



HAL
open science

Le système EPOergique cérébral : caractérisation et implication dans la protection neuronale au cours de l'épileptogénèse

Jérémie Nadam

► **To cite this version:**

Jérémie Nadam. Le système EPOergique cérébral : caractérisation et implication dans la protection neuronale au cours de l'épileptogénèse. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00195799

HAL Id: tel-00195799

<https://theses.hal.science/tel-00195799>

Submitted on 11 Dec 2007

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.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 27 juin 2007 par

Monsieur Jérémie NADAM

TITRE :

**Le système EPOergique cérébral : caractérisation et implication
dans la protection neuronale au cours de l'épileptogénèse**

Directeur de thèse :
Pr. Hervé BARRÉ

Co-encadrant :
Dr. Laurent BEZIN

JURY :

M. le Pr. Jean-Marc PEQUIGNOT,
M. le Pr. Pierre DESCHAUX,
M. le Dr. Jean-Jacques RISSO,
M. le Pr. Philippe RYVLIN,
M. le Pr. Hervé BARRE,
M. le Dr. Laurent BEZIN,

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse
Co-encadrant de la thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université	M. le Professeur L. COLLET
Vice-Président du Conseil Scientifique	M. le Professeur J.F. MORNEX
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. le Professeur J. LIETO
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur D. SIMON
Secrétaire Général	M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec	Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche	Directeur : M. le Professeur X. MARTIN
UFR de Médecine Lyon-Nord	Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE
UFR de Médecine Lyon-Sud	Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY
UFR d'Odontologie	Directeur : M. O. ROBIN
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : M. le Professeur F. LOCHER
Institut Techniques de Réadaptation	Directeur : M. le Professeur MATILLON
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique	Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU
UFR de Biologie	Directeur : M. le Professeur H. PINON
UFR de Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
UFR de Génie Electrique et des Procédés	Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET
UFR Sciences de la Terre	Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE
UFR de Mathématiques	Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE
UFR d'Informatique	Directeur : M. le Professeur M. EGEA
UFR de Chimie Biochimie	Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT
UFR STAPS	Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI
Observatoire de Lyon	Directeur : M. le Professeur R. BACON
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon	Directeur : M. le Professeur J. LIETO
IUT A	Directeur : M. le Professeur M. C. COULET
IUT B	Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs les professeurs Hervé Barré et Jean-Marc Pequignot pour m'avoir accueilli au sein du DEA de Physiologie Intégrée en Conditions Extrêmes et de m'avoir permis de réaliser mon stage de DEA, ainsi que l'ensemble de mon travail de thèse au sein de l'UMR 5123, et ce dans les meilleures conditions expérimentales et scientifiques possibles.

Je remercie le Professeur Pierre Deschaux pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse sans aucune hésitation et pour avoir pris de son temps pour analyser le présent mémoire. Je le remercie pour l'intérêt scientifique évident qu'il a manifesté pour ce travail.

Je remercie le Docteur Jean-Jacques Risso pour avoir consenti à être rapporteur de cette thèse. Je lui adresse toute ma reconnaissance pour l'intérêt scientifique qu'il a porté à ce travail et pour les remarques pertinentes qui ont permis d'améliorer le manuscrit de thèse.

Je remercie tout particulièrement le Docteur Laurent Bezin qui m'a accompagné avec enthousiasme durant mon stage de DEA et tout le long de ce travail de thèse et qui a toujours su éveiller ma curiosité scientifique, ainsi que développer mon sens de l'analyse et de synthèse qui me suivront toute ma vie.

Je remercie le Professeur Philippe Ryvlin d'avoir participé à l'avancée de ce travail de thèse en y apportant son regard d'expert médical de l'épilepsie de façon à ce que ce travail fondamental puisse un jour trouver une application clinique. Je le remercie d'avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Conscient que l'ensemble de ce travail n'aurait pu aboutir sans tous les membres de l'équipe, je tiens à remercier Chantal Bonnet, Marion Moreau-Le Cavorsin, Anne Morales, Frédérique Cohen-Adad et plus particulièrement Béatrice Georges et Colette Moulin pour la précieuse aide qu'elles m'ont apportée durant toutes ces années.

Je tiens à remercier l'ensemble des étudiants de l'équipe : Pascal, Raffat, Aël, Aurélien, Céline et Naïck pour leur bonne humeur et tout particulièrement Fabrice Navarro. *Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi, tu es un véritable ami.*

Je remercie mes parents, Martine et Jacques, ma grand-mère, Germaine, ainsi que ma petite sœur chérie, Noémie, pour avoir toujours cru en moi. *Votre soutien m'a permis de tenir dans les moments difficiles, j'espère avoir été à la hauteur de vos espérances.*

Enfin, *comment trouver les mots pour t'exprimer tout ce que je ressens. Merci d'avoir été près de moi durant ces longues années, sans toi ce travail ne serait pas ce qu'il est. J'espère que tu seras toujours à mes côtés ...* Bénédicte.

PUBLICATIONS

Articles publiés dans des revues internationales à comité de lecture

Morales A, Bonnet C, Bourgoïn N, Touvier T, **Nadam J**, Laglaine A, Navarro F, Moulin C, Georges B, Pequignot JM, and Bezin L. Unexpected expression of orexin-B in basal conditions and increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis. *Brain Research* 1109: 164-175, 2006.

Nadam J, Navarro F, Sanchez P, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot JM, Morales A, Ryvlin P, and Bezin L. Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiology of Disease* 25: 412-426, 2007.

Articles soumis pour publication

Nadam J, Navarro F, Sanchez P, Georges B, Moulin C, Le Cavorsin M, Pequignot JM, Morales A, Ryvlin P, and Bezin L. **Receptor mediating neurogenic effects of erythropoietin may not comprise common β chain.**

Navarro F, Fares R, Sanchez P, **Nadam J**, Georges B, Moulin C, Morales A, Pequignot JM, and Bezin L. Brain heparanase expression is upregulated during postnatal development and hypoxia-induced neovascularization in adult rats

Communications affichées

Nadam J, Ryvlin P, Sanchez P, Georges B, Moulin C, Morales A, and Bezin L. Exogenous erythropoietin protects hilar interneurons against degenerative process after pilocarpine-induced *status epilepticus* in adult rats. 26th International Epilepsy Congress, Paris, 28/8-01/09/2007.

GLOSSAIRE

Ac : anti-corps

ADN : L'acide désoxyribonucléique

ADNc : L'acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : L'acide désoxyribonucléique génomique

ARNm : L'acide ribonucléique messager

Asialo-Epo : L'asialo-érythropoïétine

βc : La chaîne β commune

BHE : La barrière hémato-encéphalique

bHLH : domaine basique hélice-boucle(pour « loop »)-hélice

CA : La corne d'Ammon

CA1 : La région 1 de la corne d'Ammon

CA2 : La région 2 de la corne d'Ammon

CA3 : La région 3 de la corne d'Ammon

CCG : couche des cellules granulaires

CCK : La cholécystokinine

CE : cortex entorhinal

CEpo : L'érythropoïétine carbamylée

contrôle : rat témoin naïf n'ayant reçu aucun traitement pharmacologique

contrôle/SD : rat témoin ayant reçu uniquement des injections de scopolamine et de diazépam

CR : La calrétinine

cs : collatérale de Schaeffer

DAB : La diaminobenzidine

D1 : Le sous-domaine 1 de type fibronectine III

D2 : Le sous-domaine 2 de type fibronectine III

dNTPs : Les désoxynucléotides tri-phosphates

ELT : Les épilepsies du lobe temporal

Epo : L'érythropoïétine

Epo-R : Le récepteur à l'érythropoïétine

Fe : Un atome de fer

fm : fibres moussues

FNIII : Le type de domaine fibronectine III

GABA : L'acide gamma-amino-butirique

GAS : Le site d'activation gamma

GD : Le gyrus denté

GM-CSF : Le facteur stimulant les colonies des macrophages-granulocytes

HDH : Le domaine HIF-prolyl-hydroxylase

Hi : L'hippocampe

HIF-1 : Le facteur induit par l'hypoxie 1

HIF-1 α : sous-unité α du facteur induit par l'hypoxie 1

HIF-1 β : sous-unité β du facteur induit par l'hypoxie 1

HPLC : chromatographie liquide à haute résolution (pour « performance »)

HRE : L'élément de réponse à l'hypoxie

HST : La HotStar taq polymérase

IA : Les coordonnées interaurals

IAP : La protéine inhibitrice de l'aptose

IGF : Le facteur de croissance (pour « growth ») de type insulinique

IL-1 : L'interleukine-1

IL-3 : L'interleukine-3

IL-5 : L'interleukine-5

IL-6 : L'interleukine-6

i.c.v : La voie d'injection inter-cérébroventriculaire

IgG : immunoglobuline G

i.p : La voie d'injection inter-péritonéale

i.v : La voie d'injection inter-veineuse

I κ B : La molécule inhibitrice du facteur de transcription NF κ B

J : Jour

Jak-2 : La Janus kinase - 2

JH : Le domaine JAK homologue

kDa : kilodalton

kg : kilogramme

logs : logarithmes

M : Mois

MAPk : La famille des protéines kinases à activité mitogène

ME : moëlle épinière

mL : millilitre

mUI : milliunités internationales

mm : millimètre

nM : nanomolaire

n : nombre d'animaux par groupe

NCx : Le néocortex

NFκB : Le facteur de transcription nucléaire de la chaîne légère κ des lymphocytes B

ng : nanogramme

nM : nanomolaire

O₂ : La molécule d'oxygène

ODD : Le domaine de dégradation oxygène dépendant

P0 : Le jour de la naissance des rats

PAS : Le domaine PER-ARNT-SIM

pb : paire de base

PBS : Tampon phosphate salin

PBS-T : Tampon phosphate salin avec 0,3% de triton X100

PBS-T-D₁ : tampon phosphate salin avec 0,3% de triton X100 et 1% de sérum normal d'âne

PBS-T-D₂ : tampon phosphate salin avec 0,3% de triton X100 et 2% de sérum normal d'âne

PDH : La famille des prolyl-4-hydroxylases

PF : Le paraformaldéhyde

PH : Le domaine homologue des plecstrines

PI3K : La phosphoinositide-3-kinase

pM : picomolaire

Pilo-SE : Période de status epilepticus induite par l'administration de pilocarpine

post Pilo-SE : Traitement thérapeutique à la rHuEpo administré uniquement à la suite du *status epilepticus*

post-SE : à la suite de la période de *status epilepticus*

PS : La phosphatidyl-sérine

PTZ : Le pentylènetétrazol

PV : La parvalbumine

pVHL : La protéine Van Hippel-Lindau

rHuEpo : L'érythropoïétine recombinante humaine

RT-PCR : réaction de rétro-transcription (ou « transcription inverse ») suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne

s.c : la voie d'injection sous-cutanée

SE : Le *status epilepticus*

sec : seconde

SEM : erreur standard sur la moyenne

Sg : *stratum granulosum*

SH2 : Le domaine homologue à la Src

SLMo : La *stratum lacunosum moleculare*

Sm: *stratum moleculare*

SO : *stratum oriens*

SOS : La protéine « son of sevenless »

SP: *stratum pyramidale*

SR : *stratum radiatum*

Stat : La famille des transducteurs du signal et activateurs de la transcription

TA : température ambiante

Tm : Le point de fusion

TNF α : Le facteur de nécrose tumorale α

TUNEL : “The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling”

U : unité

UI : unité internationale

UP : Eau ultra-pure

UV : Les ultraviolets

VEGF : Le facteur de croissance (pour « growth ») des cellules endothéliales vasculaires

VIP : Le polypeptide intestinal vasoactif

VP : voie perforante

WSxWS : Le motif tryptophane-sérine-x-tryptophane-sérine où le x représente n'importe quel acide aminé

μ g : microgramme

μ L : microlitre

μ m : micromètre

μ M : micromolaire

INTRODUCTION GENERALE	6
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	9
I. L'hippocampe	9
I-1. Structure tissulaire	9
I-2. Structure cellulaire	12
I-2.1. Cellules principales glutamatergiques	12
I-2.1.1. Les cellules granulaires	12
I-2.1.2. Les cellules moussues du hile	12
I-2.1.3. Les neurones pyramidaux de CA3	13
I-2.1.4. Les neurones pyramidaux de CA1	13
I-2.2. Cellules secondaires GABAergiques : les interneurones du hile	14
I-2.2.1. Généralités	14
I-2.2.2. Les « cellules en paniers »	15
II. Les épilepsies du lobe temporal	15
II-1. Généralités	15
II-2. Les traitements	16
II-2.1. La voie médicale	16
II-2.2. La voie chirurgicale	17
II-3. Physiopathologie de l'épilepsie :	18
les évidences anatomiques chez l'homme	18
II-3.1. Difficultés de l'analyse des observations anatomiques obtenues chez l'homme	18
II-3.2. La sclérose hippocampique	19
II-3.2.1. La dégénérescence neuronale	19
II-3.2.2. La gliose réactionnelle	19
II-3.2.2.1. Les astrocytes	20
II-3.2.2.2. La microglie	20
II-4. Etiologies des épilepsies chez l'homme	21
II-4.1. Les causes des épilepsies et leurs classifications	21
II-4.2. Les circonstances de survenue des épilepsies symptomatiques	22
II-5. Le status epilepticus	23
II-5.1. Complications médicales à la suite d'un status epilepticus	23
II-5.2. Les modèles animaux du status epilepticus	24
II-5.2.1. Les modèles d'induction pharmacologique de l'état de mal cérébral	25
II-5.2.1.1. Le modèle pilocarpine	25
II-5.2.1.2. Les autres modèles d'induction pharmacologique de l'état de mal cérébral	26
II-5.2.2. Modèle d'état de mal cérébral induit par stimulation électrique	26
III. La dégénérescence sélective des neurones de l'hippocampe	27
à la suite du status epilepticus	27
III-1. Le profil de dégénérescence neuronale à la suite du	27
status epilepticus dans les modèles animaux	27
III-1.1. Dans les modèles d'induction pharmacologique du status epilepticus	28
III-1.2. Dans le modèle de status epilepticus induit par stimulation électrique de la voie perforante	29
III-1.3. La dégénérescence de neurones de l'hippocampe	30
III-1.3.1. Les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon	30
III-1.3.2. Les neurones du hile	30
III-1.3.2.1. Les interneurones	30
III-1.3.2.2. Les cellules moussues	31
III-2. L'inflammation cérébrale à la suite d'un status epilepticus :	33
une des origines potentielles de la dégénérescence neuronale	33
III-2.1. L'inflammation cérébrale à la suite d'un status epilepticus	34
III-2.2. Rôle de l'inflammation dans la gliose réactionnelle	35
III-2.2.1. Inflammation et réactivité astrocytaire	35
III-2.2.2. Inflammation et réactivité microgliale	36
III-2.3. Les cytokines pro-inflammatoires	37
III-2.3.1. Interleukine-1	37
III-2.3.2. Interleukine-6	38

III-2.3.3. Facteur de nécrose tumoral α	39
III-3. Les mécanismes de la dégénérescence neuronale	40
III-3.1. L'apoptose	40
III-3.1.1. Les mécanismes cellulaires de l'apoptose : Les caspases	40
III-3.1.2 Les mécanismes cellulaires de l'apoptose : La famille des protéines Bcl-2	41
III-3.2. La nécrose : notion de « pénombre » tissulaire	42
IV. L'érythropoïétine dans le système nerveux central	43
IV-1. Structure génique	43
IV-2. Structure protéique	45
IV-3. Expression de l'érythropoïétine au sein du système nerveux central	46
IV-3.1. Expression de l'érythropoïétine et son récepteur au cours du développement cérébral	46
IV-3.2. Expression cérébrale de l'érythropoïétine chez l'adulte	47
IV-4. Mécanismes de régulation de l'expression de l'érythropoïétine	48
IV-4.1. Mécanismes d'induction de l'expression cérébrale de l'érythropoïétine	48
IV-4.1.1. A la suite d'une hypoxie : mécanismes de régulation du facteur de transcription HIF-1	48
IV-4.1.1.1. Mécanisme de stabilisation de HIF-1	48
IV-4.1.1.2. Evidences d'une régulation transcriptionnelle de HIF-1 α	51
IV-4.1.1.3. Régulation post-transcriptionnelle de HIF-1 α via aHIF	51
IV-4.1.1.4. Expression coordonnée de HIF-1 et de l'érythropoïétine sous hypoxie	52
IV-4.1.2. A la suite d'une agression du système nerveux	52
IV-4.2. Inhibition de son expression : rôle potentiel de l'inflammation cérébrale	53
V. L'effet neuroprotecteur de l'administration systémique d'érythropoïétine recombinante humaine	56
V-1. L'érythropoïétine traverse la barrière hémato-encéphalique	56
V-2. Evidences de l'effet neuroprotecteur du traitement à l'érythropoïétine	57
V-2.1. Dans les modèles animaux d'atteinte cérébrale	57
V-2.1.1. Dans des modèles d'ischémie cérébrale	58
V-2.1.2. Dans des modèles d'inflammation cérébrale	59
V-2.1.3. Dans des modèles d'atteinte traumatique du système nerveux	59
V-2.2. Dans les études cliniques chez l'homme	60
V-2.2.1. Les effets bénéfiques	60
V-2.2.2 les effets toxiques potentiels	61
VI. Les cibles biologiques de l'action protectrice de l'érythropoïétine	61
VI-1. Les voies de protection tissulaire extrinsèques de l'érythropoïétine	62
VI-1.1. L'érythropoïétine et la réponse inflammatoire	62
VI-1.2. L'érythropoïétine et le flux sanguin cérébral	64
VI-1.3. L'érythropoïétine et la reconstruction tissulaire	64
VI-2. Les voies de protection tissulaire intrinsèques de l'érythropoïétine	65
VI-2.1. Le récepteur à l'érythropoïétine	65
VI-2.1.1. Structure génique	65
VI-2.1.2. Structure protéique	65
VI-2.2. Identification des cellules cérébrales exprimant le récepteur à l'érythropoïétine	66
VI-2.2.1. Dans les conditions basales	66
VI-2.2.2. A la suite d'une atteinte cérébrale	67
VI-2.3. Mécanisme d'activation de l'Epo-R après fixation de l'érythropoïétine	68
VI-2.3.1. Structure de la Janus Kinase 2	68
VI-2.3.2. Mécanisme de transduction du signal cellulaire	68
VI-2.4. Les voies de la signalisation intracellulaire	68
VI-2.4.1. La voie de signalisation cellulaire PI3K / Akt	69
VI-2.4.1.1. Structures et mécanismes d'activation	69
VI-2.4.1.2. Actions neuroprotectrices	71
VI-2.4.2. La voie de signalisation cellulaire du NF-kappa B	72
VI-2.4.2.1. Structure et mécanismes d'activation	72
VI-2.4.2.2. Actions neuroprotectrices	72
VI-2.4.3. La voie de signalisation cellulaire des MAPs kinases	73
VI-2.4.3.1. Cascades d'activation des MAPs kinases	73
VI-2.4.3.2. Actions neuroprotectrices	73
VI-2.4.4. La voie de signalisation cellulaire de Stat5	73

VI-2.4.4.1. Structure et mécanismes d'activation	73
VI-2.4.4.2. Actions neuroprotectrices	74
VI-2.5. L'érythropoïétine contrôle l'homéostasie du calcium intra-cellulaire	74
VI-3. Existence d'un récepteur à l'érythropoïétine alternatif impliqué dans la protection spécifique des neurones au sein du système nerveux ?	74
VI-3.1. Les dérivés neuroprotecteurs de la molécules d'érythropoïétine	75
VI-3.1.1. L'asialo-érythropoïétine	75
VI-3.1.2. L'érythropoïétine carbamylée (CEpo)	76
VI-3.2. Existence d'un récepteur alternatif spécifique de l'action neuroprotectrice de l'érythropoïétine ?	77
VI-3.2.1. Les récepteurs à l'érythropoïétine alternatifs	77
VI-3.2.2 La chaîne bêta commune des récepteurs de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF	78
PROCEDURES EXPERIMENTALES	80
I. Animaux et conditions d'hébergements	80
I-1. Au cours du développement et du vieillissement	80
I-2. A la suite du status epilepticus	80
II. Traitements pharmacologiques	81
II-1. Modèle d'induction d'un status epilepticus par l'administration de pilocarpine	81
II-2. Traitements à l'érythropoïétine recombinante humaine	83
II-2.1. Préparation de la solution d'érythropoïétine recombinante humaine	83
II-2.2. Protocoles de traitement à la rHuEpo	83
II-2.2.1. Début du traitement à la rHuEpo après arrêt du status epilepticus	83
II-2.2.2. Début du traitement à la rHuEpo avant l'induction du status epilepticus	84
III. Etude comportementale au cours du status epilepticus et mesure des constantes physiologiques	85
III-1. Etude comportementale des rats au cours du status epilepticus	85
III-1.1. Développement des différents stades comportementaux au cours du status epilepticus	85
III-1.2. Sélection sur critères comportementaux des rats traités à la pilocarpine	85
III-2. Mesure des constantes physiologiques	86
III-2.1. Mesure des constantes physiologiques au cours de période d'épileptogenèse	86
III-2.2. Détermination du « point final » dans notre protocole expérimental	86
IV. Groupes expérimentaux	88
IV-1. Etude de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique endogène dans les conditions basales et physiopathologiques	88
IV-1.1. Etude de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique au cours du développement post-natal et du vieillissement chez le rat	88
IV-1.2. Etude de l'expression de l'Epo-R et de la βc sur une culture de cellules neuronales PC12	89
IV-1.3. Etude de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique à la suite du status epilepticus chez le rat	89
IV-2. Etude de l'effet de l'administration d'érythropoïétine recombinante humaine sur la survie neuronale à la suite d'un status epilepticus	90
IV-2.1. Etude de l'accumulation de la rHuEpo dans le tissu cérébral chez le rat dans les conditions physiologiques et physiopathologiques	90
IV-2.2. Etude de l'effet de l'administration de rHuEpo sur le développement du status epilepticus et la protection des neurones vulnérables de l'hippocampe	90
METHODES EXPERIMENTALES	93
I. Préparation des tissus	93
I-1. Prélèvements et traitements des tissus frais	93
I-1.1. Prélèvement des cerveaux et microdissection sur tissu frais	93
I-1.2. Préparation des ARN totaux	93
I-1.2.1 Extraction et purification	93
I-1.2.2. Vérification de la qualité des ARN totaux	94
I-1.2.3. Vérification de l'absence de contamination en ADN génomique	94
I-1.2.4. Préparation des pools d'ARN totaux	95
I-2. Prélèvements et traitements des tissus fixés	95

I-2.1. Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux	95
I-2.2. Prélèvement et conservation des coupes de cerveaux perfusés	96
I-3. Culture cellulaire	96
II. Analyse moléculaire :	97
Quantification des ARN messagers par RT calibrée et PCR en « temps réel »	97
II-1. Transcription Inverse (RT) calibrée	97
II-1.1. Calibration de la transcription inverse par l'ARN de synthèse	97
II-1.2. Réaction de transcription inverse calibrée	97
II-1.2.1. Réaction de transcription inverse sur 500 ng d'ARN totaux	98
II-1.2.2. Réaction de transcription inverse sur 1 µg d'ARN totaux	98
II-2. Amplification des ADNc d'intérêts par la technique de PCR en « temps réel » sur Lightcycler™	99
II-2.1. Principe de la PCR en « temps réel »	99
II-2.2. Etalonnage de la réaction de PCR en « temps réel »	100
II-2.2.1. Principe	100
II-2.2.2. Réalisation de la gamme d'étalonnage	100
II-2.3. Amplification des ADNc d'intérêt	101
II-2.3.1. Choix des couples d'amorces	101
II-2.3.2. Réaction de la PCR en « temps réel »	102
II-2.3.3. Identification des ADNc amplifiés	103
III. Analyses histologiques	105
III-1. Coloration au crésyl violet	105
III-2. Coloration au Fluoro-Jade B	105
III-3. Détections immunohistochimiques	106
III-3.1. Détections immunohistochimiques de l'Epo, de l'Epo-R et de la βc	107
III-3.1.1. Détections par simple marquage colorimétrique	107
III-3.1.2. Détections par doubles marquages fluorescents de l'Epo ou de l'Epo-R avec NeuN, GFAP et OX-42	108
III-3.2. Détections immunohistochimiques colorimétriques des protéines NeuN, CGRP et GAD 65/67	109
III-3.2.1. Détection de NeuN	109
III-3.2.2. Détections par simple marquage colorimétrique de la CGRP et de la GAD 65/67	110
III-4. Détection dans le tissu cérébrale de l'érythropoïétine recombinante humaine par ELISA	110
IV. Analyses et traitements des données	111
IV-1. Variables analysées	111
IV-1.1. Analyse de la quantité des ARN messagers cibles détectés par RT calibrée et PCR en « temps réel »	111
IV-1.2. Analyse des coupes de cerveau traitées par simple marquage colorimétrique	111
IV-1.2.1. Méthodologie du comptage cellulaire	112
IV-1.2.3. Méthodologie de la mesure de la densité neuronale	112
IV-1.3. Analyse des coupes traitées par doubles marquages fluorescents	112
IV-2. Expression des résultats	113
IV-3. Analyses statistiques	114
RESULTATS	116
I. L'érythropoïétine protège les neurones hippocampiques à la suite du status epilepticus induit par la pilocarpine	116
I-1. Introduction	116
I-2. Résultats	119
I-2.1. Expression basale et distribution de l'Epo-R et de l'Epo au niveau de l'hippocampe.	119
I-2.2. Expression et distribution basale de la chaîne β commune dans le cerveau de rat.	120
I-2.3. Expression de l'Epo-R dans l'hippocampe à la suite du SE induit par la pilocarpine.	120
I-2.4. Expression de l'Epo dans l'hippocampe à la suite du Pilo-SE.	121
I-2.5. La βc est exclusivement exprimée par les cellules de la microglie activée à la suite du Pilo-SE.	122
I-2.6. Décours temporel de la perte neuronale dans l'hippocampe dorsal.	122
I-2.7. Capture de la rHuEpo par le tissu cérébral dans les conditions basales et à la suite du Pilo-SE.	123

I-2.8. L'administration de rHuEpo prévient le développement du SE et réduit le nombre de crises de stade 4/5	123
I-2.9. L'administration de rHuEpo protège les neurones hippocampiques de la dégénérescence induite à la suite du Pilo-SE.	124
I-3. Discussion	138
I-3.1. Caractérisation de l'expression hippocampique de l'Epo et son récepteur dans les conditions basales	138
I-3.2. Induction de l'expression de HIF-1 α à la suite d'un Pilo-SE	139
I-3.3. Expression astrocytaire de l'Epo et son récepteur en réponse au Pilo-SE.	140
I-3.4. Hétérogénéité de la robustesse neuronale entre les différentes régions de l'hippocampe à la suite du Pilo-SE.	141
I-3.5. Capacité de la rHuEpo à traverser la BHE dans les conditions basales et à la suite du Pilo-SE.	142
I-3.6. Protection des neurones hippocampiques par le traitement à la rHuEpo contre la dégénérescence neuronale induite par le Pilo-SE.	143
I-3.7. Implication de la β c dans le signal de survie induit par la rHuEpo au niveau des neurones de l'hippocampe à la suite du Pilo-SE.	144
I-4. Conclusion.	147
II. Le récepteur responsable des effets neuronaux de l'érythropoïétine ne serait pas composé de la chaîne β commune	148
II-1. Introduction	148
II-2. Résultats	150
II-2.1. Profil d'expression cérébrale de l'Epo-R au cours du développement postnatal et du vieillissement.	150
II-2.2. Profil d'expression cérébral de la β c au cours du développement postnatal et du vieillissement.	151
II-2.3. Profil d'expression de l'Epo cérébrale au cours du développement postnatal et du vieillissement.	152
II-2.4. Expression du récepteur Epo-R et de la β c par les cellules PC12.	154
Nos résultats obtenus sur la lignée de cellules PC12 n'ont pu mettre en évidence la présence du transcrit codant pour la β c, que celles-ci soient à l'état indifférencié (phase proliférative) ou engagées dans une voie de différenciation neuronale. En revanche, le transcrit codant pour le récepteur Epo-R a été facilement détecté au niveau de cellules PC12 indifférenciées ($33\ 300 \pm 5\ 661$ de copie d'ADNc d'Epo-R). Ce niveau d'expression du récepteur Epo-R est augmenté de 17,5 fois 3 jours après le traitement des cellules au NGF (Figure R21).	154
II-3. Discussion	164
II-3.1. L'expression du récepteur Epo-R varie fortement au cours du développement et du vieillissement.	164
II-3.2. La régulation de l'expression du récepteur Epo-R pourrait être sous la dépendance de l'Epo au cours du développement et du vieillissement cérébral.	165
II-3.3. La chaîne β commune ne ferait pas partie du récepteur fonctionnel de l'Epo au niveau cérébral.	165
II-3.4. Rôles potentiels de la régulation de l'expression de l'Epo et de son récepteur au cours du développement et du vieillissement.	166
II-3.5. Conclusion	168
CONCLUSION GENERALE	169
I. L'induction astrocytaire d'Epo prolonge la survie des neurones hippocampiques en réponse à un Pilo-SE.	169
II. L'apport exogène d'Epo assure une protection efficace des neurones hippocampiques à la suite d'un Pilo-SE.	170
III. La βc n'est pas impliquée dans la formation d'un récepteur spécifique assurant les effets neuroprotecteurs de l'Epo.	172
IV. Conclusions et Perspectives	173
BIBLIOGRAPHIE	175

INTRODUCTION GENERALE

L'érythropoïétine (Epo) est une glycoprotéine impliquée dans la stimulation de la prolifération des érythrocytes (hématopoïèse) en réponse à la diminution de la teneur en oxygène de l'environnement (hypoxie) [129]. Chez l'homme adulte, elle est produite par les cellules tubulaires rénales et par les hépatocytes chez le fœtus. Récemment, il a été mis en évidence une production cérébrale de l'Epo et de son récepteur (Epo-R) chez les rongeurs, les primates et l'homme [172]. Si les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression constitutive de l'Epo au sein du système nerveux central ne sont pas actuellement bien définis, il a été montré que l'expression cérébrale de l'Epo était induite en réponse à une hypoxie [173]. Cette réponse nécessite l'activation du facteur de transcription inductible par l'hypoxie -1 (HIF-1), dont sa sous-unité régulatrice HIF-1 α est connue pour être : 1) dégradée dans les conditions normoxiques, et 2) stabilisée en conditions hypoxiques [173]. Ces résultats suggèrent que les mécanismes mis en jeu à la suite d'une hypoxie pour induire l'expression de l'Epo au niveau du cerveau sont les mêmes que ceux activés au niveau du rein, à la seule différence que les niveaux d'inductions sont plus faibles au niveau central qu'au niveau périphérique [174].

La découverte de l'expression cérébrale de l'Epo a encouragé la recherche du rôle biologique qu'elle joue au sein du système nerveux central. Rapidement, il a été mis en évidence que son expression constitutive cérébrale permet de protéger les neurones contre des agressions d'intensités modérées, comme une ischémie de courte durée chez la gerbille [227]. Toutefois, cette expression constitutive s'est avérée inefficace dans la protection contre des agressions sévères, comme une ischémie cérébrale permanente chez la souris [16]. En revanche, dans ce dernier cas, l'observation d'une induction de l'expression de l'Epo et de son récepteur autour de la zone agressée [16] a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle elle permettrait de limiter l'expansion des dommages cérébraux en augmentant la robustesse des neurones adjacents [31].

Il apparaît clairement que la synthèse cérébrale d'Epo n'est pas suffisante pour lutter efficacement contre la dégénérescence neuronale massive observée dans la zone endommagée. Toutefois, cette limitation peut être contournée par l'administration de doses importantes d'Epo de synthèse [22]; [172]; [113], dont il a été montré qu'elle traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) après son administration par voie systémique [24,79,136,262]. **Notre travail de thèse s'inscrit donc dans un champ d'investigation dont l'exploration est récente, et qui consiste à rechercher si l'apport exogène d'Epo favorise la survie neuronale, en soutien à l'action protectrice de l'Epo endogène, dans le cadre d'une agression cérébrale sévère.**

En effet, l'administration systémique d'Epo de synthèse chez le rongeur a révélé des propriétés neuroprotectrices dans différents modèles *in vivo* de pathologies du système nerveux central et périphérique associées à des dommages neuronaux, dont le traumatisme crânien [24], l'ischémie cérébrale permanente [24], l'encéphalomyélite aiguë [24], la compression et la contusion de la moëlle épinière [106] ou la lésion des nerfs périphériques [1]. En revanche, nous ne disposons d'aucune donnée concernant les effets protecteurs de l'Epo dans les modèles de l'épilepsie du lobe temporal, syndrome neurologique caractérisé par une importante dégénérescence neuronale localisée en particulier dans l'hippocampe [210]. Les modèles de ce type d'épilepsie peuvent être induits, chez le rongeur, à la suite d'un état de mal (*status epilepticus*) provoqué par l'administration d'un agent convulsivant, comme la pilocarpine. **Le premier objectif de notre travail de thèse était de rechercher si l'Epo endogène et l'Epo exogène pouvaient être impliquées dans la survie des neurones de l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par pilocarpine chez le rat adulte.** Pour ce faire, nous avons :

- 1) réalisé une description précise de l'expression cellulaire des protéines clés du système Epoergique (Epo et son récepteur Epo-R) au sein du système nerveux central ;
- 2) vérifié si, à la suite du *status epilepticus*, il existe une induction de l'expression de l'Epo et de son récepteur Epo-R au niveau de l'hippocampe ;
- 3) déterminé si l'administration systémique d'Epo de synthèse favorise la survie des neurones hippocampiques à la suite du *status epilepticus* ;
- 4) caractérisé précisément les populations neuronales protégées.

Malgré l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus chez l'animal sur les effets bénéfiques de l'Epo de synthèse dans la protection du tissu cérébral, une seule étude clinique

a recherché l'effet de son administration chez des patients victimes d'un accident vasculaire cérébral [80]. Les résultats encourageants qui ont été obtenus, avec une amélioration de la récupération des capacités cognitives et fonctionnelles chez les patients traités, ont permis de proposer l'Epo comme agent thérapeutique dans le traitement de nombreuses maladies neurodégénératives ou accidents cérébraux chez l'homme. Toutefois, la mise en évidence, chez certains patients anémiques traités à l'Epo de synthèse, d'effets secondaires toxiques associés à l'activité hématopoïétique de la molécule [22,172] a limitée le nombre d'études cliniques, et suscité le développement de nouvelles molécules dérivées de l'Epo, conservant les effets neuroprotecteurs mais perdant les effets hématopoïétiques [84,153]. Bien qu'il était classiquement admis que la forme homodimérique de l'Epo-R soit l'unique récepteur assurant les différentes fonctions de l'Epo au niveau périphérique et central [49,278], il a été suggéré que la perte de la fonction hématopoïétique des nouvelles molécules dérivées de l'Epo était liée à l'existence d'un récepteur alternatif impliqué uniquement dans la protection neuronale [22]. Ce récepteur serait composé d'un monomère d'Epo-R et d'un homodimère de la chaîne β commune (β_c) [22], dont l'absence d'expression chez des souris transgéniques est associée à la perte des effets bénéfiques de l'Epo de synthèse à la suite d'un traumatisme de la moëlle épinière [23,153]. Pourtant, même si ce résultat suggère l'implication de la β_c dans les effets neuroprotecteurs de l'Epo, sa distribution tissulaire et cellulaire au sein du système nerveux central reste encore inconnue. **Le second objectif de notre travail de thèse était de vérifier l'implication potentielle de la β_c dans la formation d'un récepteur permettant la transduction cellulaire du signal de survie induit par l'Epo.** Pour ce faire, nous avons recherché si les variations d'expression des sous-unités du récepteur alternatif potentiel de l'Epo (Epo-R et β_c) étaient corrélées à celles de l'Epo dans des situations :

- 1) physiologiques au cours du développement du système nerveux central ;
- 2) physiopathologiques à la suite d'un *status epilepticus* induit par la pilocarpine.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. L'hippocampe

L'hippocampe est une structure cérébrale qui compose la partie interne du cortex, adjacente au cortex olfactif, chez les mammifères supérieurs. Il est au centre d'un réseau neuronal complexe le mettant en contact avec de nombreuses structures cérébrales tels que l'amygdale, le septum et le thalamus pour former le système limbique appelé le « berceau des émotions ». De plus, sa capacité à moduler sa morphologie en réponse à des modifications environnementales lui permet de jouer un rôle crucial dans les processus de mémorisation et d'apprentissage.

Le déploiement tridimensionnel de l'hippocampe au niveau du cerveau est complexe. L'hippocampe apparaît comme une structure allongée en forme de C qui prend son origine au niveau du noyau septal localisé en position dorsale dans la portion antérieure du cerveau, qui traverse en direction postérieure le diencephale pour venir se loger au niveau du lobe temporal, en position ventrale [3] (Figure B1A).

I-1. Structure tissulaire

L'hippocampe s'intègre au sein d'un ensemble de structures cérébrales regroupées sous le terme de formation hippocampique composée de quatre régions cytoarchitecturales distinctes dont i) le gyrus denté (GD); ii) la corne d'Ammon (CA) ou hippocampe, qui est divisé en trois régions nommées CA1, CA2 et CA3; iii) le *subiculum* et iv) le cortex entorhinal. Le regroupement de ces différentes structures sous le terme de « formation hippocampique » est justifié par l'existence d'un ensemble de contact nerveux de type unidirectionnel entre-elles, entraînant la formation d'un vaste réseau neuronal. En effet, les neurones du cortex entorhinal envoient leurs axones, formant la « voie perforante », vers le GD pour contacter les dendrites apicales des cellules granulaires. Les axones des cellules granulaires, appelés « fibres moussues », contactent les cellules pyramidales de CA3 qui, à leur tour, projettent des axones, appelés « collatérales de Schaeffer », vers les neurones de la région CA1. Ces derniers projettent hors de l'hippocampe, vers le *subiculum* qui contacte en retour le cortex entorhinal, formant ainsi une boucle anatomique [3] (Figure B1B et C).

La corne d'Ammon est constituée par la *stratum pyramidale* qui contient les corps cellulaires des neurones pyramidaux de type glutamatergique, ainsi que la *stratum radiatum* et la *stratum lacunosum moleculare* (SLMo) qui contiennent respectivement les segments proximaux et distaux de l'arbre dendritique apical. Au niveau de CA3, une couche supplémentaire est observée, appelée *stratum lucidum*, qui contient les segments les plus proximaux des dendrites des cellules pyramidales recevant les fibres moussues des cellules granulaires. Les axones des cellules pyramidales présentent de nombreuses collatérales, notamment les collatérales de Schaeffer reliant les régions CA3 et CA1. Anatomiquement, la corne de Ammon et le GD avec leur forme de C s'enchevêtrent l'un dans l'autre (Figure B1B et C).

Le GD se compose d'une couche de cellules granulaires délimitant la région du hile composée d'une couche cellulaire dite polymorphe dans laquelle vient pénétrer la portion CA3c de la corne de Ammon. Les dendrites des cellules granulaires arborisent dans la couche moléculaire du GD. Leurs axones ou fibres moussues, traversent la couche polymorphe du hile et pour venir former des synapses avec les dendrites des cellules pyramidales au niveau de la *stratum lucidum* de la région CA3 (Figure B1B et C).

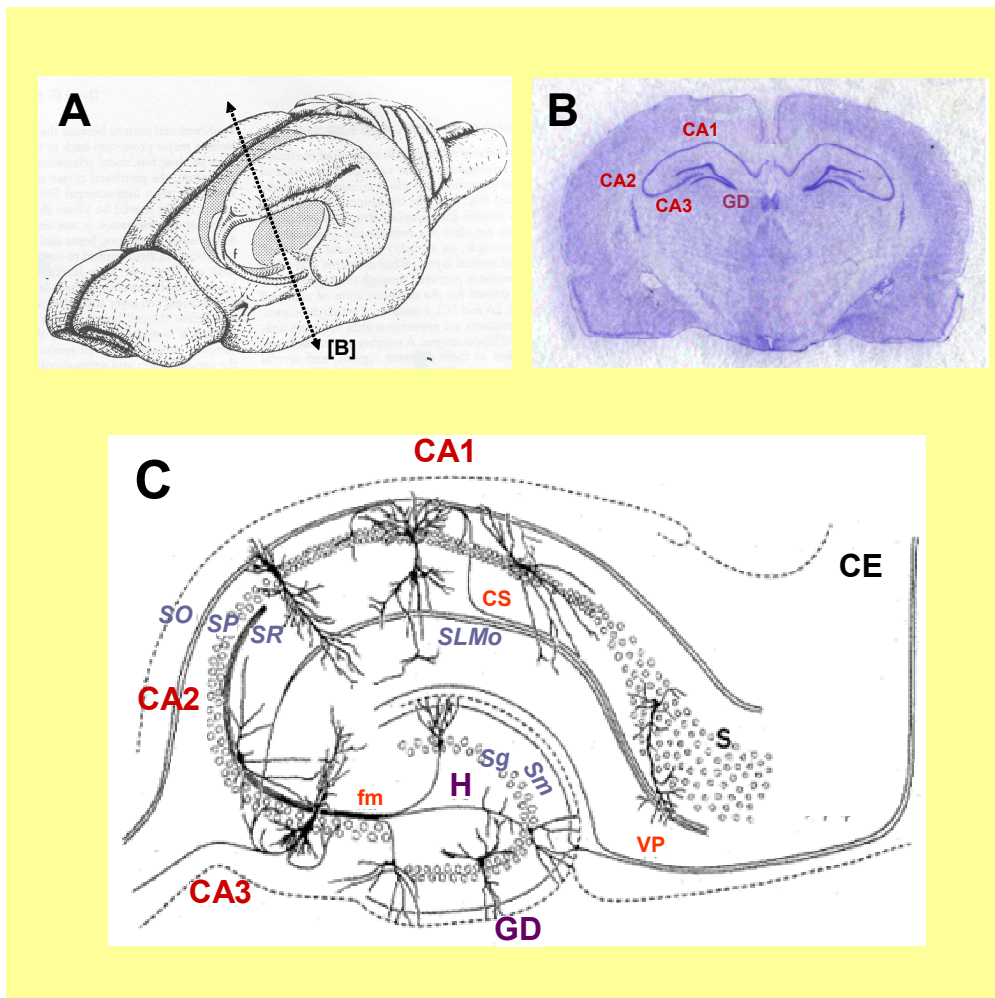


Figure B1. Anatomie de l'hippocampe. (A) Localisation de l'hippocampe dans le cerveau de rat. (B) Coupe coronale réalisée dans la partie antérieure de l'hippocampe, comme indiqué en (A) et colorée au crésyl violet. Les subdivisions CA1, CA2 et CA3 de la corne d'Ammon (CA) et le gyrus denté (GD) sont indiquées. (C) Structure de la formation hippocampique. Abréviations : (1) sous-couche cellulaire : *SO*, *stratum oriens* ; *SP*, *stratum pyramidale* ; *SR*, *stratum radiatum* ; *SLMo*, *stratum lacunosum moleculare* ; *Sg*, *stratum granulosum* ; *Sm*, *stratum moleculare*. (2) connexions nerveuses : *VP*, voie perforante ; *fm*, fibres moussues ; *cs*, collatérales de Schaeffer. (3) région hippocampique : *CA*, corne d'Ammon ; *GD*, gyrus denté ; *H*, hile. (4) structure cérébrale : *CE*, cortex entorhinal.

I-2. Structure cellulaire

Les différents neurones qui composent l'hippocampe sont répartis en deux familles cellulaires distinctes en fonction de leur activité excitatrice ou inhibitrice au sein du réseau neuronal hippocampique. La première famille est composée de cellules dites « principales » impliquées dans la transmission de l'information nerveuse à travers l'hippocampe par la libération synaptique du neurotransmetteur excitateur principal du système nerveux central : le glutamate. En revanche, la deuxième famille regroupe les cellules dites « secondaires », appelées aussi interneurons, qui régulent l'excitation hippocampique par la libération synaptique d'un neurotransmetteur inhibiteur : l'acide γ -amino-butirique (GABA) [54].

I-2.1. Cellules principales glutamatergiques

I-2.1.1. Les cellules granulaires

Le GD est la région cible de la majorité des afférences provenant du cortex entorhinal dont la fonction est de transmettre de nombreuses informations sensorielles provenant de l'environnement extérieur.

Les cellules principales du GD sont les cellules granulaires dont les petits corps cellulaires (8-12 μm de diamètre) forment une couche dense et compacte appelée la *stratum granulosum*. Ces cellules possèdent spécifiquement deux dendrites émettant de nombreuses branches fines qui atteignent la fissure hippocampique. L'arborisation dendritique des cellules granulaires est confinée au niveau de la *stratum moleculare*, qui est la couche adjacente à la *stratum granulosum*. Les axones des cellules granulaires, appelés les fibres moussues, émergent du soma et projettent massivement sur les dendrites apicales des neurones pyramidaux de la région CA3 en formant un bouton synaptique géant caractéristique. Au niveau du hile, les axones donnent naissance à de nombreuses collatérales qui contactent les cellules principales du hile, les cellules moussues [244,245].

I-2.1.2. Les cellules moussues du hile

Les cellules moussues représentent la population cellulaire majoritaire du hile et sont des cellules excitatrices qui réalisent des projections de type ipsilatéral et commissural au niveau du GD [91]. Elles se distinguent par une arborisation dendritique très dense ainsi que la présence de nombreuses excroissances en forme d'épine au niveau de leurs corps cellulaires

et de leurs axes dendritiques. Les dendrites des cellules moussues sont confinées au niveau de la région du hile [2], bien que certaines d'entre elles puissent contacter la couche moléculaire du GD [229]. Dans ce dernier cas, les axones des cellules moussues projettent sur le premier tiers de la couche moléculaire du GD pour innover les dendrites des neurones granulaires [30]. Il a également été observé l'existence de collatérales au niveau du hile qui contactent les dendrites des interneurons se trouvant à proximité [30].

I-2.1.3. Les neurones pyramidaux de CA3

Les cellules pyramidales de la région CA3 sont les cibles principales des neurones granulaires du GD. Elles reçoivent les fibres moussues du GD au niveau de la *stratum lucidum* qui est une couche spécifique de la région CA3 située entre sa *stratum pyramidale* et sa *stratum radiatum*. La région CA3 est subdivisée en trois parties appelées CA3a (le « coude » de l'hippocampe directement adjacent à la région CA2), CA3b et CA3c (la portion qui pénètre dans le hile) [3]. Les cellules pyramidales présentent un large soma caractéristique qui donne naissance à une couche de 60-120 μm de large, la *stratum pyramidale*. Une ou deux dendrites apicales proéminentes émergent du soma, orientées vers la *stratum radiatum* et la SLMo où elles donnent naissance à de fines branches qui atteignent la fissure hippocampique et la frontière du hile [125]. Les dendrites basales sont beaucoup plus nombreuses et sont orientées en direction de la *stratum oriens*. Les axones ou « collatérales de Schaffer » de cellules pyramidales de CA3 émergent du soma au niveau des dendrites basales et forme une arborisation axonale très dense dans la région de CA3 avant de projeter exclusivement dans la région de CA1 [3].

I-2.1.4. Les neurones pyramidaux de CA1

La région CA1 est la principale cible des collatérales de Schaffer des neurones pyramidaux de la région CA3. Les corps cellulaires des neurones pyramidaux de cette région, qui sont plus petit que ceux des neurones pyramidaux de CA3, forment une couche de 50-100 μm d'épaisseur, appelée la *stratum pyramidale*. Les cellules pyramidales de CA1 présentent une dendrite unique, orientée de manière radiale, qui émet de nombreux prolongements qui traversent la *stratum radiatum* pour venir se terminer, sous forme de fines touffes, au niveau de la SLMo [125]. Les axones émergent de la région du soma directement adjacente aux dendrites apicales et projettent principalement au niveau du *subiculum* et du cortex entorhinal, devenant ainsi la région majeure dans la transmission extra-hippocampique de l'information

nerveuse. Les axones émettent des collatérales dont l'arborescence est confinée au niveau de la *stratum oriens*.

I-2.2. Cellules secondaires GABAergiques : les interneurones du hile

Au niveau de l'hippocampe, en plus des cellules pyramidales glutamatergiques que nous venons de décrire, il existe des cellules dites secondaires appelées « interneurones » et qui sont de type GABAergique. Ces derniers sont présents dans l'ensemble des couches cellulaires non pyramidales de l'hippocampe et assurent un contrôle négatif sur le niveau d'excitation des neurones pyramidaux voisins. Dans ce paragraphe, nous ne décrivons que les interneurones de la région du hile du GD qui sont représentatifs de l'ensemble des interneurones de l'hippocampe.

I-2.2.1. Généralités

Les interneurones sont une population cellulaire très hétérogène, classiquement décrits comme étant « des cellules inhibitrices avec des axones courts qui jouent un rôle essentiel dans la régulation des circuits locaux d'excitation du système nerveux central ». L'avancée des connaissances sur leurs caractéristiques anatomiques et biochimiques ainsi qu'une meilleure compréhension de leurs fonctions montrent que cette définition est aujourd'hui beaucoup trop simple et restrictive.

Quoiqu'il en soit, l'ensemble des interneurones de l'hippocampe utilise le GABA comme principal neurotransmetteur [91] et joue un rôle majeur dans i) le contrôle du niveau d'intensité et de la durée des potentiels d'action, ii) la modulation du nombre de cellules qui participe à la décharge, iii) les boucles de contrôle et de rétro-contrôle négatifs de la transmission de l'information nerveuse et iv) la génération de réseaux d'oscillation rythmique dont les variations de fréquences sont impliquées dans de nombreux comportements biologiques [228]. Ils sont principalement localisés dans les régions du hile et de la SLMo ainsi que dans l'ensemble des sous-couches cellulaires de la corne d'Ammon [91].

I-2.2.2. Les « cellules en paniers »

Au niveau de l'hippocampe, les cellules dites « en paniers » représentent une population d'interneurones très hétérogène qui varie en fonction des origines très diverses de leurs afférences, de la distribution de leur projection axonique et de leurs caractéristiques neurochimiques.

Au niveau du GD, on peut distinguer deux sous-populations de cellules en paniers en fonction de la localisation de leurs corps cellulaires, de leurs distributions dendritiques et des marqueurs biochimiques qu'elles expriment [91]. Les cellules en paniers dites « granulaires » présentent une arborisation dendritique restreinte au niveau du hile. La majorité de leurs afférences excitatrices proviennent des collatérales des axones des cellules granulaires [91] et des cellules moussues [245]. Leurs corps cellulaires, deux fois plus gros que ceux des cellules granulaires, donnent naissance au niveau du soma à un axone qui projette dans la *stratum moleculare* du GD où apparaissent de nombreuses collatérales qui rentrent en contact avec les dendrites et les corps cellulaires de cellules granulaires [220]. Les cellules en paniers granulaires peuvent être différenciées par l'expression spécifique de différents neuropeptides tels que la cholécystokinine (CCK), la calrétinine (CR) et le polypeptide intestinal vasoactif (VIP). Les cellules en paniers granulaires qui expriment la parovalbumine (PV) sont les cibles spécifiques des cellules moussues au niveau du hile [91,245].

Brièvement, au niveau du GD, il existe une deuxième population de cellules en paniers appelée « pyramidale » dont le corps cellulaire est localisé à proximité des neurones granulaires mais dont une dendrite apicale émerge du soma, traverse la *stratum moleculare*, et projette au niveau de la fissure hippocampique. En revanche, leurs projections axonales sont identiques à celles des cellules en paniers granulaires [91].

II. Les épilepsies du lobe temporal

II-1. Généralités

L'épilepsie est le syndrome neurologique le plus répandu dans le monde avec environ 50 millions de patients [43]. Elle touche une population de tous âges même si le risque de développer des épilepsies est plus grand durant l'enfance ou après 60 ans [210]. Le taux de

mortalité dramatiquement élevé chez les patients épileptiques, avec un risque de mort subite vingt quatre fois supérieur chez un patient épileptique que chez un individu sain, a rendu critique le développement de nouveaux traitements permettant de lutter efficacement contre ce syndrome.

La principale caractéristique du syndrome épileptique est son expression comportementale qui correspond au développement spontané de crises épileptiques récurrentes [43]. Les crises épileptiques résultent d'une décharge synchrone des neurones liée à des modifications intrinsèques du tissu cérébral. La complexité de la maladie s'exprime par : i) les multiples formes d'expression des crises qui peuvent prendre leurs origines dans n'importe quelles régions du cerveau, ii) une étiologie souvent difficile à établir et iii) une évolution variable du syndrome au cours du temps. Actuellement, il a été caractérisé quarante types de syndromes épileptiques distincts. Les épilepsies du lobe temporal (ELT) représentent la forme d'épilepsie la plus diagnostiquée chez les patients mais aussi la plus difficile à traiter surtout chez l'adulte. En effet, 25 à 35% des patients sont atteints d'ELT dites « pharmaco-résistantes », les traitements anti-épileptiques actuels n'entraînant pas d'arrêt de la récurrence des crises épileptiques chez ces patients (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, www.ninds.nih.gov).

II-2. Les traitements

II-2.1. La voie médicale

Le traitement des épilepsies par voie pharmacologique est de type « symptomatique » et vise à faire disparaître les crises ou à en diminuer leur fréquence. La majorité des anti-épileptiques actuels sont des anti-convulsivants qui agissent sur les mécanismes intimes à l'origine de l'excitation neuronale. En effet, les anti-épileptiques actuels présentent une action pharmacologique qui peut s'exercer soit au niveau électrophysiologique (diminution de la tendance aux décharges répétitives au niveau du foyer épileptogène ; réduction de la propagation de la décharge aux structures avoisinantes), soit au niveau neurochimique (modification d'activité enzymatique ; activation de la synthèse ou dégradation de neurotransmetteurs ; modification de la structure des récepteurs aux neurotransmetteurs).

La réponse au traitement permet de distinguer trois grandes classes d'épilepsies suivant leurs évolutions qui sont : i) les épilepsies dites « pharmaco-sensibles » où les crises diminuent rapidement puis disparaissent sous l'effet du traitement qui peut être arrêté au bout de quelques années, ii) les épilepsies dites « pharmaco-dépendantes » où les crises disparaissent rapidement sous traitement mais toute tentative d'arrêt de la prise médicamenteuse fait réapparaître les crises et iii) les épilepsies dites « pharmaco-résistantes » où les crises vont persister malgré la prise correcte et régulière du traitement. Les épilepsies pharmaco-résistantes représentent environ 25 à 35% des épilepsies et présentent le plus fréquemment un foyer épileptogène au niveau du lobe temporal (National Institute of Neurological Disorders and Stroke, www.ninds.nih.gov). Chez ces épilepsies, quand la région cérébrale atteinte ne contrôle pas des fonctions vitales de l'organisme, la voie chirurgicale, qui consiste en la résection de la zone épileptogène, peut être envisagée.

Dans l'avenir, une nouvelle approche thérapeutique pourrait être envisagée avec le développement de nouvelles molécules qui seraient de type « anti-épileptogène ». En effet, le traitement des patients à risques avec celles-ci permettrait d'empêcher l'émergence de crises chroniques et ainsi la mise en place de l'épilepsie. Mais ceci nécessitera obligatoirement l'établissement d'une classification étiologique clairement définie sans laquelle aucun traitement préventif ne pourrait être envisagé.

II-2.2. La voie chirurgicale

La chirurgie de l'épilepsie est soit i) « palliative » avec la section des voies de transmission de la propagation de la décharge épileptique, ii) « curative » avec l'exérèse d'une lésion considérée comme épileptogène et/ou du foyer épileptogène qui doit être obligatoirement cortical, unique, d'étendue limitée et dont les contours doivent être clairement définis. Cette dernière ne peut être envisagée que dans les cas d'ELT pharmaco-résistantes et la résection corticale ne doit pas entraîner de déficit fonctionnel. Cela en limite grandement l'indication. On estime, actuellement en France, à 12 000 le nombre de candidat à la chirurgie de l'épilepsie pour une centaine d'interventions seulement chaque année. En revanche, lorsque tous les critères sont réunis pour réaliser l'intervention, les résultats sont encourageants avec 67 à 85% de réussite dans le contrôle des crises récurrentes et l'arrêt de l'ELT [248].

II-3. Physiopathologie de l'épilepsie : les évidences anatomiques chez l'homme

La crise épileptique, qui est l'expression comportementale du syndrome épileptique chez le patient, résulte de modifications profondes du système nerveux central provoquant l'émergence d'un nouveau réseau neuronal favorisant la décharge synchronisée des neurones et l'apparition des crises. L'une de ces modifications est la présence d'importants dommages cérébraux liés à une dégénérescence massive des neurones de l'hippocampe que l'on observe chez 70% des patients souffrant d'épilepsie de type pharmaco-résistante [120].

II-3.1. Difficultés de l'analyse des observations anatomiques obtenues chez l'homme

L'examen des tissus cérébraux réséqués provenant de patients épileptiques est essentiel dans la compréhension des modifications tissulaires qui interviennent au niveau du cerveau et qui seraient à l'origine de la mise en place de l'épilepsie. En revanche, de nombreux facteurs doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats : 1) les tissus collectés ne sont pas représentatifs de l'ensemble des patients épileptiques puisqu'ils proviennent uniquement de chirurgie de l'épilepsie (3 à 8% des patients épileptiques) ou de prélèvements *post-mortem* (1 patient sur 1000), 2) la variabilité importante du profil génétique entre les patients, 3) la difficulté de dissocier la perte neuronale liée aux crises épileptiques de celle provenant de l'agression cérébrale initiale à l'origine de la mise en place de l'épilepsie, 4) les effets des différents traitements médicaux qu'ont reçu les patients, avant de subir une chirurgie, sur la dégénérescence neuronale, 5) la variation du nombre, de la nature et de la durée des crises qu'ont subit les patients avant le prélèvement du tissu cérébral. L'ensemble de ces observations montre que « s'il existe un grand nombre d'informations sur les épilepsies du lobe temporal » obtenu à partir d'études cliniques, réalisées *post-mortem* sur les patients, mais aussi expérimentales, à l'aide de différents modèles animaux ; il existe finalement que « peu de connaissances concrètes du syndrome neurologique en lui même » [242].

