freri E., Ciusani E., Ragona F., Puvenna V., Teng Q., Alexopolous A., Janigro D. (2011) *Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics* *Mar* 28;6(3):e18200. doi: 10.1371/journal.pone.0018200.
- Marchi, N, Granata T, and Janigro D. (2014) *Inflammatory pathways of seizure disorders*. *Trends Neurosci* 37, 55-65
- Moshé, S. L., Perucca, E., Ryvlin, P., & Tomson, T. (2015). *Epilepsy: new advances*. *The Lancet*, 385(9971), 884–898.
- Nadler V., J. (1981). *Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy*. *Life Sciences*, 29(20), 2031–2042.
- Olney JW, Rhee V, and Ho OL (1974). *Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate*. *Brain Resarch*. 77, 507–512.
- Park, J.-C., Baik, S. H., Han, S.-H., Cho, H. J., Choi, H., Kim, H. J., ... Mook-Jung, I. (2016). *Annexin A1 restores Aβ1-42-induced blood-brain barrier disruption through the inhibition of RhoA-ROCK signaling pathway*. *Aging Cell*, 16(1), 149–161.
- Paxinos and Franklin's (2001), *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, edition Elsevier.
- Perretti M, and D'Acquisto F. (2009) *Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation*. *Nat Rev Immunol* 9, 62-70

- Perretti M, Leroy X, Bland EJ, and Montero-Melendez T. (2015) *Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in Inflammation*. Trends Pharmacol Sci 36, 737-755
- Peshavariya HM., Taylor CJ, Goh C, Liu GS, Jiang F, Chan EC. and Dusting GJ. (2013). *Annexin Peptide Ac2-26 Suppresses TNF α -Induced Inflammatory Responses via Inhibition of Rac1-Dependent NADPH Oxidase in Human Endothelial Cells*. PLoS ONE, 8(4), e60790.
- Purvis GSD., Chiazza, Chen J, Azevedo-Loiola R, Martin L, Kusters DHM, Reutelingsperger C, Fountoulakis N, Gnuod, L, Yaqoob MM., Collino M, Thiemermann C, and Solito E. (2018) *Annexin A1 attenuates microvascular complications through restoration of Akt signalling in a murine model of type 1 diabetes*. Diabetologia 61, 482-495
- Purvis GSD, Solito E, and Thiemermann C. (2019). *Annexin-A1: Therapeutic Potential in Microvascular Disease*. Frontiers in Immunology, 10
- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noé, F., Boer, K., Aronica, E., & Vezzani, A. (2008). *Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy*. Neurobiology of Disease, 29(1), 142–160.
- Riban, V., Bouilleret, V., Pham-Lê, B. T., Fritschy, J.-M., Marescaux, C., & Depaulis, A. (2002). *Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy*. Neuroscience, 112(1), 101–111.
- Sato M, Racine RJ, McIntyre DC (1990) *Kindling: basic mechanisms and clinical validity*. Electroenceph Clin Neurophysiol 76:459–472
- Stamatovic, S. M., Shakui, P., Keep, R. F., Moore, B. B., Kunkel, S. L., Van Rooijen, N., & Andjelkovic, A. V. (2005). *Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulation of Blood–Brain Barrier Permeability*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 25(5), 593–606.
- Thurman, D. J., Beghi, E., Begley, C. E., Berg, A. T., Buchhalter, J. R., ... Ding, D. (2011). *Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy*. Epilepsia, 52, 2–26.
- Trentin P G, Ferreira TP, Arantes AC, Ciambarella BT, Cordeiro RS, Flower RJ, Perretti M, Martins MA, and Silva PM. (2015) *Annexin A1 mimetic peptide controls the inflammatory and fibrotic effects of silica particles in mice*. Br J Pharmacol 172, 3058-3071
- Twele F, Töllner K, Brandt C, & Löscher W. (2016). *Significant effects of sex, strain, and anesthesia in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy*. Epilepsy & Behavior, 55, 47–56.
- Van Vliet EA, Forte G, Holtman L, den Burger JC, Sinjewel A, de Vries HE, Aronica E, and Gorter JA. (2012) *Inhibition of mammalian target of rapamycin reduces epileptogenesis and blood-brain barrier leakage but not microglia activation*. Epilepsia 53, 1254-1263