II-3.2. La sclérose hippocampique

L'observation histologique des tissus prélevés chez des patients souffrant d'ELT a permis de mettre en évidence la présence systématique au niveau de l'hippocampe i) d'une dégénérescence neuronale toujours associée avec ii) une réactivité importante des cellules gliales. Ces deux phénomènes ont été regroupés sous le terme de « sclérose hippocampique ». De plus, une augmentation du nombre des cellules granulaires ou « neurogenèse » a été mise en évidence, à l'aide du marqueur PSA-NCAM, chez des patients épileptiques ayant une sclérose hippocampique de moyenne intensité [186]. En revanche, cette observation n'a jamais été confirmée avec le marqueur de prolifération cellulaire Ki67 [68].

II-3.2.1. La dégénérescence neuronale

L'analyse histologique de tissus cérébraux obtenus à la suite d'une chirurgie chez des patients atteints d'ELT pharmaco-résistantes a mis en évidence que la récurrence des crises est associée avec une dégénérescence massive des neurones de l'hippocampe [56,64]. La comparaison des mesures de densité neuronale entre des hippocampes de patients épileptiques, obtenus après chirurgie, et d'individus sains *post-mortem*, montre une diminution globale du nombre de neurone chez les patients épileptiques avec une perte dramatique au niveau des régions CA1 (~70%) et CA3 (~40%) de la corne d'Ammon [64]. Il a été observé dans ces deux régions, une activation des systèmes de mort par apoptose avec une augmentation de l'expression des protéines BCL-2, BAX et de la caspase 3 au niveau des neurones pyramidaux qui aboutie à une importante fragmentation de l'ADN, observée par marquage TUNEL [117] (comme décrit dans le chapitre III-3.1.). L'ensemble de ces résultats suggère que les ELT seraient étroitement liées à une dégénérescence massive des neurones de l'hippocampe par l'activation, dans les régions vulnérables, des voies de signalisation cellulaire impliquées dans l'apoptose.

II-3.2.2. La gliose réactionnelle

La prolifération de la glie est une des caractéristiques principales de la sclérose hippocampique chez l'homme. Pourtant, l'important intérêt apporté à la description et la compréhension de ce phénomène dans les modèles animaux (décrit dans le paragraphe IV-2.2.) contraste avec le peu d'études réalisées chez l'homme.

II-3.2.2.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules cérébrales de type « glial », présentant une morphologie caractéristique en « étoile ». Dans les conditions basales, ils assurent différentes fonctions indispensables au maintien de l'homéostasie du système nerveux central. En effet, les astrocytes interviennent dans le soutien des structures cérébrales en formant un réseau tridimensionnel compact par l'intermédiaire de leurs étroits contacts les uns avec les autres. De plus, ils interviennent dans la régulation de l'excitation nerveuse : i) en amont, par la transmission du lactate aux neurones qui est la molécule énergétique indispensable à ceux-ci pour assurer leurs fonctions dont la libération de glutamate dans la fente synaptique [169] et ii) en aval, par la capture du glutamate présent dans la fente synaptique du fait de leur étroit contact avec l'ensemble des synapses du système nerveux [149].

Chez des patients souffrant d'ELT, il a été montré au niveau des pièces réséquées d'hippocampe, une augmentation dramatique de la population astrocytaire dont la localisation est toujours corrélée avec les régions hippocampiques ayant subi une dégénérescence neuronale massive comme CA1, CA3 et le hile [56]. Cette réactivité astrocytaire est toujours accompagnée par une modification morphologique des astrocytes avec une augmentation de la taille de leur noyau et l'apparition de nombreux prolongements fins qui définissent un vaste réseau au niveau des régions lésées de l'hippocampe [56]. Il a été émise l'hypothèse que ce réseau formerait une « cicatrice astrocytaire » au niveau des régions lésées de l'hippocampe, où l'abondante libération de facteurs trophiques par les astrocytes favoriserait la modification du tissu cérébral sain en un tissu épileptique hyperexcitable [219]. Pourtant, il a été mis en évidence que, dans certaines conditions, les cytokines libérées par les astrocytes à la suite d'une ischémie cérébrale peuvent devenir bénéfiques pour le tissu en assurant la survie des neurones [252].

II-3.2.2.2. La microglie

Les cellules microgliales sont de petites cellules mobiles, de forme variable et au noyau allongé. Elles appartiennent au groupe cellulaire des macrophages et sont capables de phagocytose. Dans les conditions basales, elles sont largement présentes dans le tissu cérébral mais dans un état dit « résidentiel » sous une forme quiescente et non activée. En revanche, à la suite d'une agression du système nerveux central, elles deviennent « actives », prolifèrent rapidement et secrètent de nombreuses molécules dont des cytokines et des radicaux libres qui aggravent les lésions tissulaires [267].

Il a été mis en évidence l'existence d'une prolifération des cellules microgliales au niveau de l'hippocampe chez des patients atteints d'épilepsie [56], avec un nombre de cellules onze fois supérieur dans CA1 et trois fois supérieur dans CA3 par rapport à des témoins sains [10]. Les cellules microgliales qui sont activées au niveau du tissu épileptogène présentent une morphologie caractéristique avec une augmentation de leur volume cytoplasmique et de leurs prolongements [10].

II-4. Etiologies des épilepsies chez l'homme

Le développement d'une crise de type épileptique par un individu sain ainsi que la possible répétition de crises, définissant la mise en place du syndrome épileptique chez le patient, vont dépendre de l'intervention plus ou moins prépondérante i) des facteurs génétiques et ii) des facteurs environnementaux.

II-4.1. Les causes des épilepsies et leurs classifications

Le rôle d'une prédisposition génétique va se traduire par la survenue d'une crise en l'absence de lésion cérébrale décelable et qui apparaît évident lorsque plusieurs membres d'une famille présentent le même syndrome épileptique [86]. A l'opposé, certaines lésions cérébrales paraissent suffisantes, par leurs caractères topographiques et/ou histologiques, pour favoriser l'apparition de l'épilepsie chez un individu. Cependant, pour une même lésion, quelle que soit sa localisation cérébrale, les sujets présentant des antécédents d'épilepsie familiale, auront plus de risque de développer des crises. La part des facteurs acquis et des facteurs génétiques, de même que leurs interactions, restent tout de même difficiles à apprécier. L'étiologie de l'épilepsie est dite « multifactorielle », ce qui explique les nombreuses classifications qui existent pour mieux appréhender la part des différents facteurs dans la survenue de l'épilepsie [77].

On parle d'épilepsie « idiopathique » lorsque les crises surviennent chez des sujets sains, ne présentant aucune lésion cérébrale. L'apparition des crises s'explique par un seuil épileptogène anormalement abaissé dont l'origine génétique est le plus souvent supposée ou démontrée. Ces formes d'épilepsie sont souvent retrouvées chez l'enfant et leur fréquence

diminue à l'âge adulte. A l'opposé, les épilepsies qui surviennent à l'âge adulte sont généralement de type « symptomatique » dont l'origine est une atteinte cérébrale aiguë entraînant, dans un délai qui peut être d'une trentaine d'années, le développement de crises épileptiques récurrentes par le patient. Il convient cependant de rappeler qu'actuellement près de 40% des épilepsies qui apparaissent à l'âge adulte restent d'origine inconnue et sont appelées « cryptogénique ».

II-4.2. Les circonstances de survenue des épilepsies symptomatiques

Les nombreuses études sur les origines possibles des épilepsies chez l'homme ont mis en évidence que de nombreux types de traumatismes cérébraux augmentent les risques de développer une épilepsie. Il a été montré que ces atteintes cérébrales sont suivies d'une période de latence, d'une durée variable, avant l'apparition de crises récurrentes caractérisant la mise en place du syndrome épileptique chez les patients. Cette période de latence est appelée « épileptogénèse » et est activement étudiée dans de nombreux modèles animaux (voir paragraphe II-5.2.). On observe durant cette période de nombreuses modifications morphologiques et biochimiques au niveau du cerveau avec i) une dégénérescence neuronale massive, ii) une axogénèse importante, et iii) une neurogénèse exacerbée [210]. Chez l'homme, ce temps de latence à la suite de l'agression cérébrale pourrait être une « fenêtre de prévention » durant laquelle une intervention clinique sur des individus dits « à risque » pourrait être réalisée de façon à éviter ou limiter la mise en place du syndrome épileptique.

L'apparition de crise peut être en rapport direct avec un traumatisme crânien (4%), un accident cérébro-vasculaire (11%) ou une encéphalite (5-10%). Une crise isolée peut être aussi la manifestation inaugurale du syndrome épileptique (6%) ou la présence d'agents toxiques dans l'organisme comme l'alcool qui est l'un des principaux vecteurs épileptiques. Il ne faut pas, en outre, sous estimer le rôle joué par d'autres molécules et certains médicaments comme les anti-dépresseurs tricycliques, certains neuroleptiques, ou des cytotoxiques dont la consommation peut être associée à la survenue de crises épileptiques. Enfin, la principale cause d'apparition de crises récurrentes chez les patients épileptiques est la survenue d'un épisode d'état de mal cérébral appelé « *status epilepticus* », qui est à l'origine de 40% des épilepsies diagnostiquées [121].

II-5. Le status epilepticus

Une crise épileptique peut être variable dans sa durée. Certaines absences ou crises partielles isolées peuvent pratiquement passer inaperçues, leurs durées n'excédant pas quelques secondes, sachant que généralement les crises les plus longues dépassent rarement quelques minutes. En revanche, on parle de *status epilepticus* (SE) lorsqu'une crise épileptique se prolonge ou se répète dans un intervalle bref sur une durée supérieure à trente minutes.

Le SE est état de mal cérébral convulsif représentant une condition épileptique grave. Il nécessite une prise en charge thérapeutique immédiate. Il se définit par la survenue, sur une période supérieure à trente minutes, de nombreuses crises généralisées tonico-cloniques ou d'une crise anormalement prolongée. Chez le patient, il est observé une absence de reprise de la conscience entre les crises ainsi qu'une aggravation des constantes physiologiques (tachycardie, hypotension, troubles respiratoires). La dégradation des signes neuro-végétatifs s'accompagne d'une chute brutale de la consommation cérébrale en oxygène et en glucose survenant dans les vingt premières minutes après le début de l'état de mal [195]. Ce délai représente une « fenêtre thérapeutique » dans laquelle il est impératif d'intervenir pour éviter l'apparition de lésions cérébrales graves. Cet état d'urgence neurologique est le plus souvent pris en charge cliniquement par la prescription de benzodiazépines associées à un anti-épileptique avec une demie-vie longue mais certains états de mal peuvent s'avérer très résistants à ces thérapeutiques et nécessitent alors une anesthésie générale du patient.

II-5.1. Complications médicales à la suite d'un status epilepticus

Le survenue d'un épisode de SE augmente dramatiquement le risque de mort subite du patient, principalement chez l'adulte, avec un taux de mortalité variant entre 15% et 22% [69,115]. Ce taux de mortalité élevé est directement lié aux causes de l'apparition du SE, avec 60 à 70% des décès qui sont associés à des phénomènes d'anoxie ou d'hypoxie [259]. La durée de la période de crise est un facteur déterminant dans l'évaluation du risque de mortalité à la suite du SE. En effet, il a été montré qu'une période de SE excédant les soixante minutes diminue dramatiquement les chances de survie des patients [259]. En revanche, si cette période ne dépasse pas les vingt neuf minutes, le taux de mortalité chute à 4,4% [167].

L'ensemble de ces résultats suggère l'existence de mécanismes physiologiques de « résistances » aux crises épileptiques qui seraient activés dès les premières minutes du SE mais dont l'action ne serait pas maintenue ou suffisante au cours du temps, réduisant dramatiquement les chances de survie du patient.

Chez les patients ayant survécu au SE, il a été montré que le risque de développer une épilepsie est augmenté. En effet, 40% des patients ayant subi un SE ont développé une épilepsie dans les années qui ont suivies [121]. La relation entre le SE et la mise en place d'une épilepsie chez les patients a été confirmée par des évidences anatomiques, radiologiques et biochimiques. Le SE serait responsable d'une mort neuronale massive au sein du système nerveux central avec un profil de dégénérescence qui serait identique à celui observé chez les patients atteints d'ELT (décrit dans le paragraphe II-3.2.1.). Les autopsies réalisées sur des hippocampes de patients décédés au moins 7 jours après avoir subi un SE ont mis en évidence une réduction importante de la densité neuronale mesurée dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe par rapport à des patients contrôles sains ou décédés à la suite d'une ischémie cérébrale [67]. En accord avec ces résultats, des données d'imagerie montrent une importante sclérose hippocampique évoluant au cours du temps chez des patients ayant survécu à un SE [277]. Enfin, il a été mesuré au niveau du fluide cérébro-spinal des patients, immédiatement après un épisode de SE, un taux élevé d'énolase [66], un marqueur de la souffrance neuronale dont l'augmentation est classiquement observée chez les patients épileptiques [210].

II-5.2. Les modèles animaux du status epilepticus

Les résultats provenant des études étiologiques et des observations cliniques ont mis en évidence un rôle potentiel du SE dans la mise en place de l'épilepsie chez les patients. Afin d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont activés à la suite d'un SE ainsi que les modifications du tissu hippocampique favorisant l'apparition des crises récurrentes, des modèles animaux ont été développés.

L'ensemble des modèles animaux dit « d'épilepsie chronique » est caractérisé par la présence systématique : i) d'une période de SE dite « aiguë », induite soit par voie pharmacologique soit par stimulation électrique, ii) d'une phase de latence plus ou moins longue appelée « épileptogénèse » qui aboutit iii) à l'apparition de crises spontanées dites

« chroniques ». Ces similitudes suggèrent que le SE induirait l'activation de mécanismes épileptogènes aboutissant à la mise en place de l'épilepsie chez les animaux.

II-5.2.1. Les modèles d'induction pharmacologique de l'état de mal cérébral

II-5.2.1.1. Le modèle pilocarpine

L'implication du système cholinergique dans l'épilepsie a été suggérée au début du siècle dernier [150] et a été confirmée plus tard à la suite de l'injection de pilocarpine, un agoniste des récepteurs muscariniques, qui provoque l'apparition d'un SE chez l'animal [261]. Le modèle d'induction du SE par l'administration de pilocarpine représente aujourd'hui un des trois grands modèles animaux d'étude de l'épilepsie [40].

L'émergence d'une épilepsie chez l'animal à la suite de l'administration de la pilocarpine est aussi bien un modèle de SE, caractérisé par l'apparition de crise à la suite de l'injection, qu'un modèle d'étude des crises épileptiques spontanées qui apparaissent chez l'animal environ quinze jours après l'arrêt du SE. L'apparition de crises spontanées chez l'animal est un bon critère de caractérisation d'un état épileptique puisqu'il correspond à ce que l'on observe chez les patients atteints d'ELT qui développent spontanément des crises épileptiques récurrentes à la suite d'un état convulsif prolongé [39]. La description des modifications pathologiques qui surviennent à la suite du SE induit par la pilocarpine, durant la période d'épileptogénèse, permet de mieux comprendre les processus de mise en place de l'épilepsie.

L'administration de pilocarpine ou de lithium-pilocarpine chez les rongeurs induit une activité épileptique au niveau de l'hippocampe et du cortex qui est associée à des altérations comportementales comme l'ataxie ou le développement de clonies des membres inférieurs et supérieurs qui aboutissent au SE [216]. A la suite de la période de SE, les animaux, durant la période aiguë, sont dans un état comateux associé à une importante activité de décharge des neurones présents dans l'hippocampe et le cortex. Durant cette période, il a été observé une augmentation de l'utilisation de glucose dans différentes régions cérébrales dont l'hippocampe où l'activation métabolique, suite au SE, est toujours étroitement associée avec une importante dégénérescence neuronale. Malgré le fait que l'on observe une perte neuronale à la suite des crises induites par l'administration de pilocarpine ou de lithium-pilocarpine, le système cholinergique n'est pas considéré comme potentiellement excitotoxique mais servirait à l'apparition et au maintien de l'activité épileptique au niveau cérébral [40].

Les animaux qui survivent à la période aiguë, présentent une phase de latence sans crise, où de nombreuses modifications morphologiques au niveau de l'hippocampe ont été observées dont une dégénérescence massive des neurones de l'hippocampe (comme décrit dans le paragraphe III-1) avec un profil identique à celui observé chez l'homme. Cette période est appelée épiléptogénèse et se termine par l'apparition des crises spontanées entre une et huit semaines après l'arrêt du SE. La récurrence des crises, durant la période chronique, peut varier de plusieurs par jour à une seule par mois en fonction du protocole d'injection qui a été utilisé [40].

II-5.2.1.2. Les autres modèles d'induction pharmacologique de l'état de mal cérébral

Brièvement, il existe deux autres modèles d'induction du SE par voie pharmacologique grandement étudiés où la pilocarpine est substituée soit par de l'acide kaïnique [13], soit par du pentylènetétrazol (PTZ) [262]. Ces modèles présentent de nombreuses similarités avec le modèle pilocarpine dont les trois périodes : i) aiguë du SE, ii) épiléptogénèse, durant laquelle sont observées de nombreuses modifications morphologiques au niveau de l'hippocampe, et iii) chronique, avec l'apparition des crises récurrentes. En revanche, il a été mis en évidence, à la suite du SE, une perte neuronale au niveau de l'hippocampe dont l'intensité est plus modérée que dans le modèle pilocarpine mais dont la localisation est identique à celle observée chez les patients atteints d'ELT (comme décrit dans le chapitre III-1).

II-5.2.2. Modèle d'état de mal cérébral induit par stimulation électrique

Le principale désavantage des modèles animaux de SE induit par voie pharmacologique est la difficulté de contrôler l'intensité du SE entraînant la mort d'une partie des animaux durant cette période et une grande variabilité dans l'étendue des dommages cérébraux visibles chez les animaux ayant survécu ainsi que l'incapacité de prédire l'expression des crises récurrentes [260].

Le rôle de la stimulation électrique dans l'induction d'un SE a été énoncé pour la première fois par Vicedomini et ses collaborateurs (1987). Il a mis en évidence que des stimulations intermittentes de n'importe quelles voies excitatrices entraînaient l'apparition d'un SE chez les animaux. De plus, l'application répétée de plusieurs décharges de hautes fréquences au niveau de la voie perforante, la principale voie d'entrée de l'hippocampe au

niveau des neurones granulaires du GD (comme décrit dans le paragraphe I-1.), entraîne le développement d'une activité épileptique spontanée importante chez les animaux stimulés, caractérisée par l'apparition de nombreuses crises durant une période de plusieurs heures [181]. A partir de ces observations, Sloviter a développé un élégant modèle où la stimulation de la voie perforante chez des animaux anesthésiés provoque des lésions spécifiques et reproductibles au niveau de l'hippocampe (comme décrit dans le paragraphe III-1), démontrant qu'une activité synaptique excessive est suffisante pour entraîner une mort neuronale [240,243].

III. La dégénérescence sélective des neurones de l'hippocampe à la suite du status epilepticus

III-1. Le profil de dégénérescence neuronale à la suite du status epilepticus dans les modèles animaux

De nombreuses perturbations physiologiques peuvent expliquer la rupture de l'équilibre de la balance excitation/inhibition en faveur d'une hyperexcitabilité neuronale observée au cours de l'épilepsie, comme :

➤ L'altération des fonctions du récepteur au GABA hippocampique, appelé GABA_A, à la suite du SE [25]. En effet, les sous-unités qui composent le récepteur GABA_A varient en fonction de la localisation hippocampique du récepteur et des conditions environnementales. Il a été montré chez l'homme [126] et l'animal [101] que sa composition en sous-unités est modifiée à la suite d'un SE et serait responsable des variations de sensibilité au GABA observées dans les différentes régions de l'hippocampe avec une augmentation au niveau des cellules granulaires du GD [101] et une diminution au niveau des neurones pyramidaux de la région CA1 [101].

➤ Le GABA, principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central, deviendrait excitateur à la suite du SE [52]. En effet, il a été observé une activité excitatrice du GABA sur des tranches d'hippocampe provenant de patients épileptiques [52]. Ces résultats sont en accord avec les observations réalisées durant le développement cérébral, où le GABA contrôle l'accumulation d'ion chlorure (Cl⁻) au niveau des neurones provoquant leur

dépolarisation et leur excitation [12]. L'ensemble de ces résultats a suggéré à Ben-Ari et ses collaborateurs (2002) que l'épileptogénèse ne serait qu'une récapitulation de la période d'ontogénèse.

➤ Les interneurons de type GABAergiques qui contrôlent les niveaux d'excitation de l'hippocampe, dégénèreraient sélectivement à la suite du SE [54]. Pourtant, les démonstrations les plus convaincantes de la perte neuronale proviennent des modèles animaux d'induction d'un SE qui ont montrés de manière indéniable que les neurones les plus vulnérables à un SE sont les neurones excitateurs de l'hippocampe [195]). En effet, il est classiquement accepté que l'une des régions cérébrales les plus vulnérables à une période de SE est l'hippocampe, dont les neurones pyramidaux des régions CA1 et CA3 ainsi que les cellules moussues du hile dégènèrent massivement à la suite d'un SE, alors que les neurones granulaires du GD et les interneurons inhibiteurs du hile sont résistants.

III-1.1. Dans les modèles d'induction pharmacologique du status epilepticus

A la suite d'une période de SE, malgré une variabilité de l'intensité de la perte neuronale mesurée dans les différentes études qui ont été réalisées, certaines structures cérébrales comme l'hippocampe, présentent constamment une dégénérescence neuronale. L'évaluation de la perte neuronale peut être réalisée par de nombreuses techniques qui permettent la caractérisation biochimique ou structurale des cellules en dégénérescence et ainsi différencier les cellules mourant par apoptose ou nécrose au sein du tissu cérébral. A la suite de l'administration de pilocarpine, la dégénérescence neuronale a été décrite en fonction de sa nature apoptotique ou nécrotique [95]. Il est important de remarquer que Sloviter a récemment exprimé l'idée qu'une classification de la dégénérescence neuronale ne prenant en compte que ces deux catégories était confuse et ne refléterait pas la réalité [239], certains neurones en dégénérescence exprimant en même temps aussi bien les caractères nécrotiques qu'apoptotiques [95]. Il a émis l'hypothèse selon laquelle l'agression excitotoxique induite par le SE au niveau du cerveau entraînerait une dégénérescence neuronale immédiate au niveau de la zone lésée qui pourrait être d'origine nécrotique puis la perte neuronale s'étendrait progressivement vers les régions périphériques en provoquant la mort par apoptose des neurones voisins.

L'étude la plus complète sur le profil de dégénérescence cérébrale à la suite d'une période de SE induit par l'administration de pilocarpine a été réalisée par Peredery et collaborateurs (2000). Il a mis en évidence que la perte neuronale est dispersée dans l'ensemble du système nerveux central mais que les régions les plus sensibles sont l'hippocampe, le cortex piriforme et le thalamus. De plus, la comparaison de la localisation et de l'intensité de la perte neuronale après l'administration de pilocarpine ou d'acide kaïnique a montré que les dommages cérébraux sont, dans les deux modèles animaux, localisés au niveau de l'hippocampe, du cortex, de l'amygdale et de l'hypothalamus [55]. En revanche, la perte neuronale présente une intensité plus importante chez les rats traités à la pilocarpine par rapport à ceux ayant reçu une injection d'acide kaïnique [55]. L'observation de la dégénérescence neuronale au cours du temps par imagerie cérébrale, qui permet de suivre le déroulement temporel des dommages neuronaux sans sacrifice de l'animal, a été réalisée dès l'administration de la pilocarpine jusqu'à l'apparition des crises récurrentes spontanées [222]. Les résultats obtenus ont confirmé qu'il existe une perte neuronale importante au niveau de l'amygdale, du cortex piriforme et du cortex entorhinal mais surtout ils ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la sclérose hippocampique et le développement des crises récurrentes chez les animaux. En revanche, il est encore impossible de savoir si c'est la sclérose hippocampique qui cause l'apparition des crises ou si ce sont les crises qui entraînent la sclérose hippocampique.

III-1.2. Dans le modèle de status epilepticus induit par stimulation électrique de la voie perforante

Sloviter (1987) a mis en évidence qu'un SE focal est obtenu chez des rats anesthésiés par une stimulation électrique continue, durant 24 heures, de la voie perforante [240]. A la différence des modèles de stimulation électrique classique de la voie perforante [181], aucune crise comportementale n'est observée durant la période de SE et la dégénérescence neuronale est restreinte aux populations cellulaires du hile au niveau ipsilatéral et des neurones pyramidaux de la corne d'Ammon au niveau ipsi- et contra-latéral. En revanche, aucune autre région cérébrale ne présente de lésions par rapport aux modèles pharmacologiques. Ce modèle est particulièrement intéressant pour la caractérisation des propriétés physiologiques des circuits inhibiteurs et excitateurs présents au niveau du GD et leurs implications dans la mise en place de l'épilepsie [245,288] (comme décrit dans le chapitre III-1.3).

III-1.3. La dégénérescence de neurones de l'hippocampe

L'étude de la dégénérescence des neurones de l'hippocampe à la suite du SE a mis en évidence que les différentes couches hippocampiques ne présentaient pas la même vulnérabilité, la perte neuronale étant spécifique i) de certaines aires hippocampiques et ii) de certains types cellulaires.

III-1.3.1. Les neurones pyramidaux de la corne d'Ammon

Il a été montré que les neurones pyramidaux en culture présentaient une grande vulnérabilité face à l'excitotoxicité glutamatergique [196]. Cette observation a été confirmée, *in vivo*, par de récents résultats montrant qu'à la suite d'un SE, induit par voie pharmacologique ou électrique, il est constamment observé une perte des neurones des régions CA1 et CA3 de la corne d'Ammon [40,76,181]. En revanche, l'intensité de la dégénérescence neuronale mesurée à la suite du SE varie en fonction de nombreux paramètres: 1) la dose de l'agent convulsivant injecté, comme l'a démontré Turski (1983) lors de sa caractérisation du modèle pilocarpine ; 2) la durée du SE, aucune perte neuronale n'étant observée à la suite d'un SE d'une durée inférieure à 30 minutes [18] ou 60 minutes chez le rat [94] ; 3) l'espèce et l'âge des animaux utilisés, certaines souches de souris ne présentant jamais de dommages neuronaux à la suite de l'administration d'acide kaïnique [230]. Ces résultats ont aussi été confirmés chez le rat, où la souche Long-Evans présente une dégénérescence neuronale plus importante dans les régions CA1 et CA3 que la souche Wistar à la suite d'un SE [122]. L'ensemble de ces résultats suggère l'existence d'un mécanisme de protection endogène intrinsèque au tissu hippocampique dont l'efficacité varie en fonction des caractéristiques génétiques des animaux étudiés.

III-1.3.2. Les neurones du hile

III-1.3.2.1. Les interneurones

Comme nous l'avons précédemment décrit (chapitre I-2.2.), les interneurones du hile jouent un rôle essentiel dans la régulation des circuits locaux d'excitation de l'hippocampe par l'intermédiaire de la libération du neurotransmetteur inhibiteur GABA. Ils composent une famille neuronale très hétérogène dont les membres ont été caractérisés par leur expression spécifique de différents neuropeptides [91].

Le devenir des neurones GABAergiques de l'hippocampe à la suite d'un SE est caractérisé par une vulnérabilité sélective de certaines populations d'interneurones [195]. En effet, il a été mis en évidence chez le rongeur à la suite d'un SE induit par l'administration d'acide kaïnique [28,29,170] ou de pilocarpine [74] ou par stimulation de la voie perforante [240,243] que les interneurones exprimant la somatostatine faisaient partis des populations cellulaires les plus vulnérables de l'hippocampe. La dégénérescence des interneurones exprimant la somatostatine représenterait 83% de la perte total des neurones GABAergiques au niveau du hile [29] et environ 50% de la perte des interneurones localisés au niveau de la *stratum oriens* de CA1 [74]. En revanche, la perte de marquage immunohistochimique observée pour différents marqueurs comme le neuropeptide Y, la calrétinine, la cholécystokinine ou la parvalbumine a été rapportée comme étant une diminution de l'expression des neuropeptides par les interneurones mais n'a jamais été associée à une dégénérescence cellulaire spécifique d'une population des neurones GABAergiques [63].

III-1.3.2.2. Les cellules moussues

Les cellules moussues du hile sont des neurones excitateurs de type glutamatergique, connus pour être les cellules les plus vulnérables de l'hippocampe, grâce à l'identification de marqueurs des cellules moussues avec : i) chez l'homme, le singe et le rat, les récepteurs au glutamate GluR2 et GluR3 [62,154], ii) chez le rat, la CGRP (pour « calcitonin gene-related peptide ») [92], iii) chez la souris et la gerbille, la calrétinine [20,146,164]. En effet, l'utilisation de ces marqueurs spécifiques, même si ils ne sont pas parfaits, a permis d'observer directement la dégénérescence des cellules moussues à la suite d'une agression cérébrale et de démontrer, aussi bien chez l'homme que l'animal, qu'elles meurent massivement à la suite d'une ischémie, d'un traumatisme crânien ou d'un SE [217].

Il a été mis en évidence, par immunohistochimie de la protéine GluR2/3, une dégénérescence massive des cellules moussues du hile à la suite du SE induit par l'administration d'acide kaïnique [170] ou par stimulation de la voie perforante [243,245]. En revanche, dans le modèle pilocarpine, les résultats sont contradictoires. En effet, Scharfman et ses collaborateurs (2001) ont mis en évidence au niveau du hile, par marquage immunohistochimique spécifique des neurones à la neurobiotine accompagné d'une caractérisation morphologique et électrophysiologique, une dégénérescence des cellules moussues à 1 et 6 mois après l'arrêt du SE. Pourtant, il a été montré que le nombre de cellules du hile immunopositives pour le CGRP, un marqueur spécifique des cellules moussues, ne

varie pas 1 mois après l'arrêt du SE par rapport aux rats témoins, suggérant que les cellules moussues seraient résistantes au traitement à la pilocarpine [165].

Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces résultats démontre que le réseau de contrôle excitateur assuré par les cellules moussues est altéré à la suite du SE. Actuellement, l'implication de cette altération dans la mise en place de l'épilepsie reste encore inconnue mais certaines observations anatomiques ont permis l'émergence de trois hypothèses complémentaires mettant en avant le rôle central de la perte des cellules moussues dans l'hyperexcitabilité hippocampique (Figure B2) :

➤ *La perte des cellules moussues est à l'origine de la formation de collatérales aberrantes (« sprouting ») des fibres moussues.* Cette hypothèse part de la constatation anatomique que les fibres moussues, qui sont les axones des neurones granulaires du GD (comme décrit dans le paragraphe I-1.), innervent massivement les cellules moussues du hile. Il a donc été suggéré qu'à la suite du SE, la perte des cellules cibles (cellules moussues) des fibres moussues serait responsable de la formation, par celles-ci, de collatérales aberrantes excitatrices qui viendraient contacter les dendrites des cellules granulaires entraînant leur hyperexcitabilité. On peut remarquer que le « sprouting » est l'une des caractéristiques morphologiques classiquement observée au niveau des hippocampes de patients épileptiques ou de modèles animaux [123,179].

➤ *La perte des cellules moussues est à l'origine de la mise en « sommeil » des cellules en paniers du hile.* Cette hypothèse a été développée par Sloviter (2003) en partant de la constatation anatomique que la dégénérescence des cellules moussues à la suite du SE entraîne la disparition de leurs connections excitatrices avec les cellules en paniers du hile, qui sont des interneurons de type GABAergique. Il a donc été suggéré que cette perte serait à l'origine de la mise en hypoactivité ou « sommeil » des cellules en paniers, qui ne pourraient plus assurer le contrôle négatif de l'activation des neurones granulaires, qu'elles exercent dans les conditions basales, favorisant ainsi l'hyperexcitabilité des cellules granulaires.

➤ *Les cellules moussues qui survivent au SE sont plus actives ou « irritables » que dans les conditions basales.* Cette hypothèse se distingue des deux précédentes en s'intéressant non pas aux cellules moussues qui meurent mais à celles qui survivent. En effet, Scharfman et ses collaborateurs (2001) ont mis en évidence la survie d'une infime partie de la population des cellules moussues du hile à la suite du SE dont l'activité électrique est exacerbée. Il a donc été

suggéré que ces cellules moussues survivantes et hyperactives favoriseraient l'hyperexcitabilité des neurones granulaires qu'elles contactent, une cellule moussue contactant les dendrites de plusieurs neurones granulaires.

III-2. L'inflammation cérébrale à la suite d'un status epilepticus : une des origines potentielles de la dégénérescence neuronale

Comme nous venons de le décrire dans le paragraphe précédent, l'architecture cérébrale est profondément modifiée à la suite du SE. Une des conséquences les plus précoces à la suite d'une période de SE est l'apparition d'une dégénérescence neuronale sélective au niveau de certaines couches cellulaires spécifiques de l'hippocampe, suivi quelques jours plus tard par une étape d'activation et de prolifération des cellules astrocytaires et microgliales résidentes du tissu cérébral appelée gliose réactionnelle [128]. La mort massive des neurones de l'hippocampe aurait pour origine l'inflammation dont l'intensité est terriblement exacerbée au niveau du tissu cérébral à la suite du SE entraînée par la libération de nombreuses cytokines dites « pro-inflammatoires » par les cellules microgliales [267].

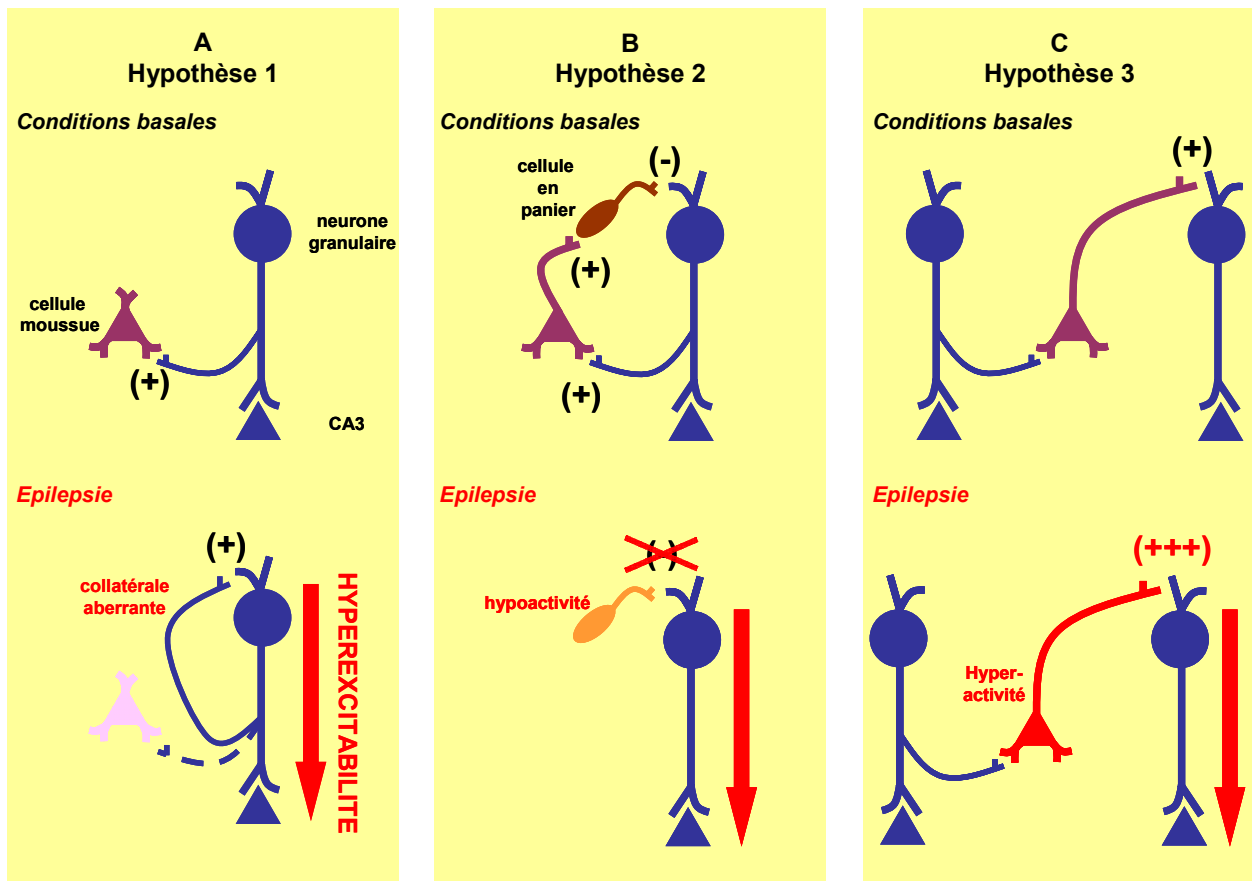


Figure B2. Implications des cellules moussues dans l'hyperexcitabilité des neurones granulaires à la suite du status epilepticus. A, Hypothèse 1 : la perte des cellules moussues à la suite du SE serait à l'origine de la formation de collatérales aberrantes par les neurones granulaires qui favoriseraient ainsi leur hyperexcitabilité?. B, Hypothèse 2 : La perte des cellules moussues à la suite du SE entraînerait la disparition de la boucle de rétrocontrôle négative de l'activité des neurones granulaires, favorisant ainsi leur hyperexcitabilité ? C, Hypothèse 3 : Les cellules moussues qui survivent à la suite du SE seraient hyperactives et viendraient hyperexciter les neurones granulaires qu'ils contactent dans les différentes couches adjacentes de la couche granulaire du GD ?

III-2.1. L'inflammation cérébrale à la suite d'un status epilepticus

Le système immunitaire et la réponse inflammatoire qui lui est étroitement associée jouent un rôle majeur dans les mécanismes de protection et de réparation tissulaire lors d'une agression infectieuse ou pathogène de l'organisme. Au niveau du système nerveux central, la réponse inflammatoire nécessite obligatoirement la présence de différentes molécules appelées cytokines qui ne sont jamais ou très peu détectées dans les conditions basales au sein du tissu. Ces molécules sont libérées dans le tissu par des cellules du parenchyme cérébral tels que les astrocytes, les cellules microgliales mais aussi les neurones. De plus, la barrière hémato-encéphalique (BHE) joue un rôle crucial dans le contrôle de la réponse inflammatoire au niveau du système nerveux central. En effet, dans les conditions basales, la BHE assure la

protection du système nerveux central en régulant spécifiquement l'entrée, dans le tissu nerveux, des molécules et des cellules immunitaires présentes dans le milieu périphérique.

A la suite d'un SE, on observe des modifications physiologiques et structurales de la BHE [262,291]. En effet, la perte de l'intégrité de la BHE ainsi que la présence d'un état inflammatoire important au niveau cérébral sont deux éléments classiquement observés à la suite d'un SE [267]. En effet, l'abondante production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales de la BHE, les cellules immunitaires circulantes et les cellules gliales (microglie et astrocyte) du parenchyme cérébral entraîne l'activation de différents mécanismes cellulaires qui aboutirait à l'augmentation de la perméabilité de la BHE [166]. Chez le rat, dans les modèles d'acide kaïnique ou de lithium-pilocarpine, on observe l'apparition d'une importante réponse inflammatoire, dès les premières heures et durant les 3 jours suivant l'arrêt du SE, au niveau des régions cérébrales où est localisée l'activité épileptique et qui serait induite par les astrocytes et les cellules microgliales présentes dans ces régions [65,188,266,270].

III-2.2. Rôle de l'inflammation dans la gliose réactionnelle

Il a été observé, à la suite du SE, une forte réactivité de la population des cellules gliales composée des astrocytes et des cellules microgliales, dont le maximum est atteint à 3 jours post-SE. Cette prolifération cellulaire importante représente un des éléments majeurs, avec la dégénérescence neuronale, de la sclérose hippocampique observée aussi bien chez l'homme que dans les modèles animaux [10,180,182,202,219]. De nombreuses composantes de la réponse gliale sont impliquées dans la mise en place du tissu épileptique [267], l'une de ces composantes majeures est l'inflammation. Elle jouerait un rôle central dans i) l'activation et la coordination de la réponse gliale, ii) le contrôle de la propagation de la pathologie dans le tissu et iii) la mort neuronale grâce à la libération par les cellules gliales de molécules de signalisation : les cytokines pro-inflammatoires.

III-2.2.1. Inflammation et réactivité astrocytaire

A la suite du SE, il a été mis en évidence une perte précoce de la capacité des astrocytes à capturer le glutamate au niveau de la fente synaptique, suggérant qu'ils seraient impliqués dans l'induction des crises épileptiques en participant à l'augmentation de la concentration du glutamate dans le tissu cérébral et l'excitation neuronale [232]. En revanche,

il a été observé une réponse tardive des astrocytes au SE, caractérisée par une expression génique augmentée et une prolifération cellulaire exacerbée qui s'accompagne d'une modification morphologique. Cette réponse astrocytaire tardive serait induite par les cytokines pro-inflammatoires comme il a été montré sur des cultures de cellule du tissu cérébral où l'administration d'interleukine-1 (IL-1) favorise la prolifération des cellules astrocytaires [105].

Le rôle joué par la réactivité astrocytaire n'est actuellement pas encore clairement établi, pourtant il a été montré que i) les astrocytes présents dans la région CA3 de l'hippocampe empêcheraient le passage des axones des neurones granulaires sur les dendrites des neurones pyramidaux de CA3 entraînant la formation de connections neuronales aberrantes au niveau du hile [219] et ii) qu'elle favoriserait la mise en place d'une réponse inflammatoire importante par la libération massive de cytokines au niveau de l'ensemble du tissu hippocampique [128]. Les cytokines agiraient de manière autocrine sur les astrocytes les ayant produites pour stimuler leur prolifération et modifier leur morphologie [185] mais aussi de manière paracrine sur les neurones et les cellules microgliales voisines pour moduler leur physiologie [161].

III-2.2.2. Inflammation et réactivité microgliale

A la suite d'un SE, les cellules microgliales répondent aux crises épileptiques par une modification de leur morphologie, une augmentation de leur niveau d'expression génique et par une prolifération exacerbée [219]. Il a été montré en culture cellulaire que les cellules microgliales peuvent libérer des facteurs neurotoxiques dans certaines conditions [104] et que la nature des molécules qu'elles libèrent est contrôlée par les cytokines présentes dans le milieu environnant. En effet, chez des souris transgéniques qui n'expriment pas la cytokine du facteur de nécrose neuronale (TNF), la microglie ne réagit pas à la suite d'un SE [26]. L'ensemble de ces résultats suggère que la réponse neurotoxique de la microglie, en réponse au SE, serait induite par l'activation précoce des astrocytes et la libération par ceux-ci de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dans le milieu cérébral.

III-2.3. Les cytokines pro-inflammatoires

Les cytokines sont des molécules solubles faisant parties des principaux médiateurs de la communication cellulaire. Elles peuvent être synthétisées au sein du système nerveux central par les cellules gliales (astrocytes et microglie) et les neurones, et viennent agir de façon autocrine (sur la cellule productrice) ou paracrine (cellules proches) sur d'autres cellules pour en réguler l'activité et la fonction. A la suite du SE, de nombreuses cytokines sont produites et interviennent dans la mise en place de la réponse inflammatoire du tissu cérébral aux crises épileptiques [128].

III-2.3.1. Interleukine-1

Le nombre important de modèles d'agression cérébrale entraînant la mort neuronale dans lesquels la régulation de l'interleukine-1 (IL-1) a été étudiée et caractérisée [152], contraste avec le peu d'intérêt qui lui a été porté dans les modèles d'épilepsie.

A la suite de l'injection d'acide kaïnique chez le rat, on observe une augmentation immédiate de la transcription cérébrale de l'ARN messager codant pour l'IL-1 β (IL-1 β -ARNm), la forme biologique principale de l'IL-1, avec un pic d'expression à 1 heure et 30 minutes post-injection [188,189]. En revanche, l'augmentation de l'expression de l'ARN messager codant pour l'IL-1 β n'est pas observée aux mêmes moments dans l'ensemble des régions cérébrales. En effet, 1 heure après l'injection d'acide kaïnique, l'augmentation de l'IL-1 β -ARNm est détectée uniquement au niveau de l'hippocampe, alors que les niveaux d'expression maximum pour le cortex, le thalamus et de l'hypothalamus sont atteints 2 heures post-injection [188]. L'expression de IL-1 β -ARNm est revenue à son niveau basal 24 heures post-injection dans l'ensemble des régions cérébrales sauf pour l'hippocampe où le niveau d'expression basale n'est retrouvé que 72 heures post-injection [188]. En revanche, un profil d'expression du transcript codant pour l'IL-1 β identique a été observé chez le rat après l'administration de PTZ, mais avec un décours temporel plus rapide soit une induction précoce dès 30 minutes post-injection et un retour au niveau basal d'expression dès 3 heures post-injection dans l'ensemble des régions cérébrales étudiées [189]. L'ensemble de ces résultats démontre le rôle central de l'IL-1 β dans la réponse inflammatoire qui survient à la suite du SE, puisqu'une induction de son expression est toujours observée quelque soit le modèle de SE utilisé, mais avec un profil d'expression dépendant du modèle, suggérant une variation de la réponse inflammatoire en fonction des agents pharmacologiques administrés.

Il a été mis en évidence une induction précoce de l'expression de l'ARN messager codant pour l'IL-1 β , 2 heures après l'injection d'acide kaïnique chez le rat, qui est détectée dans de nombreuses cellules localisées dans l'ensemble des régions cérébrales et possédant une morphologie de type microgliale [280]. Ce résultat a été confirmé chez des rats ayant reçu une infusion intra-corticale de méthanoglutamate, où la protéine de IL-1 β a été détectée dans les cellules microgliales 24 heures post-infusion et au niveau des astrocytes à partir de 2 jours et jusqu'à 7 jours post-infusion [207]. Enfin, il a été montré que le blocage de l'activité biologique de l'IL-1 au niveau du tissu cérébral durant la période de SE protège les neurones hippocampiques contre la dégénérescence neuronale induite par l'injection d'acide kaïnique [204], suggérant l'implication directe de IL-1 dans la mort neuronale.

III-2.3.2. Interleukine-6

A la suite de l'administration d'acide kaïnique chez le rat, l'expression de l'ARNm codant pour l'interleukine-6 (IL-6) est augmentée (6 fois le niveau d'expression basale) au niveau de l'hippocampe dès 2 heures post-injection avec une augmentation progressive jusqu'à 4 heures post-injection (10 fois le niveau d'expression basale) [128,188]. Ces résultats ont été confirmés chez le rat et l'homme où une élévation de la concentration tissulaire a été mesurée à la suite d'un SE. Il a été mis en évidence, sur des tranches d'hippocampe provenant de rat ayant été traités avec de l'acide kaïnique, une activité biologique importante de la protéine IL-6 à 2 jours post-injection [61]. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques réalisées chez des patients épileptiques, où il a été mesuré, 15 heures après l'arrêt de la crise tonico-clonique, une augmentation transitoire de la concentration de l'IL-6 au niveau du fluide cérébro-spinal de 3 à 20 fois supérieure à un individu sain [208].

Le rôle biologique de l'IL-6 a été étudié chez des souris transgéniques sur-exprimant l'ARN messager codant pour l'IL-6 [36]. Il a été observé que ces animaux développaient spontanément des crises épileptiques associées à des phases comportementales de tremblements et d'ataxie. Ces observations comportementales ont été confirmées par la réalisation d'électro-encéphalogramme où il a été mesuré des décharges paroxysmiques ainsi qu'une disparition du rythme θ au niveau de l'hippocampe [250]. L'examen histologique des hippocampes a révélé, au niveau du hile, la présence de connexions nerveuses aberrantes et d'une dégénérescence importante des neurones du hile. De plus, une forte réactivité astrocytaire est observée dans l'ensemble des régions hippocampiques, couplée à une importante néovascularisation. Ces résultats suggèrent que l'IL-6 interviendrait dans

l'établissement du nouveau réseau neuronal observé durant la période d'épileptogenèse, responsable de l'apparition des crises épileptiques.

III-2.3.3. Facteur de nécrose tumoral α

De nombreux travaux ont étudié le rôle du facteur de nécrose tumoral α (TNF α) dans l'émergence de l'épilepsie et le développement des crises épileptiques, mais son action durant l'épileptogenèse reste encore ambiguë. En effet, l'autopsie de souris transgéniques, qui surexpriment le TNF α au niveau de leurs neurones, a révélé d'importantes anomalies du développement du à l'apparition d'une inflammation cérébrale entraînant une démyélinisation axonale qui aboutit à l'apparition de crises épileptiques [214]. Bien que ce résultat suggère une implication directe du TNF α dans la mort neuronale et la mise en place de l'épilepsie d'autres études montrent un rôle bénéfique du TNF α à la suite d'un SE induit par voie pharmacologique.

A la suite de l'administration d'acide kaïnique chez le rat, on observe une induction (2 heures et 4 heures post-injection) de l'ARN messenger codant pour le TNF α au niveau de l'hippocampe, du cortex, du *striatum*, du thalamus et de l'hypothalamus [188]. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris après une injection intra-hippocampique d'acide kaïnique [26]. De plus, il été mesuré, sur des tranches d'hippocampe provenant de rats ayant reçu une injection intra-amygdalienne d'acide kaïnique, une importante activité de la protéine TNF α à 2 jours et 7 jours après le SE [61]. Ces résultats ont été confirmés par immunohistochimie, avec une augmentation du nombre de cellules TNF α -positives, à 4 heures post-injection, au niveau des corps cellulaires des neurones pyramidaux des régions vulnérables CA1 et CA3. L'injection intra-hippocampique d'une dose convulsivante mais non cytotoxique d'acide kaïnique chez des souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur au TNF α , montre que les souris ayant développé un SE, présentent une dégénérescence exacerbée des neurones des régions CA1 et CA3 de l'hippocampe [26] et une absence de la réactivité des cellules microgliales [96]. L'ensemble de ces résultats suggère que le TNF α neuronal jouerait un rôle fondamental dans la protection des neurones pyramidaux de CA1 et CA3 contre le SE et serait indispensable à l'activation des cellules microgliales.

III-3. Les mécanismes de la dégénérescence neuronale

De nombreuses études, réalisées aussi bien chez l'homme que dans des modèles animaux, ont montré que la dégénérescence neuronale qui survient à la suite d'un SE va impliquer l'activation des mécanismes de « mort cellulaire programmée », appelée apoptose, mais aussi les mécanismes de mort nécrotique.

III-3.1. L'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire, jouant un rôle central au cours du développement et dans le fonctionnement des organismes multicellulaires [253]. Les analyses, réalisées par microscopie électronique, ont révélé que la mort cellulaire par apoptose implique de nombreuses modifications morphologiques dont la conservation de l'intégrité des organelles, la rupture de la membrane mitochondriale, la condensation de la chromatine et sa fragmentation finale en sont les événements les plus marquants [279]. Il a été mis en évidence, dans de récents travaux chez le rat, que l'apoptose est impliquée dans la mort neuronale à la suite d'un SE avec, comme caractéristique majeure, la fragmentation de l'ADN, mise en évidence par marquage TUNEL [212]. De plus, il a été mesuré que plus de 90% des neurones en dégénérescence présentaient cette caractéristique [118], démontrant que l'apoptose est le mécanisme majeur de la mort neuronale à la suite du SE même si ces neurones présentent rarement la morphologie apoptotique classique [93,117,119]. L'ensemble de ces résultats a été confirmé chez la souris [237].

III-3.1.1. Les mécanismes cellulaires de l'apoptose : Les caspases

Les caspases appartiennent à la famille des « protéases cystéine aspartate spécifique ». Actuellement, 14 caspases ont été identifiées, qui sont soit de type « inflammatoire » (caspases 1, 5 et 11), soit de type « régulatrice de l'apoptose » (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10) [257]. Les caspases présentent toutes une structure comprenant 4 domaines avec les sous-unités p20 et p10, un domaine de liaison des sous-unités possédant un résidu d'aspartate et un prodomaine de taille variable. Lors de l'activation des caspases, le prodomaine est toujours clivé pour donner la conformation active de la protéase qui est un tétramère (p20p10)₂. Chaque caspase présente une localisation cellulaire spécifique qui détermine sa fonction, avec

une localisation cytoplasmique pour les caspases 8 et 10 ou mitochondriale pour la caspase 9 [120].

Lors de la réception du signal de mort, on assiste à une activation des caspases en cascades. En effet, les caspases 2, 8 et 10, qui sont dites « initiatrices », sont recrutées grâce à leur « domaine effecteur de mort » (DED) par le « récepteur de mort » (DR). En revanche, la caspase 9 possède « un domaine de recrutement et d'activation des caspases » (CARD), assurant son recrutement et son activation par le facteur d'apoptose à activité protéasique-1 (APAF-1). A la suite de leur activation, les caspases initiatrices viennent activer, à leur tour, les caspases dites « exécutrices » qui clivent enfin de nombreuses protéines structurales ou fonctionnelles des cellules (Mashima et coll., 1997). En effet, à la suite du SE, il a été mis en évidence une activation de la caspase 8 [237], 40 minutes après l'induction des crises [118], qui pourrait être liée en partie à l'activation du récepteur de mort TNF- α (TNFR1) [118]. Le TNF- α fait partie de la voie dite « extrinsèque » de l'induction de l'apoptose, qui précède l'activation des caspases initiatrices, le dysfonctionnement de la mitochondrie et l'activation de la caspase 9 [118]. Il est important de remarquer que l'inhibition de l'activité de la caspase 8 à la suite du SE: 1) entraîne une augmentation de la survie neuronale, 2) réduit la libération de cytochrome c par la mitochondrie, et 3) réduit efficacement les activités des caspases exécutrices 9 et 3 [118]. En effet, il a été observé une activation de certaines caspases exécutrices à la suite du SE. En effet, l'expression génique et protéique des caspases 3 et 6 est fortement induite au niveau de l'hippocampe à la suite du SE [120], suggérant qu'elles joueraient un rôle central dans la transmission du signal de mort aux neurones hippocampiques à la suite du SE.

III-3.1.2 Les mécanismes cellulaires de l'apoptose : La famille des protéines Bcl-2

La famille Bcl-2 comprend plus de 20 membres qui contrôle soit positivement, soit négativement l'apoptose [53]. Les protéines de cette famille sont particulièrement petites (de 20 000 à 30 000 dalton) et sont caractérisées par la présence d'un ou plusieurs domaines homologues (BH) en hélice α , avec quatre domaines BH pour Bax et Bcl-2 alors que Bad n'en possède qu'un seul [53]. Enfin, on peut observer un domaine transmembranaire chez la moitié des protéines de la famille Bcl-2. Dans les conditions physiologiques, les protéines Bcl-2 de type pro-apoptotique comme Bax résident comme monomères au niveau du cytoplasme ou sont associées à la membrane externe de la mitochondrie. La présence de protéines de type BH3 entraîne leur fixation avec la protéine Bax qui favorise la perméabilisation de la

membrane mitochondriale et l'entrée en apoptose de la cellule [59]. De plus, les protéines BH3 inhibent l'activité des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2. A l'opposé, les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bcl-2 ou Bcl-xl, contrôlent négativement l'apoptose en inhibant l'activité des protéines pro-apoptotiques, assurent le maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale, contrôlent la mobilisation de calcium intra-cellulaire et présentent des propriétés anti-oxydantes [53]. Quoiqu'il en soit, les protéines pro- et anti-apoptotiques sont toutes associées aux fonctions du réticulum endoplasmique, qui joue un rôle important dans l'homéostasie calcique, dans le signal mitochondrial dépendant du calcium et dans le stress induisant l'apoptose [120].

Les protéines de la famille Bcl-2 sont impliquées dans la régulation de la mort cellulaire à la suite du SE. En effet, il a été rapporté une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax [5] accompagnée par l'altération de l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xl [120] à la suite de l'induction d'un SE. L'ensemble de ces résultats montre que l'équilibre entre les protéines pro- et anti-apoptotiques, observé à l'état basal, est rompu en faveur des protéines pro-apoptotiques à la suite du SE, favorisant ainsi la mort par apoptose massive des neurones de l'hippocampe.

III-3.2. La nécrose : notion de « pénombre » tissulaire

La nécrose est la forme principale de mort cellulaire lors d'accidents traumatiques, suite à certaines pathologies ou lors de déficits métaboliques. Elle présente des caractéristiques morphologiques spécifiques comme le gonflement de la matrice mitochondriale, une dilatation du réticulum endoplasmique, une chromatine uniformément compactée et une rupture de la membrane cytoplasmique. De plus, les cellules en nécrose lors de leur lyse finale provoque une inflammation locale du tissu [279].

Alors qu'il été clairement admis que la dégénérescence neuronale induite par un SE est uniquement d'origine apoptotique, Fujikawa et ses collaborateurs (1999 ; 2000) ont observé, entre 24 heures et 72 heures après l'administration de pilocarpine ou d'acide kaïnique chez le rat, l'apparition de petites cellules acidophiles dans de nombreuses régions cérébrales, dont le néocortex et l'hippocampe. Ces cellules acidophiles ont été caractérisées comme étant des cellules en nécrose, suggérant que la dégénérescence neuronale à la suite du SE pouvait être aussi bien de nature apoptotique que nécrotique. De plus, la caractérisation de

la nécrose et de l'apoptose à la suite du SE a mis en évidence, 24 heures post-SE, la présence unique de neurones présentant un profil nécrotique, suivi de l'apparition de neurones présentant simultanément des caractères nécrotiques et apoptotiques à 72 heures post-SE [93]. L'ensemble de ces observations permet d'émettre l'hypothèse suivante : à la suite d'un SE, les neurones localisés dans la zone cérébrale subissant l'agression excitotoxique, ou « pénombre », vont dégénérer immédiatement par nécrose, entraînant l'apparition d'une inflammation locale. Puis, la réactivité gliale va provoquer l'exacerbation de la réponse inflammatoire qui va progressivement envahir les régions cérébrales voisines et stimuler, grâce à la libération de différents facteurs de mort, la dégénérescence apoptotique des neurones de ces régions.

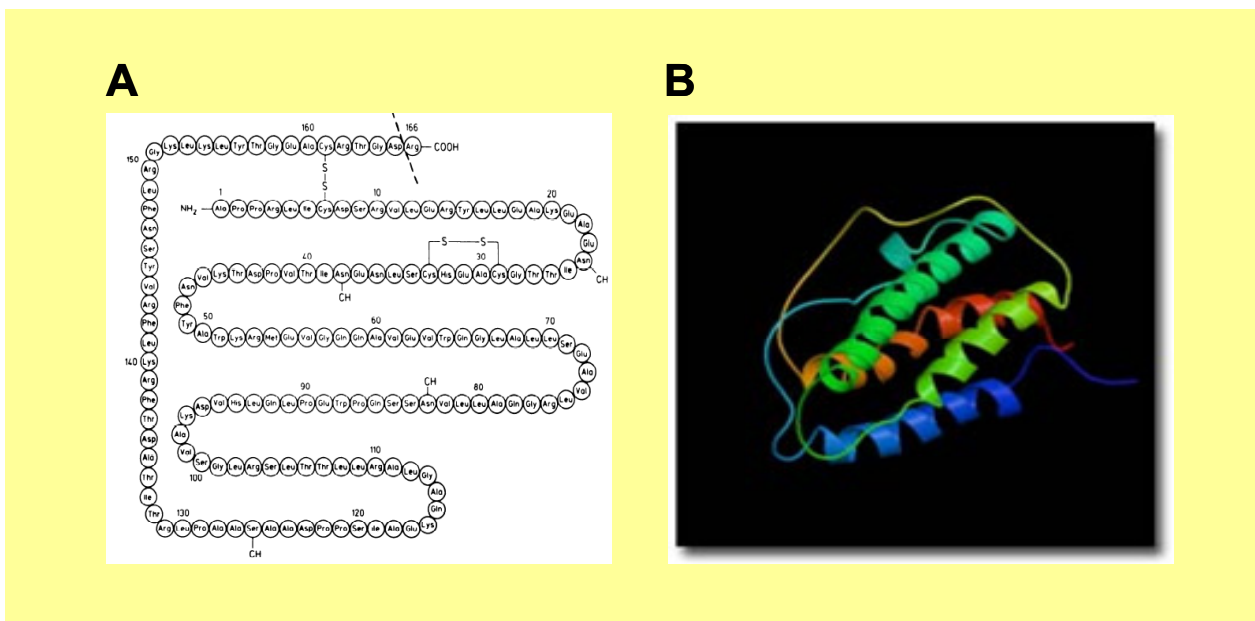
IV. L'érythropoïétine dans le système nerveux central

L'érythropoïétine (Epo) est une glycoprotéine impliquée dans la stimulation de la prolifération des érythrocytes en réponse à la diminution de la teneur en oxygène de l'environnement. Chez l'homme adulte, elle est produite par les cellules tubulaires rénales et par les hépatocytes chez le fœtus. La mise en évidence d'une production cérébrale de l'Epo ainsi que la présence de son récepteur (Epo-R) à la surface des neurones suggèrent que l'Epo pourrait agir au niveau du système nerveux central de façon autocrine et/ou paracrine, indépendamment du système Epo endocrine, l'Epo circulante traversant difficilement la BHE.

IV-1. Structure génique

Chez l'homme, le gène codant pour l'Epo a été localisé dans la région q11-q22 du chromosome 7 [151]. Il existe sous la forme d'une seule copie et se compose de cinq exons et quatre introns. Il code pour une seule chaîne polypeptidique de 193 acides aminés dont une séquence hydrophobe d'adressage de la protéine de 27 résidus qui est clivée pour donner la protéine mature [127] (Figure B3A). Le clonage du gène codant pour l'Epo dans d'autres espèces animales a montré une importante homologie de séquence indiquant la conservation de cette cytokine au cours de l'évolution. En effet, il a été montré que la séquence humaine du gène codant pour l'Epo présente une homologie de 92% avec le singe [129], de 80% avec la souris [129] et de 90% avec le rat [200].

Le degré élevé de la conservation des séquences entre les espèces ne se limite pas uniquement à la portion codante des acides aminés mais aussi au niveau des régions 5' et 3' qui encadrent le gène [129]. La présence de deux régions conservées en amont (5') et en aval (3') de la séquence codante du gène suggère qu'elles pourraient être impliquées dans la régulation de la transcription génique de l'Epo [124]. En effet, il a été mis en évidence, une séquence nucléotidique jouant un rôle clef dans l'activation de l'expression génique, appelée « élément de réponse à l'hypoxie » (HRE), à laquelle se lie spécifiquement le facteur de transcription HIF-1 (comme décrit dans le paragraphe IV-4.1.). De plus, d'autres molécules peuvent venir s'associer avec HIF-1 pour potentialiser l'expression génique de l'Epo, tels que les facteurs de transcription SP1, CBP/300, HNF-4 et Smad3/4. En outre, il existe aussi des séquences de régulation négative de l'expression de l'Epo qui seraient reconnues par les facteurs de transcriptions GATA-2 et NFκB [129] et qui seraient à l'origine de l'inhibition de l'expression cérébrale de l'Epo observée dans les maladies inflammatoires (comme décrit dans le paragraphe IV-4.2).



IV-2. Structure protéique

L'Epo est un membre de la famille des cytokines de classe I, caractérisée par une structure globulaire compacte composée de quatre hélices α [83] (Figure B3B). Elle a une masse moléculaire d'environ 30 400 daltons [129] mais migre à une taille qui varie entre 34 000 et 38 000 daltons sur un gel de polyacrylamide. Il a été mis en évidence une expression cérébrale de l'Epo, chez les rongeurs [71] et l'homme [138], dont la forme cérébrale est plus petite (30 300 daltons) mais plus active que la forme circulante de l'Epo, dissimilitude qui serait liée à des différences post-traductionnelles. Il est important de noter que l'Epo recombinante humaine (rHuEpo), qui est synthétisée à partir d'ovaires de hamster chinois génétiquement modifiés, présente la même structure primaire et secondaire que la molécule d'Epo humaine. En revanche, il existe une légère différence au niveau des glycanes qui leurs sont liés entraînant une différence de mobilité électrophorétique utilisée par les laboratoires dans les tests anti-dopages sur les urines des sportifs.

Le corps peptidique de la molécule se compose de 166 acides aminés indispensables à la fixation au récepteur et l'activation de ses fonctions. Sa portion carbohydratée, qui représente 40% de la molécule, est indispensable à la survie de l'hormone [75]. L'analyse de ses quatre chaînes carbohydratées a démontré que les trois complexes N-oligosaccharidiques liés aux résidus d'asparagine 24, 38 et 83 sont indispensables à la stabilisation de la molécule [130]. Le complexe O-oligosaccharidiques lié à la sérine 126 n'a pas encore de fonction connue. Cette observation a permis la mise au point de nouvelles molécules d'Epo dont la présence de complexe carbohydraté a été augmentée pour entraîner une présence plus longue de la molécule dans la circulation, comme la Darbepoietin α utilisée dans le traitement des anémies [130], ou totalement absente pour diminuer la demie-vie de la molécule en favorisant sa clairance par le foie, comme l'asialo-érythropoïétine (asialo-Epo) qui est étudiée dans le traitement des atteintes cérébrales [84,275] (comme décrit dans le paragraphe VI-3.2.).

IV-3. Expression de l'érythropoïétine au sein du système nerveux central

IV-3.1. Expression de l'érythropoïétine et son récepteur au cours du développement cérébral

Il a été montré que l'expression de l'Epo et son récepteur (Epo-R) varient significativement au cours du développement [31]. En effet, il a été mis en évidence, chez la souris, un fort niveau d'expression de l'Epo-R au niveau du cerveau embryonnaire, dont le niveau atteint celui observé chez la souris adulte au niveau de la moëlle osseuse. En revanche, les niveaux d'expression cérébrale de l'Epo et de l'Epo-R chutent brusquement après la naissance, puis diminuent progressivement au cours du développement et de la maturation cérébrale [31,81] avant de devenir presque indétectable chez l'adulte [16].

Juul et ses collaborateurs ont été les premiers à s'intéresser au rôle de l'Epo cérébrale durant le développement du système nerveux central chez l'homme et ont caractérisé la distribution de l'Epo et de l'Epo-R, de la cinquième semaine du développement embryonnaire jusqu'à l'âge adulte [135,138]. Dès la cinquième semaine du développement embryonnaire, il a été mis en évidence la présence précoce des ARN messagers codant pour l'Epo et l'Epo-R et leur protéine respective au niveau de la zone périventriculaire qui correspond à la zone germinale des neurones naissants. En revanche, à dix semaines post-conception, un marquage immunohistochimique de l'Epo très intense est observé au niveau des zones ventriculaires et subventriculaires alors que l'Epo-R est présent principalement dans la zone subventriculaire qui contient les cellules pluripotentes qui donneront naissance aux oligodendrocytes et aux astrocytes. Cette expression cellulaire spécifique se poursuit de la dixième semaine du développement cérébral embryonnaire jusqu'à la naissance avec une localisation neuronale pour l'Epo et astrocytaire pour l'Epo-R. En revanche, après la naissance et chez l'homme adulte, il existe une co-expression de l'Epo et son récepteur par les neurones et les astrocytes [135,137] avec un marquage neuronal très intense de l'Epo au niveau du cortex et de l'hippocampe [238].

L'ensemble de ces résultats montre que l'Epo et son récepteur sont exprimés durant le développement cérébral de la période embryonnaire jusqu'à l'âge adulte, suggérant que l'Epo jouerait un rôle central dans le contrôle du développement et de la maturation cérébrale.

IV-3.2. Expression cérébrale de l'érythropoïétine chez l'adulte

Il a été mis en évidence une expression de l'Epo par les cellules cérébrales en culture [176,178] (Tableau B1). Les résultats obtenus par RT-PCR, réalisée sur des cultures cellulaires de rat et de souris, montrent une expression de l'ARN messager codant pour l'Epo dans les neurones et les astrocytes, tant au niveau cortical qu'au niveau de l'hippocampe [15,16,81]. Les résultats obtenus par immunocytochimie ont révélé que l'ARN messager codant pour l'Epo est traduit en protéine par la population astrocytaire [16,178]. Au niveau du tissu cérébral, la présence de l'ARN messager codant pour l'Epo, détectée par RT-PCR, et celle de sa protéine correspondante, détectée par western blot, ont été confirmées *in situ* dans les astrocytes et les neurones chez la souris et le rat [16,81]. Chez l'humain et le rat, la présence d'Epo a été mise en évidence par immunohistochimie au niveau des neurones des régions corticales et hippocampiques [51,178].

	Epo		Epo-R		sources
	Types cellulaires	Espèces	Types cellulaires	Espèces	
<i>In vivo</i>	Neurones	Homme, Souris	Neurones	Homme, Rat	Bernaudin, 1999 Siren, 2001 Morishita, 1997
	Astrocytes	Souris			Bernaudin, 1999
			Cellules endothéliales	Rat	Yamaji, 1996
<i>In vitro</i>	Neurones	Souris	Neurones	Homme, Rat	Bernaudin, 2000 Morishita, 1997 Nagai, 2001
	Astrocytes	Homme, Rat, Souris	Astrocytes	Homme	Bernaudin, 2000 Nagai, 2001 Masuda, 1994 Masuda, 1997 Marti, 1996
			Microglies	Homme	Nagai, 2001
			Cellules endothéliales	Homme	Anagnostou, 1994

Tableau B1. Expression de l'érythropoïétine et de son récepteur par les cellules du système nerveux central.

IV-4. Mécanismes de régulation de l'expression de l'érythropoïétine

IV-4.1. Mécanismes d'induction de l'expression cérébrale de l'érythropoïétine

Différentes études expérimentales *in vitro*, sur des cultures de cellules nerveuses, et *in vivo*, dans différents modèles animaux, ainsi que des observations cliniques chez l'homme ont mis en évidence une réactivité tissulaire et cellulaire de l'expression de l'Epo en réponse aux variations des conditions environnementales aussi bien physiologiques que physiopathologiques, suggérant le rôle capital de l'Epo dans le maintien de l'homéostasie du système nerveux central.

IV-4.1.1. A la suite d'une hypoxie : mécanismes de régulation du facteur de transcription HIF-1

Le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle du cerveau est dépendant du glucose et d'un métabolisme oxydatif constant. En effet, la glycolyse anaérobie est incapable de produire assez d'énergie pour subvenir aux besoins énergétiques du cerveau. De ce fait, une diminution de la teneur en oxygène (hypoxie) ou une interruption du flux sanguin cérébral ont des répercussions dramatiques au niveau cérébral. Il est donc indispensable que le cerveau puisse répondre de manière rapide et efficace à une diminution de la teneur en oxygène. Cette réponse défensive de l'organisme est activée et coordonnée par un unique facteur de transcription qui est immédiatement induite par l'hypoxie : HIF-1 [234].

IV-4.1.1.1. Mécanisme de stabilisation de HIF-1

HIF-1 est un hétérodimère qui se compose de 2 sous-unités appelées HIF-1 α et HIF-1 β ou ARNT-1 (pour « aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator »). Chacune des sous-unités possède un domaine basique hélice-boucle-hélice (bHLH) et un domaine PER-ARNT-SIM (PAS) [273] indispensables au complexe protéique HIF-1 pour se dimériser et fixer l'ADN [234].

HIF-1 est classiquement décrit comme étant le facteur de transcription central dans la régulation de l'homéostasie de l'oxygénation tissulaire. Nous savons aujourd'hui qu'il contrôle l'expression d'une quarantaine de gènes possédant une séquence consensus appelée élément de réponse à l'hypoxie (HRE) et dont les protéines jouent un rôle crucial au cours du

développement et dans l'angiogenèse, l'érythropoïèse et la prolifération cellulaire [234]. En effet, il a été mis en évidence que HIF-1 permet la transcription de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans la compensation du déficit en oxygène tels que i) les enzymes et les protéines de transport qui favorisent le métabolisme glucidique, ii) l'Epo et la transferrine qui stimulent l'érythropoïèse et le métabolisme ferrique, iii) les facteurs de croissances de type insulinique (IGF) qui induisent la prolifération cellulaire et iv) le facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VEGF) et son récepteur qui sont directement impliqués dans l'angiogenèse [108].

L'activation de HIF-1 en fonction de la teneur en oxygène est régulée par la modification enzymatique oxygène-dépendante d'un de ses domaines appelé « domaine de dégradation oxygène dépendant » (ODD) (Huang et coll., 1998). Cette modification est liée à l'hydroxylation de la proline 564 par la HIF-prolyl-hydroxylase (HDH). La HDH appartient à la famille des prolyl-4-hydroxylases (PDH) qui sont des dioxygénases nécessitant comme co-substrat de l'oxygène et du 2-oxoglutarate. Celles-ci possèdent un atome de fer (Fe) lié par 2 histidines et un acide aspartique. La fixation de l'oxygène à cette structure requiert la présence de vitamine C assurant le maintien de l'ion Fe à l'état ferreux. La HDH transfère un atome d'oxygène sur la proline de HIF-1 α . Il a été montré que dans des conditions hypoxiques, il existe une diminution simultanée entre l'activité de la HDH et l'hydroxylation de proline 564 de HIF-1 α [27].

La mise en évidence d'une expression constitutive des sous-unités α et β dans l'organisme [276] a, durant longtemps, laissé penser que les mécanismes de régulation de l'activation de HIF-1 étaient uniquement liés à des modifications post-traductionnelles (Figure B4) :

➤ En normoxie (21% d'O₂), la protéine HIF-1 α est très instable. Elle est hydroxylée par la HDH sur sa proline 564, ce qui entraîne sa reconnaissance et sa fixation par la protéine de von Hippel-Lindau (pVHL). HIF-1 α est alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome cytoplasmique.

➤ En revanche, lors d'une hypoxie, HIF-1 α n'est pas hydroxylée et n'est donc pas reconnue par la pVHL. Elle se stabilise, migre dans le noyau et s'associe avec son partenaire

HIF-1 β , pour donner naissance au facteur de transcription actif : HIF-1. Une fois formé, on observe le recrutement par HIF-1 de différentes protéines accessoires, comme la p300/CBP, pour donner naissance à un complexe protéique qui va favoriser la fixation et l'activation de l'expression des gènes cibles possédant la séquence promotrice HRE, comme pour l'Epo [193].

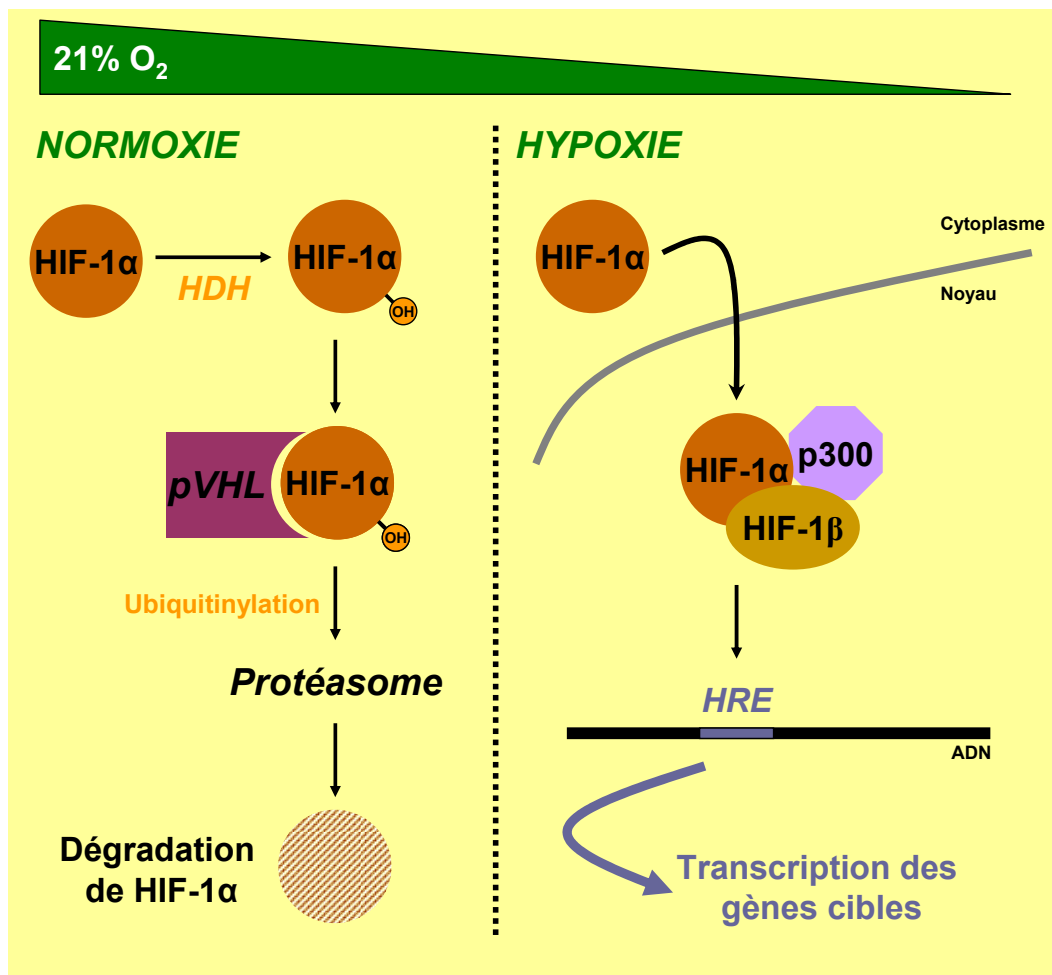


Figure B4. Mécanismes de régulation de HIF-1 α en normoxie et en hypoxie. En normoxie (21% d'O₂), la protéine HIF-1 α est très instable. Elle est hydroxylée par la HDH sur sa proline 564, ce qui entraîne sa reconnaissance et sa fixation par la pVHL. HIF-1 α est alors ubiquitinylé et dégradé par le protéasome cytoplasmique. En revanche, en hypoxie (<21% d'O₂), HIF-1 α se stabilise et migre dans le noyau. Il s'associe avec de nombreux partenaires, dont la sous-unité HIF-1 β , pour former le facteur de transcription HIF-1. Enfin, il fixe et active spécifiquement l'expression de ses gènes cibles au niveau de leurs séquences promotrices HRE.

La stabilisation de HIF-1 α en condition d'hypoxie, qui garantit l'activité de HIF-1, a été mise en évidence de manière indirecte dans plusieurs études. En effet, une exposition hypoxique aiguë ou une ischémie sévère entraîne une augmentation de l'expression cérébrale de HIF-1 α chez le rongeur [14,17]. L'induction de HIF-1 α devient maximale en quelques heures d'hypoxie, et elle se maintient quand le temps d'exposition s'accroît. La diminution de HIF-1 α est constatée dès le début de la ré-oxygénation. Cependant, 24 heures après l'hypoxie, la protéine reste détectable [17]. Une diminution de l'apport tissulaire en oxygène engendre donc une réactivité immédiate du système nerveux central qui régule la stabilisation de HIF-1 α . Néanmoins, il est aujourd'hui accepté que certaines cytokines et hormones de croissances tels que le TNF α , IL-1 β et le facteur de croissance de type insuline 1 (IGF-1) sont capables de stabiliser et d'activer HIF-1 α [235]. Le stress oxydant, produit à la suite d'une privation d'oxygène, jouerait également un rôle dans la régulation de la sous-unité α [108].

IV-4.1.1.2. Evidences d'une régulation transcriptionnelle de HIF-1 α

La protéine HIF-1 α n'est pas uniquement régulée par des modifications post-traductionnelles assurées par la pVHL et les diverses cytokines et hormones de croissance. En effet, une régulation transcriptionnelle de HIF-1 α a été mise en évidence à la suite d'une ischémie cérébrale, caractérisée par une forte augmentation de l'expression de l'ARN messenger codant pour HIF-1 α autour de la région agressée. Les modifications de l'activité protéasique provoquées par l'ischémie expliqueraient que cette forte induction de l'ARN messenger codant pour HIF-1 α n'entraîne pas une élévation aussi prononcée de la protéine correspondante [14]. Les cytokines et les facteurs de croissance joueraient également un rôle dans la stimulation de la synthèse de HIF-1 α [235].

IV-4.1.1.3. Régulation post-transcriptionnelle de HIF-1 α via aHIF

L'ARN aHIF a été décrit comme l'anti-sens naturel de HIF-1 α chez les humains et les rongeurs [223]. Il est particulièrement exprimé dans les régions tumorales et serait impliqué dans la régulation de HIF-1 α en condition d'hypoxie. Alors que la pVHL conduit à la dégradation de HIF-1 α en situation de normoxie, aHIF permettrait de neutraliser, en condition d'hypoxie, l'activité excessive de HIF-1 α en se liant à son ARN messenger et en favorisant sa dégradation [41,201].

IV-4.1.1.4. Expression coordonnée de HIF-1 et de l'érythropoïétine sous hypoxie

La diminution de l'oxygénation tissulaire entraîne une élévation de la stabilisation de HIF-1 α qui peut, après sa migration nucléaire, reconnaître la séquence promotrice HRE de ses gènes cibles impliqués dans la neuroprotection. La liaison de HIF-1 sur le promoteur HRE est augmentée en réponse à une exposition hypoxique de 5 heures à 8% d'oxygène [213]. Une translocation nucléaire rapide ou une stabilisation de la protéine déjà présente dans le noyau peut expliquer l'expression essentiellement nucléaire de HIF-1 α . Bien que la ré-oxygénation réduise l'augmentation de l'expression de HIF-1 α , cette élévation reste détectable 24 heures après hypoxie [17]. L'élévation de l'ARN messenger codant pour l'Epo, qui précède de 24 heures celle de la protéine correspondante, est observée simultanément à l'augmentation de l'expression de HIF-1 α , et reste détectable 72 heures après la fin de l'hypoxie [17,213].

Il est important de remarquer que les cas d'hypoxie pure ne sont rencontrés qu'en haute altitude. En revanche, les formes d'hypoxie cérébrale les plus couramment décrites cliniquement sont principalement liées à différents types d'atteinte cérébrale tels que les arrêts cardiaques ou les ischémies cérébrales provoquées par une occlusion vasculaire des artères cérébrales [103] pour lesquelles il a été mis en évidence une induction tissulaire de l'expression de l'Epo en réponse à l'agression cérébrale.

IV-4.1.2. A la suite d'une agression du système nerveux

Il a été montré que des groupes de gènes ou des mécanismes cellulaires impliqués dans le développement du système nerveux central peuvent être réactivés à la suite d'évènements pathologiques. En effet, le rôle de l'Epo dans les mécanismes de prolifération cellulaire et de survie neuronale durant la période de développement du système nerveux central [31] serait aussi mis à contribution à la suite d'une ischémie cérébrale. En effet, dans les conditions basales chez la souris, seuls les neurones et les astrocytes expriment l'Epo et son récepteur au sein du système nerveux central. En revanche, après une ischémie, on détecte, au niveau du cortex, une augmentation du nombre de types cellulaires exprimant ces deux gènes pour favoriser la reconstruction des structures cérébrales endommagées. Ce « réveil » ne se réalise pas au même moment pour chacun des différents types cellulaires. En effet, l'Epo et son récepteur sont successivement exprimés par les cellules endothéliales (1 jours), les cellules microgliales (3 jours) et enfin par les astrocytes localisés à la périphérie de la zone endommagée (7 jours) [16]. Un profil d'activation temporel de l'expression de l'Epo et son récepteur similaire a été mis en évidence après autopsie chez des patients décédés à la suite

d'une ischémie cérébrale [238]. En revanche, aucune induction de l'expression de l'Epo n'a été observée à la suite d'un traumatisme crânien réalisé chez la souris [246].

Des résultats similaires ont été mis en évidence à la suite d'une agression du système nerveux périphérique. En effet, à la suite d'une compression de la moëlle épinière, une activation immédiate de l'expression de l'Epo et de l'Epo-R est observée au niveau des neurones, des cellules endothéliales et des cellules gliales (8 heures) et cette induction est maintenue durant les 8 jours qui suivent le traumatisme [110]. De plus, il a été montré que les cellules de Schwann exprimaient l'Epo [34] et son récepteur [34,159] en réponse à la compression du nerf sciatique chez le rat.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'activation de l'expression de l'Epo à la suite d'une agression du système nerveux central ou périphérique correspondrait à une réactivation du profil d'expression génique embryonnaire de l'Epo coordonnée avec celui de son récepteur (décrit dans le paragraphe VI-2.2.2.) pour limiter la dégénérescence neuronale et favoriser la reconstruction tissulaire.

IV-4.2. Inhibition de son expression : rôle potentiel de l'inflammation cérébrale

De nombreuses études *in vitro* sur les origines des anémies ont mis en évidence le rôle des cytokines pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et le TNF- α sur l'inhibition de l'expression de l'Epo provoquant l'arrêt de la prolifération et la différenciation des cellules érythroïdes [85,129]. Ces résultats sont en accord avec les observations cliniques réalisées chez des patients ayant subi une assistance circulatoire sanguine à la suite de problèmes cardiaques qui est à l'origine d'un phénomène inflammatoire provoquant une anémie [209].

A partir de ces observations et des connaissances sur la réactivité du système nerveux central à la suite d'une agression cérébrale, Brines et Cérani (2005) ont décrit un mécanisme hypothétique mettant en relation les phénomènes inflammatoires, le système Epo cérébral et la mort neuronale (Figure B5). A la suite d'une atteinte cérébrale, la zone endommagée, appelée « pénombre », présente de nombreuses cellules nécrotiques qui provoquent le recrutement et la libération par les cellules immunitaires de cytokines pro-inflammatoires. Les conditions hypoxiques présentes au sein de la zone de « pénombre » induiraient l'expression de l'Epo au niveau des astrocytes pour soutenir la survie tissulaire. En revanche, l'abondante

libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires serait à l'origine de l'inhibition directe de l'expression de l'Epo par les neurones localisés à proximité de la zone endommagée, favorisant ainsi leur mort par apoptose. Pourtant, l'inflammation serait aussi à l'origine de l'induction de l'expression de l'Epo-R par les cellules de la zone de « pénombre » et des cellules voisines, la définissant comme une arme à « double tranchant ». En effet, elle diminuerait la robustesse tissulaire par l'inhibition de l'expression de l'Epo mais favoriserait la capacité du tissu à répondre au signal de survie de l'Epo grâce à l'induction de l'expression de l'Epo-R par l'ensemble des cellules du tissu agressé. De ce fait, l'application d'Epo exogène pourrait donc se substituer à la source endogène d'Epo pour venir protéger les cellules exprimant l'Epo-R contre la dégénérescence apoptotique et réduire ainsi l'expansion des dommages tissulaires.

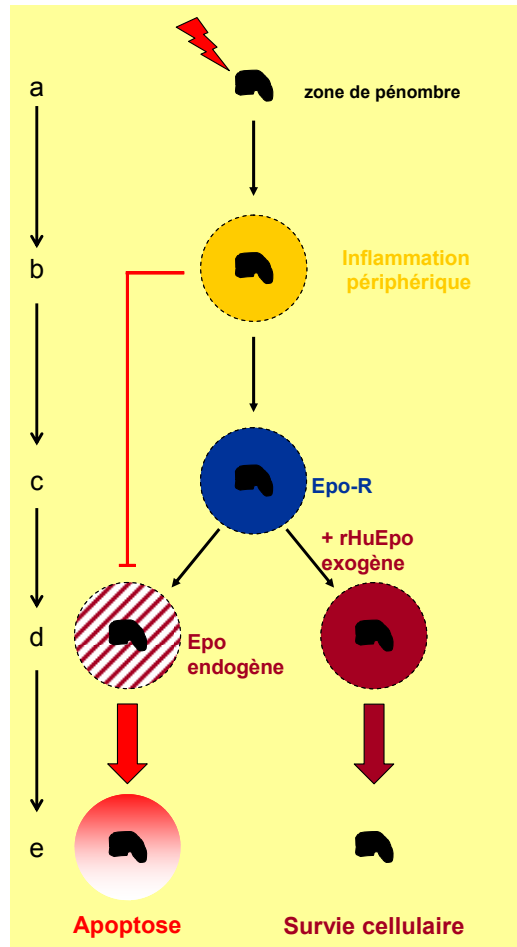


Figure B5. Evolution des dommages cérébraux et sa modulation par l'érythropoïétine endogène et exogène. A la suite d'une agression cérébrale, les neurones présents au niveau de la région endommagée dégénèrent par nécrose et donnent naissance à une zone dite de « pénombre » (a). Les cellules en nécrose libèrent dans le milieu environnant des facteurs chimiotactiques qui attirent des cellules inflammatoires. Ces cellules s'activent et libèrent des cytokines pro-inflammatoires créant une zone inflammatoire périphérique autour de la région de nécrose (b). Les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression de l'Epo-R à la surface des cellules nerveuses situées dans la zone inflammatoire (c), potentialisant le tissu à répondre au signal de survie cellulaire induit par l'Epo. Pourtant, elles inhibent aussi la synthèse d'Epo dans cette zone (d) empêchant l'activation des mécanismes apoptotiques aboutissant à la dégénérescence des neurones (e). L'inflammation serait donc une arme à « double tranchant » pour le tissu en i) réduisant ses systèmes de protection endogène (inhibition de la synthèse d'Epo) mais en ii) augmentant sa capacité à être protégé (induction de l'expression de l'Epo-R). En effet, l'augmentation de la concentration en Epo tissulaire dans cette région par l'apport exogène de rHuEpo assure la survie des cellules qui expriment l'Epo-R et réduit ainsi l'expansion des dommages cérébraux aux régions périphériques à la zone de « pénombre ».

V. L'effet neuroprotecteur de l'administration systémique d'érythropoïétine recombinante humaine

La découverte que l'érythropoïétine recombinante humaine (rHuEpo), présente dans la circulation périphérique après son administration par voie systémique, avait la capacité de traverser la BHE pour venir protéger les neurones dans de nombreux modèles animaux d'agression cérébrale [24], a permis l'émergence d'un nouvel espoir thérapeutique pour les patients atteints de maladies neurodégénératives.

V-1. L'érythropoïétine traverse la barrière hémato-encéphalique

L'Epo possède la capacité de traverser des tissus présentant une fine barrière de cellules endothéliales, au niveau desquelles il a été mis en évidence une importante expression d'Epo-R dans les conditions basales [4], tels que les testicules [89], la rétine [111] et le cerveau [24]. En effet, l'homéostasie du liquide interstitiel qui baigne les neurones est un élément crucial du bon fonctionnement du système nerveux central. La BHE, localisée au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, maintient par sa perméabilité restreinte et sélective, la composition du milieu interstitiel cérébral. Il a été mis en évidence qu'une forme tronquée de l'Epo-R était exprimée à la surface des cellules endothéliales et des prolongements astrocytaires présents au niveau des capillaires sanguins de la BHE chez l'homme [24] et permettrait le transport de la rHuEpo, de la circulation périphérique vers le tissu cérébral en traversant la BHE [79]. Des résultats similaires ont été mis en évidence chez le rat, le lapin, la chèvre et le primate, où il a été montré une accumulation de rHuEpo dans le liquide céphalo-rachidien à la suite de son injection systémique [57,79,136].

La mise en évidence, par microscopie électronique, d'une importante immunoréactivité de l'Epo-R à la surface des cellules endothéliales mais aussi dans de nombreuses petites vésicules cytoplasmiques au niveau de la BHE chez l'homme [24] a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'Epo exogène pourrait atteindre le cerveau en traversant la BHE par « transcytose » [24,82]. Dans ce mécanisme de transport cellulaire, i) l'Epo viendrait fixer son récepteur présent à la surface luminale des cellules endothéliales, ii) entraînant la formation d'une vésicule emprisonnant le complexe Epo/Epo-R iii) qui, après son internalisation, traverserait le cytoplasme iv) pour venir fusionner avec la membrane

cellulaire au niveau de la surface abluminale et libérer l'Epo dans le parenchyme cérébral. L'existence du transport de l'Epo exogène par transcytose à travers la BHE a été confirmée *in vitro* au niveau de cellules endothéliales en culture [175]. En revanche, il a été montré *in vivo* chez la souris, par chromatographie liquide à haute résolution (HPLC), que le transport des molécules d'Epo radiomarquées à travers la BHE à la suite d'une injection par voie i.v. était de type non spécifique [8]. Bien que ce résultat soit en opposition avec le mécanisme de transcytose, il se pourrait que l'expression d'une forme soluble de l'Epo-R, qui a été mise en évidence au niveau des cellules endothéliales [112,281], ait pu fausser les résultats. En effet, cette forme soluble de l'Epo-R serait impliquée dans le contrôle de la traversée de l'Epo circulante à travers la BHE en séquestrant et neutralisant l'activité biologique d'une partie des molécules d'Epo migrantes. Pourtant, même si le mécanisme de transport de l'Epo exogène à travers la BHE est encore controversé, des études réalisées dans une perspective thérapeutique de protection neuronale ont démontré de façon indiscutable que la rHuEpo, administrée par voie systémique, peut traverser les capillaires sanguins pour venir s'accumuler au niveau du parenchyme cérébral avec un rendement suffisant pour permettre une protection efficace des neurones contre une agression cérébrale aussi bien chez le rongeur que chez l'homme [24,80].

V-2. Evidence de l'effet neuroprotecteur du traitement à l'érythropoïétine

V-2.1. Dans les modèles animaux d'atteinte cérébrale

De nombreuses études, réalisées en cultures cellulaires (Tableau B2) dans différents modèles animaux d'agression cérébrale, ont démontré l'effet de la rHuEpo dans la protection des neurones (Tableau B3). Les résultats décrits dans le paragraphe suivant montrent que les doses et les protocoles d'injection de rHuEpo permettant d'obtenir un niveau de protection optimum dépendent i) du modèle d'atteinte cérébrale, ii) de l'espèce animale utilisée et iii) de la voie d'administration choisie.

Types de culture	Agent toxique	Effet de l'Epo	Sources
lignée neuronale PC12	déprivation de sérum/NGF	protection	Koshimura et coll., 1999
lignée neuronale P19	déprivation de sérum/NGF	réduction de l'apoptose	Siren et coll., 2001
motoneurones	acide kaïnique	protection	Siren et coll., 2001
neurones hippocampiques	hypoxie	protection	Siren et coll., 2001
neurones hippocampiques	anoxie	réduction de l'apoptose	Chong et coll., 2003
neurones hippocampiques	NO	protection	Sakanaka et coll., 1998
neurones hippocampiques	hypoxie chimique	réduction de l'apoptose	Wen et coll., 2002
neurones corticaux et hippocampiques	glutamate	protection	Morishita et coll., 1997
neurones corticaux primaires	déprivation d'oxygène/glucose	réduction de l'apoptose	Ruscher et coll., 2002
neurones corticaux	déprivation d'oxygène/glucose, AMPA	protection	Sinor et coll., 2000
neurones corticaux	N-méthyl-D-aspartate	réduction de l'apoptose	Digicaylioglu et Lipton, 2001

Tableau B2. Evidences in vitro de l'effet protecteur de l'érythropoïétine.

V-2.1.1. Dans des modèles d'ischémie cérébrale

Il a été montré chez les rongeurs dans différents modèles d'ischémie focale ou globale, respectivement par occlusion rapide ou permanente de l'artère cérébrale gauche vasculaire, que l'administration de rHuEpo protège le tissu cérébral *in vivo*.

Le traitement à la rHuEpo prévient la dégénérescence neuronale qui survient à la suite d'une ischémie focale : i) chez le rat, au niveau de la rétine lorsqu'elle est administrée (5 000 UI/kg ; intra-péritonéale) 24 heures et juste avant l'induction d'une ischémie d'une durée de 60 minutes [133] ou ii) chez le lapin, au niveau de la moëlle épinière quand elle est administrée (800 UI/kg ; intra-veineuse), immédiatement après l'arrêt d'une ischémie de 20 minutes [42].

Dans le cadre d'une ischémie globale, il a été montré, chez la souris, que l'infusion par voie intra-cérébroventriculaire (i.c.v) de rHuEpo, à la dose de 500 UI/kg, 24 heures avant l'occlusion permanente de l'artère cérébrale gauche réduit significativement le volume de l'atteinte cérébrale mesuré 24 heures après l'induction de l'ischémie [16]. Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat, où l'infusion de rHuEpo (1 ou 5 UI/jour ; i.c.v) immédiatement après l'induction de l'ischémie cérébrale et durant 28 jours, protège le cortex contre la dégénérescence neuronale et favorise la récupération des fonctions cognitives [226]. En revanche, par voie intra-péritonéale, la rHuEpo doit être administrée à une dose de 5 000

UI/kg et moins de 6 heures après l'agression cérébrale pour obtenir une efficacité de protection similaire [24]. Une fois cette fenêtre thérapeutique de 6 heures post-lésion dépassée, l'administration de rHuEpo (5 000 UI/kg ; i.p) ne présente plus d'effet neuroprotecteur mais favorise la restauration tissulaire en stimulant la prolifération des capillaires sanguins à la périphérie de la région lésée et la neurogenèse des précurseurs neuronaux de la zone sous ventriculaire [274].

V-2.1.2. Dans des modèles d'inflammation cérébrale

De nombreuses maladies du système nerveux central sont associées à une importante inflammation cérébrale. Il a été montré dans un modèle d'auto-immunisation, par injection de myéline, une rupture de la BHE qui favorise l'infiltration massive dans le tissu cérébral de nombreuses cellules impliquées dans les processus inflammatoires. L'exacerbation de l'inflammation cérébrale qui en résulte est à l'origine des déficits moteurs importants chez les animaux dus à la dégénérescence des axones neuronaux d'origine corticale et spinale. Il a été mis en évidence chez des rats immunisés à la myéline, que l'administration quotidienne de rHuEpo (5 000 UI/kg ; i.p), 3 jours après l'immunisation, améliore la récupération motrice [24] qui serait liée à une réduction significative de l'infiltration des cellules inflammatoires au niveau de la moëlle épinière et l'inhibition de la libération de cytokines pro-inflammatoires dans cette région [1]. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris après l'administration quotidienne de rHuEpo durant 14 jours (50 UI/kg ; i.v) [157].

V-2.1.3. Dans des modèles d'atteinte traumatique du système nerveux

Chez la souris, la contusion visible au niveau du cortex à la suite d'un traumatisme crânien peut être prévenue ou remarquablement diminuée lorsque l'injection de rHuEpo, à la dose de 5 000 UI/kg, est réalisée respectivement soit 24 heures avant soit dans un délai de 6 heures après l'impact cérébral, suivie d'une injection hebdomadaire durant 4 jours [24]. De plus, l'administration de rHuEpo (5 000 UI/kg ; i.p), 1 heure et 24 heures après l'induction du traumatisme, favorise la récupération des fonctions motrices des animaux [283]. Chez le rat, l'administration de rHuEpo (5 000 UI/kg ; i.p), à partir de 24 heures après l'impact cérébral et durant 14 jours, améliore significativement la mémoire spatiale [168]. Un effet similaire du traitement à la rHuEpo est observable dans des modèles de contusion [106], de compression [106] ou de lésion [35] de la moëlle épinière où l'injection d'une simple dose de rHuEpo immédiatement (contusion = 1 000 UI/kg ; i.p, compression = 5 000 UI/kg ; i.p) ou 24 heures (lésion = 5 000 UI/kg ; sous-cutanée) à la suite de l'agression, présente une protection robuste

des neurones et favorise la récupération totale de la mobilité des rats alors que les non traités restent paraplégiques [106]. Une récupération des fonctions motrices est observée à la suite d'une compression de la moëlle épinière après 3 jours d'administration, par voie intraveineuse, de rHuEpo à la dose de 1 000 UI/kg [84].

Brièvement, l'effet neuroprotecteur du traitement à la rHuEpo a été mis en évidence dans d'autres modèles animaux tels que la compression mécanique des nerfs périphériques chez le rat [84,153], l'hémorragie subarachnoïde chez le lapin [109,249] et l'excitotoxicité glutamatergique observée dans un modèle de la maladie de Parkinson chez la souris [99].

V-2.2. Dans les études cliniques chez l'homme

V-2.2.1. Les effets bénéfiques

Malgré la large utilisation thérapeutique de la rHuEpo dans le traitement des patients anémiques, il n'existe à ce jour qu'une seule étude clinique investiguant l'effet de l'administration de la rHuEpo sur les maladies neurodégénératives chez l'homme [80]. Ce faible intérêt porté à l'action de la rHuEpo sur le système nerveux central chez l'homme peut s'expliquer par le fait que la dose nécessaire pour induire l'hématopoïèse chez l'homme est infiniment plus faible que la dose minimum indispensable pour obtenir une neuroprotection. Pourtant, les résultats, obtenus chez l'animal, démontrant les effets bénéfiques de la rHuEpo dans la protection du cortex contre un accident cérébro-vasculaire (décrits dans la paragraphe VI-2.1.1.), ont permis la réalisation d'une étude pilote chez l'homme afin d'étudier l'effet d'un traitement thérapeutique à la rHuEpo sur le devenir neurologique et les pertes fonctionnelles des patients. A la suite d'un accident cérébro-vasculaire, les patients reçoivent une première dose de rHuEpo dans les 5 heures maximum après l'accident cérébral suivi d'une administration régulière durant 3 jours (i.v), soit un total de 33 000 UI/kg sur les 4 jours de traitement [80]. Les résultats obtenus montrent que pour des patients présentant la même sévérité d'atteinte cérébrale, les individus traités avec la rHuEpo ont une meilleure conservation des capacités fonctionnelles et une réduction des déficits neurologiques qui sont observés chez le groupe des patients non traités. En revanche, aucune différence n'a été mesurée au niveau du taux d'hématocrite entre les deux groupes. Ces premières observations ont encouragé la réalisation, actuellement en Allemagne, d'une étude clinique de phase 2/3 dans différents centres hospitaliers.

V-2.2.2 les effets toxiques potentiels

Il est important de noter que les résultats expérimentaux, décrits précédemment, doivent être pris avec précaution pour une future utilisation clinique de l'Epo. En effet, différentes études cliniques ont montré que l'administration unique ou répétée de rHuEpo présentait des effets hypertenseurs, contre-indiquant l'utilisation de cette molécule chez les individus souffrant d'hypertension [190]. Les résultats obtenus chez des patients souffrant d'anémie et traités à la rHuEpo ont montré que le traitement à la rHuEpo pouvait entraîner, chez ceux souffrant d'une anomalie rénale, la formation d'anti-corps anti-Epo se traduisant par une aplasie [35]. De plus, chez l'homme, l'administration de rHuEpo augmente les taux de plaquette sanguine, accroissant dramatiquement les risques de thrombose [251] qui sont souvent observés chez les sportifs utilisant des produits dopants [88]. Enfin, il a été montré *in vitro* sur des cultures de cellules humaines UT-7 une diminution de l'expression du récepteur à l'Epo à la surface des cellules en présence d'Epo [265], suggérant que le traitement à la rHuEpo pourrait voir son efficacité diminuer au cours du temps en provoquant l'internalisation cellulaire de son propre récepteur [21]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'administration de rHuEpo dans un cadre thérapeutique pourrait présenter des effets secondaires toxiques pour les patients. De nouvelles molécules d'Epo ont donc été développées dans le but d'assurer une neuroprotection efficace sans induire d'effets périphériques indésirables (comme décrit dans le chapitre VI-3.1.).

VI. Les cibles biologiques de l'action protectrice de l'érythropoïétine

Dans de nombreux modèles animaux d'agression cérébrale, le traitement avec de l'Epo exogène assure la survie des neurones en bloquant la dégénérescence neuronale i) en amont, au niveau de mécanismes tissulaires appelés voies « extrinsèques », comme l'inflammation, qui sont à l'origine de l'induction des signaux de mort au niveau des cellules et ii) en aval, au niveau des voies de signalisation cellulaire dites « intrinsèques » qui contrôlent les différentes étapes de l'apoptose au sein de la cellule.

VI-1. Les voies de protection tissulaire extrinsèques de l'érythropoïétine

VI-1.1. L'érythropoïétine et la réponse inflammatoire

L'Epo peut réduire la réponse inflammatoire à la suite d'une atteinte cérébrale. En effet, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, une réduction de l'activation de la réponse gliale est observée aussi bien au niveau des astrocytes que des cellules microgliales à la suite de l'administration de rHuEpo, associée à une réduction de l'apoptose neuronale [268] (comme décrit dans le paragraphe VI-2.). Cette réduction serait liée à la capacité de l'Epo à inhiber la présentation des phosphatidylsérine à la surface des neurones agressés qui est l'une des origines de l'activation des cellules microgliales résidentes et l'induction de la réponse inflammatoire [48]. Il a été montré, sur une culture primaire de neurones hippocampiques de rat, que le contrôle de l'asymétrie membranaire des phospholipides à la surface est réalisé par la voie de signalisation cellulaire PI3K/Akt dont l'activation est assurée entre autre par l'Epo (comme décrit dans le paragraphe VI-2.4.3.) [48]. Enfin, il a été mis en évidence, chez la souris ayant subi une atteinte cardiaque, que l'administration d'Epo inhibe la libération dans le tissu cardiaque des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et le TNF α [160]. Ces cytokines étant impliquées dans la prolifération et le recrutement de nouvelles cellules gliales entraînant l'exacerbation de la réponse inflammatoire observée à la suite d'une agression tissulaire.

Il est important de noter que des résultats similaires ont été obtenus dans des modèles d'agression du système nerveux n'entraînant pas de mort apoptotique massive des neurones comme les modèles d'EAE [157] ou d'atteinte de la moëlle épinière et des nerfs périphériques [1,141], suggérant un effet direct de l'Epo sur les cellules impliquées dans la réponse inflammatoire, celles-ci exprimant le récepteur à l'Epo (Epo-R) à leur surface [22].

Type d'atteinte	Espèce	Méthodologie	Traitement	Effets de l'Epo	S.
ischémie	Souris	occlusion permanente de l'artère carotide	injection (i.c.v; 500UI/kg) 24h avant	réduction du volume de contusion	
	Rat	occlusion permanente de l'artère carotide	injection (i.c.v; 1-5UI/kg) durant les 28J suivant	réduction du volume de contusion et améliore la récupération des fonctions cognitives	
	Rat	occlusion permanente de l'artère carotide	1 seule injection (i.p) dans les 6h qui suivent	réduction du volume de contusion	
	Rat	occlusion de l'artère carotide	1 seule injection (i.p) 6h après	favorise la restauration tissulaire	
	Homme	prise en charge moins de 5h après l'accident cérébro-vasculaire	première injection (i.v) dans les 5h suivant l'attaque puis durant les 3J suivant (33000UI totale)	réduction des déficits neurologiques	
inflammation	Souris	immunisation par injection de myéline	injection (i.v; 50UI/kg) quotidienne durant les 14J suivants	améliore la récupération motrice	
	Rat	immunisation par injection de myéline	injection quotidienne (i.p) durant les 3J suivants	améliore la récupération motrice	
atteinte traumatique du système nerveux	Souris	traumatisme crânien	1 seule injection (i.p) 24h avant ou dans les 6h qui suivent	réduction du volume de contusion	
	Souris	traumatisme crânien	2 injections (i.p) 1h et 24h après	améliore la récupération motrice	
	Rat	traumatisme crânien	injection quotidienne (i.p) 24h après impact et durant les 14J suivants	améliore la mémoire spatiale	
	Rat	contusion de la ME	1 seule injection (i.p; 1000UI/kg) immédiatement après	récupération complète de la mobilité	
	Rat	compression de la ME	1 seule injection (i.p) immédiatement après	récupération complète de la mobilité	
	Rat	compression de la ME	1 seule injection (s.c) 24h après	récupération complète de la mobilité	
	Rat	compression du nerf sciatique	injection (i.v; 1000UI/kg) durant les 3J suivants	récupération des fonctions motrices	
toxicité de l'acide kaïnique (AK)	Souris	crises et mortalité induites par l'injection de l'AK	1 seule injection (i.p) 24h avant	réduction de la sévérité des crises	
parkinson	Souris	injection de 1-méthyl-4phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine		protection des neurones dopaminergiques	
hémorragie sub-arachnoïdienne	Lapin	injection de sang dans la <i>cisterna magna</i>	1 seule injection (i.p)	protection complète	

Tableau B3. Evidences in vivo de l'effet neuroprotecteur du traitement à l'érythropoïétine. Les doses et les protocoles d'administration de la rHuEpo varient en fonction du modèle animal d'atteinte cérébrale, de l'espèce animal utilisée et de la voie d'administration du traitement. NB : lorsque la dose de rHuEpo n'est pas indiquée, elle était de 5 000UI/kg.

VI-1.2. L'érythropoïétine et le flux sanguin cérébral

L'Epo assure une protection tissulaire en maintenant une autorégulation vasculaire normale et en prévenant l'expansion de la zone cérébrale atteinte en évitant les dommages secondaires souvent liés à des phénomènes de vasospasme. L'Epo serait à l'origine de l'induction de l'expression de l'oxide nitrique synthétase au niveau des cellules endothéliales qui assure la relaxation des vaisseaux sanguins au niveau du tissu et le **maintien** du flux sanguin [7]. De plus, l'Epo peut aussi entraîner une vasoconstriction des vaisseaux sanguins par l'intermédiaire de l'endothéline 1. Cette observation peut expliquer la capacité de l'Epo à arrêter les spasmes vasculaires visibles chez le lapin à la suite d'une hémorragie subarachnoïde [109] et chez le rat ayant subi une compression de la moëlle épinière [106], réduisant ainsi les dommages tissulaires. Enfin, il a été montré que l'Epo pouvait interagir avec le facteur VEGF pour stimuler l'angiogenèse à la suite d'une ischémie cérébrale [274], permettant ainsi de maintenir l'intégrité des vaisseaux sanguins [157] et de la BHE [175].

VI-1.3. L'érythropoïétine et la reconstruction tissulaire

Une étude, réalisée par Shingo et ses collaborateurs (2001), a mis en évidence que l'Epo contrôle la migration et la différenciation des cellules souches neuronales, suggérant qu'elle jouerait un rôle central dans les mécanismes de réparation tissulaire qui surviennent à la suite d'une agression cérébrale. En effet, il a été montré *in vitro* que les cellules souches neuronales, provenant de la couche subventriculaire chez la souris adulte, se différencient en neurones matures lorsqu'elles sont incubées avec de l'Epo [236]. De plus, l'injection *in vivo*, chez la souris, d'Epo au niveau des ventricules latéraux entraîne une augmentation du nombre de neurones au niveau des bulbes olfactifs [236]. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le rat, où l'administration de rHuEpo (5 000 UI/kg ; i.p) 6 heures après une ischémie, favorise la restauration tissulaire en stimulant i) la prolifération des capillaires sanguins à la périphérie de la région lésée et ii) la neurogenèse des précurseurs neuronaux de la zone sous ventriculaire [274]. L'ensemble de ces observations encourage la réalisation de nouvelles études visant à mieux comprendre le rôle de l'Epo dans la plasticité du système nerveux central.

VI-2. Les voies de protection tissulaire intrinsèques de l'érythropoïétine

VI-2.1. Le récepteur à l'érythropoïétine

VI-2.1.1. Structure génique

Chez l'homme et les rongeurs, le gène codant pour le récepteur à l'Epo (Epo-R) est de petite taille (environ 5 500 bases) et code pour une protéine de 507 résidus d'acides aminés. Il se compose de 8 exons et 7 introns [284]. La taille individuelle des exons et des introns ainsi que les jonctions intron-exon présentent une grande homologie entre les espèces montrant une importante conservation de séquence durant l'évolution.

La transcription du gène codant pour l'Epo-R est contrôlée par une région présente en amont du codon ATG d'initiation de la transcription [285]. Cette séquence promotrice se distingue par le fait qu'elle ne possède pas de boîte TATA, généralement reconnue comme site d'initiation de la transcription pour de nombreux facteurs de transcription. Néanmoins, elle comporte deux boîtes de régulation qui ont été clairement identifiées comme étant les sites de fixation spécifiques des facteurs de transcription GATA-1 et SP-1, considérées comme activatrices [203]. Ces observations suggèrent le gène de l'Epo-R présente une régulation de son expression atypique dans le monde vivant puisque la boîte TATA, classiquement trouvée aussi bien chez l'homme que le rongeur, serait substituée par deux facteurs de transcription. Toutefois, il a été mis en évidence que la présence du facteur de transcription GATA-1 ne suffit pas, à elle seule, à induire l'expression du gène codant pour l'Epo-R [284], suggérant que d'autres éléments de régulation, encore mal élucidés, sont nécessaires au contrôle de l'expression du gène codant pour l'Epo-R [46].

VI-2.1.2. Structure protéique

La protéine de l'Epo-R se compose de 507 résidus d'acides aminés ne contenant qu'un seul domaine transmembranaire hydrophobe. La séquence protéique est hautement conservée au cours de l'évolution avec une homologie de 82% entre l'homme et les rongeurs [284]. L'analyse de sa séquence a montré que l'Epo-R appartient à la superfamille des récepteurs transmembranaires aux cytokines de type 1 qui comportent deux grandes caractéristiques avec i) une série de quatre résidus cystéines et ii) un motif de cinq résidus d'acides aminés tryptophane-sérine-x-tryptophane-sérine (WSxWS), localisés à proximité du domaine transmembranaire, et où le x correspond à n'importe quel acide aminé [9]. Les membres de

cette famille accueillent, en plus du récepteur à l'Epo, les récepteurs à l'interleukine 3 (IL-3), à l'interleukine 5 (IL-5) et au facteur stimulant les colonies des macrophages-granulocytes (GM-CSF) [284] (comme décrit dans le paragraphe VI-3.2.).

La région extracellulaire se compose de deux sous-domaines de type fibronectine III (FNIII) appelés D1 et D2. Le sous-domaine D1, situé à l'extrémité N-terminale du récepteur, présente deux paires de cystéines formant entre elles des ponts disulfures alors que le sous-domaine D2 possède un motif WSXWS qui est indispensable à la fixation spécifique de l'Epo [9]. En effet, au sein du motif, la présence des résidus tryptophanes ainsi que l'espace entre eux sont les deux éléments critiques intervenant dans le maintien de la structure et de la fonction de l'Epo-R [191]. Le domaine intracellulaire de l'Epo-R est essentiel pour la transduction du signal cellulaire induit à la suite de la fixation de l'Epo. Il contient un domaine de 100 acides aminés suffisant pour induire la prolifération cellulaire et dont l'activité est régulée négativement par la région carboxy-terminale du récepteur [278]. La région proximale du domaine intracellulaire de l'Epo-R présente une importante homologie avec le segment correspondant de la chaîne β commune (βc) au récepteur aux interleukines [114] (comme décrit dans le paragraphe VI-3.2.). Le domaine intracellulaire intervenant dans l'induction du signal intracellulaire possède une boîte appelée « box1 » qui est indispensable à la fixation spécifique de la Janus Kinase 2 (Jak-2), une protéine kinase qui lui est constamment associée, ainsi que 8 tyrosines qui constituent des sites d'attraction pour un groupe de protéines dites « adaptatrices » de type « Src homology 2 » (SH2) [278] (comme décrit dans le paragraphe VI-2.3.).

VI-2.2. Identification des cellules cérébrales exprimant le récepteur à l'érythropoïétine

Le rôle neuroprotecteur de l'Epo dépend de sa fixation sur son récepteur. Ainsi, la localisation cellulaire de la biosynthèse de l'Epo-R apporte des informations primordiales sur les cellules susceptibles d'être protégées par l'Epo.