- Vezzani, A., & Granata, T. (2005). *Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. Epilepsia, 46(11), 1724–1743.*
- Vezzani A, French J, Bartfai T, and Baram TZ. (2011) *The role of inflammation in epilepsy. Nat Rev Neurol 7, 31-40*
- WangZ, Chen Z, Yang J, Yang Z, Yin J, Zuo G, Duan X, Shen H, Li H, and ChenG. (2017) *Identification of two phosphorylation sites essential for annexin A1 in blood-brain barrier protection after experimental intracerebral hemorrhage in rats. J Cereb Blood Flow Metab 37, 2509-2525*
- Yang, YH, Aeberli D, Dacumos A, Xue JR, and Morand EF. (2009) *Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. J Immunol 183, 1435-1445*
- Yang Y H, Toh ML, Clyne C D, Leech M, Aeberli D, Xue J, Dacumos A, SharmaL and Morand EF. (2006) *Annexin 1 negatively regulates IL-6 expression via effects on p38 MAPK and MAPK phosphatase-1. J Immunol 177, 8148-8153*

Annexe : Données de RTqPCR

PDGFRb	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,012	0,07038	-	1,006	0,05297	-	1,006	0,04589	-	1,012	0,07081	-
24H	1,756	0,2395	0,0079 **	1,296	0,1061	0,1429	1,418	0,1642	0,0556	1,333	0,1642	0,381
72H	1,783	0,2462	0,0159 *	1,258	0,1421	0,1667	1,39	0,07457	0,0079 **	1,182	0,1072	0,4206
1W	1,745	0,191	0,0159 *	1,168	0,1626	0,1349	1,156	0,1211	0,6905	1,132	0,08494	0,3095
SRS	1,514	0,1078	0,0079 **	1,04	0,09359	0,5238	1,066	0,0814	0,3413	1,08	0,106	0,9683
TNFa	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,09	0,1944	-	1,036	0,1336	-	1,396	0,422	-	1,044	0,1537	-
24H	5,144	0,4805	0,0079 **	2,716	0,3388	0,0079 **	11,86	2,34	0,0079 **	7,408	1,029	0,0159 *
72H	2,573	0,7615	0,1905	0,9975	0,1707	0,9048	2,868	0,6418	0,0952	1,584	0,3373	0,2222
1W	2,238	0,299	0,0159 *	0,542	0,1018	0,0317 *	2,27	0,3713	0,2222	1,242	0,3208	0,6905
SRS	0,39	0,04301	0,0317 *	0,224	0,0328	0,0079 **	0,654	0,1763	0,2222	0,696	0,1438	0,1508
ANXA1	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,048	0,1608	-	1,014	0,07743	-	1,004	0,05802	-	1,022	0,1038	-
24H	2,27	0,2756	0,0079 **	1,074	0,1388	>0,9999	1,766	0,213	0,0079 **	0,9425	0,1101	0,7302
72H	2,32	0,421	0,0635	1,405	0,3841	0,9048	1,786	0,1595	0,0079 **	1,284	0,2087	0,4206
1W	2,253	0,5482	0,0159 *	1,184	0,09464	0,3095	1,554	0,1844	0,0952	1,156	0,07366	0,4206