VI-2.2.1. Dans les conditions basales

Des études réalisées à partir de cultures primaires de cellules corticales de souris ont mis en évidence, par immunocytochimie et par transcription inverse avec réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR), que les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales pouvaient exprimer l'Epo-R dans les conditions basales. En revanche, des études similaires réalisées sur des cellules de rat n'ont pas révélé la présence de l'Epo-R sur

les cellules endothéliales [16,81]. Les cultures cellulaires provenant d'embryon de rat ont permis de montrer, par RT-PCR, que les oligodendrocytes présentent une quantité supérieure d'ARN messager codant pour l'Epo-R à celle mesurée dans les neurones, les astrocytes et le rein. En outre, les niveaux d'expression de l'Epo-R dans les neurones et les astrocytes sont identiques à celui du rein [254]. Les études immunohistochimiques réalisées sur le tissu cérébral humain ont révélé la présence de l'Epo-R au niveau de la *fimbria* ou substance blanche, mais également dans les neurones corticaux et hippocampiques, les astrocytes et les cellules endothéliales [24,134,238]. Les travaux par autoradiographie de la liaison d'une molécule d'Epo radiomarquée sur des coupes cérébrales de souris ont mis en évidence une répartition hétérogène des sites de liaisons de l'Epo entre les différentes structures cérébrales avec une densité très importante au niveau de l'hippocampe, de la capsule interne, du cortex et du mésencéphale [71].

VI-2.2.2. A la suite d'une atteinte cérébrale

Chez le rongeur et l'homme, il a été observé une augmentation de l'expression tissulaire de l'Epo-R à la suite d'une agression cérébrale, encourageant l'utilisation thérapeutique de la rHuEpo du fait d'un « renforcement » des capacités du tissu à répondre au signal neuroprotecteur de l'Epo.

En effet, l'expression de l'ARN messager codant pour l'Epo-R ainsi que sa protéine sont induites par les astrocytes corticaux et par les neurones hippocampiques en culture à la suite d'une exposition hypoxique (1% O₂ ; 15 heures) [81]. De plus, il a été mis en évidence à la suite d'une ischémie cérébrale réalisée chez la souris, par western blot et immunohistochimie, une induction de la synthèse de l'Epo-R dans les neurones, les cellules endothéliales et les cellules de la microglie dès les premières 24 heures suivant l'atteinte cérébrale puis par les astrocytes entre 3 et 7 jours post-ischémie [16]. Des résultats similaires ont été révélés par des analyses immunohistochimiques réalisées post-mortem sur des pièces tissulaires prélevées chez des patients ayant subi une hypoxie aiguë ou un accident vasculaire cérébral [238]. L'augmentation de la synthèse de l'Epo-R a été mise en évidence, par immunohistochimie, au niveau des neurones, des astrocytes, des cellules inflammatoires intravasculaires et dans le tissu endothélial [238]. Cette induction pourrait s'expliquer par la réaction inflammatoire qui apparaît au sein du tissu cérébral à la suite de l'ischémie, l'expression de l'Epo-R n'étant pas sensible à l'hypoxie mais pouvant être régulée par les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou l'IL-1 β [22]. Enfin, il a été montré qu'à la

suite de la compression de la moëlle épinière chez le rat, une induction immédiate (8 heures post-compression) de la synthèse d'Epo-R au niveau des neurones, des cellules endothéliales vasculaires et des cellules gliales, est maintenue durant 2 semaines [110]. En revanche, aucune réactivité de l'expression de l'Epo-R n'a été observée chez la souris à la suite d'un traumatisme crânien [246].

VI-2.3. Mécanisme d'activation de l'Epo-R après fixation de l'érythropoïétine

VI-2.3.1. Structure de la Janus Kinase 2

La Jak-2 est une protéine kinase appartenant à la famille des Janus tyrosines kinases (Jak) [278]. Les membres de cette famille sont caractérisés par 7 domaines à activité kinase appelés aussi domaines JAK homologues (JH). Le domaine JH1 est le seul à présenter une activité catalytique, mais le domaine JH2 est indispensable à l'activité optimale de la protéine kinase. Les domaines JH6 et JH7 auraient un rôle dans l'association des JAKs avec les récepteurs aux cytokines.

VI-2.3.2. Mécanisme de transduction du signal cellulaire

L'Epo en fixant Epo-R entraîne un changement de conformation de ce dernier, puis sa dimérisation avec un monomère adjacent. Cette dimérisation provoque le rapprochement des deux Jak-2, associées à chaque monomère, et favorisent leur coactivation par transphosphorylation. Les Jak-2, une fois activées, phosphorylent les 8 tyrosines présentes sur chacun des domaines intracellulaires des monomères d'Epo-R pour donner la forme active du récepteur. Une fois le récepteur actif, on assiste au recrutement de nombreuses protéines, par l'intermédiaire de leurs domaines SH2, donnant naissance à un hétérocomplexe indispensable à la transduction du signal de l'Epo (Figure B6).

VI-2.4. Les voies de la signalisation intracellulaire

La fixation de l'Epo sur son récepteur engendre l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire qui peuvent être soit « simples », composées d'un seul intermédiaire directement phosphorylé par la Jak-2 comme les facteurs de transcription NF- κ B et STAT5, soit « complexes », composées de plusieurs intermédiaires s'activant en cascade telles que les voies PI3K / Akt et des MAPs kinases (Figure B7).

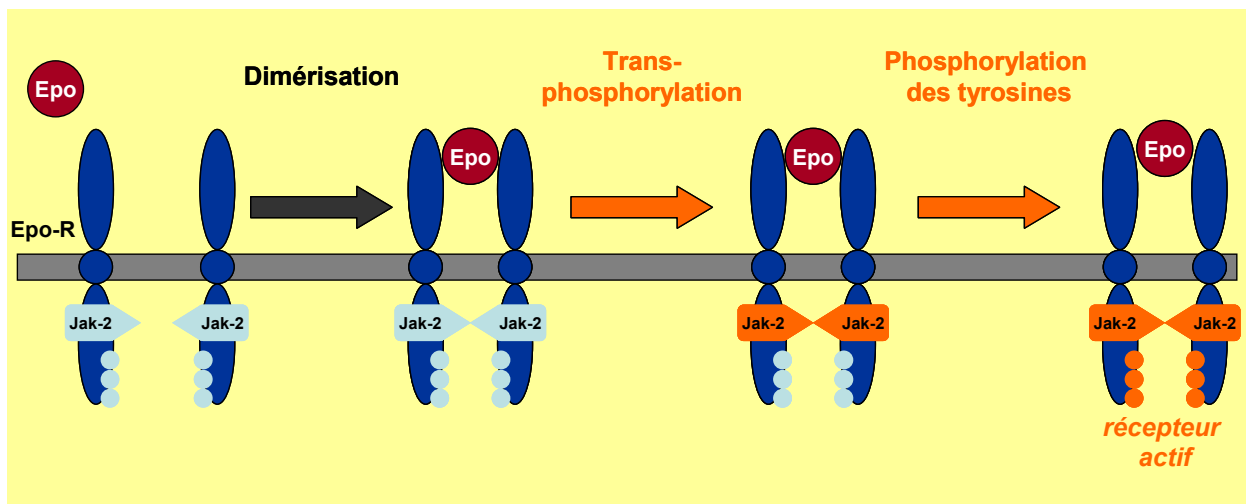


Figure B6. Mécanismes d'activation du récepteur à l'érythropoïétine. La fixation de l'Epo sur son récepteur entraîne sa dimérisation et le rapprochement des Jak-2 associées à chaque monomère d'Epo-R. Les Jak-2 se co-activent par transphosphorylation, puis activent le récepteur en phosphorylant les 8 tyrosines présentes sur chacun des domaines intracytoplasmiques des deux monomères.

VI-2.4.1. La voie de signalisation cellulaire PI3K / Akt

L'action neuroprotectrice de l'Epo a été montrée comme étant dépendante de l'activation de la protéine kinase Akt qui est un des composants de nombreuses voies de signalisation cellulaires impliquées dans la survie cellulaire et le blocage des mécanismes apoptotiques [158]. L'activation de Akt dépend de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K).

VI-2.4.1.1. Structures et mécanismes d'activation

La PI3K est un hétérodimère composée d'une sous-unité catalytique de 110 000 daltons (p110) et d'une sous-unité dite « adaptatrice et régulatrice » qui possède deux domaines SH2. Elle a besoin d'un environnement phospholipidique pour s'activer et ses nombreux substrats, dont la protéine kinase Akt, sont localisés au niveau de la membrane plasmique [264].

La protéine kinase AKT se compose d'un domaine qui lui permet de se lier aux phospholipides membranaires appelé PH (pour « plekstrin homology »), d'un domaine kinase et d'une région régulatrice C-terminale. Son activation nécessite sa phosphorylation au niveau de sa tyrosine 308 et de sa sérine 473 [139].

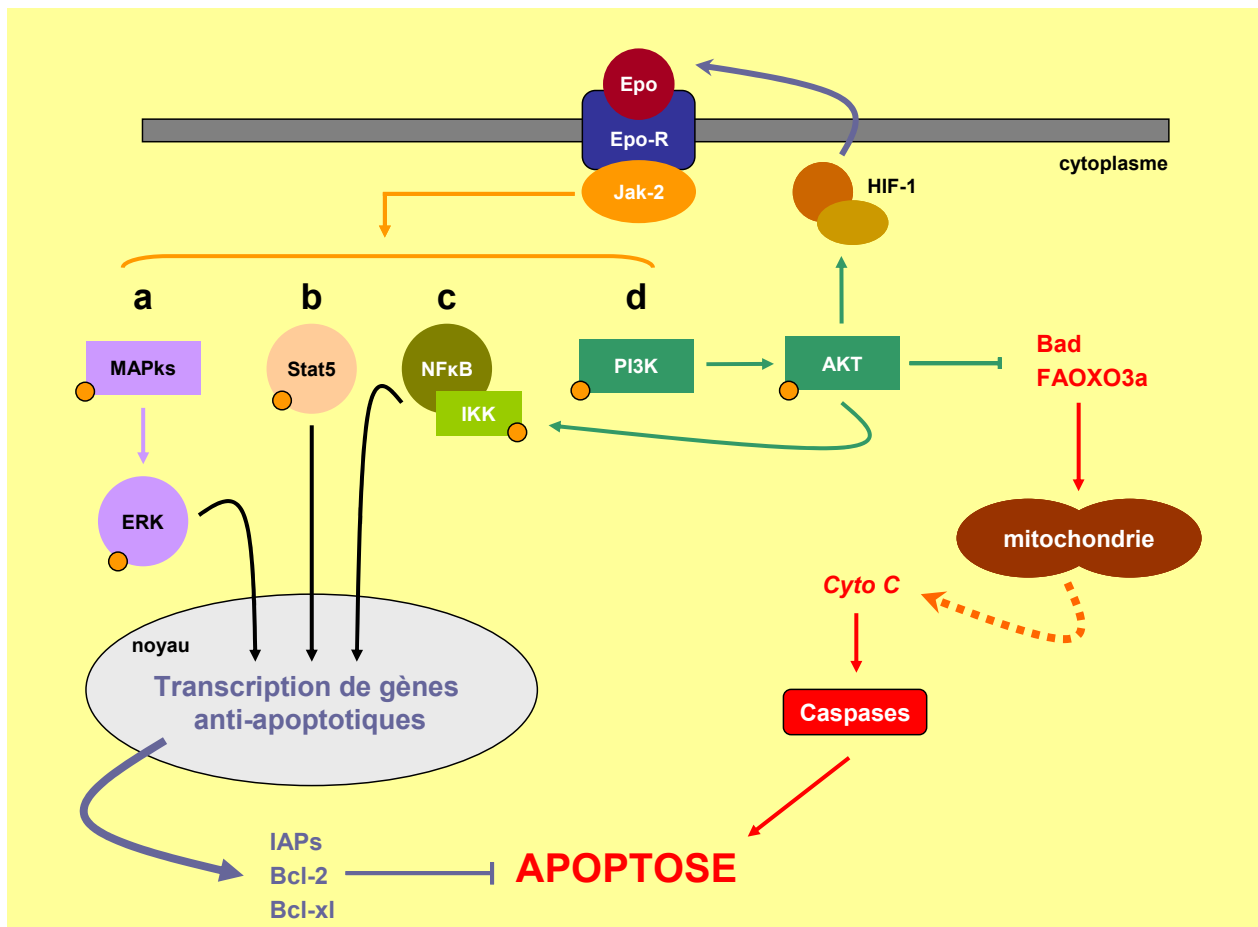


Figure B7. Les voies de signalisation cellulaire de la neuroprotection induite par l'érythropoïétine. Le signal de survie cellulaire induit par la fixation de l'Epo sur son récepteur nécessite l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire qui aboutissent au blocage des mécanismes apoptotiques. Les Jak-2, de l'Epo-R activé, recrutent par phosphorylation les facteurs de transcriptions : ERK (a), Stat5 (b) et le NFκB (c). Une fois activés, ils migrent dans le noyau et activent l'expression de gènes impliqués dans la neuroprotection comme les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-xl et les IAPs. Enfin, la voie PI3K/AKT (d) agit soit en amont de l'activation des mécanismes apoptotiques par i) le maintien de l'intégrité mitochondriale et ii) l'induction de la synthèse d'Epo par les neurones en souffrance grâce à la stimulation de l'expression de HIF-1; soit en aval, en activant le facteur de transcription NFκB.

Après activation de l'Epo-R, celui-ci présente 8 phosphotyrosines permettant le recrutement de la PI3K par l'intermédiaire de sa sous-unité régulatrice et ses deux domaines SH2. La sous-unité catalytique p110 se retrouve alors à proximité de la membrane plasmique et devient active. Elle catalyse la formation de 3-phosphoinositides (PI(3,4,5)P3) qui fixe avec une très grande affinité le domaine PH de la Akt entraînant le démasquage de ses résidus tyrosine 308 et serine 473 qui sont par la suite phosphorylés. Une fois activée, elle se détache de la membrane plasmique et migre dans le cytosol et le noyau.

VI-2.4.1.2. Actions neuroprotectrices

Le rôle central que joue la protéine kinase Akt dans la protection tissulaire induite par l'Epo a été mis en évidence aussi bien en conditions *in vitro* que *in vivo*. En effet, l'Epo protège les cultures de neurones contre la dégénérescence cellulaire induite par la présence de N-méthyl-D-aspartate ou de radicaux libres dans le milieu de culture [72,140], mais aussi contre une exposition hypoxique ou anoxique [140,238] grâce à l'activation de la voie de signalisation cellulaire Akt [140]. De plus, le blocage de l'activité de Akt sur des cellules exposées à une hypoxie (Chong et coll., 2002) ou un stress oxydatif [48,140] entraîne la perte de l'activité protectrice de l'Epo, suggérant que l'augmentation de l'activité de l'Akt mesurée chez les cellules en contact avec l'Epo est indispensable à son signal de survie. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*. En effet, l'activation de la protéine kinase Akt est observée chez le rat à la suite de l'administration d'Epo dans différents modèles de dégénérescence neuronale induite par l'administration de N-méthyl-D-aspartate [78], une ischémie cérébrale [289], ou la lésion chimique ou chirurgicale des axones des ganglions réiniens [147].

La protéine kinase Akt assure la survie cellulaire grâce au **maintien** de l'intégrité de la membrane mitochondriale par la régulation de l'activité de nombreuses protéines impliquées dans les mécanismes de mort apoptotique des cellules [158]. En effet, la protéine kinase Akt contrôle l'activité des membres de la famille Bcl-2, en favorisant l'activation de **protéines** anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-XL [215], et en inhibant l'activité de protéines pro-apoptotiques comme Bad [60]. De plus, il a été montré qu'elle inhibe l'activité de la protéine FOXO3a [286] dont l'activation entraîne une rupture de la membrane mitochondriale et la libération de cytochrome c. Enfin, la protéine Akt contrôle le **maintien** de l'intégrité mitochondriale par la régulation de l'activité de certaines caspases [158], en agissant soit en amont, par inhibition de la caspase 9 [48], soit en **aval**, en inhibant directement la libération du cytochrome c par la mitochondrie et l'activité des caspases 9 et 3 [290].

Il est important de noter que la protéine kinase Akt, en plus d'une action anti-apoptotique « directe » grâce au maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale, assure aussi une action anti-apoptotique « indirecte » en activant différents facteurs de transcriptions comme i) HIF-1, qui va induire l'expression d'Epo endogène par la cellule [87] et ii) le NF- κ B, qui joue un rôle majeur dans la transduction du signal de survie cellulaire [73].

VI-2.4.2. La voie de signalisation cellulaire du NF-kappa B

VI-2.4.2.1. Structure et mécanismes d'activation

NF-κB est un facteur de transcription qui fut décrit pour la première fois dans les lymphocytes B comme activateur de l'expression de la chaîne légère κ (« Nuclear Factor, enhancer for κ light chain B »). Il se compose de deux sous-unités appelées p50 et p65. Dans les conditions basales, le NF-κB est séquestré dans le cytoplasme par une molécule inhibitrice spécifique appelée IκB. Lors de l'activation d'une cellule, par l'intermédiaire d'un récepteur à activité kinase, l'IκB est inactivée par phosphorylation et dégradée par le protéasome après ubiquitinylation. Le NF-κB, alors libéré dans le cytoplasme, migre dans le noyau pour stimuler l'expression de ses gènes cibles.

VI-2.4.2.2. Actions neuroprotectrices

La protection cellulaire de l'Epo est en partie dépendante de l'activation du facteur de transcription NF-κB qui contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes anti-apoptotiques. En effet, le rôle du NF-κB dans le signal de survie induit par l'Epo a été mis en évidence sur des cultures de neurones de rongeurs dans des modèles *in vitro* mimant une ischémie cérébrale [73] ou la maladie d'Alzheimer [50] mais aussi durant une période d'anoxie [163]. En revanche, *in vivo*, le NF-κB n'interviendrait pas dans la neuroprotection induite par l'Epo observée chez le raton de 7 jours ayant subi une ischémie [246].

Le rôle du facteur de transcription NF-κB dans la survie cellulaire serait assuré par sa capacité à induire l'expression de gènes codant pour les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAPs) comme c-IAP-1 et c-IAP-2 [158]. Les IAPs inhibent spécifiquement l'activité des caspases 3, 7 et 9 [218] qui sont à l'origine de l'induction des cascades d'activation des caspases aboutissant à l'induction du signal apoptotique au sein de la cellule. De plus, il a été mis en évidence que c-IAP-1 et c-IAP-2 sont à l'origine de l'arrêt de l'activité apoptotique du TNF-α grâce à l'inhibition de la caspase 8 qui est une des sources d'activation de cette cytokine [272]. Enfin, le NF-κB peut inhiber directement l'apoptose en venant stimuler l'expression du gène codant pour la protéine anti-apoptotique Bcl-XL [44].

VI-2.4.3. La voie de signalisation cellulaire des MAPs kinases

VI-2.4.3.1. Cascades d'activation des MAPs kinases

La protéine kinase ERK appartient à la famille des protéines kinases à activité mitogène (MAPk), caractérisée par la présence de nombreux résidus sérines et thréonines dans sa séquence. La fixation de l'Epo sur son récepteur aboutit à la formation d'un complexe protéique actif qui entraîne l'activation en cascade des MAPks [224]. La première à être activée est la protéine kinase i) Raf-1, qui active à son tour la ii) protéine MEK, qui vient phosphoryler spécifiquement les résidus sérines et thréonines de la protéine iii) ERK. Une fois activée, la ERK migre dans le noyau et active l'expression de gènes impliqués dans la neuroprotection.

VI-2.4.3.2. Actions neuroprotectrices

L'activation de la voie de signalisation cellulaire des MAPks participe au signal de survie induit par l'Epo. En effet, il a été montré *in vitro* que l'addition d'Epo dans le milieu de culture de neurones hippocampiques de rat protège les cellules contre une période d'hypoxie aiguë grâce à l'activation neuronale des ERKs [238]. De plus, l'administration d'un bloqueur spécifique de l'activation des protéines kinases ERKs entraîne une perte de l'effet protecteur de l'Epo, suggérant que cette voie de signalisation cellulaire est indispensable dans la survie neuronale induite par l'Epo [238]. Des résultats similaires ont été mis en évidence *in vivo* chez le raton et le rat adulte ayant subi une ischémie cérébrale [275,289].

VI-2.4.4. La voie de signalisation cellulaire de Stat5

VI-2.4.4.1. Structure et mécanismes d'activation

Le facteur de transcription Stat5 appartient à la famille des transducteurs du signal et activateurs de la transcription (Stat). Il se compose de plusieurs domaines hautement conservés avec : i) un domaine de liaison à l'ADN, qui reconnaît spécifiquement le site d'activation gamma (GAS), ii) un domaine d'activation de la transcription et iii) un domaine SH2, lui permettant d'être recruté notamment par l'Epo-R activé [231]. En effet, à la suite de l'activation de l'Epo-R, les monomères de Stat5 sont phosphorylés au niveau de leurs tyrosines 700 par la Jak-2 entraînant leur dimérisation. Une fois sous la forme de dimère actif, Stat5 transloque dans le noyau et stimule l'expression de ses gènes cibles impliqués dans la neuroprotection [158].

VI-2.4.4.2. Actions neuroprotectrices

Sur des cultures de cellules souches érythroïdes, le facteur de transcription Stat5 est indispensable à l'Epo pour assurer sa fonction de survie et de prolifération cellulaire [58]. En revanche, son rôle reste controversé dans la transduction du signal de neuroprotection de l'Epo. En effet, le facteur de transcription Stat5 n'intervient pas dans la protection induite par l'Epo *in vitro* sur des cultures de neurones contre une hypoxie aiguë [238] et *in vivo* chez des rats de 7 jours contre une ischémie cérébrale [246]. En revanche, il a été montré une activation de Stat5 précédée par l'induction de l'Epo au niveau des neurones corticaux de souris à la suite d'une période d'anoxie dans un modèle *in vitro* de neuroprotection par pré-conditionnement anoxique [163]. Cette observation suggère que Stat5 n'interviendrait pas systématiquement dans la transduction du signal de survie neuronale induite par l'Epo mais serait activé de manière spécifique dans certains cas d'atteintes cérébrales.

VI-2.5. L'érythropoïétine contrôle l'homéostasie du calcium intra-cellulaire

Il a été mis en évidence sur des cultures de cellules mononucléées humaines de la moëlle osseuse [192] ou des cellules neuronales de lignées neuroblastiques [177] que l'Epo pouvait induire une rapide augmentation de la concentration en calcium intra-cellulaire. En effet, l'Epo module l'homéostasie calcique en stimulant un influx de calcium dont la source peut être intra-cellulaire ou extra-cellulaire [187,196]. De plus, il a été observé, sur des cultures de neurones, que l'inhibition de l'induction de la concentration intra-cellulaire de calcium entraîne la perte de l'effet protecteur de l'Epo contre le glutamate [196]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'augmentation rapide de la concentration en calcium intra-cellulaire est un des mécanismes indispensables à l'action protectrice de l'Epo contre une agression excitotoxique.

VI-3. Existence d'un récepteur à l'érythropoïétine alternatif impliqué dans la protection spécifique des neurones au sein du système nerveux ?

L'administration de rHuEpo assure la survie des neurones dans de nombreux modèles animaux d'atteintes cérébrales suggérant que l'Epo pourrait être utilisée en clinique comme un agent thérapeutique robuste et efficace dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Pourtant, le risque d'effets secondaires toxiques dus à l'activité hématopoïétique de l'Epo a

entraîné le développement de nouvelles molécules d'Epo qui sont neuroprotectrices mais non hématopoïétiques. La perte de cette fonction serait liée à l'existence d'un récepteur alternatif à l'Epo impliqué uniquement dans la protection tissulaire et qui fixerait spécifiquement certains dérivés de l'Epo.

VI-3.1. Les dérivés neuroprotecteurs de la molécules d'érythropoïétine

Le développement d'effets périphériques toxiques par l'administration de rHuEpo risque de diminuer sévèrement l'utilisation de l'Epo comme agent thérapeutique dans le cadre des maladies du système nerveux central. Il a donc été envisagé de développer de nouvelles molécules dérivées de l'Epo, comme l'asialo-Epo ou l'Epo carbamylée (CEpo), qui conservent les effets neuroprotecteurs de l'Epo mais sont dépourvues de toute activité hématopoïétique [84,153].

VI-3.1.1. L'asialo-érythropoïétine

L'utilisation de l'asialo-Epo comme dérivé de l'Epo dans le cadre de la neuroprotection a été dictée par le fait que la prolifération des globules rouges nécessite une présence continue d'Epo à proximité des cellules souches érythroïdes alors qu'un simple contact de l'Epo avec un neurone, appelé « emprunte protectrice de l'Epo », est suffisant pour induire un signal protecteur *in vitro* [196]. Il a donc été suggéré que l'administration d'une molécule d'Epo possédant une demie-vie courte passant efficacement la BHE pour venir au contact des cellules nerveuses pourrait induire un signal protecteur, sans qu'elle soit présente assez longtemps dans le milieu circulant pour stimuler l'érythropoïèse.

L'asialo-Epo présente une demie-vie très inférieure à celle de la protéine native de l'Epo, du fait de l'absence de l'acide acétylneuraminique à son extrémité N-terminale [84,129,275]. Il a été montré chez la souris que l'administration deux fois par semaine durant quarante jours d'asialo-Epo (100 µg/kg = 5 000 UI/kg ; i.p) n'augmente pas le taux d'hémoglobine mesuré par rapport aux souris traitées avec de la rHuEpo (5 000 UI/kg ; i.p) [84]. En revanche, l'asialo-Epo présente toujours une activité neuroprotectrice. En effet, l'effet protecteur de l'asialo-Epo a été mis en évidence chez le rat dans un modèle d'ischémie focale [84,275], dans un modèle de compression de la moëlle épinière [84] et dans un modèle de compression du nerf sciatique [84]. Son activité biologique neuroprotectrice serait liée à sa

fixation spécifique sur l'homodimère (Epo-R)₂, comme il a été mis en évidence sur des cultures de cellules Baf/3 modifiées pour sur-exprimer l'Epo-R à leur surface [153].

Il est important de noter que si l'effet bénéfique d'un traitement avec de l'asialo-Epo sur la survie des neurones a été mis en évidence dans de nombreux modèles animaux d'atteintes cérébrales, aucun effet neuroprotecteur n'a été observé sur la lignée de souris R6/2 dans un modèle de la maladie d'huntington [102].

VI-3.1.2. L'érythropoïétine carbamylée (CEpo)

Sachant que la structure de la molécule d'Epo définit sa fonction, Leist et ses collaborateurs (2004) ont cherché à modifier la structure de la protéine d'Epo de façon à perdre sa fonction hématopoïétique tout en conservant son action neuroprotectrice. Une des différentes modifications connues pour abolir la fonction hématopoïétique de l'Epo est la carbamylation de ses lysines, une modification qui entraîne d'importantes altérations conformationnelles et fonctionnelles de la protéine d'Epo native [197]. Les résultats obtenus montrent que la molécule de CEpo perd toute activité hématopoïétique au niveau des cellules souches érythroïdes [197,269]. En revanche, la molécule de CEpo conserve son activité neuroprotectrice aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, l'incubation de cellules neuronales P19 et de neurones hippocampiques avec la CEpo les protège contre l'apoptose induite par la présence de N-méthyl-D-aspartate [153]. De plus, il a été mis en évidence chez le rat que l'administration par voie intra-veineuse de CEpo réduit le volume lésionnel mesuré à la suite d'une ischémie cérébrale [153,269] accompagnée d'une réduction de l'inflammation et des déficits moteurs des animaux [269]. En outre, l'administration de CEpo favorise la récupération motrice chez les rats ayant subi une compression du nerf sciatique ou une lésion de la moëlle épinière, souffrant d'une encéphalomyélite de type auto-immune ou diabétique [153].

L'ensemble de ces résultats montre que la CEpo, qui ne possède plus d'activité hématopoïétique, présente des effets neuroprotecteurs, identiques ou supérieurs à ceux obtenus avec la rHuEpo dans de nombreux modèles animaux d'agression du système nerveux central et périphérique [153]. La perte de son activité hématopoïétique peut s'expliquer par son absence d'affinité pour la conformation (Epo-R)₂ classique du récepteur à l'Epo [153], mise en évidence sur des cellules de lignées neuronales UT-7 en culture, suggérant que son

action neuroprotectrice passerait par un récepteur alternatif à l'Epo qui serait spécifique de la protection tissulaire.

VI-3.2. Existence d'un récepteur alternatif spécifique de l'action neuroprotectrice de l'érythropoïétine ?

Au regard des connaissances des effets hématopoïétiques de l'Epo [129] et du fait que l'Epo-R puisse être exprimé par l'ensemble de cellules du système nerveux central [172], on a longtemps pensé que l'activité neuroprotectrice de l'Epo passait uniquement par l'homodimère (Epo-R)₂ [158]. Pourtant, la mise en évidence que la CEpo ne fixe pas l'(Epo-R)₂ classique, ainsi que la découverte de nombreux types de récepteurs alternatifs à l'Epo dans l'ensemble de l'organisme, suggèrent qu'il existerait un récepteur à l'Epo spécifiquement impliqué dans la transduction de son signal de survie cellulaire [22,23].

VI-3.2.1. Les récepteurs à l'érythropoïétine alternatifs

Il était accepté que l'action de l'Epo sur les cellules, qu'elle soit de type proliférative au niveau des cellules érythroïdes ou protectrice pour les neurones, été uniquement liée à l'expression de l'Epo-R par les cellules (décrit dans le paragraphe VII-2). Pourtant, un récepteur à l'érythropoïétine atypique a été mis en évidence à la surface des cellules endothéliales, présentant des singularités par rapport au récepteur des cellules érythroïdes avec i) une densité plus importante à la surface des cellules endothéliales, ii) une structure différente, comprenant une seule protéine de liaison de 45 kDa par rapport aux deux classiquement décrites (110 kDa et 95 kDa) et iii) une affinité très faible pour l'Epo (≈ 5 nM contre ≈ 200 pM pour les érythrocytes) [4,258]. De plus, de récents résultats ont montré l'existence d'un autre récepteur à l'Epo atypique à la surface des cellules d'origine neuronale PC12 avec une faible affinité pour l'Epo (≈ 20 nM) et une seule protéine d'encrage [281]. Ces résultats démontrent que l'Epo agirait au niveau du système nerveux central de façon autocrine ou paracrine étant donné que le niveau d'Epo circulante est beaucoup trop faible (1-5 pM), pour venir se fixer sur les récepteurs alternatifs de faibles affinités présents à la surface des cellules nerveuses.

VI-3.2.2 La chaîne bêta commune des récepteurs de l'IL-3, de l'IL-5 et du GM-CSF

L'ensemble des résultats que nous venons de décrire démontre l'existence de différents types de récepteurs à l'Epo dans l'organisme dont la structure détermine l'action de l'Epo sur les cellules, expliquant que la CEpo protège les tissus contre l'apoptose sans fixer l'(Epo-R)₂. En revanche, il est indéniable que l'action neuroprotectrice de l'Epo est dépendante du monomère de l'Epo-R puisqu'il a été montré que l'administration d'un anticorps anti-Epo-R, empêchant la fixation de l'Epo sur son récepteur, inhibe l'effet neuroprotecteur de l'Epo [33].

Comme l'Epo-R fait partie de la superfamille des récepteurs aux cytokines I, l'étude des récepteurs de la même famille a fait émerger la chaîne β commune (β c), associée aux récepteurs de l'IL-3, de l'IL-5 et au GM-CSF, comme élément potentiellement impliquée dans les effets neuroprotecteurs de l'Epo. En effet, il a été mis en évidence à la surface des cellules murines Baf3, l'expression d'un hétérorécepteur Epo-R/ β c qui est biologiquement actif et possédant une affinité accrue pour l'Epo par rapport à l'(Epo-R)₂ [132]. De plus, le développement de souris transgéniques n'exprimant pas la sous-unité β c a permis de mettre en évidence que cette sous-unité n'est pas indispensable à l'Epo pour assurer son rôle hématopoïétique [233] mais qu'elle serait indispensable pour son action neuroprotectrice [23]. En effet, il a été montré à la suite d'un traumatisme de la moëlle épinière, dont les neurones co-expriment l'Epo-R et la β c à l'état basal, que l'administration de rHuEpo favorise la récupération motrice des souris de phénotype sauvage mais ne présente aucun effet chez des souris transgéniques qui n'expriment pas la β c mais uniquement l'Epo-R [23]. L'ensemble de ces résultats a suggéré à Brines et ses collaborateurs (2005) l'hypothèse selon laquelle l'effet protecteur de l'Epo au sein du système nerveux serait lié exclusivement à la présence d'un hétérorécepteur composé d'un monomère d'Epo-R et d'un dimère de β c (Figure B8). Pourtant, la distribution de la β c au sein du système nerveux central reste actuellement encore inconnue.

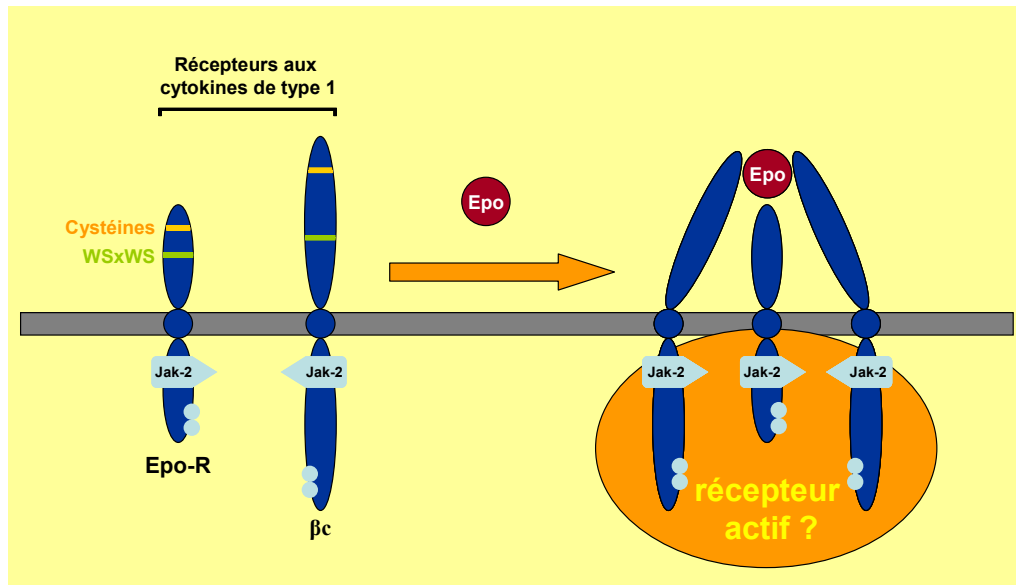


Figure B8. Structure hypothétique du récepteur de la neuroprotection de l'érythropoïétine. Le récepteur à l'Epo (Epo-R) fait parti de la superfamille des récepteurs aux cytokines de type 1 à laquelle appartient aussi la chaîne β commune (βc) aux récepteurs à l'IL-3, l'IL-5 et au GM-CSF. De ce fait, ils présentent tous les deux des similitudes structurales. En effet, on observe au niveau de leurs domaines extracellulaires, i) un motif tryptophane-sérine-x-tryptophane-sérine (WSxWS) et ii) quatre résidus de cystéines et au niveau de leurs domaines intracytoplasmiques, la présence iii) d'une Jak-2 et de iv) résidus de tyrosines. Il a été proposé que la structure du récepteur impliqué dans la transduction spécifique du signal de survie de l'Epo serait composée d'un monomère d'Epo-R associé à deux monomères de βc .

PROCEDURES EXPERIMENTALES

Les expérimentations sur les animaux décrites ci-dessous ont été réalisées en accord avec la réglementation européenne (décret 86/609) et la loi française (décret 87/848) régissant l'expérimentation animale. Tous les efforts ont été mis en œuvre pour diminuer la souffrance des animaux et réduire leur nombre au cours des expériences.

I. Animaux et conditions d'hébergements

I-1. Au cours du développement et du vieillissement

Cette étude a été réalisée exclusivement sur des rats Sprague Dawley mâles (Harlan France) qui ont été sacrifiés à différentes étapes de leur développement postnatal, le jour de leur naissance étant considéré comme le jour 0 (0J). Les ratons, ayant été sacrifiés durant les 3 premières semaines de leurs vies, ont été reçus à l'âge de 1 jours (J) avec leur mère nourricière dans une animalerie conventionnée. Ils ont été hébergés à la température maintenue à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ dans un cycle nyctéméral d'une périodicité de 12 heures (période lumineuse : 6-18 heures). A l'âge de 21J, les ratons ont été séparés de leur mère nourricière et répartis de façon aléatoire à raison de 5 rats par cage (Bac Polycarbonate E, 450x300x200 mm, Charles Rivers). Les rats, ayant été sacrifiés à l'âge de 3 et 12 mois (M), ont été reçus à l'animalerie 3 semaines avant le début de l'expérimentation et répartis de façon aléatoire à raison de 5 rats par cage (Bac Polycarbonate E, 450x300x200 mm, Charles Rivers). L'ensemble des rats adultes (mères nourricières et mâles) avait un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

I-2. A la suite du status epilepticus

L'ensemble des traitements pharmacologiques a été réalisé sur des rats âgés de 7 semaines (42J) ayant séjourné durant au moins 2 semaines dans l'animalerie pour qu'ils soient habitués aux différents paramètres environnementaux (période lumineuse : 6-18 heures ; température : $21 \pm 1^\circ\text{C}$) ainsi qu'aux expérimentateurs. Dès leur arrivée à l'animalerie, les rats ont été répartis de façon aléatoire à raison de 5 rats par cage (Bac

Polycarbonate E, 450x300x200, Charles Rivers), avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

À la suite des traitements pharmacologiques, les rats étaient hébergés en cage individuelle (Bac Polycarbonate E, 450x300x200 mm, Charles Rivers) pour favoriser leur récupération physiologique, qui est évaluée par la mesure de la prise de masse corporelle, de nourriture et de boisson pour chacun des rats (comme décrit dans le chapitre III.). En revanche, les rats contrôles n'ayant pas reçu d'administration de pilocarpine étaient hébergés à raison de 5 rats par cage (Bac Polycarbonate E, 450x300x200 mm, Charles Rivers) et n'ont jamais été isolés jusqu'à leur sacrifice. En effet, si l'isolement s'impose chez le rat souffrant, afin qu'il recouvre plus rapidement ses constantes physiologiques, l'isolation sociale chez l'animal sain constitue un véritable stress entraînant d'importantes perturbations physiologiques et comportementales chez celui-ci [155]. Les sacrifices ont toujours été réalisés entre 8 heures et 12 heures du matin.

II. Traitements pharmacologiques

II-1. Modèle d'induction d'un status epilepticus par l'administration de pilocarpine

Dans l'ensemble des expériences réalisées lors de ce travail de thèse, le *status epilepticus* (SE) a toujours été déclenché par un traitement à la pilocarpine hydrochloride (160 mg/mL dans du NaCl 0,9% ; Sigma) administrée par voie systémique (voie intra-péritonéale, i.p) aux doses de 300 mg/kg ou 375 mg/kg. La pilocarpine hydrochloride est un agoniste des récepteurs muscariniques centraux et périphériques. Afin de limiter ses effets périphériques indésirables et d'éviter la mort subite de l'animal, les rats ont été traités, 30 minutes avant son administration, avec de la scopolamine méthyl nitrate (0,5 mg/mL dans du NaCl 0,9% ; Sigma), un antagoniste des récepteurs muscariniques, qui lorsqu'il est injecté à la dose de 1 mg/kg par voie sous-cutané (s.c) ne présente aucun effet central. Le SE induit à la suite de l'administration systémique de pilocarpine est arrêté au bout de 2 ou 3 heures après l'apparition de la première crise de stade 5 par l'administration i.p de diazépam (Valium[®], 5 mg/mL, Roche) à la dose de 10 mg/kg (Figure. P1). Les injections de pilocarpine ont toujours été effectuées entre 8 heures et 9 heures du matin. Les doses de pilocarpine hydrochloride qui

ont été utilisées, ainsi que la durée de la période de SE sont mentionnées plus bas pour chacune des expériences réalisées.

Chez les rats appartenant au groupe des témoins naïfs (**contrôles**) ou des témoins scopolamine-diazépam (contrôle/SD), les injections de produits pharmacologiques ont été substituées par l'administration de sérum physiologique (NaCl à 0,9%).

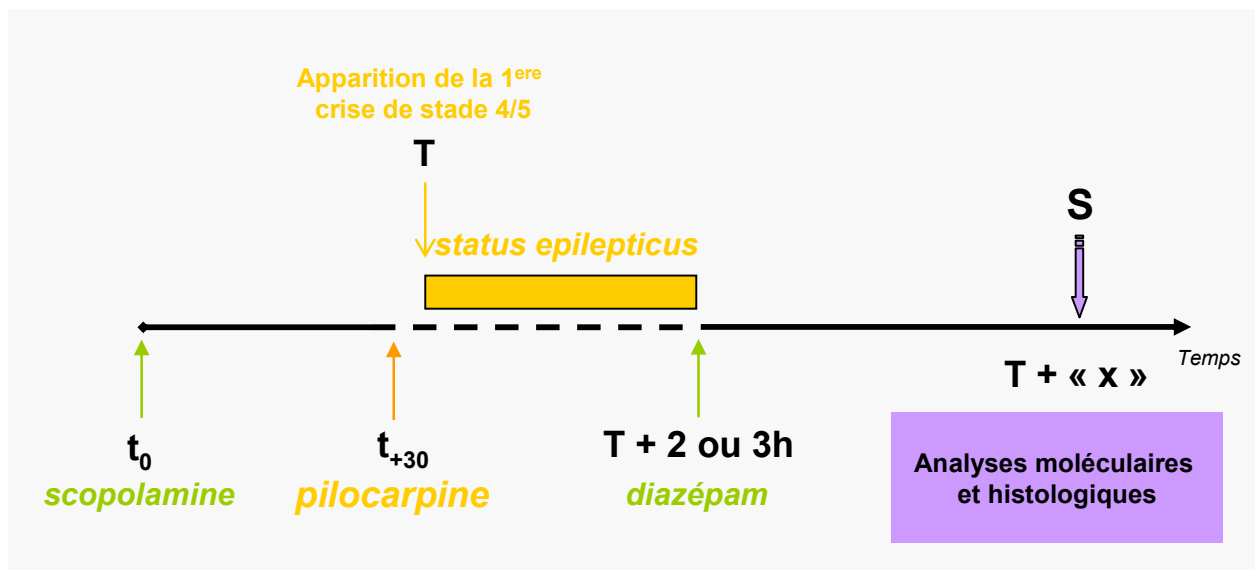


Figure P1. Protocole d'induction d'un status epilepticus par l'administration de pilocarpine chez le rat. Les rats « Pilo » reçoivent une injection de scopolamine (t_0) puis sont traités, 30 minutes après, à la pilocarpine (t_{30}). Leurs comportements sont rigoureusement observés, et l'examineur note le temps d'apparition de la première crise de stade 4/5 (T). L'état de mal cérébral (SE) est arrêté au bout de 2 ou 3 heures après l'apparition de la première crise par l'administration de diazépam ($T+2$ ou $3h$). Le sacrifice des différents groupes de rat s'effectue au temps « x ». Il est important de noter que : i) les rats contrôles S/D sont traités à la scopolamine et au diazépam mais reçoivent une injection de sérum physiologique à la place de la pilocarpine et ii) les rats témoins naïfs reçoivent uniquement des injections de sérum physiologique à la place des différents agents pharmacologiques.

II-2. Traitements à l'érythropoïétine recombinante humaine

II-2.1. Préparation de la solution d'érythropoïétine recombinante humaine

A chaque jour d'injection, une solution de rHuEpo (Eprex[®], Janssen-Cilag, France) à 2,5 UI/mL a été préparée à partir d'une solution mère (40 000 UI/mL ; i.e. 336 µg/mL) diluée avec de l'eau pour préparations injectables (Lavoisier). Cette solution était injectée par voie i.p aux rats à la dose de 5000 UI/kg (i.e. 42 µg/mL), décrite comme étant la dose optimale pour induire une protection neuronale par ce mode d'administration [32]. Chez les rats témoins naïfs (contrôle), les injections de rHuEpo ont été remplacées par l'administration de sérum physiologique (NaCl à 0,9%).

Les flacons de rHuEpo pour solutions injectables qui nous ont servis pour réaliser l'ensemble des travaux que compose ce travail de thèse, nous ont été aimablement fournis par le laboratoire Janssen-Cilag (France).

II-2.2. Protocoles de traitement à la rHuEpo

Afin d'étudier l'effet de la rHuEpo sur la mort neuronale qui survient à la suite du SE chez le rat, nous avons testé deux protocoles d'injection de la rHuEpo. Les différentes injections de la rHuEpo ont toujours été réalisées entre 7 h 30 et 12 h 00 du matin par voie i.p pour l'ensemble des rats.

II-2.2.1. Début du traitement à la rHuEpo après arrêt du status epilepticus

Ce protocole est appelé « traitement thérapeutique » car il a été établi pour être proche d'un traitement potentiellement applicable lors de la prise en charge clinique d'un patient en état de mal cérébral. Dans ce protocole, seuls les rats ayant développé un SE et sélectionnés sur critères comportementaux (comme décrit dans le chapitre III-1.1.), subissent trois injections de rHuEpo à 30 minutes, 1 jours et 3 jours après l'injection de diazépam et l'arrêt du SE (Figure. P2A).

II-2.2.2. Début du traitement à la rHuEpo avant l'induction du status epilepticus

Ce protocole se compose de quatre injections de rHuEpo dont les deux premières sont effectuées à 24 heures et 30 minutes avant l'administration de pilocarpine et l'induction du SE chez les rats, suivi de deux autres à 1 et 3 jours après l'injection de diazépam et l'arrêt du SE (Figure. P2B). Ce protocole est appelé « traitement préventif » car des injections de rHuEpo sont réalisées avant le traitement à la pilocarpine.

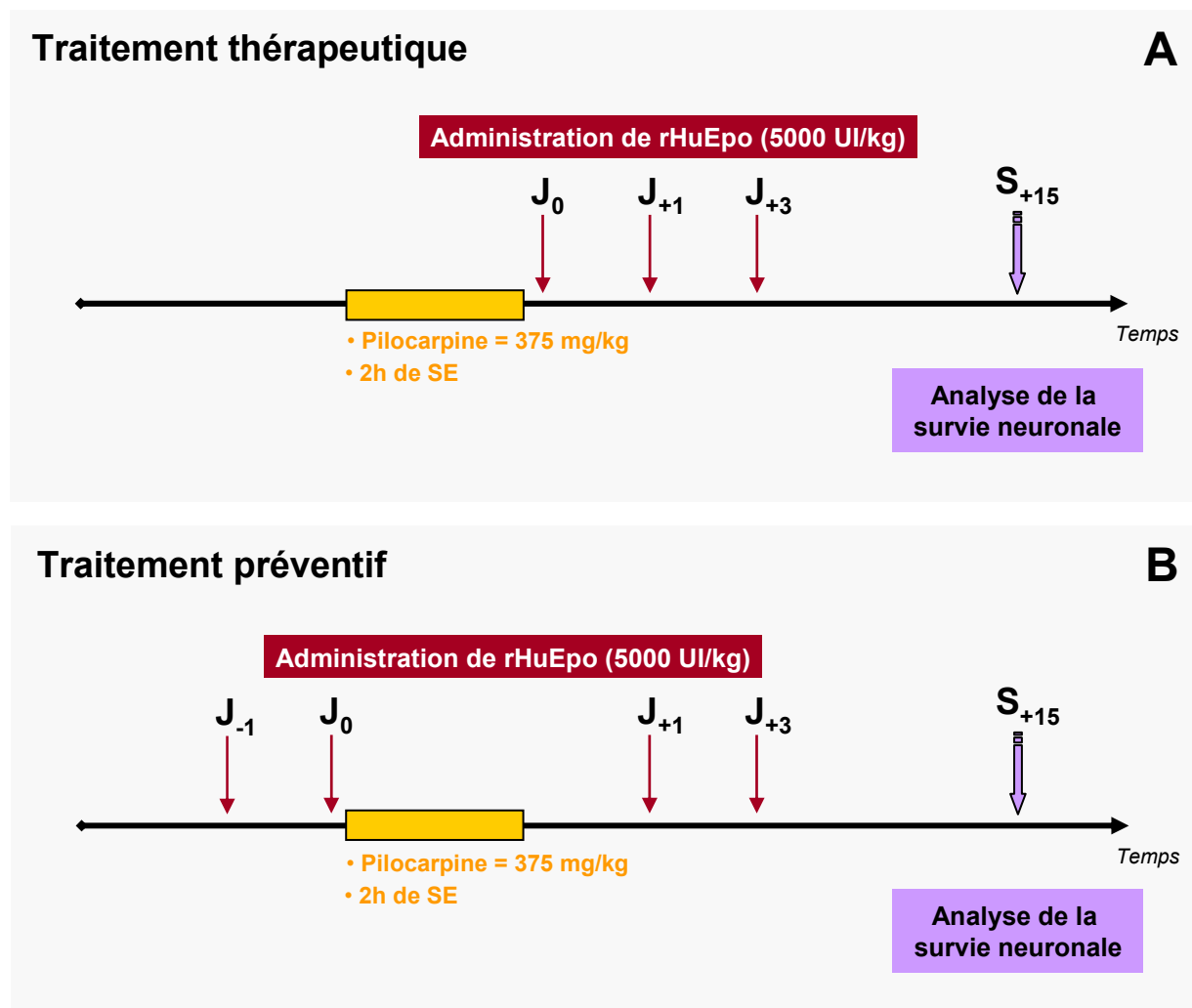


Figure P2. Protocoles de traitement à l'érythropoïétine recombinante humaine. A, Protocole de traitement « thérapeutique » à la rHuEpo. Les rats, ayant développé un SE durant 2 heures à la suite de l'administration de pilocarpine (i.p ; 375 mg/kg), reçoivent 3 injections de rHuEpo (i.p ; 5000 UI/kg) à 30 minutes (J₀), 1 jour (J₊₁) et 3 jours (J₊₃) après l'arrêt du SE. L'analyse histologique de la survie neuronale est réalisée à 15 jours post-SE (S₊₁₅). B, Protocole de traitement « préventif » à la rHuEpo. Les rats reçoivent 2 injections « préventives » de rHuEpo (i.p ; 5000 UI/kg) 1 jour (J₋₁) et 30 minutes (J₀) avant l'administration de pilocarpine (i.p ; 375 mg/kg). Seuls les rats ayant développé une SE, d'une durée de 2 heures, sont à nouveau traités à la rHuEpo à 1 jour et 3 jours post-SE. L'analyse histologique de la survie neuronale est réalisée à 15 jours post-SE (S₊₁₅).

III. Etude comportementale au cours du status epilepticus et mesure des constantes physiologiques

III-1. Etude comportementale des rats au cours du status epilepticus

III-1.1. Développement des différents stades comportementaux au cours du status epilepticus

Une étude comportementale a été réalisée sur l'ensemble des rats traités à la pilocarpine de façon à sélectionner les rats ayant développé un comportement homogène face au traitement. Après l'injection de scopolamine, les rats sont placés individuellement dans une cage en plexiglas (Bac Polycarbonate E, 450x300x200, Charles Rivers) et observés jusqu'à la fin du SE. Durant cette période, l'observateur va mesurer le temps d'apparition des différents symptômes énoncés par Racine [216] qui définit les différents stades amenant au développement d'un SE: stade 0 = pas de réaction au traitement ; stade 1 = ataxie, mâchonnement ; stade 2 = hochements de la tête ; Stade 3 = clonies des membres antérieurs ; Stade 4 = tremblements généralisés avec redressement, et enfin le stade 5 = clonies généralisées, redressement et chute appelé « *status epilepticus* » (SE). L'entrée en SE est considérée quand l'animal développe des tremblements continus après avoir montré au moins 1 crise de stade 4 ou 5. Le nombre total de crise de stade 5 est comptabilisé au cours du SE pour chaque animal.

III-1.2. Sélection sur critères comportementaux des rats traités à la pilocarpine

Les résultats obtenus montrent qu'à la dose de 300 mg/kg, 62,5% des rats traités à la pilocarpine développent un SE avec en moyenne $6 \pm 0,7$ crises et un temps d'apparition de $27,8 \pm 2,2$ minutes. En revanche, à 375 mg/kg, 100% des rats rentrent en SE avec $6 \pm 0,84$ crises de moyenne et un temps d'apparition de $28,6 \pm 2,3$ minutes.

III-2. Mesure des constantes physiologiques

III-2.1. Mesure des constantes physiologiques au cours de période d'épileptogénèse

Après le traitement à la pilocarpine, les animaux présentent une ataxie et une absence de réponse aux stimuli environnementaux [39,184]. Nous avons réalisé au sein du laboratoire une étude portant sur l'influence du traitement à la pilocarpine sur le gain de masse corporelle et la prise de nourriture chez les rats durant les 21 jours suivant l'arrêt du SE [194]. Les résultats obtenus, nous ont permis de mettre en évidence, qu'à la suite de l'injection de pilocarpine, les rats présentent une perte de poids importante (Figure P3A) liée à un état de dénutrition avancé (Figure P3B) aboutissant généralement à la mort des rats (Figure P3). Cette étude démontre qu'il existe une période critique de 5 jours à la suite du SE où seuls les rats qui recommencent à se nourrir survivent.

III-2.2. Détermination du « point final » dans notre protocole expérimental

Afin d'être en accord avec la réglementation européenne (décret 86/609) et française (décret 87/848) qui régissent les procédures d'expérimentation sur l'animal, nous avons défini un « point final » qui correspond au point critique à partir duquel la souffrance des animaux devient intolérable et ne peut être justifiée par la nécessité expérimentale. Les rats dont la perte de masse corporelle ne s'était pas stoppée au bout de cinq jours après l'arrêt du SE ont été sacrifiés par décapitation après une injection d'une dose létale (250 mg/kg) de pentobarbital sodique (Sanofi).

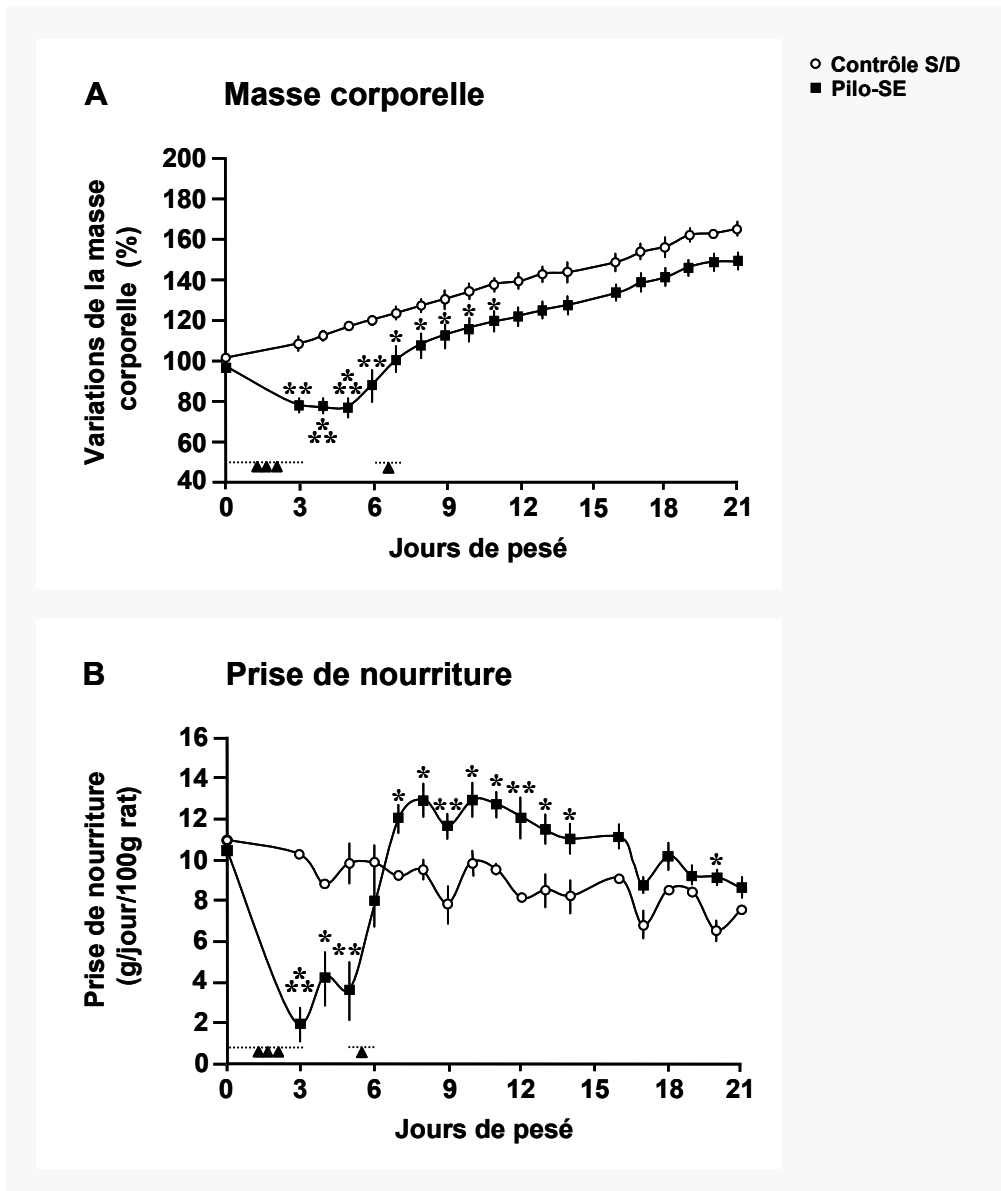


Figure P3. Mesures des constantes physiologiques à la suite d'un Pilo-SE chez le rat. La variation de masse corporelle (A) et la prise de nourriture (B) mesurées à la suite du Pilo-SE révèlent une rapide et importante réduction de la consommation de nourriture jusqu'à 5J post-SE. L'augmentation de la prise de nourriture observée entre 5J et le 6J post-SE précède le gain significatif de masse corporelle mesuré à 7J post-SE. Il est important de noter que les rats ayant subi un SE présentent une hyperphagie entre 7J et 14J post-SE et que la différence de masse corporelle mesurée entre les rats traités à la pilocarpine (Pilo-SE) et les rats contrôles S/D n'est pas significative à partir de 12J post-SE. ▲ : Comparaison entre un point de la cinétique et le point précédent pour le groupe des rats Pilo-SE uniquement et * : Comparaison entre le groupe des rats Pilo-SE et le groupes de rats contrôles S/D pour un point de la cinétique donné ; avec ▲ et *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ▲▲▲ et ***, $P < 0,001$. Groupe de rats Pilo-SE : $n = 14$ jusqu'à 5J, $n = 9$ à 6J post-SE, $n = 7$ à partir de 7J post-SE et jusqu'à la fin de l'étude. Groupe rats contrôles S/D : $n = 5$. Abréviations : J, jour de pesé.

IV. Groupes expérimentaux

Les différents groupes expérimentaux ainsi que leurs traitements pharmacologiques respectifs ont été répertoriés dans le tableau P1.

IV-1. Etude de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique endogène dans les conditions basales et physiopathologiques

IV-1.1. Etude de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique au cours du développement post-natal et du vieillissement chez le rat

Afin de connaître les niveaux de variation d'expression cérébrale des ARN messagers codant respectivement pour l'Epo, l'Epo-R, la βc et la sous-unité HIF-1 α au cours du développement et du vieillissement chez le rongeur, nous avons sacrifié des rats à 2J (n = 7), 8J (n = 7), 14J (n = 5), 21J (n = 5), 3M (n = 5) et 12M (n = 5) à la suite d'une injection létale de pentobarbital sodique (Sanofi ; 250 mg/kg). L'hippocampe, le néocortex et l'hypothalamus ont été rapidement retirés puis congelés dans de l'azote liquide. Pour chacune des structures cérébrales et à chacun des temps de la cinétique, les niveaux d'expression des différents ARN messagers d'intérêt ont été déterminés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel.

Afin de corroborer les variations d'expression des ARN messagers avec celles de leurs protéines respectives et de caractériser les cellules qui les synthétisent au cours du développement postnatal et du vieillissement, une étude immunohistochimique a été réalisée à 5J (n = 5), 21J (n = 5), 3M (n = 5) et 12M (n = 3). Les rats ont été perfusés par voie trans-cardiaque avec une solution de paraformaldéhyde à 4% réalisée dans du tampon phosphate à 0,1 M, à raison de 15 mL/min durant 4 minutes pour les 5J et 30 mL/min durant 6 minutes pour les 21J ou durant 9 minutes pour les 3M et 12M.

IV-1.2. Etude de l'expression de l'Epo-R et de la βc sur une culture de cellules neuronales PC12

Afin de mettre en évidence si les cellules d'origine neuronale PC12 expriment l'Epo-R et la βc , nous avons mesuré les niveaux d'expression de leurs ARNm respectifs durant les périodes de maturation cellulaire et de différenciation neuronale, induites par l'addition du facteur de croissance neuronal (NGF) dans le milieu de culture.

IV-1.3. Etude de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique à la suite du status epilepticus chez le rat

Afin de déterminer les variations de l'expression hippocampique du système Epo à la suite d'un SE, des rats ont subi 3 heures de SE induit par l'administration de pilocarpine hydrochloride à la dose de 300 mg/kg. Dans cette étude, nous avons utilisé la dose minimale de pilocarpine nécessaire pour produire un SE soutenu tout en assurant leur survie sur le long terme. Afin de déterminer les niveaux d'expression des ARN messagers codant pour les protéines clefs du système Epo (i.e. Epo, Epo-R, βc , HIF-1 α et son ARN anti-sens naturel aHIF), les animaux ont été sacrifiés après l'injection d'une dose létale de pentobarbital (250 mg/kg). Les hippocampes ont été rapidement prélevés et congelés à différents temps (t) après l'initiation du SE : t = 8 heures (0,3 jours) (n = 5), t = 1 jour (n = 6), t = 2 jours (n = 6), t = 3 jours (n = 8) et t = 7 jours (n = 3). Afin de déterminer l'effet de l'administration de la scopolamine et du diazépam sur les niveaux d'expression des gènes d'intérêts, des rats contrôles (contrôles/SD) ont reçu des injections de scopolamine et de diazépam aux mêmes moments que les rats pilocarpine (n = 5 pour chacun des temps de la cinétique). Enfin, l'hippocampe, le néocortex et la moëlle épinière (au niveau des vertèbres T2/T4) ont été prélevés chez des rats naïfs, sacrifiés à t = 0 (contrôle, n = 5) et n'ayant reçu aucun traitement pharmacologique.

Afin de localiser et de mesurer la mort neuronale, par marquage immunohistochimique respectivement avec le Fluoro-Jade B et le marqueur nucléaire NeuN, ainsi que de localiser et caractériser les cellules exprimant l'Epo, l'Epo-R et la βc au niveau de l'hippocampe, les rats ont été anesthésiés par une injection de pentobarbital (250 mg/kg) à 1 jour (n = 3), 3 jours (n = 5), 4 jours (n = 5) et 15 jours (n = 7) à la suite du SE induit par l'administration de pilocarpine (Pilo-SE) (3 heures ; 300 mg/kg) et perfusés par voie trans-cardiaque avec une solution de

paraformaldéhyde à 4% réalisée dans du tampon phosphate à 0,1 M. Après une étape de cryoprotection dans une solution de sucrose à 25% préparée dans du tampon phosphate 0,1M salin à 0,9%, les cerveaux ont été congelés dans de l'isopentane et conservés à -80°C. Des rats naïfs (contrôles, n = 4) n'ayant reçu aucun traitement pharmacologique ont été inclus dans cette étude.

IV-2. Etude de l'effet de l'administration d'érythropoïétine recombinante humaine sur la survie neuronale à la suite d'un status epilepticus

IV-2.1. Etude de l'accumulation de la rHuEpo dans le tissu cérébral chez le rat dans les conditions physiologiques et physiopathologiques

La concentration en rHuEpo au niveau du plasma sanguin et dans le tissu cérébral a été mesurée à différents temps à la suite de son administration périphérique chez le rat (n = 20), ayant : i) reçu ou non une première injection de rHuEpo à la même dose 24 heures auparavant, et ii) subi ou non 2 heures de Pilo-SE (375 mg/kg ; i.p). Après l'administration d'une dose létale de pentobarbital (250 mg/kg ; i.p), des échantillons de sang sont prélevés par ponction cardiaque et collectés dans des tubes héparinés. A la suite d'une perfusion cardiaque rapide (1 minute) avec une solution de NaCl à 0,9%, l'hippocampe et le néocortex ont été disséqués, pesés, congelés dans une solution de nitrogène et conservés à -80°C.

IV-2.2. Etude de l'effet de l'administration de rHuEpo sur le développement du status epilepticus et la protection des neurones vulnérables de l'hippocampe

Dans cette étude, les rats ont subi une période de 2 heures de SE induit par l'administration de pilocarpine hydrochloride à la dose de 375 mg/kg, qui a été la dose classiquement utilisée pour caractériser la dégénérescence neuronale chez le rat [261]. Trois séries d'expériences ont été réalisées avec, dans chacune, des rats répartis en 3 groupes expérimentaux : Groupe 1 : les rats ayant reçu uniquement trois injections de rHuEpo à la suite du SE (i.e. 30 minutes, 1 jour et 3 jours à la suite du SE ; Groupe 2 : les rats ayant reçu quatre injections de rHuEpo avec deux injections à 24 heures et 30 min avant l'administration de pilocarpine hydrochloride et deux injections à 30 minutes et 1 jour après l'arrêt du SE ; et Groupe 3 : les rats n'ayant reçu aucune injection de rHuEpo (n = 20). Au total, le nombre de

rats était de 20 dans le groupe 1, de 10 dans le groupe 2 et de 20 dans le groupe 3. Des rats n'ayant subi aucun traitement pharmacologique ont été inclus dans l'étude (n = 5). Chez ces différents groupes de rat, nous avons mesuré les différentes variables qui caractérisent le développement du SE à savoir : i) le temps de latence entre l'administration de la pilocarpine et l'apparition du SE, ii) le temps d'apparition et le nombre de crises de stade 4 (redressement avec clonies des membres) et de crises de stade 5 (redressement avec perte de l'équilibre et chute accompagnés par des tremblements continus) comme décrit dans le paragraphe III-1.1. Afin d'évaluer le niveau de la protection neuronale des traitements à la rHuEpo et de caractériser les neurones ayant survécu, les rats sont anesthésiés par l'administration d'une dose létale (250 mg/kg ; i.p) de pentobarbital 15 jours après l'arrêt du Pilo-SE, puis leurs cerveaux sont fixés, cryoprotégés, congelés et conservés à -80°C, comme décrit dans le paragraphe IV-1.2.

Etude	Technique	Nombre de rats	Traitement	Sacrifice	Prélèvements
Développement	PCR	34	∅	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	Hi; NCx; Hpt
Développement	Immuno-histochimie	18	∅	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	Cerveaux perfusés
<i>Status Epilepticus</i>	PCR	28	Pilocarpine (300 mg/kg) Scopolamine Diazépam	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	Hi
		5	Scopolamine Diazépam	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	
		4	∅	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	
Accumulation cérébrale de la rHuEpo	ELISA	5	∅	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	Hi; NCx
		5	Pilocarpine (375 mg/kg)		
		5	rHuEpo (5 000 UI/kg)		
		5	Pilocarpine (375 mg/kg)		
Effet neuroprotecteur de la rHuEpo	Immuno-histochimie	20	3 injections de rHuEpo (5 000 UI/kg) Pilocarpine (375 mg/kg)	Pentobarbital (250 mg/kg) et Guillotine	Cerveaux perfusés
		10	4 injections de rHuEpo (5 000 UI/kg) Pilocarpine (375 mg/kg)		
		20	Pilocarpine (375 mg/kg)		
		5	∅		

Tableau P1. Récapitulatif des différents groupes expérimentaux et de leurs traitements pharmacologiques.

METHODES EXPERIMENTALES

I. Préparation des tissus

I-1. Prélèvements et traitements des tissus frais

Cette partie concerne les animaux dont différents tissus cérébraux ont été prélevés et traités afin d'y doser la quantité des ARN messagers codant pour les différents gènes d'intérêts.

I-1.1. Prélèvement des cerveaux et microdissection sur tissu frais

Avant le sacrifice, les rats ont reçu une injection létale de pentobarbital sodique (250 mg/kg ; Sanofi). Après décapitation, à l'aide d'une guillotine, les cerveaux ont été retirés rapidement de la boîte crânienne et placés sur un plan de travail réfrigéré afin d'effectuer la microdissection des structures d'intérêt. Les tissus ainsi collectés ont été déposés dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL, congelés immédiatement dans de l'azote liquide, pour éviter toute dégradation des ARN messagers présents dans le tissu, et stockés dans un congélateur à -80°C.

L'hypothalamus a été prélevé sur le cerveau complet, une fois sorti de la boîte crânienne. L'hippocampe et le cortex ont été prélevés à partir d'une coupe coronale de 2 mm d'épaisseur réalisée dans la région de l'hippocampe dorsal à tous les temps du développement étudié. En revanche, chez les rats traités à la pilocarpine, seul l'hippocampe dorsal a été prélevé.

I-1.2. Préparation des ARN totaux

I-1.2.1 Extraction et purification

Les pièces tissulaires sont homogénéisées dans 280 µL d'eau ultra-pure (UP) (EUROBIO). Une fraction de 30 µL est prélevée pour les dosages protéiques. L'extraction des acides nucléiques est réalisée par l'ajout de 750 µL de Tri-Reagent LS (Euromedex) dans les 250 µL d'homogénat restant et de 200 µL de chloroforme. Après centrifugation (15 minutes à 4°C ; 12 000 g), la phase supérieure aqueuse, contenant les ARN totaux, est délicatement

récupérée puis traitée avec 500 μL d'isopropanol (Sigma). Après centrifugation (10 minutes à 4°C ; 12 000 g), le surnageant est éliminé et le culot d'acides nucléiques est lavé dans 1,5 mL d'éthanol à 75%. Après centrifugation (10 minutes à 4°C ; 12 000 g) et élimination de l'éthanol, les culots sont rapidement séchés à 37°C puis repris dans 200 μL d'eau UP. Une fois mélangés, les échantillons sont congelés à -70°C .

Une fois extraits, les ARN totaux sont traités à la Turbo DNA Free (Ambion) durant 30 minutes à 37°C afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN génomique (ADNg). A l'issue de la purification, la concentration en ARN totaux est déterminée dans une UVette exempte de RNAses (Eppendorf) par la mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) à 260 nm sur le Biophotomètre (Eppendorf), sachant qu'une unité de DO équivaut à 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'ARN.

I-1.2.2. Vérification de la qualité des ARN totaux

La qualité des ARN totaux a été vérifiée systématiquement à l'aide d'un bioanalyseur (2100 bioanalyser, Agilent) par électrophorèse sur une puce d'analyse (Nano LabChip #5065-4476, Agilent). Chacun des puits de la puce est coté avec un mélange de gel-colorant (RNA 6000 Nano gel matrix, Agilent), puis 1 μL d'ARN totaux, prélevé sur les 200 μL d'aliquot, est déposé ainsi que 1 μL de RNA 6000 ladder (#7152, Agilent).

I-1.2.3. Vérification de l'absence de contamination en ADN génomique

La vérification de non contamination en ADNg est réalisée sur 25 ng d'ARN totaux à partir de l'amplification d'une séquence d'un gène codant pour l'exon V du BDNF. La PCR s'effectue sur LightcyclerTM (Roche), et comprend : i) une étape de dénaturation initiale, ii) une étape d'amplification de 45 cycles et iii) une étape de fusion où la courbe obtenue permet d'identifier le produit d'amplification à partir de sa température de fusion (comme décrit dans le paragraphe II-2.). Le volume réactionnel contenu dans les capillaires comprend 5 μL de solution concentrée à 25 ng d'ARN totaux, et 5 μL de mélange réactionnel réalisé à partir du kit Roche. Ce mélange est élaboré à partir de 2,75 μL d'eau ultra-pure, 1 μL de « Hot Star reaction mix » (Roche), 1 μL de solution de MgCl_2 et 0,25 μL d'amorces spécifiques à la concentration de 10 μM chacune. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification sont données dans le tableau 1 et les conditions de l'amplification sont précisées dans le tableau 2. Afin de vérifier le bon déroulement de la PCR, un standard d'ADNc du BDNF, de concentration connue, est également amplifié (décrit dans le paragraphe II-2.2.). Nos résultats

n'ont mis en évidence aucune amplification pour les échantillons d'ARN totaux, alors que le standard du BDNF était correctement amplifié. Ces observations signifient que les traces éventuelles d'ADNg ont bien été éliminées des échantillons d'ARN totaux. L'étape de réaction de transcription inverse des ARN messagers peut alors être effectuée.

I-1.2.4. Préparation des pools d'ARN totaux

Après vérification de leur non contamination en ADNg, et leurs dosages précis, les solutions d'ARN totaux sont ramenées à 41,7 ng/μL. Les réactions de transcription inverse (RT) sont réalisées : i) sur 500 ng d'ARN totaux pour chaque échantillon (c'est le cas dans l'étude de la variation de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique à la suite d'un SE) ou ii) sur 1 μg pour les pools d'ARN totaux (c'est le cas dans l'étude de la variation de l'expression cérébrale du système érythropoïétinergique au cours du développement). Un pool est réalisé pour les individus d'un même groupe expérimental et pour une structure donnée, avec 24 μL d'ARN totaux prélevés pour chaque individu d'un même groupe expérimental. Pour chaque pool, 12 μL seront prélevés en tripliqués pour réaliser la RT.

I-2. Prélèvements et traitements des tissus fixés

Cette partie concerne les animaux dont les cerveaux fixés ont servi à la localisation tissulaire et à la caractérisation cellulaire de l'expression des différentes protéines d'intérêt par détection immunohistochimique.

I-2.1. Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux

Les rats sont anesthésiés par une injection i.p d'une dose létale de pentobarbital sodique (250 mg/kg ; Sanofi), puis sont perfusés par voie intracardiaque (15 mL/min durant 4 minutes pour les P5 ; 30 mL/min durant 6 minutes pour les P21 ou 9 minutes pour les 3M et les 12M). Les cerveaux sont tout d'abord « lavés » de leur sang durant 1 minute (P5) ou 2 minutes (autres âges) avec un tampon phosphate salin (PBS ; pH = 7,4) à 0,1M, puis fixés durant 10 minutes, à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PF) à 4% préparée dans un tampon phosphate (PB ; pH = 7,4) à 0,1M final. Après décapitation, les cerveaux sont délicatement retirés de la boîte crânienne, post-fixés dans une solution de PF à 4% durant 2 heures et enfin déshydratés durant 48 heures dans une solution de saccharose à 25%, préparée

dans du PB à 0,1M final. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane à -40°C pendant 1 minutes et 10 secondes puis conservés à -80°C.

I-2.2. Prélèvement et conservation des coupes de cerveaux perfusés

Dans l'ensemble de nos études sur cerveaux perfusés, des coupes transversales de 40 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica) au niveau de la région de l'hippocampe (coordonnée interaural (IA): +5,86 mm à +4,20 mm). Les plans de départ et de fin de coupe ont été choisis pour encadrer le plan d'intérêt localisé dans l'hippocampe dorsal (IA = +5,40 mm) sur lequel est réalisé l'ensemble des études immunohistochimiques. La première coupe de chaque plan est prélevée puis montée sur une lame gélatinée (1% de gélatine) avant d'être colorée au crésyl violet afin de vérifier la qualité de la perfusion et d'effectuer le recalage anatomique entre les différents cerveaux (comme décrit dans le chapitre suivant VI-1). Les autres coupes sont dans un premier temps récupérées en « flottantes » dans des puits de plaques de culture cellulaire « 24 puits » (Falcon), remplis avec 2 mL de tampon PBS 0,1M (pH = 7,4), avant d'être transférées dans un tampon anti-congelant contenant 10% de solution PB 0,2 M, 30% glycérol (Prolabo) et 30% d'éthylène glycol (Prolabo), puis conservées à -20°C.

I-3. Culture cellulaire

Les cellules d'origine neuronale de rat PC12 ont été maintenues dans une flasque de culture cellulaire dans une atmosphère humidifiée (à 90%) comprenant 95% d'air et 5% de CO₂ à 37°C. Le milieu de culture (PC12 complete medium", PC12CM) est composé d'un milieu « Duplecco's modified Eagle's » (DMEM, Eurobio # CM1DME60K) supplémenté avec 7% de sérum de cheval inactivé, 7% de sérum de veau fœtal et de différents antibiotiques (80 unités / mL de pénicilline et 80 mg / mL streptomycine). Le milieu de culture a été changé tous les 2 jours. Après décollage mécanique, les cellules PC12 ont été cultivées dans des boîtes de culture cotée avec du collagène (Biocat) avec une densité cellulaire de 300 cellules / mm² et dans du milieu PC12CM. Après 3 jours (jour 0; J0), un premier groupe de cellules a été récolté et leurs ARNm extraits, alors qu'un deuxième groupe a été traité avec 50 ng / mL de NGF de souris recombinante 2.5S (Promega) ajouté dans un milieu de culture DMEM

complété avec 1% de sérum de cheval et des antibiotiques. Ces dernières ont été récoltées pour en extraire leurs ARNm à J1 et J3 après traitement.

II. Analyse moléculaire :

Quantification des ARN messagers par RT calibrée et PCR en « temps réel »

II-1. Transcription Inverse (RT) calibrée

II-1.1. Calibration de la transcription inverse par l'ARN de synthèse

Au sein de l'équipe, une technique d'étalonnage de la réaction de RT a été développée, sur la base de l'utilisation d'un ARN de synthèse, appelé SmRNA, permettant d'évaluer la qualité de la réaction et de normaliser les échantillons entre eux. Cette invention est protégée par un brevet mondial (Morales et Bezin (2004) ; WO2004.092414) enregistré et déposé au nom du CNRS et de l'université Claude Bernard Lyon 1 avec comme co-inventeurs les Drs Laurent Bezin et Anne Morales. Celui-ci a été créé de façon à i) posséder une queue poly(A) ainsi qu'une séquence nucléotidique différente de toutes celles référencées actuellement dans l'ensemble des bases de données, tous génomes confondus, d'où son qualificatif « d'hétérologue », et ii) à ce que ses séquences nucléotidiques, servant à l'amorçage de la synthèse de son ADNc durant la réaction de PCR, ne permettent pas l'amplification des ADNc issus de la transcription inverses des ARN messagers des échantillons expérimentaux prélevés chez différentes espèces animales (homme, souris, rat, gammare, *arabidopsis thaliana*), d'où son qualificatif de « non-compétitif ». Ce deuxième critère a rendu la création de la séquence de cet ARN de synthèse particulièrement difficile puisque de nombreuses amorces, qui répondaient au second critère de sélection, permettaient l'amplification des ADNc de séquences inconnues présents dans nos échantillons expérimentaux.

II-1.2. Réaction de transcription inverse calibré

Le principe de cet étalonnage réside dans l'ajout d'une quantité connue d'ARN de synthèse dans le milieu réactionnel de la RT.

II-1.2.1. Réaction de transcription inverse sur 500 ng d'ARN totaux

Pour les échantillons individuels d'ARN totaux. La réaction de RT est réalisée dans des tubes à faible pouvoir de rétention (gamme « maximum recovery » ; Axygen) avec pour chacun des échantillons, un volume réactionnel final de 20 µL, comprenant 12 µL de la solution d'ARN totaux purifiés, ramenée à la concentration de 41,7 ng/µL, et 8 µL d'un mélange réactionnel contenant : 100 U de M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus (Promega), le tampon de l'enzyme, 0,5 mM de chacun des dNTPs (Promega), 1 µg d'amorces oligo(dT)₁₅ (Eurobio) et 80 pg de SmRNA. Les RT de chacun des échantillons sont réalisées en même temps à partir d'un même mélange réactionnel. Après une incubation d'1 heure et 30 minutes à 42°C, l'activité de la transcriptase inverse est inhibée par la chaleur (15 minutes à 70°C). Pour chaque échantillon, la solution d'ADNc obtenue est diluée dans 80 µL d'eau UP (Eurobio) puis fractionnée en aliquots de 5 µL dans des tubes « maximum recovery ». Les aliquots sont conservée à -25°C.

II-1.2.2. Réaction de transcription inverse sur 1 µg d'ARN totaux

Pour les pools d'ARN totaux. La réaction de RT est réalisée dans des tubes à faible pouvoir de rétention (gamme « maximum recovery » ; Axygen) avec pour chacun des échantillons, un volume réactionnel final de 40 µL, comprenant 24 µL de la solution d'ARN totaux purifiés, ramenée à la concentration de 41,7 ng/µL, et 16 µL d'un mélange réactionnel contenant : 200 U de M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus (Promega), le tampon de l'enzyme, 1 mM de chacun des dNTPs (Promega), 2 µg d'amorces oligo(dT)₁₅ (Eurobio) et 80 pg de SmRNA. Les RT de tous les pools correspondant à une même structure cérébrale sont effectuées en même temps et en tripliquées, à partir d'un mélange réactionnel identique. Après une incubation d'1 heure et 30 minutes à 42°C, l'activité de la transcriptase inverse est inhibée par la chaleur (15 minutes à 70°C). Pour chaque échantillon, la solution d'ADNc obtenue est diluée dans 60 µL d'eau UP (Eurobio) puis fractionnée en aliquots de 5 µL dans des tubes « maximum recovery ». Les aliquots sont conservée à -25°C.

II-2. Amplification des ADNc d'intérêts par la technique de PCR en « temps réel » sur Lightcycler™

II-2.1. Principe de la PCR en « temps réel »

L'amplification des ADNc d'intérêts a été réalisée par la technique de PCR en « temps réel » sur un Lightcycler™ (Roche). Le développement de ce thermocycleur a résulté de la convergence de deux principes fondamentaux qui sont, d'une part, le transfert de chaleur par convection d'air chaud ou froid, et d'autre part, le suivi en « temps réel » de la cinétique complète de l'amplification des ADNc. De plus, l'utilisation de tubes de capillaires (verre de borosilicates) qui présente une grande surface de contact avec le milieu ambiant, i) facilite les échanges thermiques lors de la réaction d'amplification, ii) assure une répartition homogène des variations thermiques sur l'ensemble du tube et enfin, iii) diminue de façon importante les temps de chacune des différentes étapes qui composent la réaction de PCR.

Le principal avantage de cette technique est le suivi cycle par cycle de l'amplification des ADNc d'intérêts, ce qui permet de déterminer précisément les cycles au-delà desquels l'amplification n'est plus exponentielle donc plus quantitative. Ce suivi est rendu possible grâce à l'utilisation d'un agent intercalant fluorescent appelé SYBR Green I, qui n'est pas fluorescent sous sa forme libre, mais qui émet de la fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 521 \text{ nm}$) lorsqu'il s'intercale au niveau de l'ADN double brin. Chaque cycle d'amplification de l'ADN est composé d'une étape de dénaturation, d'une étape d'hybridation et enfin d'une étape d'élongation à la fin de laquelle de l'ADN double brin est obtenu. Une lecture spectrofluorométrique est réalisée par le Lightcycler™ à chaque fin de cycle d'amplification afin de déterminer avec une grande précision la quantité d'ADNc qui a été amplifiée et qui s'est accumulée dans le capillaire. Les données, acquises en temps réel, sont ensuite traitées directement par un logiciel, associé au Lightcycler™, à l'aide de la méthode du « maximum de la dérivée seconde », qui permet de déterminer de façon reproductible un cycle de PCR appartenant à la phase détectable et exponentielle de la PCR. Ce cycle est appelé « point de sortie », et sera utilisé afin de comparer les quantités d'ADNc ciblé dans les différents échantillons. La conversion du « point de sortie » d'un échantillon en une quantité d'ADNc est rendue possible par la réalisation au préalable d'une gamme d'étalonnage.

II-2.2. Etalonnage de la réaction de PCR en « temps réel »

II-2.2.1. Principe

Pour chacun des ADNc ciblés, dans le but d'étalonner la réaction d'amplification, une gamme étalon est réalisée sur une fenêtre de concentration allant de 10 à 10⁸ copies, les points de sortie correspondant devant encadrer ceux des échantillons dosés. Pour chacun des gènes d'intérêt, la droite de régression obtenue corrèle le point de sortie au nombre de copies initialement contenu dans chaque point de gamme. La gamme étalon permet d'extrapoler, pour un échantillon, sa valeur initiale en ADNc à partir de son point de sortie.

Pour un gène donné, la gamme étalon a été réalisée à partir d'une solution purifiée et de concentration connue de l'ADNc ciblé, appelé aussi « standard pur », qui subit une série de dilutions en cascade au 10^{ème}, dans de l'eau UP, pour obtenir une gamme entre 10 et 10⁸ copies. Chaque point de dilution, appelé « standard dilué », est choisi de façon à ce que l'ensemble des points de la gamme encadre le « point de sortie » des échantillons à doser. Après dosage du standard pur, la concentration en ng/μL est convertie en nombre de copies/μL grâce à la valeur de la masse molaire et du nombre d'Avogadro. L'équation de la droite étalon, obtenue à partir de l'amplification des ADNc spécifiques contenus dans chaque point de gamme, permet i) de mettre en relation le « point de sortie » d'un échantillon donné avec le nombre de copies d'ADNc présentes dans celui-ci avant la réaction de PCR et ii) de calculer le coefficient d'efficacité de la réaction de PCR (compris communément entre 1,6 et 2) à partir de son coefficient directeur. L'équation de la droite étalon est la suivante :

$$\text{Point de sortie} = \text{coefficient directeur} \times \text{nombre de copies} + \text{ordonnée à l'origine}$$

II-2.2.2. Réalisation de la gamme d'étalonnage

La préparation du « standard pur » est réalisée sur un thermocycleur conventionnel (PCR Express ; Hybaid) à l'aide du couple d'amorces identique à celui utilisé sur LightcyclerTM et de deux types d'ADN polymérase : la HotStar Taq polymérase (HST) (Qiagen) qui amplifie l'ADNc cible et la Proof Star DNA polymérase (Qiagen) qui corrige, grâce à son activité 3' exonucléasique, les erreurs de répliation produite par la HST, afin d'obtenir un « standard pur » absent de toute mutation.

Le mélange réactionnel est composé de 300 μM de dNTPs, 0,5 μM de chacune des amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt, 2 μL d'ADNc obtenus à partir d'une

RT d'ARN messagers provenant d'un organe de rat où l'on sait que l'expression de notre gène d'intérêt y est forte et de 5U de HST. Après une incubation de 13 minutes à 95°C, la réaction est arrêtée par le dépôt du tube contenant la réaction sur la glace, la Proof Star DNA polymerase (0,05U) est ajoutée, puis la réaction est à nouveau activée par une incubation de 2 minutes à 95°C. L'ADNc cible est alors amplifié durant 50 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C durant 10 secondes, une étape d'hybridation de 60°C durant 60 secondes et enfin, une étape d'élongation à 68°C durant 25 secondes. Après l'étape d'élongation finale (68°C ; 5 minutes), le produit de la PCR est purifié à l'aide du kit de purification « PCR MiniElute » (Qiagen). Le produit d'amplification est dosé par spectrophotométrie dans une UVette et sa taille est vérifiée après migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5%.

Une cascade de dilution au 10^{ème} du « standard pur » est alors réalisé dans de l'eau UP (Eurobio) afin d'obtenir entre 10 et 10⁸ copies de l'ADNc cible déterminés de façon à ce que leurs « point de sortie » respectifs, après amplification sur LightcyclerTM, encadrent ceux des échantillons.

II-2.3. Amplification des ADNc d'intérêt

II-2.3.1. Choix des couples d'amorces

Les séquences des différents couples d'amorces (Tableau M1) ont été choisies à l'aide du logiciel en-ligne « primer 3 » (NIH : <http://www.basic.nwe.edu>) et synthétisées par le laboratoire Eurobio.

Idéalement, les amorces ne doivent pas dimériser pour ne pas diminuer leurs disponibilités durant la réaction d'amplification des ADNc. Nous avons donc défini 3 critères de sélection fondamentaux des couples d'amorces : i) minimisation extrême des complémentarités internes des séquences de façon à limiter la formation d'épingle à cheveux, ii) minimisation de la complémentarité intrinsèque à l'extrémité 3'-OH des amorces afin d'éviter le phénomène « d'auto-dimérisation » et enfin, iii) minimisation maximale de la complémentarité entre les amorces, en particulier au niveau de leurs extrémités 3'-OH.

ADNc amplifié	Amorces	Taille de l'amplificon (paire de base)	Référence GenBank
<i>aHIF</i>	5'- TTT GTG TTT GAG CAT TTT AAT AGG C -3' 5'- CCA GGC CCC TTT GAT CAG CTT -3'	279	U85044.1
<i>βc</i>	5'- CCT GGT GGC TCT CTG CTG -3' 5'- GCA GAG TCT TCA GAG GGA CAG -3'	68	NM_133555
<i>BDNF exon V</i>	5'- AAA TTA CCT GGA TGC CGC AA -3' 5'- CGC CAG CCA ATT CTC TTT TT -3'	345	X67108
<i>Epo</i>	5'- GCT CCA ATC TTT GTG GCA TC -3' 5'- ATC CAT GTC TTG CCC CCT A -3'	66	NM_017001
<i>Epo-R</i>	5'- CCA GCT CTA AGC TCC TGT GC -3' 5'- CTT CAG GTG AGG TGG AGT GG -3'	68	D13566
<i>HIF-1α</i>	5'- CTC AGA GGA AGC GAA AAA TGG -3' 5'- AAT TCT TCA CCC TGC AGT AGG -3'	307	Y09507

Tableau M1. Séquences des couples d'amorces nucléotidiques utilisées pour l'amplification des gènes d'intérêt par PCR en « temps réel ». Les séquences des différents couples d'amorces ont été choisies à l'aide du logiciel en-ligne « primer 3 » (NIH : <http://www.basic.nwe.edu>) en prenant en compte les 3 critères de sélection fondamentaux suivants : i) minimisation extrême des complémentarités internes des séquences de façon à limiter la formation d'épingle à cheveux, ii) minimisation de la complémentarité intrinsèque à l'extrémité 3'-OH des amorces afin d'éviter le phénomène « d'auto-dimérisation » et enfin, iii) minimisation maximale de la complémentarité entre les amorces, en particulier au niveau de leurs extrémités 3'-OH. Bleu = séquence sens ; Gris = séquence anti-sens.

Pour chaque couple d'amorces, nous avons sélectionné le kit de PCR en temps réel avec lequel l'efficacité de la PCR est la meilleure.

L'amplification de l'Epo, de l'Epo-R, de la βc et de HIF-1α a été réalisée à l'aide du kit d'amplification QuantiTect SYBR Green I (Qiagen), avec un volume réactionnel contenu dans le tube capillaire constitué de 5 μL d'ADNc cible et de 15 μL de mélange réactionnel comprenant 4 μL d'eau UP, 10 μL de QuantiTect Master Mix à la concentration 2x (Qiagen) et 1 μL d'un mélange des amorces sens et anti-sens spécifique à la concentration de 10 μM. En revanche, l'amplification de aHIF et du BDNF a été réalisée avec le kit LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) avec un volume réactionnel final comprenant 5 μL d'ADNc ciblé, 2,75 μL d'eau UP, 1 μL de MgCl₂ à la concentration finale de 3,5 mM, 1 μL de mélange « HotStar reaction Mix » à la concentration 10x (Roche) et 0,25 μL d'amorces spécifiques à la concentration de 10 μM chacune.

Les conditions d'amplification et de fusion de chaque ADNc cibles sont présentées dans le tableau M2 (les séquences des amorces et les conditions d'amplification de l'ARN de synthèse sont protégées par le brevet mondial WO2004.092414. et gardées confidentielles).

II-2.3.3. Identification des ADNc amplifiés

Chaque ADN double-brin amplifié possède un point de fusion (T_m) spécifique, défini comme la température pour laquelle 50% des ADNc contenus dans l'échantillon en fin de réaction de polymérisation sont sous forme double-brin alors que les 50% restant sont sous la forme simple brin. La T_m est déterminée lors de l'étape de « fusion », réalisée après le dernier cycle d'amplification. Elle se compose de 3 phases : i) la température est, tout d'abord, élevée à 95°C avec une vitesse de 20°C/sec, afin d'obtenir uniquement des ADNc sous la forme simple brin, ii) puis elle est abaissée, à la même vitesse, à une température supérieure de 10°C à la température d'hybridation des amorces de façon à ce que l'ensemble des ADNc se soit réhybridé, et enfin iii) la température est augmentée très lentement (0,1°C/sec) jusqu'à 95°C de façon à obtenir une déshybridation lente des ADNc. La fluorescence est lue en continue durant toute l'étape de fusion. Le calcul de la dérivée négative de la fluorescence ($-dF/dT$), sous forme d'un pic de fluorescence en fonction de la température, permet de s'assurer de la présence d'un seul pic de fusion montrant qu'un seul type d'ADNc a été amplifié.

De plus, lors de la phase de validation de la spécificité de nos différents couples d'amorce, les produits d'amplification subissent une étape de refroidissement après la phase de fusion, où les ADN simples brins se réhybrident. Cela permet ainsi de vérifier l'identité du produit amplifié après migration sur un gel d'agarose à 1,5% et la mise en évidence d'une seule bande à la taille de l'amplificon.

ADNc amplifié	Dénaturation initiale	Amplification			Fusion			Refroidissement	Equation de la droite étalon	Efficacité
		Dénat.	Hybrid.	Elong.	Dénat.	Hybrid.	Elong.			
aHIF	95°C	95°C	60°C	72°C	95°C	70°C	98°C	40°C	$y = -3,5982x + 46,216$	1,896
	10 min	15 sec	6 sec	12 sec	0 sec	20 sec	0,1°C/sec	30 sec		
βc	95°C	94°C	58°C	72°C	95°C	68°C	98°C	40°C	$y = -3,0769x + 31,852$	2,114
	15 min	15 sec	30 sec	8 sec	0 sec	20 sec	0,1°C/sec	30 sec		
BDNF exon V	95°C	95°C	60°C	72°C	95°C	70°C	95°C	40°C	$y = -3,5354x + 36,412$	1,918
	15 min	15 sec	7 sec	14 sec	0 sec	20 sec	0,1°C/sec	30 sec		
Epo	95°C	94°C	58°C	72°C	95°C	68°C	98°C	40°C	$y = -3,3535x + 41,468$	1,987
	15 min	15 sec	30 sec	8 sec	0 sec	20 sec	0,1°C/sec	30 sec		
Epo-R	95°C	94°C	58°C	72°C	95°C	68°C	98°C	40°C	$y = -3,3664x + 39,965$	1,982
	15 min	15 sec	30 sec	8 sec	0 sec	20 sec	0,1°C/sec	30 sec		
HIF-1α	95°C	94°C	58°C	72°C	95°C	68°C	98°C	40°C	$y = -3,8089x + 39,262$	1,83
	15 min	15 sec	30 sec	15 sec	0 sec	20 sec	0,1°C/sec	30 sec		

Tableau M2. Conditions d'amplification des gènes d'intérêt par PCR en « temps réel » sur Lightcycler™. Les ADNc qui sont sous la forme simple brin à la suite de l'étape de dénaturation initiale, sont amplifiés durant 50 cycles d'amplification. Chaque cycle d'amplification de l'ADN est composé d'une étape de dénaturation, d'une étape d'hybridation et enfin d'une étape d'élongation à la fin de laquelle de l'ADN double brin est obtenu. Une lecture de la fluorescence émise par le SYBR Green I intercalé dans l'ADN double brin est réalisée par le Lightcycler™ à chaque fin de cycle d'amplification afin de déterminer avec une grande précision la quantité d'ADNc qui a été amplifiée et qui s'est accumulée dans le capillaire. Le traitement informatique en temps réel des résultats permet le suivi cycle par cycle de l'amplification des ADNc d'intérêts et de déterminer le « point de sortie ». L'étape de « fusion » permet de calculer le point de fusion spécifique (Tm) de l'ADN amplifié, représenté par un pic de fluorescence en fonction de la température, et de s'assurer ainsi qu'un seul type d'ADNc a été amplifié. On notera que seuls les couples d'amorces assurant une efficacité de PCR comprise entre 1,6 et 2 sont sélectionnés.

III. Analyses histologiques

III-1. Coloration au crésyl violet

L'ensemble des marquages immunohistochimiques a été réalisé au niveau de l'hippocampe dorsal (IA = +5,40 mm ; [206]). Afin que l'ensemble des coupes utilisées soit localisé dans le même plan anatomique, une étape dite de « recalage anatomique » par coloration au crésyl violet (Merck) a été réalisée sur l'ensemble des cerveaux perfusés. Le crésyl violet est un marqueur qui colore les corps de Nissl des cellules permettant ainsi de visualiser différents repères anatomiques afin de situer la position de la coupe sur l'axe caudo-rostral du cerveau. Les coupes sont montées sur des lames gélatinées à 1%. Une fois sèches, elles sont plongées dans une solution de crésyl-violet-acétate (à 0,5% poid/volume, CH₃CO₂Na 12,2 mM, pH = 3,5) durant 5 minutes, déshydratées dans des bains successifs d'éthanol respectivement à 50% (1 minute), 70% (1 minute), 95% (10 minutes) et 100% (6 minutes), puis « délipidées » dans un bain de xylène (10 minutes) avant le montage dans le milieu DPX (Fluka) afin de les conserver.

III-2. Coloration au Fluoro-Jade B

Une coloration des coupes de cerveaux au Fluoro-Jade B a été réalisée pour localiser spécifiquement, au niveau de l'hippocampe, les neurones en dégénérescence à la suite du Pilo-SE [211]. Les coupes de cerveaux sélectionnées (IA = +5,40 mm ; [206]) ont été montées sur des lames gélatinées avant d'être immergées dans des bains successifs : d'éthanol à 80% et NaOH à 1% (5 minutes), d'éthanol à 70% (2 minutes), d'eau distillée (2 minutes) et de permanganate de potassium à 0,06% sous agitation (10 minutes). Après un rinçage rapide dans de l'eau distillée (2 minutes), les lames sont immergées durant 20 minutes à l'obscurité dans une solution de Fluoro-Jade B (Chemicon) à 0,0004% préparée dans une solution d'acide acétique à 0,1%. Les coupes sont ensuite rapidement rincées dans de l'eau distillée (3 fois 1 minute) et égouttées (15 secondes) avant d'être séchées complètement durant 10 minutes à 50°C. Enfin, les coupes sont placées dans un bain de xylène durant 1 minute puis montées dans un milieu DPX (Fluka), puis conservées à 4°C.

Les coupes marquées ont été observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 ; Leica microsystemes SA). Le Fluoro-Jade B a été excité avec une longueur d'onde de 480 nm et le logiciel d'analyse, couplé au microscope, a récupéré la fluorescence émise, à l'aide d'un filtre fluorescéine/FITC, à la longueur d'onde de 525 nm (vert).

III-3. Détections immunohistochimiques

Les différents anticorps (Ac) primaires et secondaires utilisés pour l'ensemble des détections immunohistochimiques dans ce chapitre sont répertoriés dans le tableau M3.

Protéines cibles	Animal source	Type	Dilution	Milieu d'incubation	Référence
Epo	Lapin	Polyclonal	1 : 250	PBS-T-D ₁	Sc-7956 ; Santa Cruz
Epo-R	Lapin	Polyclonal	1 : 500	PBS-T-D ₁	Sc-697 ; Santa Cruz
βc	Lapin	Polyclonal	1 : 100	PBS-T-D ₂	Sc-678 ; Santa Cruz
NeuN	Souris	monoclonal	1 : 1000	PBS-T-D ₂	MAB-377 ; Chemicon
GFAP	Souris	monoclonal	1 : 2500	PBS-T-D ₂	G3893 ; Sigma
OX-42	Souris	monoclonal	1 : 2000	PBS-T-D ₂	CBL1512Z ; Chemicon
CGRP	Chèvre	Polyclonal	1 : 500	PBS-T-D ₂	1720-9007 ; Biogenesis
GAD65/67	Souris	monoclonal	1 : 10 000	PBS-T-D ₂	GC-3108 ; Santa Cruz
<i>Anti-IgG Lapin</i>	Ane	-	1 : 1000	PBS-T-D ₂	711-066-152 ; JIR
<i>Anti-IgG Souris</i>	Ane	-	1 : 1000	PBS-T-D ₂	715-065-151 ; JIR
<i>Anti-IgG Chèvre</i>	Ane	-	1 : 1000	PBS-T-D ₂	705-066-147 ; JIR
<i>A488 - Anti-IgG Lapin</i>	Ane	-	1 : 500	PBS-T-D ₂	A-21206 ; Molecular Probes
<i>A633 - Anti-IgG Souris</i>	Chèvre	-	1 : 500	PBS-T-D ₂	A-21052 ; Molecular Probes

Tableau M3. Récapitulatif des différents anti-corps primaires et secondaires utilisés lors des détections immunohistochimiques (simple marquage colorimétrique ou double marquage fluorescent) des protéines d'intérêt. Gras = Ac primaire ; Italique = Ac secondaire.

III-3.1. Détections immunohistochimiques de l' Epo, de l'Epo-R et de la β c

Des coupes de cerveaux, localisées dans le plan d'intérêt (IA = +5,40 mm ; [206]), ont été traitées pour la détection des protéines Epo, Epo-R et β c à l'aide d'un protocole immunohistochimique à révélation colorimétrique. De plus, des coupes adjacentes à celles-ci ont servi pour réaliser des doubles marquages fluorescents des protéines Epo ou Epo-R avec NeuN, GFAP et OX-42.

III-3.1.1. Détections par simple marquage colorimétrique

Les coupes flottantes perfusées sont retirées de l'anti-congelant, rincées abondamment avec du PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS 0,1M (PBS) avec 0,5% de triton X100 (PBS-T 0,5%) ; cela permet de perméabiliser le tissu et de favoriser ainsi la pénétration de l'Ac. Les coupes sont ensuite incubées pendant 2 heures à température ambiante (TA) dans du PBS avec 0,3% de triton X100 et 2% de sérum normal d'âne (PBS-T-D₂) pour permettre la saturation des sites antigéniques non spécifiques qui pourraient être reconnus par l'anticorps secondaire. De plus, une étape de saturation des biotines endogènes est réalisée à l'aide d'un kit (AbCys) : les coupes sont incubées dans une solution d'Avidine D pendant 10 minutes, puis rincées 5 minutes dans du PBS, et enfin incubées dans une solution de Biotine durant 10 minutes. Cette étape a pour but d'empêcher la détection des biotines endogènes lors de la reconnaissance des biotines greffées sur les anticorps secondaire. Après un lavage de 5 minutes, les coupes sont ensuite incubées, une nuit à TA sous agitation, avec un Ac polyclonal de lapin dirigé soit contre l'Epo (sc-7956 ; Santa Cruz), soit contre l'Epo-R (sc-697 ; Santa Cruz) dilués respectivement au 1 : 250 et au 1 : 500 dans du PBS-T avec 1% de sérum normal d'âne (PBS-T-D₁), soit contre la β c (sc-678 ; Santa Cruz) dilué au 1 : 100 dans du PBS-T-D₂.

Les coupes sont rincées 2 fois dans du PBS-T, 1 fois dans du PBS, puis incubées avec un Ac secondaire biotinylé d'âne anti-Immunoglobuline G (IgG) de lapin (715-066-152 ; Jackson Immunoresearch) dilué au 1 : 1000 dans du PBS-T-D₂. L'incubation se fait sur la nuit à 4°C sous agitation. Au cours de cette réaction, l'Ac secondaire va venir reconnaître spécifiquement la seule IgG de lapin présente au niveau du tissu qui correspondant aux Ac primaires dirigés contre l'Epo, l'Epo-R et la β c.

Après 3 rinçages dans du PBS afin d'éliminer les anticorps secondaires qui ne se sont pas liés avec un Ac primaire, les coupes sont incubées pendant 1 heure à TA avec le complexe avidine biotine peroxydase, dilué au 1 : 1000 dans du PBS (Kit Vectastain Elite ABC peroxydase standard, VPK-6100 ; Vector). Les coupes sont rincées 3 fois dans du PBS puis la révélation des protéines cibles, présentes dans le tissu, est réalisée par une incubation des coupes durant 10 minutes dans une solution de diaminobenzidine (DAB) (D-4293 ; Sigma Fast), contenant de l'eau oxygénée (H₂O₂). La peroxydase du complexe ABC réagit avec la solution H₂O₂/DAB pour former un précipité brun.

Les coupes sont abondamment rincées dans du PBS afin de stopper la réaction colorimétrique, puis à l'eau de robinet. Elles sont ensuite montées sur des lames gélatinées à 1%. Une fois sèches, elles sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à 50% (rapide), 70% (rapide), 95% (10 minutes) et 100% (6 minutes), puis « délipidées » dans un bain de xylène (10 minutes) et placées entre lame et lamelle dans le milieu DPX (Fluka).

III-3.1.2. Détections par doubles marquages fluorescents de l'Epo ou de l'Epo-R avec NeuN, GFAP et OX-42

Les coupes flottantes perfusées sont retirées de l'anti-congelant, rincées abondamment avec du PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS-T 0,5%. Les coupes sont ensuite incubées pendant 2 heures à TA dans du PBS-T-D₂ puis une nuit à TA sous faible agitation, avec différents couples d'Ac primaires, composés de l'Ac polyclonal de lapin dirigé contre l'Epo (1 : 250, sc-7956 ; Santa Cruz) ou l'Epo-R (1 : 500, sc-697 ; Santa Cruz) associés soit à l'Ac monoclonal de souris anti-NeuN (1 : 1000, MAB-377 ; Chemicon), soit à l'Ac monoclonal de souris anti-GFAP (1 : 2500, G3893 ; Sigma), soit à l'Ac monoclonal de souris anti-OX-42 de rat (1 : 2000, CBL 1512 ; Chemicon), tous dilués dans du PBS-T-D₂.

Les étapes suivantes ont été réalisées à l'abri de la lumière. Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS puis incubées sous agitation durant 1 nuit à 4°C puis 2 heures à TA avec l'Ac secondaire d'âne anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa-488 (A-21206 ; Molecular Probes) et l'Ac secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'Alexa-633 (A-21052 ; Molecular Probes). Les Ac secondaires fluorescents ont tous été dilués au 1 : 500 dans du PBS-T-D₂. Les coupes sont lavées 3 fois 10 minutes dans du PBS, 1 fois dans de l'eau du robinet, montées sur lames SuperFrost Plus, séchées à TA et montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage spécifique à la fluorescence (ProLong[®] Gold Antifade reagent, Molecular Probes).

III-3.2. Détections immunohistochimiques colorimétriques des protéines NeuN, CGRP et GAD 65/67

Des coupes de cerveaux, localisées dans le plan d'intérêt (IA = +5,40 mm ; [206]), ont été traitées à l'aide d'un protocole immunohistochimique à révélation colorimétrique pour la détection de la protéine NeuN ainsi que les protéines CGRP et GAD 65/67 sur les coupes adjacentes.

III-3.2.1. Détection de NeuN

Les coupes flottantes perfusées sont retirées de l'anti-congelant, rincées abondamment avec du PBS puis incubées pendant 1 heure à TA dans du PBS-T-D₂. Les biotines endogènes sont saturées à l'aide d'un kit spécifique (SP-2001 ; AbCys), puis les coupes sont incubées durant un jour et demi à 4°C avec un Ac monoclonal de souris anti-NeuN (MAB-377 ; Chemicon) dilué au 1 : 2000 dans du PBS-T-D₂. Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans du PBS-T puis incubées durant 1 nuit à 4°C avec un Ac biotinylé d'âne anti-IgG de souris (715-065-151 ; Jackson Immunoresearch) dilué au 1 : 1000 dans du PBS-T-D₂. Les coupes sont rincées 3 fois dans du PBS, incubées 15 minutes à TA dans une solution de H₂O₂ à 0,1% finale, préparée dans du PBS, afin de bloquer les peroxydases endogènes, puis rincées 3 fois dans du PBS avant d'être incubées durant 1 heure et 30 minutes dans le complexe avidine biotine peroxydase (VPK-6100 ; Valbiotech). Les protéines NeuN tissulaires sont révélées par une incubation de 10 minutes dans une solution de DAB (D-4293 ; Sigma Fast). Les coupes sont montées sur lames, déshydratées dans différents bains d'éthanol, « délipidées » dans un bain de xylène et enfin, placées entre lame et lamelle dans du DPX (Fluka).

III-3.2.2. Détections par simple marquage colorimétrique de la CGRP et de la GAD 65/67

Les coupes flottantes perfusées sont retirées de l'anti-congelant, rincées abondamment avec du PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS-T 0,5%. Les coupes sont incubées pendant 2 heures à TA dans du PBS-T-D₂ suivi d'une étape de saturation des biotines endogènes à l'aide d'un kit spécifique (SP-2001 ; AbCys). Les coupes sont incubées durant une nuit à TA avec l'Ac polyclonal de chèvre anti-CGRP de rat (1720-9007 ; Biogenesis) ou l'Ac monoclonal de souris anti-GAD 65/67 (GC-3108 ; Santa Cruz) dilués respectivement au 1 : 500 et au 1 : 10 000 dans du PBS-T-D₂. Les coupes sont rincées 2 fois 10 minutes dans du PBS-T puis une fois dans du PBS avant d'être incubées, durant 1 nuit à 4°C, respectivement avec un Ac biotinylé d'âne anti-IgG de chèvre (705-066-147 ; Jackson Immunoresearch) et un Ac biotinylé d'âne anti-IgG de souris (715-065-151 ; Jackson Immunoresearch) dilués au 1 : 1000 dans du PBS-T-D₂. Les coupes sont rincées 3 fois dans du PBS, incubées 15 minutes à TA dans une solution de H₂O₂ à 0,1% finale préparée dans du PBS, rincées 3 fois dans du PBS et incubées durant 1 heure et 30 minutes dans le complexe avidine biotine peroxydase (VPK-6100 ; Valbiotech). Les protéines CGRP et GAD 65/67 tissulaires sont révélées après une incubation de 10 minutes dans une solution de DAB (D-4293 ; Sigma Fast). Les coupes sont montées sur lames, séchées à TA, déshydratées dans différents bains d'éthanol, « délipidées » dans un bain de xylène et enfin, montées entre lame et lamelle dans du milieu de montage DPX (Fluka).

III-4. Détection dans le tissu cérébrale de l'érythropoïétine recombinante humaine par ELISA

La détection de la rHuEpo a été réalisée sur des homogénats de tissu frais ainsi que sur des sérums de prélèvements sanguins à l'aide du kit d'ELISA « Human Erythropoietin Quantikine IVD » (R&D system). Pour ce faire, les hippocampes et les néocortex, qui avaient été pesés avant d'être congelés dans une solution de nitrogène, ont été homogénéisés respectivement dans 150 µL et 300 µL de NaCl à 0,9%. Après centrifugation des homogénats tissulaires (12 000 x g durant 20 minutes à 4°C) et des prélèvements sanguins (760 x g durant 5 minutes à 4°C), la concentration tissulaire en rHuEpo a été mesurée dans 100 µL de surnageant ou de plasma à l'aide du kit ELISA selon les recommandations du fabricant. Les quantités de rHuEpo tissulaires et sanguines ont été déterminées à l'aide d'une gamme de

dilution allant de 0 à 200 mIU/mL d'Epo avec un seuil de détection inférieur à ~ 1 mUI/mL (donné par le constructeur). Les résultats obtenus pour les échantillons d'hippocampe et de néocortex ont été exprimés en mUI par gramme de tissu (mUI/gt), et en mUI/mL pour les échantillons de plasma sanguin.

IV. Analyses et traitements des données

IV-1. Variables analysées

IV-1.1. Analyse de la quantité des ARN messagers cibles détectés par RT calibrée et PCR en « temps réel »

Pour chacun des échantillons, les valeurs des « points de sortie » de chaque ADNc d'intérêt et de l'ARN de synthèse ont été convertis en nombre de copies à l'aide de l'équation de la droite étalon réalisée pour chacun des gènes cibles (comme décrit dans le chapitre V-2.2.1.). Pour chacun des gènes d'intérêt, sa valeur en nombre de copies est normalisée par celle de l'ARN de synthèse lui correspondant. Cette normalisation permet de prendre en compte i) la reproductibilité de la réaction de RT, puisque la quantité d'ARN de synthèse introduite dans chaque échantillon avant la réaction de RT est constante, et ii) de s'affranchir de l'utilisation d'un « gène de ménage » ou standard interne dont nous avons montré que son expression pouvait être sujette à des variations dans nos conditions expérimentales faussant ainsi l'analyse de nos résultats. La valeur normalisée obtenue pour chacun des gènes d'intérêt est exprimée en nombre de copies d'ADNc initialement présentes dans l'échantillon avant amplification par PCR.

IV-1.2. Analyse des coupes de cerveau traitées par simple marquage colorimétrique

Les comptages cellulaires au niveau du hile et de la *stratum lacunosum moleculare* (SLMo) ainsi que la mesure de la densité neuronale de la couche pyramidale des régions CA1 et CA3 ont été réalisés systématiquement pour les hippocampes droit et gauche de chacun des rats. Les deux valeurs acquises ont ensuite été moyennées pour obtenir un nombre cellulaire ou une densité neuronale globale pour l'ensemble de la structure hippocampique dorsale localisée dans le plan d'intérêt (IA = +5,40 mm ; [206]).

IV-1.2.1. Méthodologie du comptage cellulaire

Les coupes de cerveau traitées par simple marquage colorimétrique avec les marqueurs NeuN ou CGRP ont été observées à l'aide d'un microscope (Diaplan, Leiz) associé à une caméra couleur (DXC 930P tri CCD couleur, Sony Corp.). Le logiciel Visilog® 6.0 (Noesis) permet de scanner une zone de la coupe délimitée par l'observateur sous la forme d'une image dite en « mosaïque » grâce au contrôle d'une platine motorisée (Märzhauseur) montée sur le microscope. L'intérêt de cette opération est de pouvoir en créer une seule image couvrant un large champ du tissu cérébral, à partir de l'accolement automatisé de plusieurs champs capturés avec un objectif de grossissement x20.

La diversité morphologique des neurones qui peuplent les régions du hile et de la SLMo n'a pas permis d'établir un profil « neuronal » standard permettant un comptage automatique des cellules NeuN ou CGRP immunopositives par le logiciel d'analyse d'images Visilog® 6.3. De ce fait, le comptage cellulaire a été réalisé manuellement par deux observateurs, de façon indépendante et en aveugle par rapport aux traitements pharmacologiques, à partir d'images « mosaïques » de l'ensemble de l'hippocampe.

IV-1.2.3. Méthodologie de la mesure de la densité neuronale

Après détection de la protéine NeuN, la couche pyramidale de CA1, directement adjacente à la région CA2, ainsi que celle de CA3 ont été observées au grossissement x20 à l'aide d'un microscope (Diaplan, Leiz) et les images ont été numérisées à l'aide de l'analyseur d'images (Visilog 6.3, Noesis). L'accolement des cellules pyramidales rendant difficile leur dénombrement, nous avons mesuré la surface du marquage dans la couche pyramidale, à l'aide des logiciels de l'analyseur d'images. Pour ce faire, nous avons traité l'image au travers de filtre qui ont permis d'éliminer le marquage associé aux portions proximales des dendrites et de mesurer la surface de marquage systématiquement dans une fenêtre de $282\,440\ \mu\text{m}^2$. La fenêtre de mesure étant constante, la surface de marquage mesurée dans cette espace fournit donc un index de la densité des corps cellulaires des neurones de CA1 et CA3.