SRS	1,802	0,227	0,0556	0,992	0,04684	0,6905	1,86	0,2083	0,0079 **	1,022	0,1724	>0,9999
FPR1	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,008	0,06086	-	1,006	0,0612	-	1,042	0,1575	-	1,054	0,1682	-
24H	2,686	0,4437	0,0079 **	1,822	0,2575	0,0317 *	2,294	0,2803	0,0159 *	1,313	0,2957	0,5556
72H	1,098	0,2891	>0,9999	1,305	0,2007	0,4127	1,236	0,1668	0,5476	0,83	0,1432	0,6905
1W	1,135	0,2455	>0,9999	1,274	0,07891	0,0556	1,546	0,4566	0,6905	1,114	0,126	0,6905
SRS	0,914	0,1458	0,547	1,202	0,1136	0,3095	1,014	0,08213	>0,9999	1,208	0,2404	0,6905
FKBP5	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,014	0,08078	-	1,01	0,06723	-	1,026	0,1035	-	1,012	0,07774	-
24H	1,466	0,209	0,1508	1,756	0,1705	0,0159 *	1,65	0,2686	0,1508	1,92	0,3034	0,0317 *
72H	0,9625	0,1685	0,5556	0,7975	0,1685	0,4127	1,18	0,1116	0,2222	0,988	0,07729	0,8413
1W	0,9075	0,1744	0,2857	0,998	0,1468	0,6905	1,116	0,1856	>0,9999	1,174	0,1842	0,6905
SRS	0,752	0,1269	0,0952	1,048	0,1401	>0,9999	1,242	0,194	0,4206	1,36	0,1169	0,0317 *
HSD11B1	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,006	0,04823	-	1,006	0,0575	-	1,014	0,08022	-	1,03	0,1278	-
24H	1,51	0,1692	0,0159 *	0,874	0,04718	0,2222	0,838	0,03023	0,1508	0,88	0,0573	0,7302
72H	0,94	0,007539	0,4127	0,835	0,1237	0,4127	0,824	0,08412	0,1508	0,832	0,03967	0,3095
1W	1,155	0,07708	0,1905	0,724	0,03203	0,0079 **	0,608	0,04116	0,0079 **	0,784	0,06705	0,2222

SRS	1,092	0,07684	0,4206	0,952	0,09041	0,8413	0,852	0,103	0,3095	0,812	0,1718	0,5476
TMEM	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,004	0,05212	-	1,008	0,06151	-	1,014	0,08681	-	1,066	0,1866	-
24H	0,872	0,09189	0,0952	0,434	0,04155	0,0079 **	0,5	0,07583	0,0079 **	0,655	0,1187	0,1111
72H	1,563	0,1066	0,0159 *	1,08	0,2266	0,9048	0,98	0,1043	>0,9999	1,01	0,131	>0,9999
1W	2,373	0,3406	0,0159 *	0,73	0,04506	0,0159 *	1,014	0,1909	0,8413	0,852	0,1739	0,4206
SRS	0,876	0,1189	0,6905	0,438	0,04663	0,0079 **	0,728	0,1021	0,0556	0,7	0,03701	0,1508
P2Y12	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,026	0,1129	-	1,016	0,09373	-	1,064	0,1975	-	1,084	0,2049	-
24H	0,346	0,04781	0,0079 **	0,418	0,03707	0,0079 **	0,262	0,02853	0,0079 **	0,2775	0,03351	0,0159 *
72H	1,535	0,2936	0,1905	2,358	0,4748	0,0317 *	1,82	0,06458	0,0317 *	1,586	0,2675	0,1508
1W	2,783	0,3406	0,0159 *	1,576	0,1481	0,0159 *	1,18	0,1271	0,4206	1,034	0,1381	>0,9999
SRS	1,254	0,154	0,4206	1,016	0,07928	0,8413	0,764	0,08376	0,1508	0,598	0,07493	0,0952
HEXB	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,026	0,1246	-	1,004	0,04792	-	1,018	0,09129	-	1,01	0,06841	-
24H	1,368	0,1549	0,2222	0,598	0,04705	0,0079 **	0,786	0,09511	0,1508	0,66	0,1101	0,0635
72H	2,268	0,4427	0,0317 *	1,955	0,3171	0,0317 *	1,644	0,1819	0,0317 *	1,294	0,05776	0,0317 *
1W	3,325	0,4355	0,0159 *	1,18	0,05079	0,0556	1,43	0,2117	0,0556	1,028	0,1253	0,5476

SRS	1,532	0,1279	0,0952	0,518	0,02956	0,0079 **	1,19	0,1149	0,3095	0,692	0,07317	0,0556
CCL2	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,084	0,1901	-	1,124	0,2509	-	1,308	0,4524	-	1,406	0,4436	-
24H	14,77	1,275	0,0079 **	4,284	0,7	0,0079 **	73,86	11,27	0,0079 **	47,7	13,55	0,0159 *
72H	1,72	0,3711	0,1905	1,655	0,4682	0,5556	5,636	0,7137	0,0079 **	6,064	1,981	0,0952
1W	1,89	0,4394	0,1111	0,286	0,0397	0,0079 **	2,412	0,725	0,246	4,704	1,527	0,1508
SRS	0,242	0,02835	0,0079 **	0,044	0,006	0,0079 **	0,822	0,2361	0,6905	1,05	0,3349	0,5476
CCL12	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,014	0,08908	-	1,008	0,0656	-	1,126	0,2611	-	1,028	0,1206	-
24H	2,696	0,2093	0,0079 **	1,43	0,2142	0,0556	6,056	0,283	0,0079 **	5,598	0,05498	0,0159 *
72H	0,9025	0,1676	>0,9999	0,7675	0,1495	0,2857	1,766	0,2691	0,2222	1,594	0,2196	0,0873
1W	1,25	0,1738	0,2857	0,376	0,01364	0,0079 **	1,022	0,1116	0,8413	0,96	0,2056	>0,9999
SRS	0,32	0,04648	0,0079 **	0,102	0,0102	0,0079 **	0,456	0,07991	0,0556	0,39	0,05857	0,0079 **
ICAM	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,01	0,07007	-	1	0,01581	-	1,01	0,07443	-	1,012	0,07832	-
24H	2,942	0,1153	0,0079 **	1,434	0,09147	0,0079 **	2,412	0,1871	0,0079 **	1,843	0,06088	0,0159 *
72H	1,738	0,2861	0,0317 *	1,39	0,2289	0,2857	1,582	0,1646	0,0159 *	1,168	0,1228	0,2222
1W	2,42	0,2984	0,0159 *	1,078	0,07832	0,2222	1,266	0,09212	0,0556	1,134	0,2008	0,8413

SRS	1,4	0,1138	0,0317 *	0,52	0,05431	0,0079 **	1,102	0,2241	0,6905	0,86	0,09618	0,4206
VCAM	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,008	0,06367	-	1,004	0,04445	-	1,01	0,07477	-	1,026	0,118	-
24H	0,946	0,1468	0,8413	1,118	0,06763	0,3095	1,27	0,1241	0,2222	1,18	0,3952	0,9048
72H	2,128	0,3335	0,0159 *	1,74	0,2697	0,1111	1,81	0,1148	0,0079 **	1,182	0,05508	0,4206
1W	2,49	0,2313	0,0159 *	1,44	0,1249	0,0079 **	1,404	0,1757	0,1508	1,386	0,1081	0,0556
SRS	1,308	0,152	0,0952	0,786	0,0907	0,0159 *	1,022	0,1226	>0,9999	1,016	0,06313	>0,9999
ZO-1	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,012	0,07426	-	1,002	0,04188	-	1,006	0,05921	-	1,014	0,0716	-
24H	0,82	0,07918	0,1508	0,97	0,04572	0,6905	1,022	0,1127	>0,9999	0,9325	0,07878	0,7302
72H	1,02	0,1758	0,4206	1,175	0,1143	0,1905	1,218	0,1058	0,3095	0,96	0,07064	0,6905
1W	1,064	0,1432	>0,9999	1,092	0,09265	0,8413	1,004	0,07298	0,8413	1,02	0,1223	>0,9999
SRS	1,114	0,06976	0,3095	0,924	0,0694	0,4206	0,97	0,08228	>0,9999	0,988	0,08986	>0,9999
GFAP	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,032	0,09132	-	1,009	0,02668	-	1,044	0,1266	-	1,016	0,04484	-
24H	8,033	1,803	0,0694	4,975	0,5987	0,7169	5,596	1,273	0,4342	6,387	0,9743	0,2501
72H	8,262	1,46	0,0201 *	9,117	1,63	0,0212 *	8,086	0,8958	0,0216 *	9,051	2,162	0,0457 *
1W	10,17	4,294	0,0737	8,08	2,742	0,1253	9,793	4,803	0,1901	9,97	3,091	0,0326 *