IV-1.3. Analyse des coupes traitées par doubles marquages fluorescents

Les coupes doublement marquées ont été observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 ; Leica microsystemes SA). Les fluorochromes couplés aux Ac secondaires

présents sur les coupes sont excités à l'aide d'un laser à l'Argon à une longueur d'onde de 488 nm ou à l'aide d'un laser à l'Hélium-Néon à une longueur d'onde de 633 nm. Le logiciel d'analyse du signal filtre la fluorescence émise par les différents fluorochromes : pour l'Alexa Fluor 488, le logiciel récupère la fluorescence entre 497 et 527 nm (vert) ; pour l'Alexa Fluor 633, le signal est recueilli pour des valeurs de longueur d'ondes comprises entre 550 et 663 nm (rouge). Après avoir défini le niveau d'épaisseur de la coupe où le marquage pour les 2 fluorochromes est le plus intense, une image est capturée sur une épaisseur de coupe de 1 μ m pour les 2 marqueurs fluorescents en deux séquences consécutives. Une fois les images acquises, elles ont été superposées à l'aide du logiciel Adobe PhotoshopTM. Une colocalisation du marquage correspond à une superposition des marquages vert et rouge visible sur l'image par un marquage jaune.

IV-2. Expression des résultats

Pour chaque étude, un nombre n de rats a été utilisé dans chacun des groupes expérimentaux. La moyenne des mesures obtenues pour chaque groupe est calculée, ainsi que « l'erreur standard sur la moyenne » (SEM). Les résultats sont exprimés pour chaque étude par la moyenne \pm SEM des valeurs obtenues.

Lors de la comparaison des variations des niveaux d'expression des ARN messagers cibles à la suite du SE, les valeurs moyennes acquises pour chaque groupe à chacun des temps étudiés ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les témoins \pm SEM.

Lors de la comparaison des différentes quantifications réalisées au niveau du hile et de la SLMo (nombre de cellules immunopositives) et des couches pyramidales des régions CA1 et CA3 (densité neuronale) entre les différents groupes de rats, les valeurs moyennes obtenues pour chaque groupe ont été exprimées en pourcentage de la valeur moyenne obtenue chez les témoins \pm SEM.

IV-3. Analyses statistiques

➤ Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA II), où le facteur « 1 » est la structure cérébrale étudiée et le facteur « 2 » le temps, a été réalisée afin de comparer les variations de quantité i) des ARN messagers codant respectivement pour l'Epo, l'Epo-R, la β c et HIF-1 α et ii) de l'ARN anti-sens aHIF qui ont été détectées au niveau du cortex, de l'hippocampe et de l'hypothalamus au cours du développement.

➤ Une analyse de variance à un facteur (ANOVA I) a été réalisée afin d'étudier les variations des quantités ARN messagers codant pour les différents gènes d'intérêts détectées au cours du temps entre les rats ayant été traités avec de la scopolamine et du diazépam (Contrôles/SD) et les rats témoins naïfs (Contrôles).

➤ Une ANOVA I a été réalisée afin d'étudier les variations des quantités ARN messagers codant pour les différents gènes d'intérêts détectées au cours du temps entre les rats ayant subi un SE induit par pilocarpine et les rats témoins naïfs (Contrôles).

➤ Une analyse de variance à deux facteurs (ANOVA II), où le facteur « 1 » est la valeur de la variable physiologique au cours du temps et le facteur « 2 » est le groupe expérimental, a été réalisée afin de comparer la modulation des variables physiologiques mesurées chez les rats à la suite du Pilo-SE.

➤ Une ANOVA I a été réalisée lors de la comparaison de la dégénérescence neuronale détectée dans différentes régions hippocampiques au cours du temps entre les rats ayant subi un SE induit par pilocarpine et les rats témoins naïfs (Contrôles).

➤ Une ANOVA I a été réalisée lors de la comparaison des différentes variables comportementales mesurées durant la période de SE entre les groupes de rats traités uniquement à la pilocarpine et les rats traités à la pilocarpine et à la rHuEpo.

➤ Une ANOVA II, où le facteur « 1 » représente le nombre de cellules immunopositives comptées ou la densité cellulaire mesurée et le facteur « 2 » représente le traitement pharmacologique des rats, a été réalisée afin de déterminer si l'administration de

rHuEpo protège les neurones vulnérables de l'hippocampe à la suite d'un SE induit par pilocarpine.

A chaque fois que l'ANOVA I ou II était significative, les groupes expérimentaux ont été comparés entre eux à l'aide du test *post-hoc* de comparaison multiple Fisher LSD. Nous avons considéré qu'une différence entre deux valeurs est significative lorsque le risque statistique de premier ordre est inférieur ou égal à 5%.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat® (SPSS inc.).

RESULTATS

I. L'érythropoïétine protège les neurones hippocampiques à la suite du status epilepticus induit par la pilocarpine

I-1. Introduction

L'érythropoïétine (Epo) a été classiquement décrite comme jouant un rôle central au cours de l'hématopoïèse, en favorisant l'augmentation du nombre des érythrocytes circulants dans le sang [129], grâce à la protection des cellules souches érythroïdes contre l'apoptose [100]. La mise en évidence que l'Epo et son récepteur (Epo-R) sont exprimés au sein du système nerveux central chez le rongeur et l'homme [47,138,174,238], au niveau des neurones, des astrocytes, des oligodendrocytes, de la microglie, et des cellules endothéliales [113] a encouragé la recherche d'un nouveau rôle biologique de l'Epo. Rapidement, l'administration exogène d'Epo a révélé des propriétés neuroprotectrices considérables, dans de nombreux modèles *in vitro* et *in vivo* d'agressions neuronales, aussi bien au niveau central que périphérique, survenant à la suite d'un traumatisme crânien, d'une ischémie cérébrale ou d'un processus inflammatoire [22,35,171].

L'Epo recombinante humaine (rHuEpo) administrée par voie systémique traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) [24,79,107,136], et protège les neurones dans différents modèles *in vivo* de pathologie du système nerveux central et périphérique associées à des dommages neuronaux [22,136]. Des études pionnières réalisées chez le rongeur dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal (ELT) ont révélé que la rHuEpo pouvait bloquer le développement du *status epilepticus* (SE), mais n'ont jamais analysé l'effet de la rHuEpo sur la dégénérescence neuronale [24] [262], qui est l'une des principales caractéristiques du SE. Pourtant, les différentes voies de signalisations cellulaires impliquées dans la mort apoptotique des neurones à la suite d'un SE [120] sont connues comme étant les cibles spécifiques de l'effet protecteur de l'Epo [22,171].

De nombreuses études cliniques ont mis en garde contre les effets délétères qui pourraient être associés à une administration chronique de rHuEpo, tels que l'augmentation de la pression sanguine et les risques de thromboses, ainsi que la résistance des cellules tumorales et leur dissémination [22,171], justifiant le développement de molécules dérivées

d'Epo qui conserveraient une action neuroprotectrice mais seraient dépourvues des effets indésirables mentionnés ci-dessus [153]. L'une de ces nouvelles molécules, l'Epo carbamylée (CEpo), présente une très faible affinité pour la forme homodimérique (Epo-R)₂ du récepteur à l'Epo par comparaison à la molécule native de l'Epo, mais possède une activité neuroprotectrice aussi bien au niveau du néocortex [153] que de la moëlle épinière [23,153]. Pourtant, bien qu'il soit largement accepté que l'action neuroprotectrice de l'Epo passe par l'homodimère (Epo-R)₂ [172], de récentes études proposent que cette action soit assurée par un hétérorécepteur atypique impliqué uniquement dans la protection tissulaire [22]. En effet, il a été montré que les effets protecteurs de la CEpo et de la rHuEpo sont abolis chez des souris transgéniques qui expriment normalement l'Epo-R, mais n'expriment pas le gène de la chaîne β commune (β c) des récepteurs au facteur stimulant la prolifération des colonies de macrophages-granulocytes (GM-CSF), à l'interleukine-3 (IL-3) et à l'IL-5 [23,98]. Il a alors été émise l'hypothèse selon laquelle le récepteur à l'Epo atypique serait composé d'une seule sous-unité d'Epo-R associée à un homodimère de la β c [22]. Malheureusement, la description *in situ* de l'expression cérébrale de la β c chez des animaux de phénotype sauvage reste encore inconnue.

Le nombre important de travaux portant sur l'effet protecteur de l'Epo exogène contre la dégénérescence neuronale contraste avec le peu d'intérêt porté à la production d'Epo par le système nerveux central. En particulier, au niveau de l'hippocampe, la description précise des modalités d'expression *in situ* (quantité tissulaire et types cellulaires) de l'Epo et l'Epo-R, font défaut aussi bien à l'état basal que dans des situations traumatiques. Actuellement, la réactivité du système Epo n'a été décrite qu'au niveau du néocortex dans un modèle d'ischémie cérébrale [16], et à la suite de traumatismes infligés au niveau de la moëlle épinière [110] ou au niveau du système nerveux périphérique [34,159]. En revanche, la réactivité du système Epo n'a jamais été étudiée à la suite d'un SE induit par voie pharmacologique, responsable des modifications observées au sein du tissu cérébral qui aboutissent à l'émergence de crises récurrentes présentant de nombreuses ressemblances avec les ELT [261].

Sur la base de l'ensemble de ces observations, nous avons émis les hypothèses selon lesquelles :

❖ L'expression de l'Epo cérébrale est induite en réponse à une période de SE induite par l'administration de pilocarpine pour protéger les neurones vulnérables de l'hippocampe.

❖ L'administration d'Epo recombinante humaine (rHuEpo), par voie systémique, protège efficacement les neurones hippocampiques à la suite d'un SE, en soutenant l'action protectrice de l'Epo endogène cérébrale.

❖ Le signal cellulaire de neuroprotection de l'Epo est induit par sa fixation à un récepteur spécifique : Epo-R/ $(\beta c)_2$.

Notre étude est la première à mettre en évidence :

- Dans les conditions basales, que l'Epo-R est exprimé par la majorité des neurones de l'hippocampe et rarement par les astrocytes alors que l'Epo est exprimé par les neurones et par quelques astrocytes résidents.

- A la suite du SE, au niveau de l'hippocampe : i) une induction transitoire de l'expression de l'Epo par les astrocytes de l'hippocampe, les régions hippocampiques où la population astrocytaire exprimant l'Epo est la plus dense présentant la meilleure robustesse neuronale, et ii) une induction permanente de l'expression de l'Epo-R.

- A la suite du SE, que l'administration de rHuEpo protège significativement les neurones hippocampiques, dont les cellules moussues du hile qui ont été décrites comme les cellules les plus vulnérables à la suite d'un SE.

- Dans les conditions basales, que le niveau de l'expression de la βc au sein de l'hippocampe est très faible par comparaison à la moëlle épinière, alors qu'il est très fortement augmenté à la suite du Pilo-SE mais uniquement au niveau de la microglie activée.

I-2. Résultats

I-2.1. Expression basale et distribution de l'Epo-R et de l'Epo au niveau de l'hippocampe.

Chez les rats contrôles, 983 ± 133 copies d'ADNc codant pour l'Epo-R et 224 ± 55 copies d'ADNc codant pour l'Epo ont été quantifiées par PCR en temps réel réalisée à la suite de la transcription inverse de 500 ng d'ARN totaux d'hippocampe.

Le marquage colorimétrique de l'Epo-R a montré qu'il est exprimé dans l'ensemble des couches neuronales de l'hippocampe (Figure R1A). Les doubles marquages fluorescents de l'Epo-R avec différents marqueurs spécifiques des neurones (NeuN), des astrocytes (GFAP) ou des cellules microgliales (OX-42) ont permis de mettre en évidence que l'expression de l'Epo-R est exclusivement neuronale (Figure R1) mais, à l'inverse, tous les neurones de l'hippocampe n'expriment pas l'Epo-R, en particulier dans la région du hile (comme illustré par les flèches blanches dans la Figure R1B). Le marquage de l'Epo-R est essentiellement localisé au niveau des corps cellulaires des neurones, sauf dans CA1 où un signal intense est visible au niveau de l'arborisation dendritique (Figure R1). De plus, le marquage fluorescent a révélé un marquage intense de type vésiculaire dans l'ensemble de l'hippocampe qui suggère une possible présence de l'Epo-R dans de nombreuses varicosités neuronales. Enfin, l'Epo-R a été rarement observé dans les astrocytes (Figure R2A) et jamais détecté au niveau des cellules microgliales résidentes (résultats non fournis).

Le marquage colorimétrique n'a permis de détecter la présence de l'Epo qu'au niveau de la couche pyramidale de CA3 (résultats non fournis), du péricaryon et des prolongements des neurones du hile (Figure R3A) et de CA3c (résultats non fournis), et dans les cellules granulaires du gyrus denté (résultats non fournis). Dans les autres régions hippocampiques, le marquage obtenu était trop proche du seuil de détection pour être considéré comme fiable. Les doubles marquages fluorescents de l'Epo avec NeuN, GFAP ou OX-42 ont révélé que l'Epo était principalement exprimée par les neurones (résultats non fournis) et par quelques astrocytes présents au niveau du hile (Figure R3E). En revanche, l'Epo n'a jamais été détectée dans la microglie résidente (résultats non fournis).

I-2.2. Expression et distribution basale de la chaîne β commune dans le cerveau de rat.

De récents travaux, réalisés chez la souris dans un modèle de traumatisme de la moëlle épinière, ont suggéré que l'effet neuroprotecteur de la rHuEpo nécessite la présence d'un hétérorécepteur composé de l'Epo-R et de la β c, la sous-unité impliquée dans la transduction du signal cellulaire des récepteurs du GM-CSF, de l'IL-3 et de l'IL-5 [23]. Les résultats que nous avons obtenus chez le rat dans les conditions basales, par la quantification de l'ARN messenger cible par PCR en temps réel réalisée à la suite de la transcription inverse de 500 ng d'ARN totaux tissulaires, ont mis en évidence que le transcript codant pour la β c est exprimé à un faible niveau dans l'hippocampe (702 ± 80 copies) et le néocortex (718 ± 80 copies) en comparaison de la moëlle épinière ($1\ 830 \pm 153$ copies) (Figure R4A). Cette observation explique que le rapport entre les ARN messagers codant pour l'Epo-R et la β c, calculé dans l'hippocampe, est respectivement 1,6 et 3 fois plus fort que les rapports déterminés dans le néocortex et la moëlle épinière (Figure R4B). La détection immunohistochimique de la β c, au niveau de l'hippocampe, a montré que son expression était uniquement restreinte à certains neurones du hile (Figure R5). La comparaison de la localisation protéique de l'Epo-R et de la β c au niveau du gyrus denté et du néocortex indique que le nombre de cellules qui expriment l'Epo-R, dans ces deux régions, est plus important que celui des cellules exprimant la β c (Figure R5).

I-2.3. Expression de l'Epo-R dans l'hippocampe à la suite du SE induit par la pilocarpine.

A la suite du Pilo-SE, la quantité d'ARN messagers codant pour l'Epo-R est fortement augmentée dans l'hippocampe entre 1 jour et 7 jours post-SE, avec un pic d'induction observé à 3 jours post-SE (Figure R2B). Cet effet est spécifique au SE induit par l'administration de pilocarpine (Pilo-SE), étant donné qu'aucune variation d'expression du gène de l'Epo-R n'a été mise en évidence, pour tous les points de la cinétique, entre les rats témoins naïfs (contrôle) et les rats témoins ayant reçu uniquement des injections de scopolamine et de diazépam (contrôle/SD) (Figure R6). Les marquages immunohistochimiques réalisés à 4 jours post-SE ont mis en évidence une réduction de l'intensité et du nombre de neurones marqués au niveau du hile et de CA3c (Figures R2C et E). En revanche, de nouvelles cellules, de type glial, ont été détectées dans l'ensemble des régions de l'hippocampe, comme illustré au niveau du hile (Figures R2C et E) et de CA3 (Figures R2D et F, flèches noires). Ces nouvelles

cellules ont été identifiées comme étant des astrocytes grâce à un double marquage fluorescent GFAP/Epo-R (Figure R2A).

I-2.4. Expression de l'Epo dans l'hippocampe à la suite du Pilo-SE.

A la suite du Pilo-SE, l'expression de l'ARN messager codant pour l'Epo est transitoirement augmenté dans l'hippocampe à 2 jours post-SE (+196% ; $P < 0,001$) (Figure R3F). Les marquages colorimétriques réalisés à 1 jour, 3 jours et 4 jours post-SE ont révélé la disparition du marquage neuronal au niveau du hile, comme illustré à 3 jours post-SE (Figures R3A et C). En revanche, dans certaines couches de l'hippocampe dont les cellules n'exprimaient pas d'Epo dans les conditions basales, comme la *stratum lacunosum moleculare* (SLMo) et la *stratum radiatum* de CA1, l'Epo a été détectée dans de nouvelles petites « cellules rondes » à 3 jours post-SE (Figures R3B et D). Ces nouvelles cellules ont aussi été localisées dans la couche des neurones pyramidaux des régions CA1 et CA3 (résultats non fournis), dans la couche moléculaire du gyrus dentelé (résultats non fournis), et dans le hile (Figures R3A et C). Dans l'ensemble de ces régions, ces petites « cellules rondes » ont été caractérisées comme étant des astrocytes GFAP-immunopositifs (Figure R3E, flèches blanches). Enfin, l'Epo n'a jamais été détectée au niveau de la microglie activée OX-42-immunopositive présente dans l'hippocampe à la suite du SE (résultats non fournis).

De plus, nos résultats ont mis en évidence une activation génique du facteur de transcription HIF-1, qui contrôle l'expression de l'Epo. En effet, une augmentation du niveau d'expression de l'ARN messager codant pour HIF-1 α , la sous-unité fonctionnelle de HIF-1, a été observée dans l'hippocampe dès 8 heures post-SE (+61% ; $P < 0,001$). Cette induction est maintenue jusqu'à 2 jours post-SE (+97% ; $P < 0,001$) (Figure R3F) et s'accompagne d'une réduction significative de l'expression (-40%) de l'ARN anti-sens naturel de HIF-1 α (aHIF) durant toute la période étudiée (Figure R3F). Aucune variation de l'expression de l'Epo, HIF-1 α et aHIF n'a été observée entre les rats contrôles et les rats contrôles/SD pour tous les points de la cinétique (Figure R6).

I-2.5. La βc est exclusivement exprimée par les cellules de la microglie activée à la suite du Pilo-SE.

A la suite du Pilo-SE, le niveau d'expression de l'ARN messager codant pour la βc est très fortement et transitoirement augmenté dans l'hippocampe, avec un pic d'induction à 1 jour post-SE (+9 897%, $P < 0,001$) (Figure R7A). Aucune différence du niveau d'expression de la βc n'a été observée entre les rats contrôles et les rats contrôles/SD (Figure R6). Les études immunohistochimiques réalisées à 3 jours post-SE ont révélé une réduction du marquage neuronal au niveau du hile (résultats non fournis) et une augmentation du marquage dans l'ensemble de l'hippocampe, comme illustré dans la région CA1 (Figure R7B), à l'intérieur de cellules présentant une morphologie de microglie activée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez le rat à la suite de l'injection de lipopolysaccharides ou d'une ischémie cérébrale [6].

I-2.6. Décours temporel de la perte neuronale dans l'hippocampe dorsal.

Une coloration au Fluoro-Jade B a été utilisée pour déterminer les neurones en dégénérescence au cours du temps. En outre, une évaluation quantitative de la perte neuronale au niveau de CA1 (à proximité de CA2), de CA3, de la SLMo et du hile à IA +5,40 mm (Paxinos, 1998 #258) au cours du temps, a été réalisée à l'aide du marquage immunohistochimique NeuN. Les animaux ayant subi un SE présentent des profils de perte neuronale différents en fonction des régions de l'hippocampe (Figure R8). Dans le hile, un marquage intense au Fluoro-Jade B a été observé dès 1 jour post-SE et maintenu jusqu'à 15 jours post-SE, comme illustré à 3 jours post-SE (Figure R8A). La perte neuronale, quantifiée à partir des coupes NeuN-immunomarquées, est de ~ 45% à 1 jour post-SE et se stabilise à ~ 65% à partir de 3 jours post-SE (Figure R8B). Dans les régions CA1 et CA3, un marquage au Fluoro-Jade B est observé dès 1 jour post-SE et augmente jusqu'à 3 (Figure R8A) et 4 jours post-SE. La perte neuronale a été mise en évidence dès 3 jours post-SE et quantifiée à ~ 50% à 15 jours post-SE (Figure R8B). La SLMo ne présente aucun marquage au Fluoro-Jade B, entre 1 jour et 4 jours post-SE (Figure R8A) mais on observe une dégénérescence neuronale d'une valeur de ~ 40% à 15 jours post-SE (Figure R8B).

I-2.7. Capture de la rHuEpo par le tissu cérébral dans les conditions basales et à la suite du Pilo-SE.

Il a été montré que la rHuEpo pouvait traverser efficacement la BHE à la suite de son administration systémique et venir s'accumuler au niveau du fluide cérébro-spinal chez le rat et l'homme [24,79]. Toutefois, la concentration de la rHuEpo au niveau du parenchyme cérébral restait encore à déterminer, et nous ne savions pas si elle s'y concentrait de façon homogène. Chez les rats contrôles, à la suite d'une injection systémique de rHuEpo à la dose de 5 000 UI/kg, nous avons mis en évidence, 4 heures post-injection, que la concentration tissulaire de rHuEpo au niveau du néocortex était ~ 3 fois supérieure à celle mesurée au niveau de l'hippocampe (Figure R9, groupe 1). En revanche, lorsque les rats reçoivent une première injection de rHuEpo 24 heures avant la seconde, la capture de la rHuEpo est considérablement diminuée dans le néocortex uniquement : la rHuEpo n'étant pas détectée 1 heure après l'injection, et le niveau mesuré à 4 heures post-injection est ~ 7 fois inférieur à celui mesuré sans le pré-traitement (Figure R9, groupe 2). Chez les rats traités à la pilocarpine qui n'ont pas reçu de pré-injection de rHuEpo, la concentration tissulaire de rHuEpo administrée 2,5 heures post-SE est 2 fois plus importante que celle observée chez les rats contrôles dans l'hippocampe (comparer les figures R9 et R10, groupe 1). En revanche, lorsque les rats sont pré-traités avec de la rHuEpo, le profil de la capture tissulaire de la rHuEpo au cours du temps (comparer les figures R9 et R10, groupe 2) est : i) similaire aux rats contrôles au niveau de l'hippocampe, mais ii) ne présente plus l'inhibition de la capture mise en évidence chez les rats contrôles au niveau du néocortex. En effet, le pic détecté à 2 heures post-injection de la rHuEpo présente un niveau comparable à celui observé chez les rats contrôles 4 heures post-injection. La concentration plasmatique de la rHuEpo ne présente aucune différence entre l'ensemble des rats testés, de 1 à 7 heures post-injection, atteignant 538 ± 8 mUI/mL (4520 ± 67 pg/mL) durant cette période.

I-2.8. L'administration de rHuEpo prévient le développement du SE et réduit le nombre de crises de stade 4/5

L'administration de rHuEpo chez la souris et le rat prolonge la période de latence et réduit la sévérité des crises induites par voie pharmacologique à l'aide de l'acide kaïnique et du pentylènetétrazol [24,262]. Nos résultats démontrent que le pré-traitement par la rHuEpo à la dose de 5 000 UI/kg à deux reprises avant l'induction du SE (24 heures et 30 minutes avant

l'administration de pilocarpine) réduit significativement (-40%, $P < 0,05$) le nombre de rats entrant en SE. Chez les rats traités à la rHuEpo mais ayant développé un SE, le temps d'apparition du SE est identique à celui mesuré chez les rats traités uniquement à la pilocarpine ($28,6 \pm 2,3$ minutes ; $P = 0,962$). En revanche, les rats pré-traités à la rHuEpo présentent une importante réduction du nombre de crises de stade 4/5 (pilocarpine uniquement : $6,00 \pm 0,84$ crises ; rHuEpo + pilocarpine : $2,00 \pm 0,58$ crises ; $P = 0,015$) durant les 2 heures de SE.

I-2.9. L'administration de rHuEpo protège les neurones hippocampiques de la dégénérescence induite à la suite du Pilo-SE.

Des études préliminaires avaient montré dans un modèle d'ischémie cérébrale que le traitement à la rHuEpo à la dose de 5 000 UI/kg, appliqué 24 heures avant l'induction de l'ischémie, réduisait significativement le volume de l'atteinte cérébrale et que cet effet bénéfique était maintenu lorsque la rHuEpo était administrée 3 heures après l'ischémie [24]. Le même protocole d'administration de la rHuEpo a montré une protection tissulaire similaire dans un modèle de traumatisme crânien, mais accompagné d'une injection quotidienne de rHuEpo durant les 4 jours suivant l'agression [24]. Il a été montré qu'un traitement chronique à la rHuEpo était bien toléré chez le rat [24,168,274], à raison d'une administration durant 7 jours consécutifs sans qu'il ne soit observé d'augmentation du taux d'hématocrite [274]. De ce fait, pour augmenter les chances d'observer un effet neuroprotecteur de la rHuEpo à la suite du Pilo-SE, nous avons décidé de réaliser des injections répétées de rHuEpo avec deux protocoles d'administration : dans le premier, la rHuEpo a été administrée de manière préventive (24 heures et 30 minutes avec le début du SE) puis de manière thérapeutique (1 et 3 jours après l'arrêt du SE) ; dans le second, la rHuEpo n'a été administrée que de façon thérapeutique à 2,5 heures, 1 et 3 jours après l'arrêt du SE. Seuls les rats ayant développé un SE ont été inclus dans notre étude.

Au niveau de l'hippocampe, un effet neuroprotecteur de la rHuEpo a été observé quelque soit le protocole d'administration, mais le niveau de la protection est dépendant du protocole d'injection et de la population neuronale, comme illustré dans la région CA1 et le hile (Figures R11A-H). En effet, on observe un niveau de protection similaire des neurones pyramidaux de la région CA1 avec les deux protocoles d'administration (Figures R11A-D), alors que la protection des neurones du hile n'est mise en évidence que lorsque la rHuEpo est

administrée de façon thérapeutique à la suite du SE (Figures R11E-H). L'analyse quantitative des populations neuronales NeuN-immunopositives révèle que la neuroprotection induite par les deux protocoles d'administration de la rHuEpo est modeste mais significative au niveau de CA1 alors qu'elle est totale dans CA3 et la SLMo (Figure R11I). En revanche, seul le traitement thérapeutique à la rHuEpo (post Pilo-SE) présente une protection significative des neurones vulnérables du hile (Figure R11I).

Il est largement établi que les cellules moussues du hile, de type glutamatergique, représentent la population de neurone la plus vulnérable de l'hippocampe [240,241,243,245]. Au niveau de l'hippocampe, seules ces cellules expriment le CGRP (pour « calcitonin-gene-related-peptide ») [92]. L'étude des cellules GAD65/67-immunopositives au niveau du hile a montré que les interneurons de cette région sont préservés à la suite du Pilo-SE (Figures R12A-C). En revanche, le nombre de cellules moussues CGRP-immunopositives [92] détectées au niveau du hile (Figures R12D-E) est fortement diminué chez les rats ayant subi un Pilo-SE ($29 \pm 3\%$ des rats contrôles ; $P < 0,001$, Figure R12G). Toutefois, chez les rats traités thérapeutiquement à la rHuEpo (post Pilo-SE), le nombre de cellules moussues du hile ayant survécu (Figures R12D-G) est considérablement augmenté ($71 \pm 4\%$ des rats contrôles; $P < 0,001$).

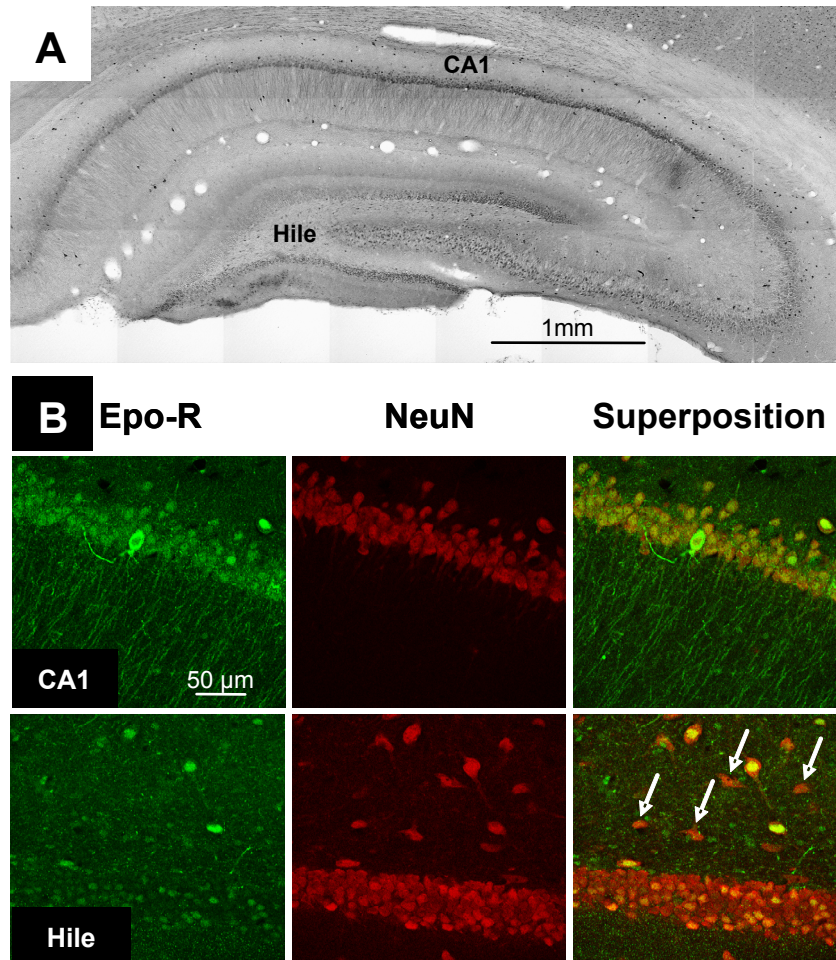


Figure R1

Distribution l'Epo-R au niveau de l'hippocampe dans les conditions basales. A, Le marquage colorimétrique démontre que l'Epo-R est exprimé dans l'ensemble des couches neuronales de l'hippocampe. B, L'Epo-R (vert) est exclusivement exprimé par les neurones (NeuN, rouge), notamment au niveau des zones de vulnérabilités hippocampiques comme la région CA1 et le hile. En revanche, il est important de noter que l'ensemble des neurones du hile n'exprime pas l'Epo-R (comme illustré par les flèches blanches). Barres de mesures: A, 1 mm; B, 50 μ m.

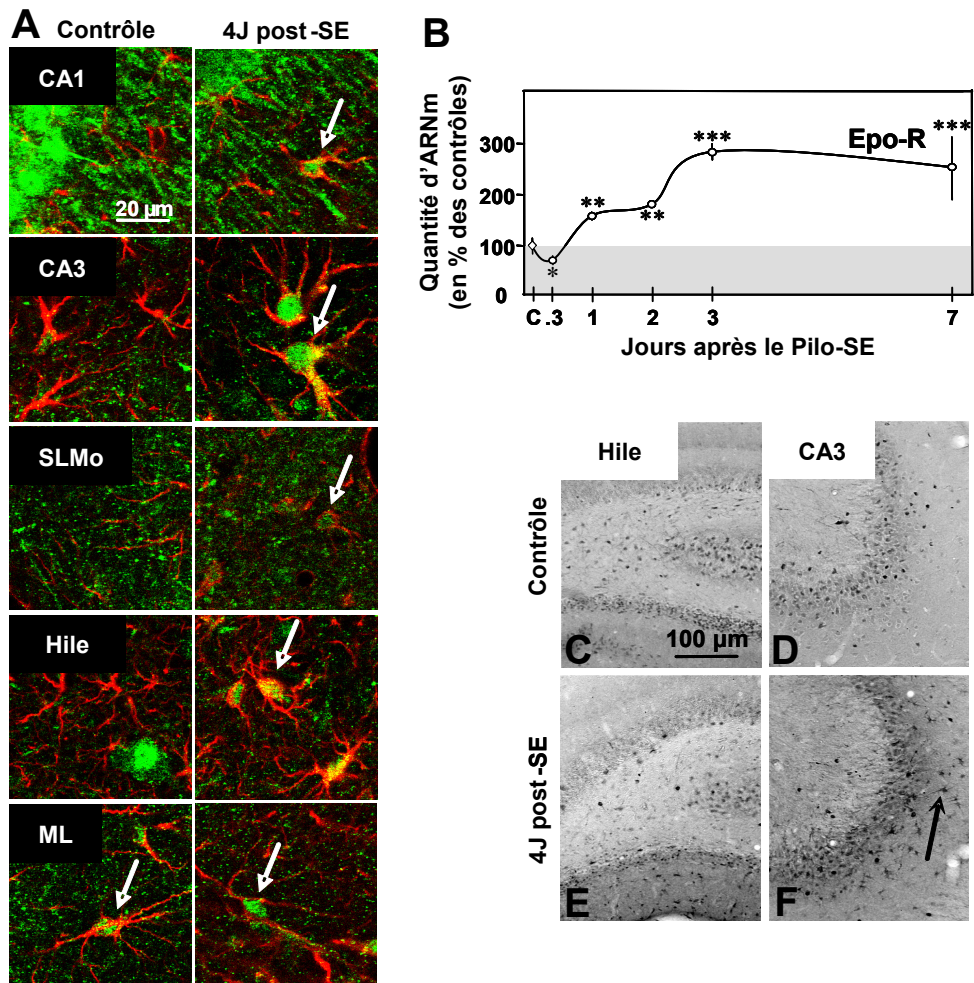


Figure R2

L'expression de l'Epo-R est induite par les astrocytes dans l'hippocampe à la suite du Pilo-SE. A, Les astrocytes (GFAP, rouge), activés à 4 jours post-SE dans l'ensemble des couches cellulaires de l'hippocampe, sont à l'origine de l'induction de l'expression de l'Epo-R (vert), comme illustré par les flèches blanches. B, La quantification des ARNm codant pour l'Epo-R par RT-PCR en temps réel montre que le niveau d'expression de l'Epo-R est significativement augmenté dans l'hippocampe durant les 7 jours suivant le Pilo-SE. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ en comparaison des rats contrôles. C-F, Le marquage colorimétrique, réalisé sur des coupes de cerveaux à 4 jours post-SE, met en évidence : 1) une diminution de l'expression de l'Epo-R au niveau des neurones du hile (C, E), et 2) l'apparition de "nouvelles" cellules, ayant une morphologie d'astrocyte et exprimant l'Epo-R, détectées dans l'ensemble de l'hippocampe, comme illustré au niveau de la région CA2 par la flèche noire (D, F). J, jour; CM, Couche moléculaire; SLMo, *stratum lacunosum moleculare*. Bares de mesures: A, 20 μ m; C-F, 100 μ m.

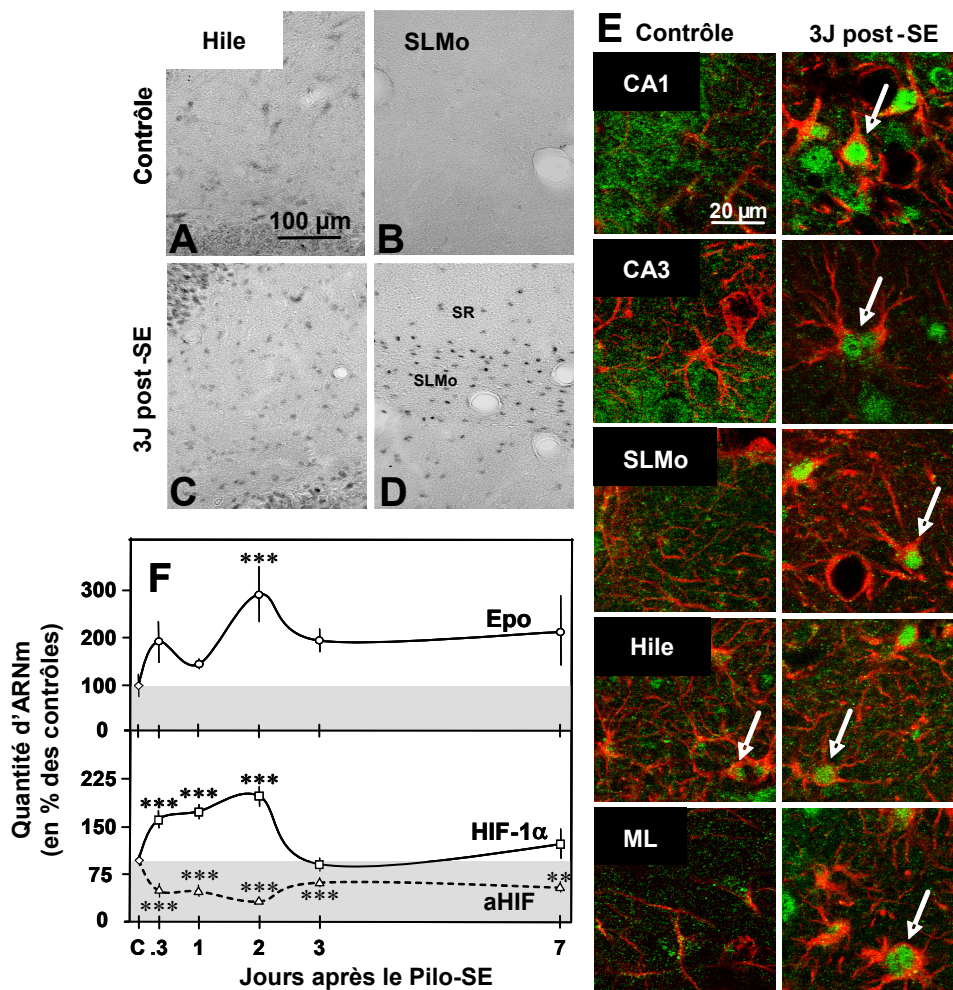


Figure R3

Les astrocytes expriment transitoirement l'Epo en réponse au SE. A-D, L'Epo est détectée par immunohistochimie au niveau des neurones du hile à l'état basal (A) et dans de "nouvelles" cellules ayant une morphologie d'astrocyte à 3 jours post-SE (C, D). E, Ces "nouvelles" cellules exprimant l'Epo (vert) ont été caractérisées par double marquage fluorescent comme étant des astrocytes (GFAP, rouge). F, La quantification de l'ARNm codant pour l'Epo par RT-PCR en temps réel montre une induction transitoire de sa quantité au niveau de l'hippocampe 2 jours après l'arrêt du SE; cette induction de l'Epo est précédée par une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour HIF1- α accompagnée par une inhibition permanente de l'expression de aHIF, son ARN anti-sens naturel. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$ en comparaison des rats contrôles. Abréviations: cf Fig R2; SR, *stratum radiatum*. Barres de mesures: A-D, 100 μm ; E, 20 μm .

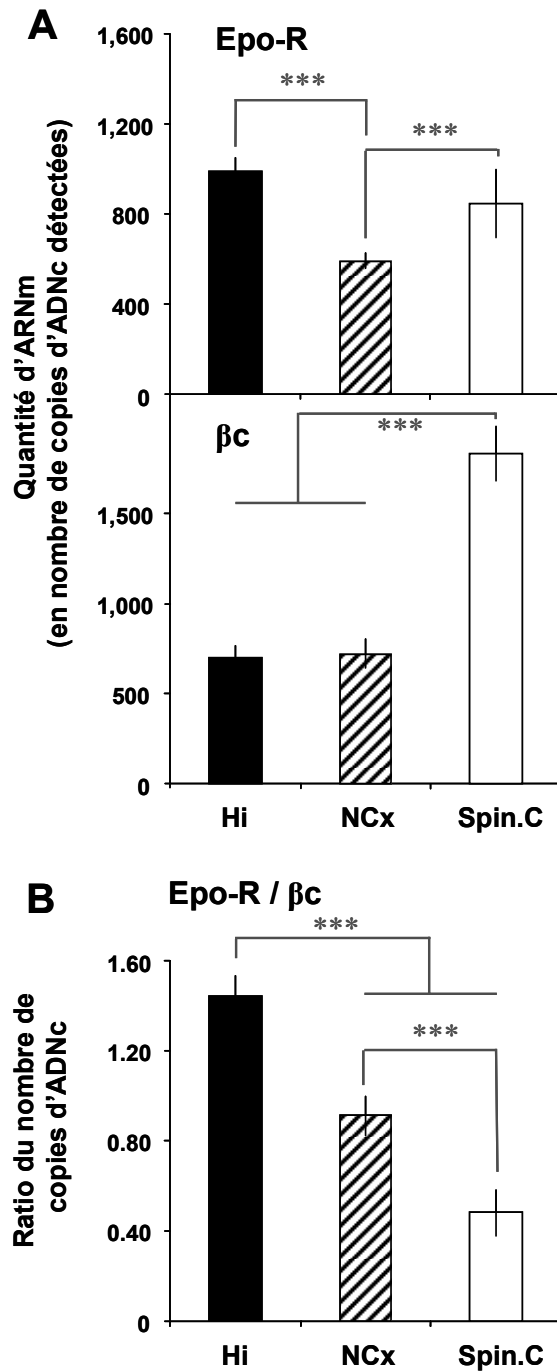


Figure R4

L'expression de l'Epo-R par rapport à la βc est structure dépendante au sein du système nerveux central chez le rat. Chez des rats contrôles, il a été démontré par RT-PCR en temps réel que l'ARNm codant pour l'Epo-R est abondamment exprimé au niveau de la formation hippocampique et dans la moëlle épinière alors que la concentration de l'ARNm codant pour la βc est plus importante dans la moëlle épinière par rapport à l'hippocampe et au néocortex. ***, $P < 0,001$ en comparaison des niveaux d'expression mesurés dans les autres structures. Abréviations : Hi, hippocampe ; NCx, néocortex ; ME, moëlle épinière.

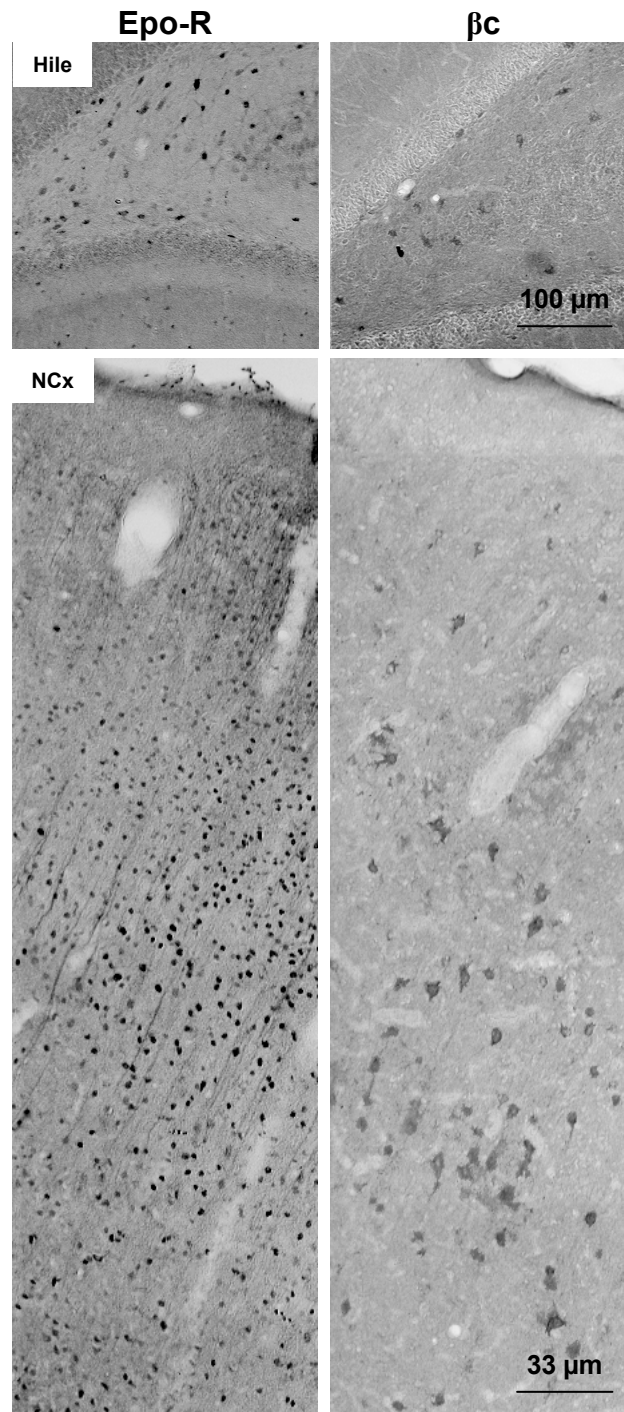


Figure R5

Localisation des protéines Epo-R et βc au niveau de l'hippocampe et du néocortex. Au niveau de l'hippocampe, l'expression de la βc est restreinte au hile, et le nombre de cellules marquées « βc » est plus faible que le nombre de cellules marquées « Epo-R ». Abréviations : Hi, hippocampe ; NCx, néocortex. Barres de mesures : Hile, 100 μm ; NCx, 33 μm .

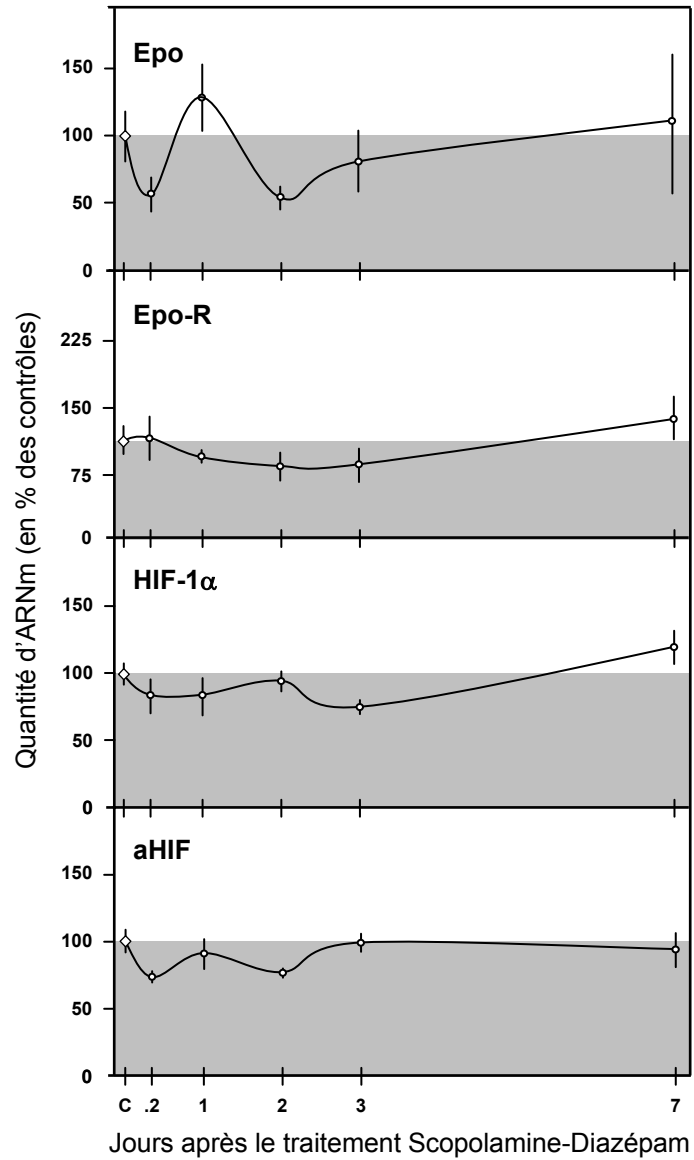


Figure R6

Le traitement à la scopolamine et au diazépam n'influence pas l'expression des gènes codant pour les différentes protéines d'intérêts du système Epoergique. Chez les rats contrôles S/D, nous montrons par RT-PCR en temps réel que la quantité de transcript de l'Epo, l'Epo-R, HIF-1 α et aHIF, mesurée dans l'hippocampe, ne varie pas significativement durant la durée de l'étude.

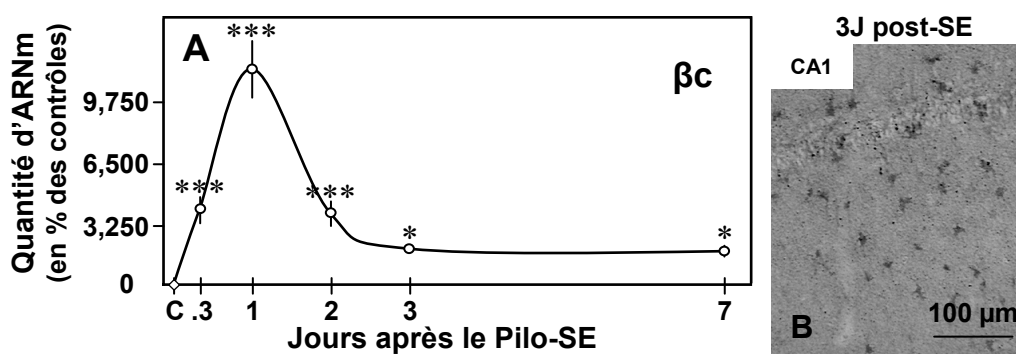


Figure R7

L'expression de la β c est dramatiquement augmentée par la microglie à la suite de Pilo-SE. A, Il a été mis en évidence par RT-PCR en temps réel que l'expression de l'ARNm codant pour la β c est significativement induite durant les 7 jours suivant le Pilo-SE, avec un important pic d'induction à 1 jours post-SE. *, $P < 0,05$; ***, $P < 0,001$ en comparaison des rats contrôles. B, Le marquage colorimétrique, réalisé à 3 jours post-SE, a mis en évidence une augmentation de l'expression de la β c dans l'ensemble des couches de l'hippocampe, comme illustré dans la région CA1, par des cellules présentant une morphologie caractéristique des cellules microgliales activées. Barre de mesure : B, 100 μ m.

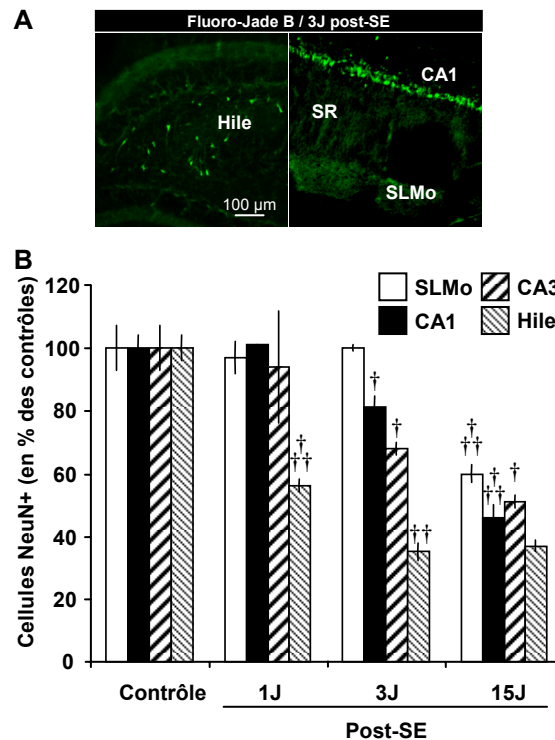


Figure R8

Les profils de dégénérescence neuronales varient en fonction des régions de l'hippocampe durant l'épileptogénèse. A, 3 jours après l'arrêt du SE, des neurones en dégénérescences sont marqués au Fluoro-Jade B dans la région CA1 et le hile mais pas au niveau de la SLMo. B, Quantification de la perte neuronale au niveau de l'hippocampe dorsal (IA +5,40 mm; Paxinos et Watson, 1998) durant l'épileptogénèse. †, $P < 0,05$; ††, $P < 0,01$; †††, $P < 0,001$ en comparaison du temps de mesure précédent. Abréviations: cf Fig R3. Barre de mesure: A, 100 µm.

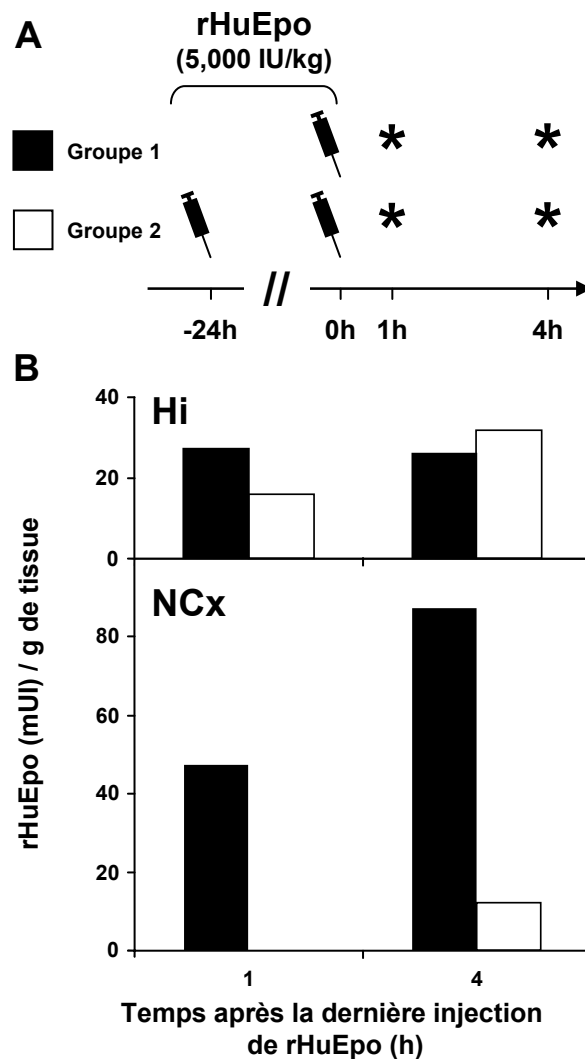


Figure R9

Accumulation de la rHuEpo dans le parenchyme cérébral de rat à la suite de son administration systémique dans les conditions basales. A, Procédure expérimentale : les concentrations tissulaires de la rHuEpo au niveau de l'hippocampe et du néocortex ont été déterminées chez des rats sacrifiés 1 et 4 heures à la suite de sa dernière injection systémique (5 000 UI/kg ; i.p) (n=8). La rHuEpo a été appliquée une fois pour le groupe 1 (n=4) et 2 fois, à 24 heures d'intervalle, pour le groupe 2 (n=4). B, Chacune des barres représente la concentration de rHuEpo moyenne, calculée à partir de 2 rats. Il est important de noter dans le groupe 2 que le rHuEpo n'a pu être détecté au niveau du néocortex de chacun des rats à 1 heure après la dernière injection.

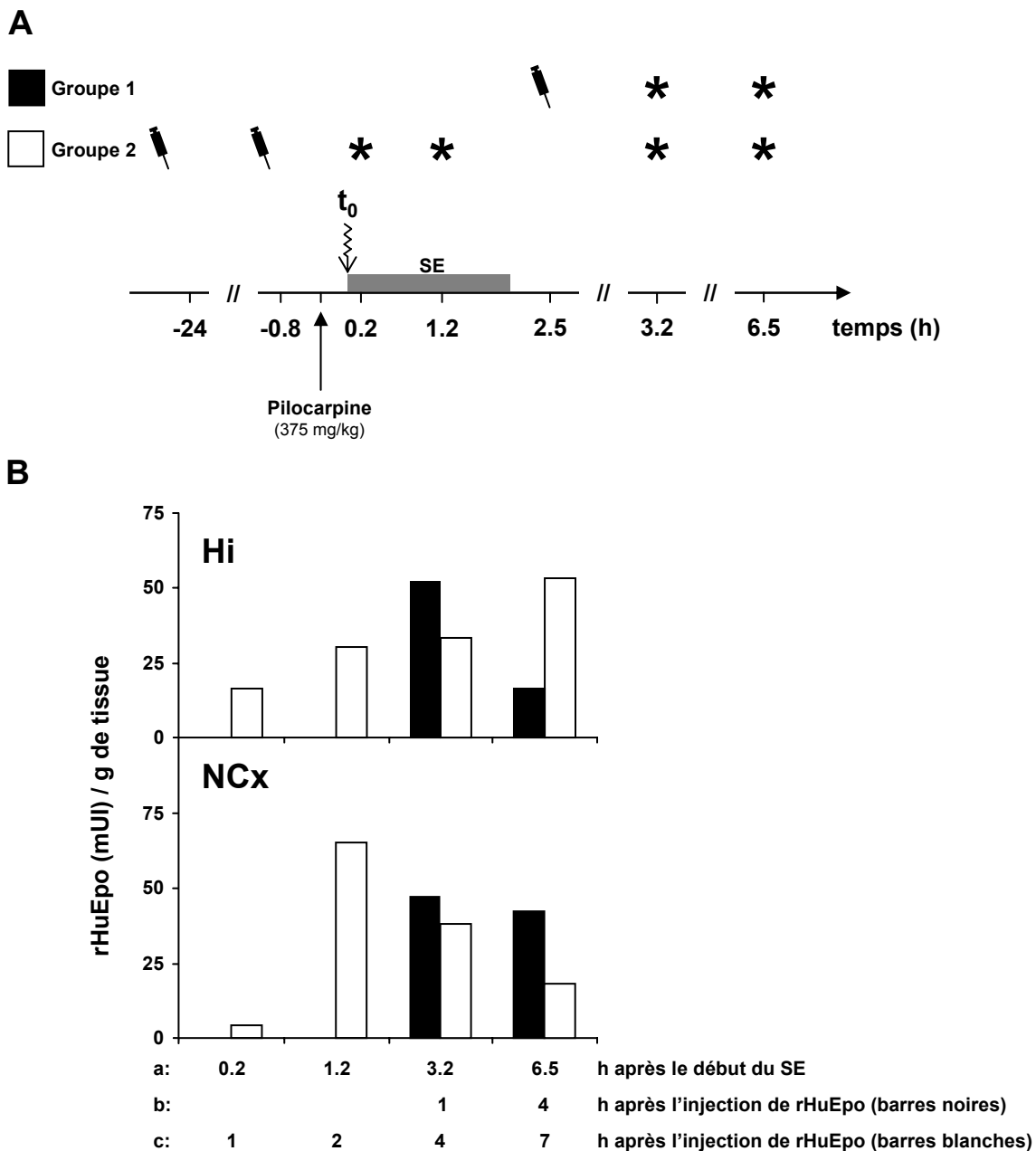


Figure R10

Accumulation de la rHuEpo dans le parenchyme cérébral de rat ayant subi un SE. A, Procédure expérimentale : t_0 représente le temps à partir duquel les rats sont rentrés en SE après l'administration de pilocarpine. La rHuEpo a été injectée seulement après (30 minutes, 1 et 3 jours) la fin du SE dans le groupe 1 (n=4), et a été injectée avant (-24 heures et -30 minutes) l'administration de pilocarpine et après (1 et 3 jours) la fin du SE dans le groupe 2 (n=8). B, Chacune des barres représente la concentration de rHuEpo moyenne, déterminée sur 2 rats. Au niveau de l'axe des abscisses, le temps (heure) a été exprimé soit en fonction du début du SE (a), soit à partir de la dernière injection de rHuEpo (b pour le groupe 1 ; c pour le groupe 2).