SRS	9,984	2,325	0,0090 **	3,44	1,166	>0,9999	5,614	2,135	0,4547	3,693	1,894	>0,9999
GRa	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,01	0,06979	-	1,002	0,0376	-	1,012	0,07144	-	1,052	0,1587	-
24H	0,648	0,05616	0,0159 *	1,014	0,05183	>0,9999	0,972	0,1137	>0,9999	0,8925	0,0839	0,7302
72H	1	0,04601	0,5556	1,06	0,1457	>0,9999	1,056	0,05492	0,5714	1,082	0,09447	>0,9999
1W	1,15	0,1702	0,4127	1,168	0,1294	0,4206	0,804	0,09298	0,0556	1,162	0,07446	0,6905
SRS	1,32	0,1026	0,0317 *	1,15	0,127	0,5476	1,014	0,1096	0,6905	1,232		0,4206
GRb	Right dorsal hippocampus			Left dorsal hippocampus			Right ventral hippocampus			Left ventral hippocampus		
	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value	Mean	± SEM	P-value
SHAM	1,074	0,1913	-	1,066	0,1772	-	1,036	0,1253	-	1,054	0,1637	-
24H	0,45	0,1114	0,0317 *	1,044	0,06185	0,6905	1,078	0,1538	>0,9999	0,6475	0,0834	0,1111
72H	0,8275	0,1446	0,5556	1,268	0,2535	0,9048	1,364	0,1859	0,1508	0,848	0,1803	0,3095
1W	0,9825	0,1442	0,4127	1,254	0,2181	0,5476	1,418	0,287	0,4603	1,016	0,1823	>0,9999
SRS	1,204	0,07089	0,6905	1,262	0,1913	0,5476	1	0,1883	0,8413	0,974	0,1059	0,8889

Résumé

Il a été récemment montré que des changements immunologiques se produisent dans l'épilepsie clinique et expérimentale. Aussi nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la pathophysiologie induite par des crises provoque une altération de la voie anti-inflammatoire endogène liée à l'Annexine A1. Des cortex épileptiques humains présentant deux types d'épilepsies (FCDII et MTLE) et des témoins ont été utilisés pour des évaluations histologiques cliniques des expressions d'Annexine A1. Nous avons examiné si l'administration d'Annexine A1 exogène modifiait l'activité épileptique et sa pathophysiologie *in vivo*. Nous avons utilisé aussi un modèle murin d'épilepsie du lobe mesio-temporal (MTLE) basé sur l'injection intra-hippocampique d'acide kainique. Des analyses de vidéo-EEG, de biologie moléculaire, des mesures sanguines et des tests pharmacologiques ont été effectués sur ce modèle. Une diminution progressive de l'expression de la forme phosphorylée du récepteur aux glucocorticoïdes pGR et du rapport pGR/GR total pendant la phase d'épileptogénèse dans le foyer de l'hippocampe a pu être constatée. En aval des ressources génétiques, la protéine Annexine A1 est restée à des niveaux basiques en dépit d'une inflammation persistante. Les effets se sont reflétés en périphérie sous la forme d'Annexine A1 et les niveaux de corticostérone sont restés au niveau de base tout au long de l'épileptogénèse et n'ont augmenté de manière transitoire que tôt après le *Status Epilepticus*. Une augmentation des monocytes circulants atteste d'un état pro inflammatoire périphérique. Aussi, ces résultats suggèrent l'absence d'un engagement global du mécanisme anti-inflammatoire Annexine A1/GR au cours de la progression des crises. Dans les échantillons humains, nous avons constaté que le profil d'Annexine A1 était anormal, son immunoréactivité périvasculaire était diminuée par rapport aux tissus péri-lésionnels témoins. Alors, nous avons ensuite testé si la potentialisation de la réponse anti-inflammatoire endogène par administration intrapéritonéale de la protéine annexine A1 recombinée pourrait modifier la pathophysiologie de la maladie *in vivo*. Bien que la réponse inter individuelle ait été variable, l'administration d'Annexine A1 exogène a permis de réduire les durées d'activités épileptiques. La voie Annexine A1/Glucocorticoïdes est altérée durant la progression de l'épilepsie. Nous proposons ainsi qu'une compensation pharmacologique des mécanismes endogènes anti inflammatoires puisse être envisagée comme une nouvelle voie thérapeutique complémentaire dans le traitement de l'épilepsie.

Mots clés : Epilepsie, Annexine A1, inflammation, glucocorticoïde barrière hémato-encéphalique