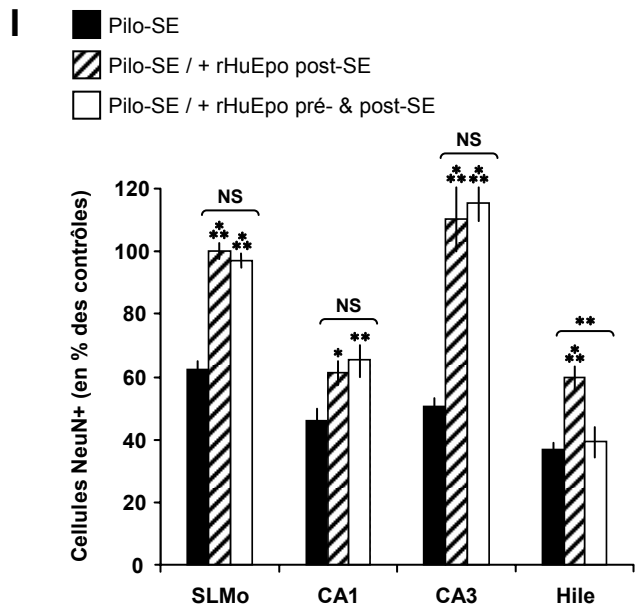
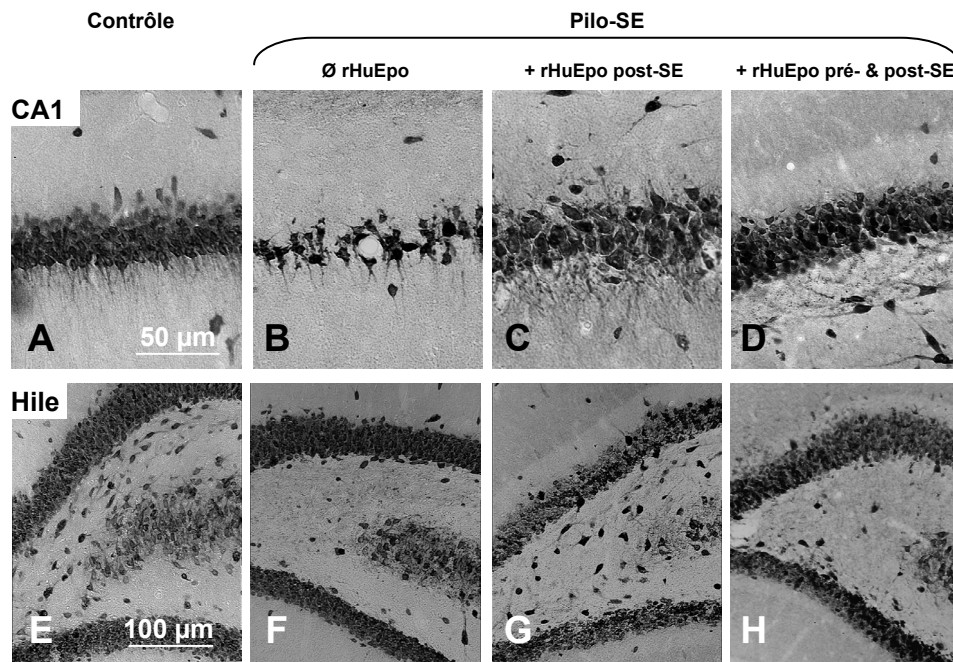


Figure R11

L'administration systémique de rHuEpo (5 000 UI/kg) à la suite du SE protège l'hippocampe contre la dégénérescence neuronale. A-F, Le marquage NeuN, à 15 jours post-SE, a mis en évidence que les 2 traitements de rHuEpo utilisés protègent les neurones de la région CA1 mais seul le traitement appliqué uniquement à la suite du SE présente une action protectrice sur les neurones du hile. G, Les 2 protocoles d'administration de rHuEpo sauvent complètement les neurones de la SLMo et les neurones pyramidaux de la région CA3, et partiellement les neurones pyramidaux de CA1 de la dégénérescence induite par le SE, mais seul le traitement appliqué post-SE protège les neurones du hile. †, $P < 0,05$; ††, $P < 0,01$; †††, $P < 0,001$, en comparaison des rats traités uniquement à la pilocarpine. Abréviations: cf Fig R2. Barres de mesures: A-C, 50 µm; D-F, 100 µm.

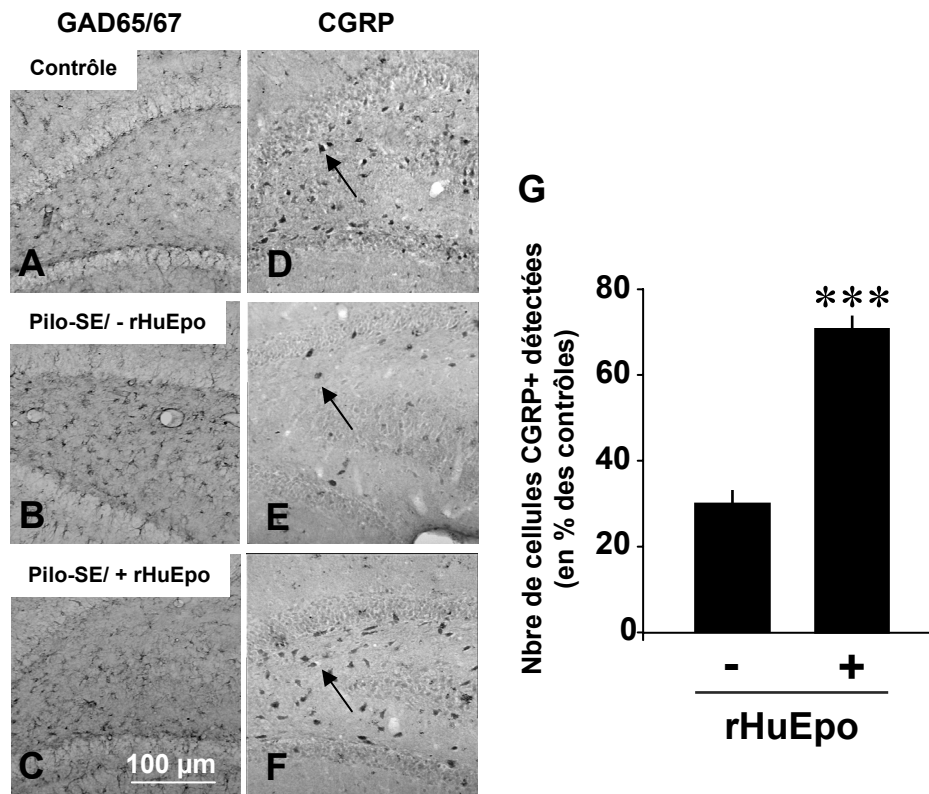


Figure R12

L'administration systémique de rHuEpo (5 000 UI/kg) protège spécifiquement les cellules moussues du hile contre un Pilo-SE. A-C, La population des interneurons GABAergiques, GAD65/67-immunohistopositifs, du hile ne varie pas à la suite du SE (15 jours post-SE). D-F, Les cellules moussues glutamatergiques du hile (illustrées par les flèches noires), CGRP-immunopositives, sont extrêmement vulnérables et meurent massivement à la suite du Pilo-SE, mais une majorité est sauvée par le traitement à la rHuEpo. G, Quantification de l'effet protecteur du traitement à la rHuEpo sur les cellules moussues du hile à la suite du Pilo-SE. †††, $P < 0,001$ en comparaison des rats traités uniquement à la pilocarpine. Abréviations: cf Fig R2. Barre de mesure: A-F, 100 μm .

I-3. Discussion

Cette étude présente pour la première fois la distribution de l'Epo, l'Epo-R et la chaîne β commune (βc) dans l'hippocampe de rat dans les conditions basales. Elle révèle que l'Epo-R est exprimé par la majorité des neurones de l'hippocampe alors que l'expression de l'Epo et la βc est beaucoup plus discrète et restreinte à certaines populations neuronales. De plus, quelques astrocytes, dispersés dans l'ensemble de l'hippocampe, expriment l'Epo et l'Epo-R. En revanche, l'Epo et l'Epo-R sont exprimés par de nombreux astrocytes à la suite du Pilo-SE, et les régions hippocampiques où l'induction astrocytaire d'Epo est la plus importante présentent une meilleure robustesse neuronale. En revanche, l'augmentation importante de l'expression de la βc à la suite du SE est restreinte uniquement à la microglie. De plus, nous avons démontré que l'administration thérapeutique de rHuEpo, à la suite du Pilo-SE, augmente significativement la survie des neurones de l'ensemble des régions de l'hippocampe. De ce fait, notre étude indique que la rHuEpo pourrait venir agir en synergie avec l'induction endogène d'Epo par les astrocytes afin d'assurer une protection neuronale plus efficace et augmenter ainsi la survie des neurones dans l'ensemble des régions de l'hippocampe à la suite d'un SE.

I-3.1. Caractérisation de l'expression hippocampique de l'Epo et son récepteur dans les conditions basales

De nombreuses études *in vitro* ont mis en évidence le fait que l'Epo-R est exprimé par les cultures de neurones hippocampiques [48,81,142,153]. Bien qu'il ait été montré une abondante présence de sites de fixation de l'Epo dans l'hippocampe de rongeur adulte à l'état basal [71], confirmée par la mise en évidence d'une expression hippocampique d'Epo-R [81], seulement une seule étude *in situ* a illustré succinctement l'existence de cellules exprimant l'Epo-R au niveau de l'hippocampe de rat adulte [196]. Etonnement, dans une autre étude, la présence de l'Epo au niveau de l'hippocampe a été mise en évidence à la suite d'une exposition hypoxique, mais pas dans les conditions basales [156]. Quoiqu'il en soit, pour totalement discerner les cellules qui sont influencées par le système Epo endogène et donc ciblées par l'Epo exogène, nous devons accroître nos connaissances sur la distribution de l'Epo-R dans l'hippocampe de rat adulte. Un des résultats majeurs de notre étude est que l'Epo-R est exprimé par la totalité des neurones composant les différentes couches de

l'hippocampe, excepté dans le hile, et que cette expression est quasiment exclusive aux neurones. Le marquage immunohistochimique de l'Epo-R montre qu'il est concentré principalement dans les corps cellulaires et les varicosités des neurones, sauf dans CA1 où il est aussi observé dans les dendrites basales des neurones pyramidaux qui projettent dans la *stratum radiatum*. Cette concentration massive d'Epo-R dans les conditions basales suggère que la libération d'Epo jouerait un rôle important dans l'homéostasie des neurones hippocampiques. L'Epo a été détectée dans l'hippocampe de rat adulte par western blot dans les conditions basales [81]. Notre étude *in situ* confirme les précédents travaux [271] montrant que l'Epo est principalement localisée au niveau des neurones pyramidaux, des neurones du hile et des cellules granulaires. De plus, nous montrons ici que quelques astrocytes dispersés dans l'hippocampe participent à l'expression basale de l'Epo. La faible présence d'Epo à l'état basal a pourtant été décrite comme étant suffisante pour assurer la protection des neurones vulnérables face à des agressions cérébrales de faible intensité, comme une courte ischémie cérébrale chez le gerbille [227].

I-3.2. Induction de l'expression de HIF-1 α à la suite d'un Pilo-SE

Quand l'agression est de forte intensité ou de longue durée, le fait que l'Epo-R soit exprimé par l'ensemble des neurones de l'hippocampe pourrait permettre d'augmenter la probabilité de fixer efficacement l'Epo produite localement par le tissu en souffrance. Nos résultats montrent que la quantité d'ARN messagers codant pour l'Epo est rapidement augmentée au niveau de l'hippocampe à la suite du Pilo-SE, et suivie 24 heures plus tard, par la détection de sa protéine dans de nombreux astrocytes localisés notamment au niveau de la SLMo. Dans la majorité des tissus de l'organisme, l'induction de l'expression du gène de l'Epo est régulée par le facteur de transcription 1 inductible par l'hypoxie (HIF-1), lui-même sous le contrôle d'un grand nombre de stressseurs dont l'hypoxie [173]. L'activité de HIF-1 est dépendante de sa sous-unité HIF-1 α , dont la protéine est soit dégradée en normoxie, soit accumulée dans le tissu en réponse à une hypoxie [173]. Nous avons montré que l'induction de l'expression de l'Epo au niveau de l'hippocampe à la suite du Pilo-SE est précédée par l'augmentation du niveau de transcript codant pour HIF-1 α , ainsi que par l'inhibition de l'expression de aHIF, son ARN anti-sens naturel. La séquence de aHIF est complémentaire de la région 3' UTR de l'ARN messager codant pour HIF-1 α et favorise sa dégradation lorsqu'il se fixe à lui [223]. A la suite du Pilo-SE, en plus de stabilisation de la protéine HIF-1 α ,

indispensable à l'induction de l'Epo, la mise en évidence d'une régulation coordonnée entre l'ARN messager codant pour HIF-1 α et son ARN anti-sens naturel aHIF, suggère que l'hippocampe aurait été exposé à d'importants dommages hypoxiques. La diminution de l'oxygénation tissulaire qui a été rapportée entre 1 et 3 jours après le SE et qui serait causée par une expansion des capillaires sanguins au niveau de la fissure hippocampique [242] pourrait expliquer l'induction de l'Epo par les astrocytes dans la SLMo. En effet, il a été démontré que l'expression de l'Epo par les astrocytes était induite à la suite d'une hypoxie [178,238] ou par des agents mimétiques de l'hypoxie [17].

I-3.3. Expression astrocytaire de l'Epo et son récepteur en réponse au Pilo-SE.

Cette étude est la première à mettre en évidence, chez le rat adulte, que l'expression génique de l'Epo et de l'Epo-R est dramatiquement augmentée, au niveau des neurones et des astrocytes, dans un modèle de dommages neuronaux sévères se produisant dans les régions les plus vulnérables de l'hippocampe, tels que CA1 et le hile. Les profils d'induction de l'Epo et de l'Epo-R observés sont en accord avec ceux qui ont été rapportés chez la souris au niveau du cortex à la suite d'une ischémie cérébrale [16], et chez le rat à la suite d'un traumatisme infligé au niveau de la moëlle épinière [107,110], ou des nerfs périphériques [159]. En revanche, nos résultats n'ont jamais permis de détecter une expression de l'Epo et de l'Epo-R ni dans la microglie activée ni dans les cellules endothéliales à la suite du Pilo-SE, comme cela avait été précédemment décrit dans d'autres modèles d'agression cérébrale [16,238]. L'observation que l'Epo et l'Epo-R sont simultanément exprimés par les astrocytes au niveau de la SLMo à la suite du Pilo-SE suggère que l'Epo libérée pourrait agir de façon autocrine ou paracrine sur les astrocytes la produisant et entraîner la libération de différents facteurs astrocytaires, comme le facteur de croissance des neurones (NGF), impliqués dans la survie neuronale. En effet, il a été mis en évidence *in vitro* que l'Epo pouvait contrôler la différenciation des astrocytes de rat en culture et favoriser la synthèse et la libération par ceux-ci du facteur de croissance neurale (NGF) [205], dont il a été montré qu'il pouvait protéger des cellules neuronales PC12 en culture contre une ischémie mimée par privation en oxygène et en glucose (POG) [256].

I-3.4. Hétérogénéité de la robustesse neuronale entre les différentes régions de l'hippocampe à la suite du Pilo-SE.

Dans cette étude, les processus neurodégénératifs ainsi que la perte neuronale ont été méticuleusement examinés durant les temps précoces de l'épileptogenèse (1 à 4 jours post-SE) dans différentes régions de l'hippocampe, à l'aide de la coloration au Fluoro-Jade B et du marquage immunohistochimique NeuN. Nous avons noté que la neurodégénérescence apparaissait très rapidement au niveau du hile, corroborant de précédents résultats qualifiant les neurones du hile comme étant les cellules les plus vulnérables de l'hippocampe [240,241,243,245]. En revanche, les neurones présents dans la SLMo paraissent plus robustes que ceux localisés dans le hile et la corne d'Ammon, aucun marquage au Fluoro-Jade B n'étant visible dans cette région entre 1 et 4 jours post-SE. Ces résultats suggèrent que : i) l'expression basale de l'Epo par les neurones du hile ne permet pas d'assurer l'intégrité de cette population neuronale dès les premiers instants (24 heures) suivant le Pilo-SE, et ii) la grande robustesse des neurones de la SLMo ne peut être attribuée à la présence locale d'Epo dans les conditions basales, l'Epo n'ayant pas été détectée dans la SLMo chez les rats contrôles. En revanche, la possibilité que l'induction de l'Epo par les astrocytes soit à l'origine de la survie prolongée des neurones de la SLMo à la suite du Pilo-SE ne peut être exclue. Il a été émise l'hypothèse que l'Epo produite par les astrocytes à la suite d'une ischémie cérébrale serait un agent neuroprotecteur astrocytaire qui viendrait agir de façon paracrine sur les neurones environnants pour assurer leur survie [225]. En effet, il a été rapporté *in vitro* une induction de l'expression de l'ARN messager codant pour l'Epo chez des astrocytes en culture placés en condition ischémique par POG et dont le milieu de culture présente la capacité de protéger des neurones en culture contre une POG [225]. Le fait que l'addition d'un Ac anti-Epo dans le milieu de culture abolisse la survie neuronale démontre que, en réponse à une hypoxie, les astrocytes produisent et libèrent de l'Epo qui joue le rôle de facteur de survie neuronale (Ruscher, 2002 #275).

Une des observations majeures de ce travail reste que l'induction d'Epo n'est que transitoire à la suite du Pilo-SE, un résultat qui peut être expliqué par l'activation de nombreuses cytokines pro-inflammatoires dans l'hippocampe [221,270], connues pour inhiber l'expression de l'Epo [90,107,199]. De plus, cette induction transitoire d'Epo n'apparaît pas suffisante pour permettre une protection efficace des neurones de la SLMo au cours du temps, une dégénérescence neuronale étant visible dans cette région 15 jours après l'arrêt du SE.

I-3.5. Capacité de la rHuEpo à traverser la BHE dans les conditions basales et à la suite du Pilo-SE.

La neuroprotection induite par l'administration systémique de rHuEpo nécessite qu'elle traverse efficacement la BHE. L'Epo-R présent à la surface apicale des cellules endothéliales a été suggéré comme assurant de la transcytose de la rHuEpo du milieu circulant vers le tissu cérébral sain [24] ou le tissu épileptique humain [82]. L'administration par voie intra-veineuse chez l'homme d'une molécule de rHuEpo radio-marquée a permis de mettre en évidence qu'elle a la capacité de s'accumuler au niveau du tissu cérébral après avoir traversée la BHE intacte [79]. Dans notre étude, nous avons établi que la concentration tissulaire de la rHuEpo, 4 heures après son administration systémique (5 000 UI/kg) chez le rat sain, est de ~ 85 mUI/mg au niveau du néocortex. Nous avons estimé, approximant que 1 mg de tissu \approx 1 mL, que la concentration tissulaire de rHuEpo que nous avons mesurée est en accord avec les résultats précédemment obtenus au niveau du fluide cérébro-spinal avec le même protocole d'administration (~ 100 mUI/kg mesurée 3,5 heures après l'injection) [79]. De plus, nous avons montré que la capture cérébrale de la rHuEpo n'est pas homogène dans l'ensemble des régions du cerveau sain. En effet, la capture de la rHuEpo au niveau du néocortex est ~ 3 fois plus importante que celle mesurée au niveau de l'hippocampe. En revanche, lorsque les rats sont pré-traités avec une injection préalable de rHuEpo, 24 heures avant la seconde injection de rHuEpo, la capacité du cerveau à capter la rHuEpo est abolie, au niveau du néocortex mais pas au niveau de l'hippocampe. Bien que les raisons qui entraînent la perte de la capacité du néocortex à capter la rHuEpo chez les rats pré-traités à la rHuEpo restent obscures, les résultats obtenus chez les rats traités à la pilocarpine nous amènent à rejeter l'hypothèse selon laquelle le pré-traitement à la rHuEpo entraînerait une disparition par endocytose des Epo-R présents à la surface des cellules endothéliales au niveau du néocortex. En effet, chez les rats pré-traités à la rHuEpo, nous avons mis en évidence la présence importante de rHuEpo, 1,2 heures après le début du Pilo-SE, au niveau du néocortex sachant qu'elle avait été injectée juste avant l'administration de pilocarpine. Ce résultat ne peut être expliqué par une facilitation de la pénétration de la rHuEpo circulante dans le tissu cérébral lié à la rupture de la BHE qui survient à la suite du SE [79], puisque il a été mis en évidence que le pré-traitement à la rHuEpo protège efficacement la BHE contre la rupture aussi bien *in vitro* [175] et *in vivo* [262]. De plus, chez les rats pré-traités à la rHuEpo, le passage de la rHuEpo du milieu circulant dans le cerveau nécessite la présence de récepteur à l'Epo actifs à la surface

des cellules endothéliales qui constituent la BHE. En revanche, quand la rHuEpo est administrée à la suite du Pilo-SE uniquement, l'augmentation de ~ 2 fois de la concentration en rHuEpo au niveau de l'hippocampe 1 heure post-injection peut s'expliquer par la rupture de la BHE [262].

I-3.6. Protection des neurones hippocampiques par le traitement à la rHuEpo contre la dégénérescence neuronale induite par le Pilo-SE.

En considérant la large distribution de l'Epo-R à la surface des neurones de l'hippocampe, il était fondamental de déterminer si l'administration thérapeutique d'Epo exogène pouvait significativement réduire, dans cette structure, la dégénérescence neuronale à la suite du Pilo-SE. Nous avons dans une première approche, administré la rHuEpo avant l'induction du SE, en référence aux précédentes études qui ont rapporté que l'administration de rHuEpo 24 heures avant l'induction d'une ischémie ou d'un traumatisme crânien protégeait significativement les zones cérébrales agressées [16] [24]. De plus, nous avons réalisé 3 autres injections de rHuEpo : 30 minutes avant le début du SE, puis 1 et 3 jours après l'administration de pilocarpine pour augmenter la chance de protéger les neurones, comme nous l'avons préalablement justifié (voir les résultats). Nos résultats montrent que l'administration de rHuEpo 24 heures et 30 minutes avant l'administration de pilocarpine réduit de 40% le nombre de rats développant un SE ainsi que la sévérité des crises comportementales, corroborant les précédentes études utilisant de l'acide kaïnique ou du pentylentétrazol pour induire un SE chez le rongeur adulte [24] [262]. Chez les rats qui ont développé un SE, nous avons montré à 15 jours post-SE que le niveau de la protection des neurones lié au traitement à la rHuEpo varie en fonction de la population neuronale étudiée avec une protection : i) complète des neurones de la région CA3 et de la SLMo, ii) partielle des neurones pyramidaux de CA1 et iii) absente au niveau des neurones du hile.

Dans une seconde approche, que nous voulions plus proche d'un traitement potentiellement applicable lors de la prise en charge d'un patient, nous avons administré la rHuEpo uniquement après l'arrêt du SE (30 minutes, 1 et 3 jours post-SE) et avons montré que l'effet protecteur, initialement observé dans la première approche, était étendu aux neurones du hile. Au niveau du hile, nous avons montré que les interneurones GABAergiques, caractérisés par la détection *in situ* de la GAD65/67, survivent au Pilo-SE, ce qui est en accord avec de précédents travaux [38]. La neuroprotection observée au niveau du hile ne

s'applique qu'aux cellules moussues, considérées comme les neurones les plus vulnérables de l'hippocampe [240,241,243,245]. En effet, nous avons observé une protection significative des cellules CGRP-immunopositives, caractérisant spécifiquement les cellules moussues du hile [92]. En revanche, il nous est impossible d'expliquer pourquoi les neurones pyramidaux de CA1, qui présentent la plus forte expression de l'Epo-R à leur surface, sont modestement protégés par la rHuEpo dans les deux traitements testés dans notre étude. Au niveau du hile, bien que le traitement à la rHuEpo sauve un grand pourcentage de cellules moussues, de nombreux neurones dégénèrent tout de même (~ 30% des neurones du hile). Nous émettons l'hypothèse selon laquelle les neurones du hile qui n'ont pas été protégés par la rHuEpo sont ceux qui n'expriment pas l'Epo-R dans les conditions basales. Dans ce cas, leur extrême vulnérabilité résulterait dans leur incapacité à répondre aux signaux de survie induits par l'Epo endogène et par la rHuEpo exogène.

I-3.7. Implication de la βc dans le signal de survie induit par la rHuEpo au niveau des neurones de l'hippocampe à la suite du Pilo-SE.

De nombreuses études ont mis en évidence que l'action hématopoïétique de l'Epo était assurée par sa fixation à son récepteur Epo-R sous la forme homodimérique (Epo-R)₂ [278]. Des récentes études *in vitro* ont suggéré que l'activation de l'Epo-R sous cette forme homodimérique, ainsi que la transphosphorylation des Janus Kinase 2, serait indispensable pour activer les différentes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la protection neuronale de la rHuEpo [22,73]; [172]. Nous avons montré que l'expression hippocampique de l'Epo-R était immédiatement induite, chez le rat, à la suite d'un SE, confirmant les précédents résultats obtenus chez l'homme et le rongeur à la suite d'une ischémie cérébrale [16,238] et d'une compression de la moëlle épinière [110], suggérant que le tissu cérébral répond à une agression par l'augmentation de sa capacité à fixer l'Epo. De plus, il a été montré *in vitro* que l'effet protecteur de la rHuEpo sur des cultures primaires de neurones corticaux de rat placés en hypoxie était aboli par l'addition d'un Ac anti-Epo-R dans le milieu de culture [225]. L'ensemble de ces résultats suggère que l'Epo-R est indispensable à l'Epo pour assurer la transmission de signal de survie cellulaire.

Les agents permettant la survie cellulaire face à une agression tissulaire et qui sont sans danger pour la santé des patients sont extrêmement intéressants dans le cadre d'une application clinique, notamment dans le cadre des traitements des maladies

neurodégénératives ou cardiovasculaires. Les observations réalisées à la suite de traitement à l'Epo chez des patients souffrant d'anémie ou de maladies rénales chroniques et plus récemment chez des individus ayant subi une ischémie cérébrale, ont montré que le traitement est bien toléré par les patients [98] [130,171], suggérant que l'Epo pourrait être utilisée en clinique comme un agent thérapeutique robuste et efficace dans de nombreuses maladies. Pourtant, il a été suggéré que l'action « tissu protectrice » de l'Epo serait entravée par des effets toxiques. En effet, l'administration d'Epo entraînerait, du fait de son activité hématopoïétique [129], des perturbations délétères chez les patients traités. Certaines études ont suggéré qu'un taux plasmatique élevé d'Epo serait associé avec une augmentation de la sévérité des troubles cardiaques [263]. De plus, l'administration d'Epo à court ou long terme serait hypertensive, entraînant sa contre indication chez les patients souffrant d'hypertension [172], et associée à l'apparition i) de troubles cardiaques, ii) de thromboses, iii) de vomissements ou iv) d'infections des voies respiratoires. Enfin, il a été suggéré que le traitement à l'Epo augmenterait les risques, chez les patients cancéreux, de prolifération des cellules tumorales [116] et, chez les patients sains, d'aplasie liée à une auto-immunisation des individus contre l'Epo [37]. L'ensemble de ces risques a entraîné le développement de nouvelles molécules d'Epo qui sont neuroprotectrices mais non hématopoïétiques.

Une première approche pour développer une molécule d'Epo neuroprotective mais non érythropoïétique s'est appuyée sur l'observation que les signaux cellulaires de protection ne nécessitent qu'un contact unique et rapide des neurones avec de l'Epo [196], suggérant que l'utilisation de molécules possédant une demie-vie courte, comme l'asialo-érythropoïétine [22], pourrait permettre de protéger de façon efficace les neurones mais sans stimuler l'érythropoïèse, qui nécessite un contact prolongé des cellules souches érythroïdes avec l'Epo [84]. En effet, l'Epo possède un acide sialique, en position terminale de sa chaîne oligosaccharidique, dont la fonction est de la prévenir contre une clairance rapide du plasma sanguin [129] et qui, lorsqu'il est enlevé, entraîne une réduction importante de la demie-vie de la molécule [129]. Il a été mis en évidence que l'asialo-érythropoïétine présentait une action neuroprotectrice dans de nombreux modèles d'agression du système nerveux, comme l'ischémie cérébrale, sans modifier le taux d'hématocrite des animaux traités [84]. De plus, elle fixe les neurones de CA1 [84], qui expriment l'Epo-R, et protège les cultures de neurones hippocampiques contre des dommages excitotoxiques [153].

Une deuxième approche, s'appuyant sur l'idée que la structure d'une molécule définit sa fonction, a abouti au développement de l'Epo carbamylée (CEpo), un dérivé de la molécule d'Epo qui ne possède pas d'activité hématopoïétique mais présente un effet neuroprotecteur identique à celui de l'Epo [153]. En revanche, l'étude des effets protecteurs de cette molécule a montré qu'ils ne passeraient pas par la forme homodimérique de l'Epo-R [153], suggérant qu'il existerait un récepteur à l'Epo spécifiquement impliqué dans la neuroprotection. L'Epo appartient à la superfamille des cytokines de type 1 dont les membres présentent de multiples fonctions définies par les différents assemblages en sous-unités réalisées par leurs récepteurs spécifiques [22]. L'étude des récepteurs de cette famille a suggéré que la chaîne βc , qui leur est classiquement associée, pourrait être impliquée dans les effets neuroprotecteurs de l'Epo. En effet, il a été montré, que la capacité de la rHuEpo et de CEpo à favoriser la récupération motrice à la suite d'un traumatisme de la moëlle épinière est abolie chez des souris transgéniques n'exprimant pas la βc [22,23]. Ce résultat a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'effet protecteur de l'Epo et de la CEpo nécessite le recrutement d'un hétérorécepteur comprenant un monomère d'Epo-R et un homodimère de βc [22]. Au niveau de l'hippocampe de rat dans les conditions basales, nous avons montré que l'expression de la βc était restreinte uniquement au hile, indiquant qu'elle ne peut être impliquée dans l'effet neuroprotecteur de la rHuEpo que nous avons observé au niveau de la corne d'Ammon et de la SLMo. De plus, le rapport Epo-R / βc que nous avons établi à partir des quantités de transcript présentent dans l'hippocampe, est 1,6 et 3 fois plus important que celui que nous avons mesuré respectivement au niveau du néocortex et de la moëlle épinière. Si nous considérons comme juste l'hypothèse selon laquelle la CEpo requière obligatoirement un récepteur Epo-R/(βc)₂ pour assurer son effet neuroprotecteur, ce résultat confirme les effets bénéfiques de la CEpo qui ont été rapportés à la suite de traumatismes de la moëlle épinière [23,153] mais suggère qu'elle ne présentera qu'une action très faible et limitée au niveau de l'hippocampe. La CEpo pourrait alors être utilisée pour protéger spécifiquement les neurones exprimant la βc contre une agression cérébrale, dont notamment certains neurones du hile de l'hippocampe, du néocortex et de la moëlle épinière. Il sera nécessaire, dans des études ultérieures, d'administrer de la CEpo chez des animaux non transgéniques ayant subi un SE pour vérifier la réelle nécessité, pour les neurones hippocampiques, d'exprimer la βc afin de bénéficier des effets neuroprotecteurs de la CEpo. S'il est vérifié que les effets neuroprotecteurs de la CEpo nécessitent la présence de βc : i) l'hétérogénéité des rapports Epo-R / βc dans les différentes structures cérébrales étudiées, et ii) l'hétérogénéité du marquage immunohistochimique de la βc dans les conditions basales, soutiendraient

l'hypothèse selon laquelle de multiples récepteurs à l'Epo participent à l'effet neuroprotecteur, et encourageraient la recherche d'autres dérivés de l'Epo, distincts de la CEpo et ne possédant toujours pas d'activité hématopoïétique.

I-4. Conclusion.

En conclusion, cette étude est la première à avoir mis en évidence, au niveau de l'hippocampe, une induction astrogliale de l'expression de l'Epo et de l'Epo-R dans un modèle de SE qui aboutit à l'apparition de crises épileptiques spontanées, qui est l'une des caractéristiques des épilepsies du lobe temporal. De plus, nous avons montré que l'administration d'Epo présentait un effet bénéfique sur la survie des neurones, suggérant que le rôle de l'Epo endogène produit par les astrocytes à la suite du SE est protecteur et non délétère. L'administration de rHuEpo viendrait soutenir l'action endogène de l'Epo produite par les astrocytes pour accroître le nombre de neurones qui survivront à la suite du SE. L'utilisation de la rHuEpo dans une étude clinique chez des patients ayant subi un accident cérébro-vasculaire a déjà été réalisée avec succès [80]. Les résultats que nous avons obtenus sur l'effet protecteur de la rHuEpo sur la survie neuronale à la suite du Pilo-SE encouragent son utilisation clinique pour limiter les complications neurologiques classiquement observées chez les patients ayant subi un épisode sévère de SE.

II. Le récepteur responsable des effets neuronaux de l'érythropoïétine ne serait pas composé de la chaîne β commune

II-1. Introduction

L'érythropoïétine (Epo) cérébrale présente une activité neuroprotectrice [113] qu'elle soit exprimée constitutivement par les neurones dans les conditions basales [198] pour contrer la dégénérescence tissulaire qui survient à la suite d'une agression de faibles intensités [227] ou lorsqu'elle est fortement induite par les astrocytes [16,110,198], la microglie et les cellules endothéliales ([16,110] en réponse à une agression de forte intensité. De plus, Il a été montré que l'administration périphérique d'une forte dose d'Epo recombinante humaine (rHuEpo), traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) chez les mammifères adultes [24,79,136,198], et viens assurer la survie des neurones au sein du tissu cérébrale dans de nombreux modèles animaux *in vivo* de maladies neurodégénératives [113,198].

L'ensemble de ses résultats suggère que l'administration de rHuEpo pourrait présenter un nouvel espoir thérapeutique dans la lutte contre les maladies neurodégénératives chez l'homme. Pourtant, l'idée selon laquelle l'action périphérique de l'Epo [130] et de la rHuEpo [172] sur la stimulation de l'érythropoïèse pouvait être à l'origine d'effets secondaires néfastes [22] a motivée le développement de nouvelles molécules dérivées d'Epo dénuées d'une activité érythropoïétique périphérique mais possédant toujours une activité neuroprotectrice centrale [153]. Si il est reconnue que le signal érythropoïétique de l'Epo est assuré par la forme homodimérique du récepteur à l'Epo (Epo-R) [130], il a récemment été suggéré, à la suite de l'utilisation de molécules dérivées d'Epo non-érythropoïétiques comme l'Epo carbamylée (CEPO), que l'effet neuroprotecteur de l'Epo serait liée à un récepteur composé par un monomère d'Epo-R et un homodimère de la chaîne β commune (βc) [22,153]. Cette dernière étant classiquement retrouvée dans la formation des récepteurs aux facteurs de croissance des colonies de macrophage et des granulocytes (GM-CSF) et des interleukines 3 (IL-3) et 5 (IL-5) [22]. Cette hypothèse repose uniquement sur l'observation montrant que la rHuEpo perd son activité neuroprotectrice au niveau de la moëlle épinière chez des souris transgénique exprimant le récepteur Epo-R mais pas la βc [23]. Pourtant, les très faibles niveaux d'expression de la βc qui ont été rapportés au niveau de l'hippocampe et du néocortex dénotent avec son abondante expression au niveau de la moëlle épinière et

suggère fortement l'absence d'implication de βc dans l'action neuroprotectrice de l'Epo au niveau du système nerveux central (SNC) [198].

Afin de mettre à l'épreuve l'hypothèse selon laquelle la forme [Epo-R/(βc)₂] du récepteur à l'Epo serait présente dans le cerveau du rat, nous avons recherché à savoir si les variations d'expression de la βc dans des modèles *in vivo* pouvaient refléter celles observées pour le récepteur Epo-R. Pour ce faire, nous avons éliminé les modèles de maladies neurologiques, car : 1) nous avons initialement rapporté que les augmentations d'expression de la βc et de l'Epo-R n'étaient pas localisées dans les mêmes cellules à la suite d'un état de mal cérébral [198], et 2) l'expression de la βc est fortement augmentée dans la microglie activée à la suite d'une inflammation cérébrale [6,198]. Nous avons au contraire établi les profils d'expression de la βc et du récepteur Epo-R chez des rats sains, cette approche étant notamment justifiée par le fait que l'administration préventive d'Epo implique que toutes les composantes de son récepteur putatif soient exprimées de façon constitutive (à l'état de base). Nous avons choisi notamment de comparer les profils d'expression de la βc et de l'Epo-R au cours de la période postnatale et du vieillissement, car : 1) des modifications importantes d'expression du récepteur Epo-R ont été observées au cours du développement sur des extraits de cerveau entier [162] [81,144], et 2) des sites de liaison de l'Epo sont exprimés très tôt au cours de la période postnatale et sont fonctionnels, puisque la rHuEpo administrée chez le raton nouveau né réduit les dommages cognitifs et psychomoteurs, de même que les phénomènes neurodégénératifs, généralement observés à la suite d'une ischémie/hypoxie [70,148,183,247].

Notre étude est la première à mettre en évidence que :

- Les profils d'expression des transcrits codant pour le récepteur Epo-R et la βc ne sont pas corrélés au niveau de l'hippocampe, du néocortex et de l'hypothalamus durant le développement post-natal et le vieillissement chez le rat.
- durant le développement et le vieillissement du SNC, le récepteur Epo-R est fortement et exclusivement exprimé par les neurones alors que la βc est très faiblement exprimée par le SNC durant cette période.
- le profil d'expression de l'Epo cérébrale au cours du développement et du vieillissement du SNC est étroitement corrélé avec celui du récepteur Epo-R et diffère totalement de celui de la βc .

- les cellules PC12, connue pour être protégées par l'ajout d'Epo dans leur milieu de culture contre de nombreux agents nocifs [97,145] expriment exclusivement et en grande quantité l'ARNm codant pour le récepteur Epo-R mais pas celui codant pour la β c.

II-2. Résultats

II-2.1. Profil d'expression cérébrale de l'Epo-R au cours du développement postnatal et du vieillissement.

Parmi les trois structures cérébrales examinées (hippocampe, néocortex et hypothalamus), l'hippocampe est celle qui présente les variations de concentration du transcrite codant pour le récepteur Epo-R les plus importantes durant le développement post-natal et le vieillissement (Figure R13A-C). Au niveau de l'hippocampe et du néocortex, la concentration la plus importante en ARNm codant pour le récepteur Epo-R a été mesurée à 2J, alors qu'au niveau de l'hypothalamus, le pic d'expression n'est observé qu'à 3M. En revanche, des trois structures cérébrales analysées, l'hippocampe est la seule à présenter une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm codant pour le récepteur Epo-R entre 12M et 3M (Figure R13A).

Les doubles marquages fluorescents de l'Epo-R avec les marqueurs cellulaires NeuN, GFAP, ou OX-42 ont révélé que celui-ci était exclusivement exprimé par les neurones durant l'ensemble des stades développementaux étudiés (5J, 21J, 3M et 12M) et quelle que soit la structure cérébrale analysée (résultats non fournis).

A 5J, il est important de noter la présence d'un marquage des capillaires sanguins au niveau de l'hippocampe et du néocortex, suggérant que le récepteur Epo-R pourrait être exprimé par les cellules endothéliales durant la période précoce du développement postnatal (résultats non fournis). De plus, au niveau de l'hippocampe et du néocortex, il existe un marquage fluorescent intense détecté dans de nombreuses petites "cellules rondes" (Figures R14A-D), qui ont été caractérisées comme étant d'origine neuronale, comme illustré dans la région CA1 (Figure R15A, flèches blanches). Au niveau de l'hippocampe, ces petites cellules rondes sont présentes dans la *stratum oriens* de la région CA1 (Figure R14B), dans la couche pyramidale de la région CA3 (Figure R14C), et au niveau du hile (Figure R14D). Dans la

région CA3, les neurones présentent un intense marquage fluorescent pour le récepteur Epo-R qui se mélange avec celui des neurones différenciés. Le double marquage fluorescent du récepteur Epo-R avec GAD65/67, un marqueur des neurones GABAergiques, a révélé que l'ensemble des petites "cellules rondes" Epo-R-immunopositives exprime la GAD65/67, comme illustré au niveau de la *stratum oriens* de la région CA1 (Figure R15B). En revanche, aux âges les plus tardifs du développement (21J, 3M et 12M), le nombre de petites "cellules rondes" exprimant le récepteur Epo-R est dramatiquement réduit.

A 21J, le marquage fluorescent du récepteur Epo-R apparaît dans les prolongements des neurones corticaux (Figure R14E) et des neurones pyramidaux de CA1 (Figure R14F), et, dans une moindre mesure, au niveau des prolongements des neurones pyramidaux de CA3 (Figure R14G) et des neurones du hile (Figure R14H). Certains neurones de la région CA3c sont aussi marqués de façon intense, alors qu'un signal relativement faible est détecté au niveau des neurones granulaires du gyrus denté (Figure R14H).

Entre 21J et 3M, le signal devient beaucoup plus intense au niveau des dendrites basales des neurones pyramidaux qui projettent dans la *stratum radiatum* (Figure R14J), dans l'ensemble des neurones pyramidaux de la corne d'Ammon, principalement au niveau de CA3 (Figure R14K), et dans les neurones granulaires du gyrus denté (Figure R14L).

Durant le vieillissement (3M-12M), le marquage fluorescent du récepteur Epo-R augmente en intensité, notamment au niveau des dendrites des neurones pyramidaux de CA1 (Figure R13N), du péricarya des neurones pyramidaux des régions CA3 et CA3c (Figures R14O-P), et au niveau des neurones granulaires (Figure R14P).

II-2.2. Profil d'expression cérébral de la βc au cours du développement postnatal et du vieillissement.

Nos résultats démontrent, dans l'hippocampe, que l'ARNm codant pour la βc est fortement exprimé chez le raton (2J et 8J) et le rat âgé (12M) (Figure R13D) alors que des pics d'expression ont été uniquement mesurés à 3M et 12M respectivement dans l'hypothalamus et le néocortex (Figures R13E-F). La comparaison des résultats obtenus dans les trois structures cérébrales à tous les âges examinés, entre la βc et le récepteur Epo-R, n'a révélé aucune corrélation significative (Figure R13G) cours du développement cérébral.

La βc est rarement observée, par marquage fluorescent, dans l'ensemble des structures cérébrales analysées. Au niveau de l'hippocampe et du néocortex, les doubles marquages fluorescents montrent que la faible expression cérébrale de la βc est principalement assurée par les neurones à 21J, 3M et 12M (Figure R16, flèches blanches) et par quelques astrocytes isolés (résultats non fournis).

II-2.3. Profil d'expression de l'Epo cérébrale au cours du développement postnatal et du vieillissement.

Les niveaux d'expression de l'ARNm codant pour l'Epo mesurés au cours du développement postnatal et du vieillissement chez le rat présentent des profils d'expression très similaires à ceux du récepteur Epo-R (Figures R17A-C), quelle que soit la structure cérébrale examinée (hippocampe, néocortex et hypothalamus). En revanche, l'hippocampe présente les variations d'expression les plus importantes (Figures R17A-C). La concentration tissulaire d'ARNm codant pour l'Epo au niveau de l'hippocampe est maximale à 2 jours (2J) après la naissance, et diminue dramatiquement jusqu'à l'âge adulte (3 mois, 3M), l'expression de l'Epo-ARNm hippocampique étant ~ 10 fois moins importante à 3M qu'à 2J. Au cours du vieillissement, on observe une augmentation (~ 5 fois) de l'expression génique de l'Epo entre 3M et 12M (Figure R17A). Au niveau du néocortex, le niveau d'expression de l'Epo-ARNm présente un pic à 2J, puis chute dramatiquement à 8J pour atteindre un niveau d'expression conservé jusqu'à 12M (Figure R17B). En revanche, on observe un faible niveau d'expression de l'Epo-ARNm au niveau de l'hypothalamus dès la naissance (2J) maintenu jusqu'à 21J, suivi d'une induction de $\sim 1,5$ fois durant la période de vieillissement (3M-12M) (Figure R17C). La comparaison des niveaux des transcrits entre l'Epo et le récepteur Epo-R ou la βc , déterminés dans les trois structures cérébrales et à tous les âges analysés, révèle une corrélation hautement significative entre l'Epo et le récepteur Epo-R (Figure R18A) mais pas entre l'Epo et la βc (Figure R18B).

Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'expression constitutive de l'Epo ne sont pas actuellement bien définis. Cependant, il a été mis en évidence une induction de l'expression génique de l'Epo sous hypoxie, impliquant l'activation du facteur de transcription inductible par l'hypoxie -1 (HIF-1) [173]. La protéine HIF-1 α , la sous-unité régulant l'activité de HIF-1, est connue pour être i) dégradée dans les conditions

normoxiques, et ii) stabilisée en conditions hypoxiques, grâce à des modifications post-traductionnelles, entraînant son accumulation tissulaire [173]. En plus de la stabilisation de la sous-unité HIF-1 α , nous avons récemment démontré que l'induction de l'expression de l'Epo-ARNm au niveau de l'hippocampe était associée à l'augmentation de la concentration tissulaire de l'ARNm codant pour HIF-1 α et à la diminution concomitante de l'expression de son ARN anti-sens naturel aHIF [198]. Celui-ci serait impliqué spécifiquement dans la régulation de l'expression de HIF-1 α en favorisant la dégradation de son ARNm [223]. Durant la période de développement et de vieillissement cérébral, nos résultats montrent que les profils d'expression transcriptionnelle de HIF-1 α (Figures R17D-F) et de aHIF (Figures R17G-I) diffèrent de ceux mesurés pour l'Epo dans les trois structures cérébrales étudiées (Figures R17A-C). En revanche, les ratios HIF-1 α -ARNm/aHIF-ARN calculés pour chacune des structures (Figure R19) présentent des profils d'expression similaires à ceux observés pour l'Epo (Figures R17A-C), suggérant que l'induction de l'expression de l'Epo serait liée à l'inhibition des mécanismes de dégradation de HIF-1 α .

Les doubles marquages fluorescents de l'Epo avec les marqueurs spécifiques des neurones (NeuN), des astrocytes (GFAP), ou de la microglie (OX-42) ont révélé que l'Epo était exprimée exclusivement par les neurones à tous les stades développementaux étudiés (5J, 21J, 3M et 12M) et ceux pour les trois structures cérébrales examinées (résultats non fournis). Nos résultats montrent une variation similaire de la localisation cellulaire de l'Epo au cours du développement de hippocampe (Figure R20) et du néocortex (résultats non fournis). A 5J, si un faible marquage pour l'Epo est détecté au niveau du péricaryon des neurones (Figure R20A), on observe un signal dense et ponctué sur l'ensemble du tissu, suggérant la présence d'Epo dans de nombreuses varicosités, comme illustré au niveau de la *stratum radiatum* de la région CA1 de l'hippocampe (Figure R20B). En revanche, l'intensité du marquage des varicosités est dramatiquement diminuée à tous les autres stades du développement étudiés (Figure R20A), contrastant avec l'augmentation du marquage péricaryal des neurones, comme illustré au niveau de la couche des neurones pyramidaux de CA1 et du gyrus denté (Figure R20A). Dans ces régions hippocampiques, l'intensité du marquage de l'Epo augmente fortement au niveau du péricaryon des neurones chez les rats âgés (12M) en comparaison des adultes (3M) (Figure R20A). En revanche, l'hypothalamus présente un marquage Epo-positif exclusivement au niveau du péricaryon des neurones quelque soit le stade développemental (résultats non fournis).

II-2.4. Expression du récepteur Epo-R et de la βc par les cellules PC12.

Nos résultats obtenus sur la lignée de cellules PC12 n'ont pu mettre en évidence la présence du transcrit codant pour la βc , que celles-ci soient à l'état indifférencié (phase proliférative) ou engagées dans une voie de différenciation neuronale. En revanche, le transcrit codant pour le récepteur Epo-R a été facilement détecté au niveau de cellules PC12 indifférenciées ($33\,300 \pm 5\,661$ de copie d'ADNc d'Epo-R). Ce niveau d'expression du récepteur Epo-R est augmenté de 17,5 fois 3 jours après le traitement des cellules au NGF (Figure R21).

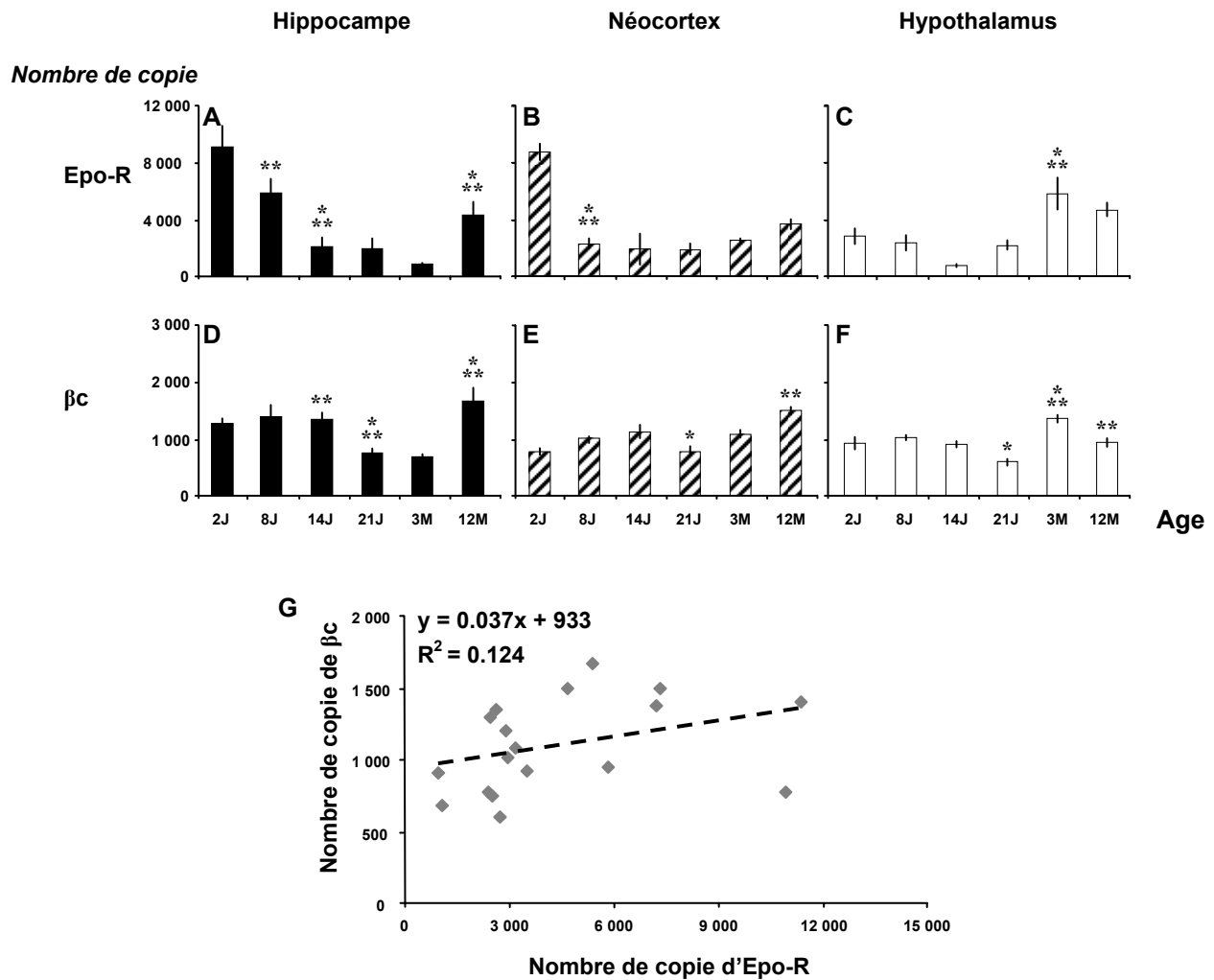


Figure R13

Profils d'expressions du récepteur Epo-R et de la βc au niveau de l'hippocampe, du néocortex et de l'hypothalamus durant le développement postnatal et le vieillissement. (A-F) Le nombre de copies d'ADNc, exprimé en moyenne \pm SEM, a été quantifié par PCR en temps réel. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison du temps de mesure précédent. (G) L'expression du transcrite de la βc n'est pas corrélée à celle du récepteur Epo-R pour l'ensemble des âges et des structures cérébrales étudiés. Abréviations: J, jour; M, mois.

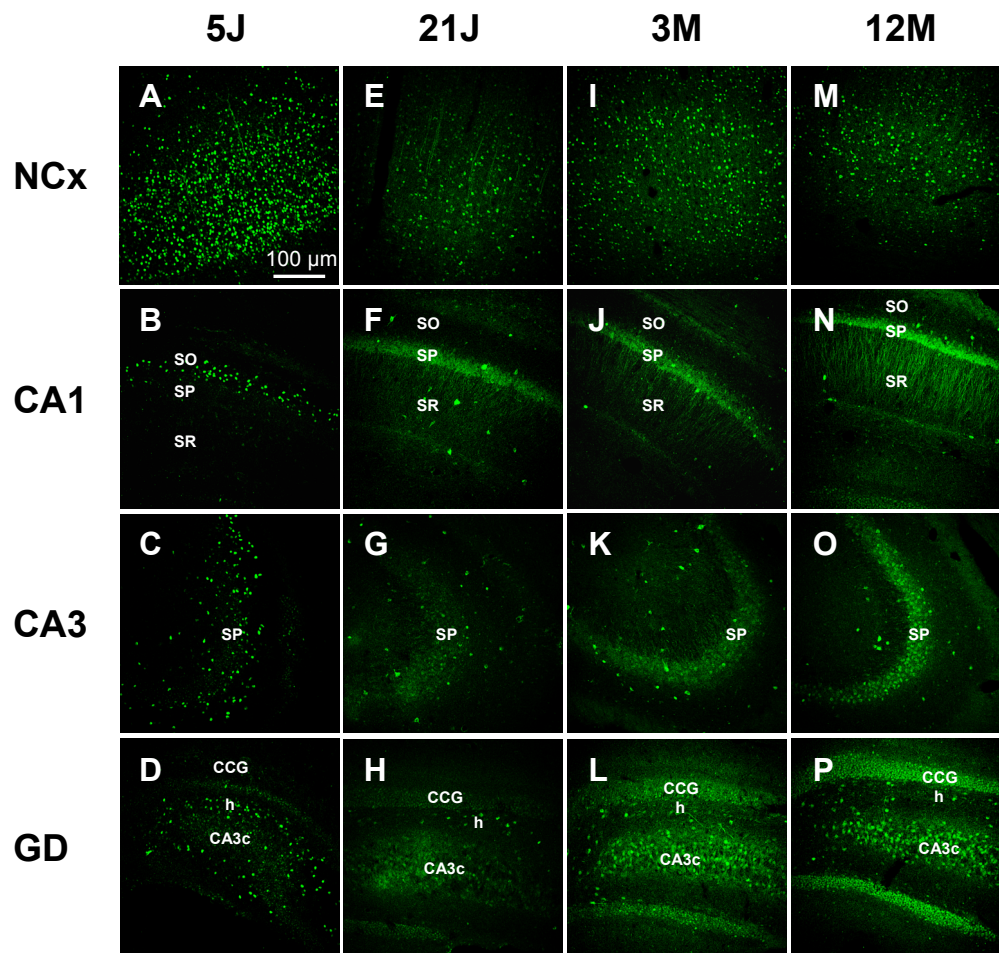


Figure R14

Localisation du récepteur Epo-R au niveau du néocortex et de l'hippocampe durant le développement postnatal et le vieillissement. Le récepteur Epo-R est détecté par marquage fluorescent au niveau du néocortex (A,E,I,M), et de l'hippocampe illustré par les régions CA1 (B,F,J,N), CA3 (C,G,K,O) et le gyrus denté (D,H,L,P). Abréviations: J, jours; GD, gyrus denté; CCG, couche des cellules granulaires; h, hile; M, mois; NCx, néocortex; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*.

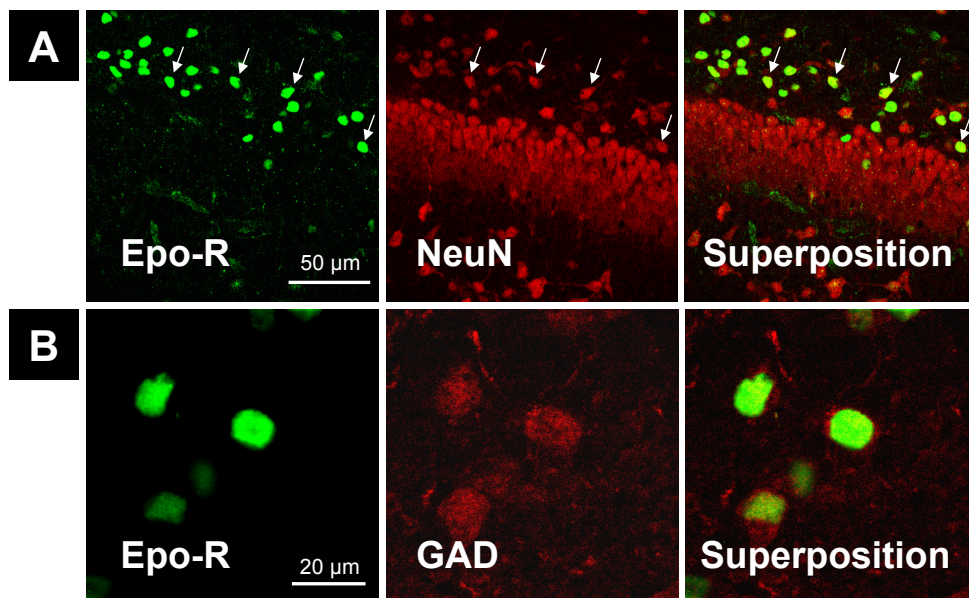


Figure R15

Caractérisation phénotypique des cellules rondes exprimant fortement le récepteur Epo-R au niveau de la *stratum oriens* de la région CA1 à 5J. Le récepteur Epo-R (vert) a été détecté dans des cellules exprimant le marqueur neuronal NeuN (rouge; A) ou la GAD65/67 (rouge; B). Certaines cellules co-exprimant le marqueur NeuN et le récepteur Epo-R ont été indiquées par des flèches blanches.

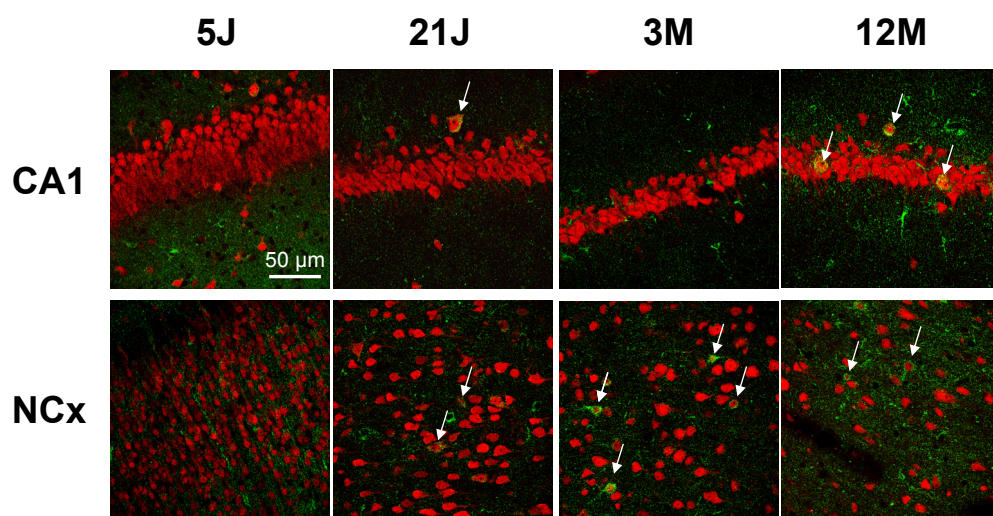


Figure R16

Localisation hippocampique et néocorticale de la βc durant le développement postnatal et le vieillissement. La βc (vert) est exclusivement exprimée par les neurones NeuN-immunopositifs (rouge) (flèches blanches) au niveau de la région CA1 et du néocortex. Abréviations: J, jour; NCx, néocortex; M, mois.

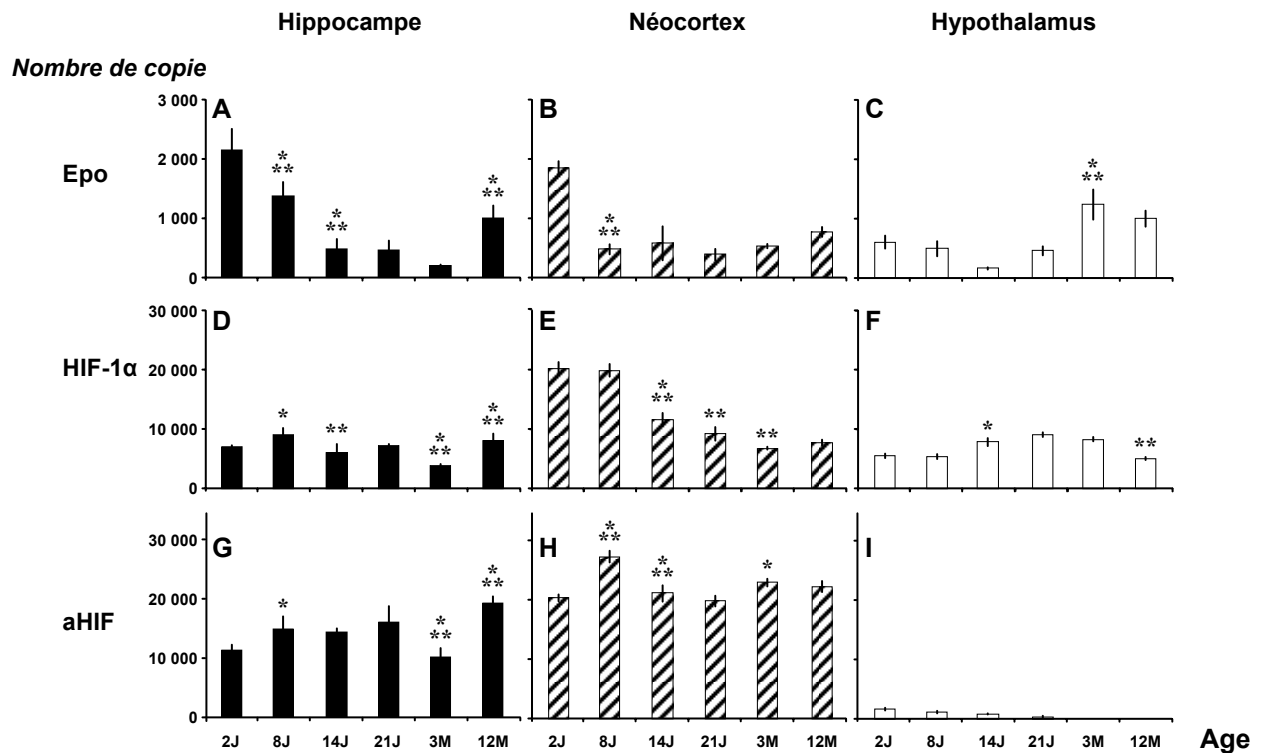


Figure R17

Profils d'expression des transcrits de l'Epo, de HIF-1 α et de aHIF, au niveau de l'hippocampe, du néocortex et de l'hypothalamus au cours du développement postnatal et du vieillissement. Le nombre de copies d'ADNc, exprimé en moyenne \pm SEM des valeurs obtenues, a été quantifié par PCR en temps réel. Il est important de noter qu'aucune variation significative de l'expression de aHIF n'a été mesurée au niveau de l'hypothalamus pour l'ensemble de la cinétique. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison du temps de mesure précédent. Abréviations: J, jours; M, mois.

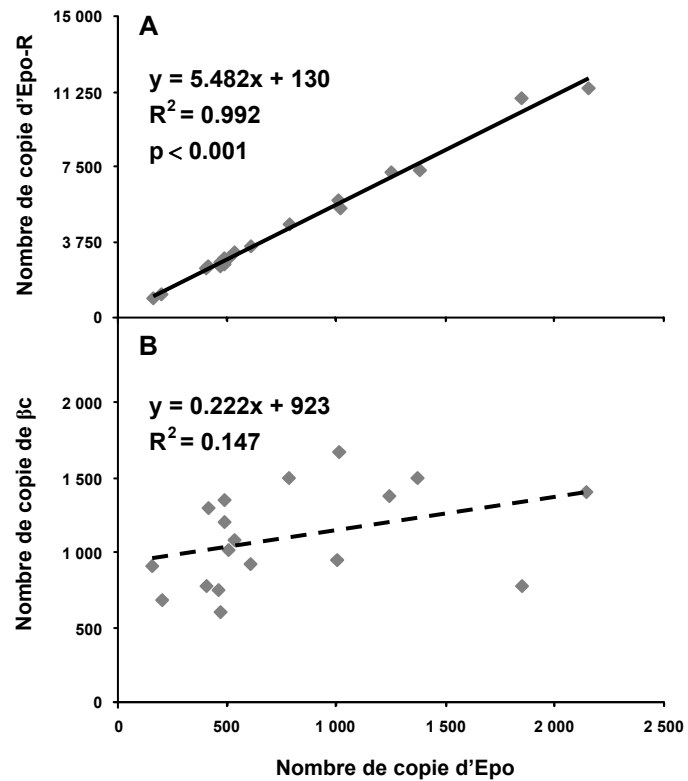


Figure R18

Corrélation des niveaux d'expression des ARNm entre l'Epo et le récepteur Epo-R (A) ou la βc (B). L'analyse a été réalisée à tous les âges et pour les trois structures cérébrales étudiées (hippocampe, néocortex, hypothalamus). L'équation de la droite de régression linéaire, le coefficient de détermination, et la significativité de la pente sont indiqués dans le graphe.

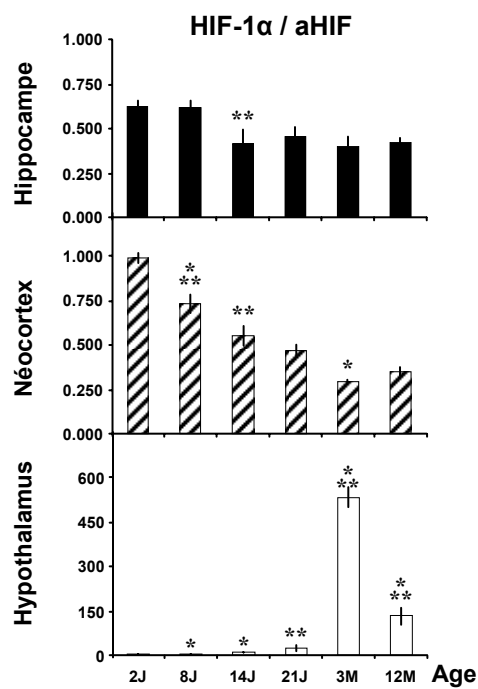


Figure R19

Ratio entre HIF-1 α -ARNm et son anti-sens naturel aHIF au niveau de l'hippocampe, du néocortex et de l'hypothalamus durant le développement postnatal et le vieillissement. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison du temps de mesure précédent. Abréviations: J, jours; M, mois.

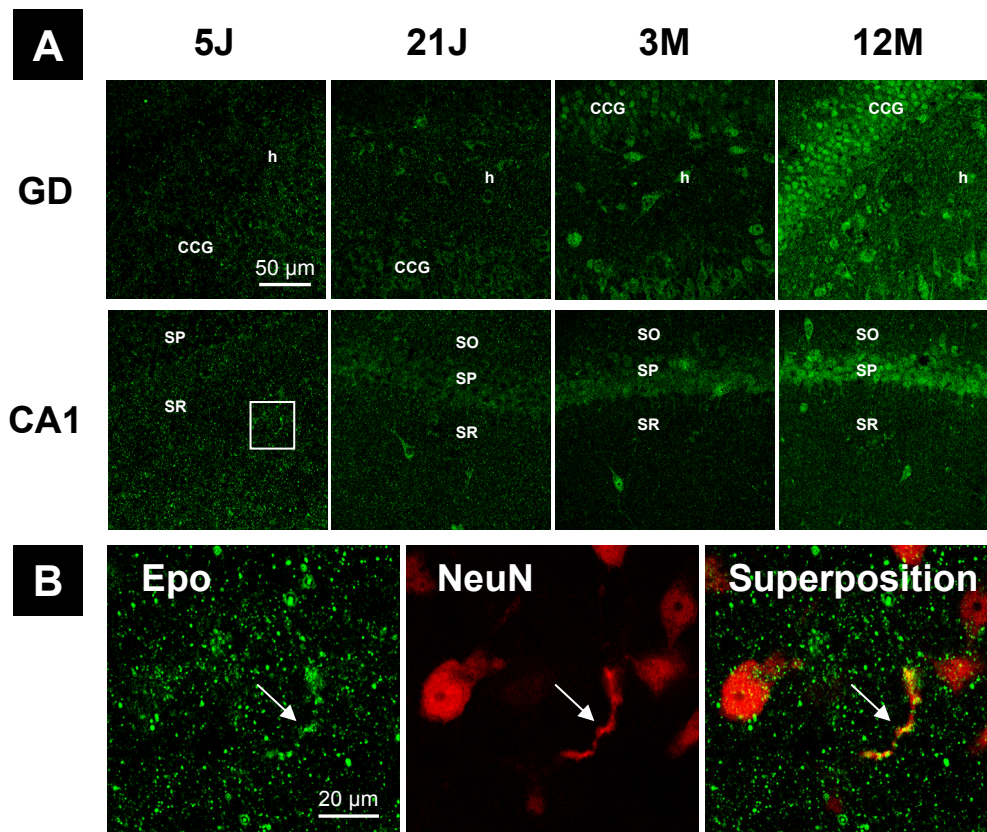


Figure R20

Localisation de l'Epo au niveau de l'hippocampe au cours du développement postnatal et du vieillissement. (A) L'Epo est détectée au niveau du gyrus denté et de la région CA1. (B) A 5J, on observe que les prolongements dendritiques des neurones (rouge) qui projettent dans la *stratum radiatum* de la région CA1 (boîte blanche), expriment l'Epo (vert). Abréviations: J, jours; GD, gyrus denté; CCG, couche des cellules granulaires; h, hilus; M, mois; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*.

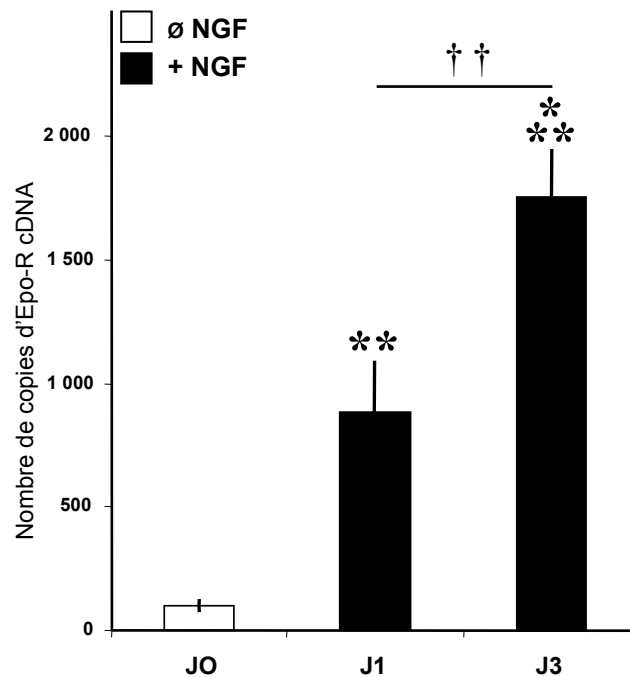


Figure R21

Expression du récepteur codant pour le récepteur Epo-R dans les cellules PC12 en phase proliférative (ØNGF) et au cours de leur différenciation neuronale induite par le NGF (+NGF). A J0, les cellules en phase de prolifération ont été récoltées 3 jours après leur ensemencement (densité : 300 cellules / mm²), ou traitées au NGF (50 ng/mL) pour induire leur différenciation neuronale. Les cellules PC12 engagées dans la voie de différenciation neuronale ont été récoltées 1 jour (J1) ou 3 jours (J3) après traitement au NGF. Le nombre de copies d'ADNc du récepteur Epo-R, exprimé en moyenne \pm SEM, a été quantifié par PCR en temps réel. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$ en comparaison à J0. †† $P < 0,01$. Abréviations: J, jours; NGF, Nerve Growth Factor.

II-3. Discussion

Cette étude est la première à mettre en évidence l'existence d'une régulation coordonnée de l'expression cérébrale de l'Epo et de son récepteur Epo-R pendant la période post-natale. En effet, l'expression de l'Epo suit celle de son récepteur Epo-R, quelle que soit la structure cérébrale étudiée. En revanche, les données que nous avons obtenues sur la régulation de l'expression de la βc , aussi bien au niveau du transcrite que de la protéine, nous incitent à émettre l'hypothèse selon laquelle le récepteur central de l'Epo ne contiendrait pas la chaîne βc , contrairement aux propositions d'autres groupes de recherche. En effet, ces derniers avaient annoncé que la βc faisait partie du récepteur à l'origine des effets neuroprotecteurs de l'Epo, à partir de résultats obtenus sur des souris transgéniques dont le gène codant pour la βc avait été invalidé [22,23]. Notre étude révèle également une très forte expression du récepteur Epo-R dans les phases précoces du développement post-natal, localisée exclusivement au niveau des interneurons GABAergiques. Enfin, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de l'Epo et de son récepteur Epo-R au cours du vieillissement, spécifiquement dans l'hippocampe.

II-3.1. L'expression du récepteur Epo-R varie fortement au cours du développement et du vieillissement.

Le niveau d'expression du récepteur Epo-R déterminerait, selon certains auteurs, la réponse tissulaire à l'Epo [45]. Les études antérieures avaient analysé l'expression du récepteur Epo-R, de la période embryonnaire à l'âge adulte, et avaient montré qu'au niveau cérébral, la plus forte expression du transcrite codant le récepteur Epo-R est mesurée au jour embryonnaire E10,5, diminuant ensuite rapidement pour arriver, à E16,5, à une valeur environ 10 000 fois inférieure à celle mesurée à E10,5, pour finalement se stabiliser jusqu'à l'âge adulte [162]. Au niveau protéique, l'analyse de l'expression de la protéine Epo-R sur des homogénats de cerveau entier par western blot avait montré de fortes variations développementales, le maximum étant observé à E13, la valeur adulte, 10 fois inférieure à celle mesurée à E13, étant atteinte dès P5 [144]. Ces études antérieures, qui avaient intégré des échelles de variations extrêmement larges, ne permettaient pas de mettre en évidence des variations d'expression subtiles, et vraisemblablement pertinentes d'un point de vue fonctionnel, au cours du développement postnatal et au cours du vieillissement. En outre,

l'analyse sur homogénat de cerveau entier ne permettait pas de répondre à la question de savoir si les variations d'expression du récepteur Epo-R sont identiques dans toutes les régions cérébrales qui l'expriment. Notre étude est la première à mettre en évidence une régulation physiologique de l'expression du récepteur Epo-R au cours de la période post-natale, les niveaux de transcrits mesurés dans le néocortex et l'hippocampe à P2 étant largement supérieurs à ceux mesurés à l'âge adulte. En outre, nous mettons en évidence que si les profils d'expression du transcrit Epo-R sont relativement similaires entre le néocortex et l'hippocampe, ils sont nettement différents de celui dans l'hypothalamus. En effet, dans ce dernier, le niveau d'expression du transcrit Epo-R est maximal à l'âge adulte. Enfin, nous montrons que la mesure de l'expression du récepteur Epo-R dans des homogénats de cerveau entier peut masquer des variations importantes entre différentes régions, même à l'âge adulte. Ainsi, le niveau d'expression tissulaire du transcrit codant pour l'Epo-R chez l'adulte est plus élevé dans l'hypothalamus que dans le néocortex, le niveau le plus faible ayant été mesuré dans l'hippocampe.

II-3.2. La régulation de l'expression du récepteur Epo-R pourrait être sous la dépendance de l'Epo au cours du développement et du vieillissement cérébral.

L'induction cérébrale du récepteur Epo-R impliquerait le facteur de transcription GATA-3, dont l'expression est stimulée par l'Epo [45]. En outre, il a été montré sur des cultures de cellules endothéliales que l'hypoxie et l'Epo stimulent l'expression du récepteur Epo-R [11]. Nous avons montré que l'expression cérébrale du récepteur Epo-R est fortement corrélée à celle de l'Epo, toutes périodes post-natales et toutes régions cérébrales confondues. Il se pourrait donc que l'expression cérébrale du récepteur Epo-R, qui se limite essentiellement aux neurones dans les conditions physiologiques à tous les stades du développement post-natal et de la maturité que nous avons examinés et dans les trois régions cérébrales sélectionnées, soit sous la dépendance de l'Epo.

II-3.3. La chaîne β commune ne ferait pas partie du récepteur fonctionnel de l'Epo au niveau cérébral.

Le développement de molécules dérivées de l'Epo, dotées de son effet neuroprotecteur mais dépourvues de son activité hématopoïétique, a suscité la recherche du récepteur par lequel passe l'effet neuroprotecteur de l'Epo. Il est aujourd'hui clairement admis que l'effet

hématopoïétique de l'Epo fait intervenir un récepteur composé d'un homodimère (Epo-R)₂ [130]. En revanche, les dérivés neuroprotecteurs de l'Epo, tels que l'Epo carbamylée, n'ont qu'une très faible affinité pour cet homodimère [153]. Le récepteur de l'Epo responsable de ses effets neuroprotecteurs ne peut donc pas être l'homodimère (Epo-R)₂. Afin de rechercher quelles composantes pouvaient former ce récepteur, des études comparatives ont été menées au niveau de la famille des cytokines de classe I, à laquelle appartiennent l'Epo, mais aussi le GM-CSF, l'IL-3 et l'IL-5. Ces derniers ont pour particularité de ne pas avoir pour récepteur un homodimère, mais un hétérodimère composé d'une sous-unité α spécifique de chaque cytokine (récepteur GM-CSF, récepteur IL-3R ou récepteur IL-5R), et d'une sous-unité commune appelée chaîne β commune (β c). Il a donc été recherché si le récepteur responsable de l'effet neuroprotecteur de l'Epo ne pouvait pas être constitué de l'assemblage d'une sous-unité α (récepteur Epo-R) avec la chaîne β c. Des expérimentations réalisées sur des souris transgéniques n'exprimant pas la chaîne β c ont montré que l'Epo n'avait plus aucun effet neuroprotecteur, bien que le niveau d'expression du récepteur Epo-R soit similaire à celle des souris sauvages [23]. Il a donc été proposé à partir de ces résultats que le récepteur responsable de l'effet neuroprotecteur de l'Epo soit composé d'un monomère du récepteur Epo-R et d'un homodimère de chaîne β c [Epo-R/(β c)₂] [22]. Nous montrons que l'expression du transcrite codant pour la chaîne β c n'est ni corrélée à celle du transcrite codant pour le récepteur Epo-R, ni à celle du transcrite codant pour l'Epo. En outre, le signal correspondant à la détection immunohistochimique de la chaîne β c ne recouvre quasiment jamais celui correspondant au récepteur Epo-R. Enfin, nous démontrons sur des cellules PC12 que la β c n'est jamais exprimée, aussi bien dans les conditions favorisant leur prolifération, que dans les conditions induisant leur différenciation neuronale, bien que la différenciation neuronale induise une très forte augmentation de l'expression du récepteur Epo-R. Toutes nos observations nous amènent à invalider la proposition selon laquelle le récepteur responsable de l'effet neuroprotecteur de l'Epo serait composé de la chaîne β c. Aujourd'hui, s'il ne fait nul doute que la protéine Epo-R fait partie du récepteur central de l'Epo, le(s) partenaire(s) moléculaire(s) associé(s) demeure(nt) inconnu(s).

II-3.4. Rôles potentiels de la régulation de l'expression de l'Epo et de son récepteur au cours du développement et du vieillissement.

Les modifications de l'expression cérébrale de l'Epo et de l'Epo-R que nous avons mises en évidence au cours du développement post-natal suggèrent que l'Epo joue un rôle

important dans la mise en place des structures cérébrales. La délétion du gène codant pour le récepteur Epo-R chez des souris est associée à une augmentation de l'apoptose au niveau cérébral dès le jour embryonnaire E10,5 [287]. Ces souris, dont la mort survient peu de temps après la naissance à cause d'une anémie sévère, peuvent être sauvées par l'introduction d'un transgène assurant l'expression du récepteur Epo-R spécifiquement au niveau des cellules progénitrices d'érythroïdes, qui survivent jusqu'à l'âge adulte et restent fertiles. Ces résultats indiquent que l'expression cérébrale du récepteur Epo-R ne serait pas indispensable à la survie, malgré une importante dégénérescence neuronale [255]. Il se peut toutefois que l'absence de voies de signalisation de l'Epo ait été compensée au niveau cérébral chez ces souris par le recrutement d'autres systèmes trophiques.

Nous avons observé une forte expression du récepteur Epo-R à P5, au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Il se pourrait donc que chez les jeunes ratons, l'Epo stimule la formation de capillaires sanguins, comme l'ont démontré des études réalisées au cours de l'embryogenèse sur des souris dont l'expression de l'Epo ou du récepteur Epo-R a été invalidée [143]. C'est à P5 également que nous avons montré une très forte expression du récepteur Epo-R au niveau des interneurons GABAergiques, aussi bien au niveau de l'hippocampe que du néocortex. C'est entre P5 et P15 qu'un ajustement du nombre d'interneurons GABAergiques est réalisé par mort cellulaire programmée [131,282]. Compte tenu du rôle neuroprotecteur de l'Epo, il se pourrait que la forte diminution du transcrit codant pour le récepteur Epo-R, associée à celle du transcrit codant pour l'Epo, observée entre P2 et P14 dans le néocortex et l'hippocampe contribue à la dégénérescence des interneurons GABAergiques. Actuellement, les grands prématurés sont traités par l'Epo recombinante, afin de stimuler l'érythropoïèse et lutter contre l'anémie sévère dont ils souffrent [19]. L'Epo recombinante, quand elle est administrée à fortes doses, passe la barrière hémato-encéphalique non seulement chez le rat, la souris ou le primate non-humain adulte [24,79,136], mais aussi chez les très jeunes mammifères, comme le fœtus du mouton [136] ou le jeune raton à P5 comme le montrent des résultats acquis récemment dans l'équipe de Laurent Bezin. Il se pourrait que les administrations de fortes doses d'Epo recombinante à ces jeunes âges perturbent la mise en place du réseau vasculaire. Ces administrations pourraient également profondément bouleverser la mise en place des circuits neuronaux participant à la régulation de l'excitabilité neuronale, par une protection trop importante des interneurons GABAergiques à une période au cours de laquelle on assiste à une réduction massive de leur nombre. Des études sont actuellement en cours dans l'équipe, afin d'étudier les répercussions

fonctionnelles à long terme de l'administration de fortes doses d'Epo recombinante entre P5 et P8.

A l'âge adulte, l'expression du récepteur Epo-R et de l'Epo dans l'hippocampe et le néocortex pourrait contribuer au renouvellement des contingents neuronaux, puisqu'il a été montré aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* que l'Epo régule la production de progéniteurs neuronaux [236]. En outre, le système EPOergique contribue à l'âge adulte à la réparation et à la restructuration tissulaire à la suite d'atteintes cérébrales, comme en témoignent de nombreuses études [22,113,172]. Nos résultats montrent également une importante induction de l'Epo et du récepteur Epo-R dans l'hippocampe dans les périodes précoces du vieillissement (12 mois). Il se pourrait que cette induction soit une réponse protectrice du tissu hippocampique pour palier à la diminution d'autres facteurs qui pourrait menacer la survie neuronale. La dégénérescence neuronale observée au cours du vieillissement pourrait alors être retardée par l'administration d'Epo recombinante chez le sujet âgé. Récemment, l'induction du récepteur Epo-R a été mise en évidence au niveau des populations neuronales et astrocytaires dans l'hippocampe et le cortex de patients schizophrènes [79]. Des études cliniques sont actuellement engagées afin de savoir si le traitement par l'Epo recombinante peut protéger contre la dégénérescence neuronale observée dans cette pathologie, souvent associée à l'aggravation de la maladie [79].

II-3.5. Conclusion

Cette étude est la première à mettre en évidence de fortes variations de l'expression neuronale de l'Epo et de son récepteur Epo-R au cours du développement post-natal et du vieillissement. En outre, les résultats obtenus excluent toute participation de la chaîne β commune à la composition du récepteur fonctionnel de l'Epo au niveau cérébral. Enfin, la forte présence du récepteur Epo-R sur les interneurons GABAergiques et les cellules endothéliales des capillaires sanguins à P5 laisse présager que l'administration thérapeutiques d'Epo recombinante chez le jeune puisse entraîner d'importantes modifications des réseaux capillaires et neuronaux lourdes de conséquences au niveau fonctionnelle.

CONCLUSION GENERALE

Notre travail de thèse visait à **rechercher si l'apport exogène d'Epo pouvait favoriser la survie neuronale, en soutien à l'action protectrice de l'Epo endogène, dans le cadre d'une agression cérébrale sévère**. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps recherché si l'Epo endogène et exogène pouvaient être impliquées dans la survie des neurones de l'hippocampe à la suite d'un *status epilepticus* induit par pilocarpine (Pilo-SE) chez le rat adulte et, dans un second temps, vérifié l'implication potentielle de la βc dans la formation d'un récepteur permettant la transduction cellulaire du signal de survie induit par l'Epo.

Nos résultats sont les premiers à avoir mis en évidence :

- ∞ Que le récepteur Epo-R est exprimé, dans les conditions basales, par la majorité des neurones de l'hippocampe et rarement par les astrocytes. En revanche, l'Epo est exprimée par les neurones et par quelques astrocytes résidents.
- ∞ Qu'à la suite d'un SE, i) les astrocytes expriment transitoirement l'Epo au niveau de l'hippocampe, les aires hippocampiques où l'induction astrocytaire de l'Epo étant la plus forte présentant les meilleurs scores de survie neuronale, et ii) le récepteur Epo-R est induit dans l'hippocampe de façon permanente.
- ∞ Qu'en dépit de l'activation du système EPOergique endogène, de nombreux neurones hippocampiques dégénèrent, en particulier les cellules moussues du hile qui ont été décrites comme faisant partie des cellules les plus vulnérables du SNC.
- ∞ Que l'administration de rHuEpo protège significativement les neurones hippocampiques contre l'excitotoxicité glutamatergique induite par le SE, et notamment les cellules moussues du hile.
- ∞ Que la βc n'est pas impliquée dans les effets centraux de l'Epo, que ce soit : i) dans les conditions physiopathologiques, à la suite d'un Pilo-SE, ou ii) dans les conditions physiologiques, au cours du développement et du vieillissement.

I. L'induction astrocytaire d'Epo prolonge la survie des neurones hippocampiques en réponse à un Pilo-SE.

Un rôle potentiel de l'Epo au niveau du SNC avait été suggéré par la mise en évidence de nombreux sites de liaisons de l'Epo au sein du tissu cérébral chez la souris [71]. Afin de

déterminer ce rôle, de nombreuses études ont recherché quels types cellulaires exprimaient l'Epo et de son récepteur. Les premiers résultats obtenus *in vivo* chez le rongeur et l'homme avait aboutis à la conclusion que les astrocytes étaient la principale source cérébrale de l'Epo [16,238]. Pourtant, notre caractérisation minutieuse des différents types cellulaires qui expriment l'Epo et son récepteur, aussi bien durant le développement du SNC que chez l'adulte, s'oppose catégoriquement à cette idée et démontre que les neurones représentent la principale source de l'Epo et du récepteur Epo-R dans les conditions basales.

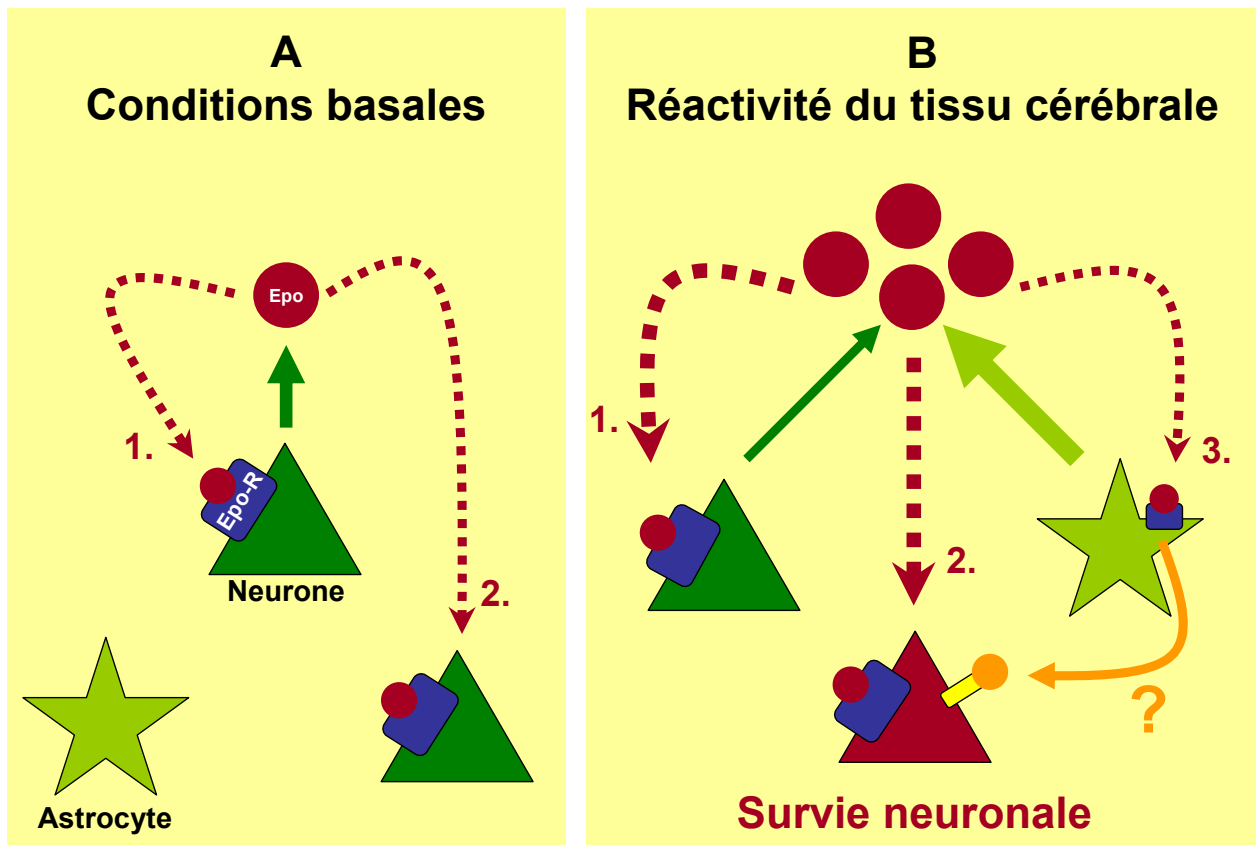


Figure C1. L'activation endogène de l'expression d'érythropoïétine induit la survie neuronale à la suite d'une agression cérébrale. A. L'activité basale de l'Epo cérébrale est assurée par son action autocrine (1.) et paracrine (2.) au niveau des neurones l'exprimant et présentant son récepteur (Epo-R) à leurs surfaces. B. L'action neuroprotectrice de l'Epo, induite par les astrocytes en réponse à une agression cérébrale, est liée i) à une protection directe des neurones par un renforcement de ses voies d'action autocrine (1.) et paracrine (2.), mais aussi ii) à son action indirect sur les astrocytes en stimulant la libération par ceux-ci d'un facteur secondaire (3.) qui viens induire la survie neuronale.

De nombreuses études avaient déjà décrit une induction de l'expression de l'Epo et de son récepteur, notamment au niveau astrocytaire, en réponse à une agression cérébrale. Les profils d'induction de l'Epo et du récepteur Epo-R que nous avons observés sont en accord avec ceux qui ont été rapportés chez la souris au niveau du cortex à la suite d'une ischémie cérébrale [16], et chez le rat à la suite d'un traumatisme infligé au niveau de la moëlle

épinière [107,110], ou des nerfs périphériques [159]. En revanche, nos résultats n'ont jamais permis de détecter l'expression de l'Epo et du récepteur Epo-R ni dans la microglie activée, ni dans les cellules endothéliales à la suite du Pilo-SE, comme cela avait été précédemment décrit dans d'autres modèles d'agression cérébrale [16,238]. De plus, le fait que les régions où l'induction astrocytaire d'Epo est la plus forte présentent une meilleure robustesse neuronale, renforce des travaux antérieurs qui avaient montré *in vitro* que les neurones corticaux pouvaient être protégés par l'Epo libérée par les astrocytes en réponse à une hypoxie sévère [225]. Enfin, l'expression simultanée de l'Epo et du récepteur Epo-R par les astrocytes à la suite du Pilo-SE laisse augurer que l'Epo agirait de façon autocrine ou paracrine sur les astrocytes eux-mêmes, stimulant alors la libération d'un facteur astrocytaire secondaire impliqué dans la survie neuronale, comme le facteur NGF par exemple [205,256] (Figure C1).

II. L'apport exogène d'Epo assure une protection efficace des neurones hippocampiques à la suite d'un Pilo-SE.

Le niveau d'expression basal de l'Epo au niveau du SNC serait suffisant pour soutenir la protection des neurones hippocampiques contre des atteintes cérébrales légères [227]. En revanche, l'administration exogène d'Epo a rapidement présenté des propriétés neuroprotectrices considérables contre des agressions neuronales de forte intensité, aussi bien au niveau central que périphérique [35,171]; [22]. Toutefois, l'effet de l'Epo recombinante humaine (rHuEpo) sur la dégénérescence neuronale n'avait jamais été analysé dans un modèle animal d'hyperexcitabilité cérébrale sévère, comme le SE, même si des études pionnières avaient révélé chez le rongeur que la rHuEpo pouvait bloquer le développement du SE [24,262].

A la suite du SE, nos résultats montrent que l'induction transitoire d'Epo n'est pas suffisante pour permettre une protection efficace des neurones, même au niveau de la SLMO où celle-ci est la plus intense. En revanche, nous avons démontré que l'administration thérapeutique de rHuEpo, à la suite du Pilo-SE, augmente significativement la survie des neurones de l'ensemble des régions hippocampiques étudiées, et notamment les cellules moussues qui sont les neurones les plus vulnérables de l'hippocampe. L'ensemble de nos résultats indique que la rHuEpo peut agir en synergie avec l'induction endogène d'Epo par les

astrocytes afin d'assurer une protection neuronale plus efficace dans l'ensemble des régions de l'hippocampe à la suite d'un SE.

III. La βc n'est pas impliquée dans la formation d'un récepteur spécifique assurant les effets neuroprotecteurs de l'Epo.

Si l'ensemble des résultats expérimentaux suggère que l'Epo peut devenir un agent thérapeutique robuste et efficace dans le traitement de nombreuses maladies neurodégénératives, les résultats cliniques obtenus chez des patients anémiques traités à la rHuEpo mettent en garde contre des effets périphériques délétères associés à l'administration chronique de cette molécule hématopoïétique [22,171]. Cette crainte a justifié le développement de nouvelles molécules dérivées de l'Epo, comme l'Epo carbamylée (CEpo), qui conservent une activité neuroprotectrice centrale, mais qui sont dépourvues d'une activité hématopoïétique [153]. L'absence d'effet neuroprotecteur de la CEpo observé sur de souris transgéniques, dont l'expression de la chaîne β commune (βc) avait été invalidée, a fait naître l'hypothèse selon laquelle le récepteur à l'Epo impliqué dans la neuroprotection serait composé par l'association atypique d'une sous-unité α , appelée récepteur Epo-R, avec un homodimère de βc [22]. Malheureusement, la description *in situ* de l'expression cérébrale de la βc chez des animaux de phénotype sauvage restait encore inconnue.

Chez le rat, la caractérisation moléculaire et cellulaire de l'expression cérébrale du récepteur Epo-R et de la βc au cours du développement, de la maturation et du vieillissement du SNC a démontré que le récepteur Epo-R présente une expression majoritairement neuronale alors que la présence de la βc reste très discrète et restreinte à certaines populations neuronales. De plus, à l'âge adulte, nous avons mis en évidence un déséquilibre du niveau d'expression basal de la βc entre le système nerveux central et périphérique avec une très faible expression au niveau de l'hippocampe par rapport à son abondante expression au niveau de la moëlle épinière qui sont deux structures protégées par l'administration de rHuEpo. Enfin, cette absence de régulation coordonnée de l'expression cérébrale du récepteur Epo-R et de la βc a également été observée en réponse à un Pilo-SE, avec une induction essentiellement astrocytaire pour le récepteur Epo-R et microgliale pour la βc . L'ensemble de ces résultats démontre que l'existence d'un récepteur de l'Epo, qui serait composé du récepteur Epo-R et la βc , est impossible au niveau cérébral, non seulement à l'état basal, mais

aussi en réponse à une agression cérébrale. Nos résultats permettent donc de rejeter l'hypothèse selon laquelle la βc serait impliquée dans la transduction du signal de survie neuronale induit par l'Epo (Figure C2).

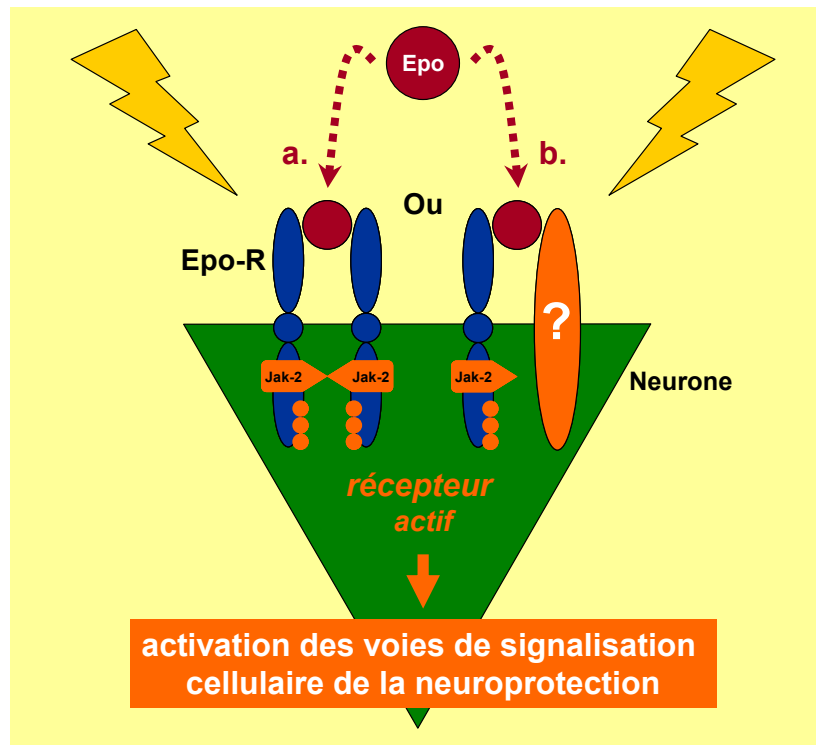


Figure C2. Le récepteur de la neuroprotection par l'Epo. Le signal de survie neuronale induit par l'Epo est assuré par son récepteur Epo-R présent à la surface des neurones soit sous sa forme homodimérique (a.) soit associé avec une autre sous-unité encore inconnue (b.).

IV. Conclusions et Perspectives

Cette étude est la première à mettre en évidence à la suite d'un SE, que l'administration de rHuEpo présente un effet bénéfique sur la survie des neurones présent dans les régions dorsales de l'hippocampe en venant soutenir l'action endogène de l'Epo produite par les astrocytes. En revanche, aucune protection n'a été observée dans les régions ventrales hippocampiques, ce résultat pouvant s'expliquer par l'absence d'expression de l'Epo-R par ces régions.

➤ Un travail de thèse, réalisé actuellement au sein de l'équipe, recherche si le réveil de l'expression de l'Epo-R au niveau des régions ventrales de l'hippocampe, grâce à une

exposition hypoxique, permettrait de restaurer l'effet de l'administration de rHuEpo et de protéger celles-ci contre le Pilo-SE.

Sachant que des effets bénéfiques d'un traitement à la rHuEpo ont déjà été décrits chez des patients ayant subi un accident vasculaire cérébral [80], nos résultats encouragent vivement son utilisation clinique afin de limiter les complications neurologiques qui surviennent chez les patients ayant subi un épisode sévère de SE.

➤ Il serait judicieux de vérifier si la prise en charge rapide de patients ayant subi un SE par un traitement à la rHuEpo permettrait une protection efficace de leurs hippocampes, ce qui favoriserait une récupération plus rapide de leurs capacités psychomotrices et limiterait les modifications comportementales dont souffrent fréquemment les patients épileptiques.

En revanche, l'observation selon laquelle le récepteur Epo-R est très fortement exprimé par les neurones GABAergiques durant la période développementale suggère que l'administration de rHuEpo chez le nourrisson pourrait interférer avec la mise en place du réseau neuronal et entraîner des perturbations néfastes de l'équilibre excitation/inhibition à l'âge adulte.

➤ Nous rechercherons les répercussions à l'âge adulte d'une administration de rHuEpo chez des rats sur le développement du SNC. Pour ce faire, nous vérifierons si il existe i) une augmentation du nombre de neurones GABAergiques, ii) des modifications comportementales (piscine de Morris), iii) des modifications de l'excitabilité cérébrale (mesure de l'EEG) ou iv) de la transmission synaptique (mesure de la LTD et la LTP sur tranches d'hippocampe).

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- [1] D. Agnello, P. Bigini, P. Villa, T. Mennini, A. Cerami, M.L. Brines and P. Ghezzi, Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis, *Brain Res* 952 (2002) 128-134.
- [2] D.G. Amaral, A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat, *The Journal of comparative neurology* 182 (1978) 851-914.
- [3] D.G. Amaral and M.P. Witter, Hippocampal formation. In: G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system*, Academic Press, San Diego, 1995, pp. 443-493.
- [4] A. Anagnostou, E.S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson and M. Steiner, Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 5978-5982.
- [5] C. Ananth, S. Thameem Dheen, P. Gopalakrishnakone and C. Kaur, Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response, *J Neurosci Res* 66 (2001) 177-190.
- [6] K. Appel, M. Buttini, A. Sauter and P.J. Gebicke-Haerter, Cloning of rat interleukin-3 receptor beta-subunit from cultured microglia and its mRNA expression in vivo, *Journal of Neuroscience* 15 (1995) 5800-5809.
- [7] Y. Asami, Y. Kagaya, M. Takeda, N. Yamaguchi, H. Tada, K. Ito, J. Ohta, T. Shiroto, K. Shirato, N. Minegishi and H. Shimokawa, Protective role of endogenous erythropoietin system in nonhematopoietic cells against pressure overload-induced left ventricular dysfunction in mice, *Circulation* 115 (2007) 2022-2032.

-B-

- [8] W.A. Banks, N.L. Jumbe, C.L. Farrell, M.L. Niehoff and A.C. Heatherington, Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa, *Eur J Pharmacol* 505 (2004) 93-101.
- [9] J.F. Bazan, Haemopoietic receptors and helical cytokines, *Immunol Today* 11 (1990) 350-354.
- [10] T.G. Beach, W.B. Woodhurst, D.B. MacDonald and M.W. Jones, Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy, *Neurosci Lett* 191 (1995) 27-30.
- [11] B.B. Beleslin-Cokic, V.P. Cokic, X. Yu, B.B. Weksler, A.N. Schechter and C.T. Noguchi, Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells, *Blood* 104 (2004) 2073-2080.
- [12] Y. Ben-Ari, Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture, *Nat Rev Neurosci* 3 (2002) 728-739.
- [13] Y. Ben-Ari and J. Lagowska, [Epileptogenic action of intra-amygdaloid injection of kainic acid], *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 287 (1978) 813-816.
- [14] M. Bergeron, A.Y. Yu, K.E. Solway, G.L. Semenza and F.R. Sharp, Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain, *The European journal of neuroscience* 11 (1999) 4159-4170.
- [15] M. Bernaudin, A. Bellail, H.H. Marti, A. Yvon, D. Vivien, I. Duchatelle, E.T. Mackenzie and E. Petit, Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain, *Glia* 30 (2000) 271-278.

- [16] M. Bernaudin, H.H. Marti, S. Roussel, D. Divoux, A. Nouvelot, E.T. MacKenzie and E. Petit, A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice, *J Cereb Blood Flow Metab* 19 (1999) 643-651.
- [17] M. Bernaudin, A.S. Nedelec, D. Divoux, E.T. MacKenzie, E. Petit and P. Schumann-Bard, Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain, *J Cereb Blood Flow Metab* 22 (2002) 393-403.
- [18] G. Biagini, M. Avoli, J. Marcinkiewicz and M. Marcinkiewicz, Brain-derived neurotrophic factor superinduction parallels anti-epileptic--neuroprotective treatment in the pilocarpine epilepsy model, *J Neurochem* 76 (2001) 1814-1822.
- [19] R. Bierer, M.C. Peceny, C.H. Hartenberger and R.K. Ohls, Erythropoietin concentrations and neurodevelopmental outcome in preterm infants, *Pediatrics* 118 (2006) e635-640.
- [20] J.M. Blasco-Ibanez and T.F. Freund, Distribution, ultrastructure, and connectivity of calretinin-immunoreactive mossy cells of the mouse dentate gyrus, *Hippocampus* 7 (1997) 307-320.
- [21] M. Brines, What evidence supports use of erythropoietin as a novel neurotherapeutic?, *Oncology (Williston Park)* 16 (2002) 79-89.
- [22] M. Brines and A. Cerami, Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system, *Nat Rev Neurosci* 6 (2005) 484-494.
- [23] M. Brines, G. Grasso, F. Fiordaliso, A. Sfacteria, P. Ghezzi, M. Fratelli, R. Latini, Q.W. Xie, J. Smart, C.J. Su-Rick, E. Pobre, D. Diaz, D. Gomez, C. Hand, T. Coleman and A. Cerami, Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 14907-14912.
- [24] M.L. Brines, P. Ghezzi, S. Keenan, D. Agnello, N.C. de Lanerolle, C. Cerami, L.M. Itri and A. Cerami, Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 10526-10531.
- [25] A.R. Brooks-Kayal, M.D. Shumate, H. Jin, T.Y. Rikhter and D.A. Coulter, Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy, *Nat Med* 4 (1998) 1166-1172.
- [26] A.J. Bruce, W. Boling, M.S. Kindy, J. Peschon, P.J. Kraemer, M.K. Carpenter, F.W. Holtzman and M.P. Mattson, Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors, *Nat Med* 2 (1996) 788-794.
- [27] R.K. Bruick and S.L. McKnight, A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science* 294 (2001) 1337-1340.
- [28] P.S. Buckmaster and F.E. Dudek, Neuron loss, granule cell axon reorganization, and functional changes in the dentate gyrus of epileptic kainate-treated rats, *The Journal of comparative neurology* 385 (1997) 385-404.
- [29] P.S. Buckmaster and A.L. Jongen-Relo, Highly specific neuron loss preserves lateral inhibitory circuits in the dentate gyrus of kainate-induced epileptic rats, *J Neurosci* 19 (1999) 9519-9529.
- [30] P.S. Buckmaster, H.J. Wenzel, D.D. Kunkel and P.A. Schwartzkroin, Axon arbors and synaptic connections of hippocampal mossy cells in the rat in vivo, *The Journal of comparative neurology* 366 (1996) 271-292.
- [31] M. Buemi, C. Caccamo, L. Nostro, E. Cavallaro, F. Floccari and G. Grasso, Brain and cancer: the protective role of erythropoietin, *Med Res Rev* 25 (2005) 245-259.

- [32] G. Calapai, M.C. Marciano, F. Corica, A. Allegra, A. Parisi, N. Frisina, A.P. Caputi and M. Buemi, Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation, *Eur J Pharmacol* 401 (2000) 349-356.
- [33] W.M. Campana, R. Misasi and J.S. O'Brien, Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin, *Int J Mol Med* 1 (1998) 235-241.
- [34] W.M. Campana and R.R. Myers, Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury, *Faseb J* 15 (2001) 1804-1806.
- [35] W.M. Campana and R.R. Myers, Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury, *The European journal of neuroscience* 18 (2003) 1497-1506.
- [36] I.L. Campbell, C.R. Abraham, E. Masliah, P. Kemper, J.D. Inglis, M.B. Oldstone and L. Mucke, Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 10061-10065.
- [37] N. Casadevall, K.U. Eckardt and J. Rossert, Epoetin-induced autoimmune pure red cell aplasia, *J Am Soc Nephrol* 16 Suppl 1 (2005) S67-69.
- [38] E.A. Cavalheiro, GAD-immunoreactive neurons are preserved in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures, *Braz J Med Biol Res* 23 (1990) 555-558.
- [39] E.A. Cavalheiro, J.P. Leite, Z.A. Bortolotto, W.A. Turski, C. Ikonomidou and L. Turski, Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures, *Epilepsia* 32 (1991) 778-782.
- [40] E.A. Cavalheiro, M.G. Naffah-Mazzacoratti, L.E. Mello and J.P. Leite, The pilocarpine model of seizures. In: A. Pitkänen, P. Schwartzkroin and S. Moshé (Eds.), *Models of seizures and epilepsy*, Academic Press, 2006, pp. 433-448.
- [41] A. Cayre, F. Rossignol, E. Clottes and F. Penault-Llorca, aHIF but not HIF-1 α transcript is a poor prognostic marker in human breast cancer, *Breast Cancer Res* 5 (2003) R223-230.
- [42] M. Celik, N. Gokmen, S. Erbayraktar, M. Akhisaroglu, S. Konakc, C. Ulukus, S. Genc, K. Genc, E. Sagiroglu, A. Cerami and M. Brines, Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 2258-2263.
- [43] B.S. Chang and D.H. Lowenstein, *Epilepsy*, *N Engl J Med* 349 (2003) 1257-1266.
- [44] C. Chen, L.C. Edelstein and C. Gelinas, The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L), *Mol Cell Biol* 20 (2000) 2687-2695.
- [45] Z.Y. Chen, R. Warin and C.T. Noguchi, Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response, *Neurodegenerative disease* 3 (2006) 68-75.
- [46] K. Chin, N. Oda, K. Shen and C.T. Noguchi, Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs, *Nucleic Acids Res* 23 (1995) 3041-3049.
- [47] K. Chin, X. Yu, B. Beleslin-Cokic, C. Liu, K. Shen, H.W. Mohrenweiser and C.T. Noguchi, Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain, *Molecular Brain Research* 81 (2000) 29-42.
- [48] Z.Z. Chong, J.Q. Kang and K. Maiese, Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways, *Br J Pharmacol* 138 (2003) 1107-1118.
- [49] Z.Z. Chong, J.Q. Kang and K. Maiese, Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases, *Circulation* 106 (2002) 2973-2979.

- [50] Z.Z. Chong, F. Li and K. Maiese, Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity, *Curr Neurovasc Res* 2 (2005) 387-399.
- [51] Y.H. Chung, S.I. Kim, K.M. Joo, Y.S. Kim, W.B. Lee, K.W. Yun and C.I. Cha, Age-related changes in erythropoietin immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of rats, *Brain Res* 1018 (2004) 141-146.
- [52] I. Cohen, V. Navarro, S. Clemenceau, M. Baulac and R. Miles, On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro, *Science* 298 (2002) 1418-1421.
- [53] S. Cory and J.M. Adams, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat Rev Cancer* 2 (2002) 647-656.
- [54] R. Cossart, C. Bernard and Y. Ben-Ari, Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies, *Trends Neurosci* 28 (2005) 108-115.
- [55] L. Covolan and L.E. Mello, Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus, *Epilepsy Res* 39 (2000) 133-152.
- [56] A. Crespel, P. Coubes, M.C. Rousset, C. Brana, A. Rougier, G. Rondouin, J. Bockaert, M. Baldy-Moulinier and M. Lerner-Natoli, Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, *Brain Res* 952 (2002) 159-169.

-D-

- [57] C. Dame, S.E. Juul and R.D. Christensen, The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential, *Biology of the neonate* 79 (2001) 228-235.
- [58] J.E. Damen, H. Wakao, A. Miyajima, J. Krosi, R.K. Humphries, R.L. Cutler and G. Krystal, Tyrosine 343 in the erythropoietin receptor positively regulates erythropoietin-induced cell proliferation and Stat5 activation, *Embo J* 14 (1995) 5557-5568.
- [59] N.N. Danial and S.J. Korsmeyer, Cell death: critical control points, *Cell* 116 (2004) 205-219.
- [60] S.R. Datta, H. Dudek, X. Tao, S. Masters, H. Fu, Y. Gotoh and M.E. Greenberg, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell* 91 (1997) 231-241.
- [61] F. de Bock, J. Dornand and G. Rondouin, Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage, *Neuroreport* 7 (1996) 1125-1129.
- [62] N.C. de Lanerolle, T. Eid, G. von Campe, I. Kovacs, D.D. Spencer and M. Brines, Glutamate receptor subunits GluR1 and GluR2/3 distribution shows reorganization in the human epileptogenic hippocampus, *The European journal of neuroscience* 10 (1998) 1687-1703.
- [63] N.C. de Lanerolle, J.H. Kim, R.J. Robbins and D.D. Spencer, Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy, *Brain Res* 495 (1989) 387-395.
- [64] N.C. de Lanerolle, J.H. Kim, A. Williamson, S.S. Spencer, H.P. Zaveri, T. Eid and D.D. Spencer, A retrospective analysis of hippocampal pathology in human temporal lobe epilepsy: evidence for distinctive patient subcategories, *Epilepsia* 44 (2003) 677-687.
- [65] M.G. De Simoni, C. Perego, T. Ravizza, D. Moneta, M. Conti, F. Marchesi, A. De Luigi, S. Garattini and A. Vezzani, Inflammatory cytokines and related genes are

- induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus, *The European journal of neuroscience* 12 (2000) 2623-2633.
- [66] C.M. DeGiorgio, P.S. Gott, A.L. Rabinowicz, C.N. Heck, T.D. Smith and J.D. Correale, Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus, *Epilepsia* 37 (1996) 606-609.
- [67] C.M. DeGiorgio, U. Tomiyasu, P.S. Gott and D.M. Treiman, Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus, *Epilepsia* 33 (1992) 23-27.
- [68] M.R. Del Bigio, Proliferative status of cells in adult human dentate gyrus, *Microsc Res Tech* 45 (1999) 353-358.
- [69] R.J. DeLorenzo, W.A. Hauser, A.R. Towne, J.G. Boggs, J.M. Pellock, L. Penberthy, L. Garnett, C.A. Fortner and D. Ko, A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia, *Neurology* 46 (1996) 1029-1035.
- [70] E.J. Demers, R.J. McPherson and S.E. Juul, Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia, *Pediatric Research* 58 (2005) 297-301.
- [71] M. Digicaylioglu, S. Bichet, H.H. Marti, R.H. Wenger, L.A. Rivas, C. Bauer and M. Gassmann, Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 3717-3720.
- [72] M. Digicaylioglu, G. Garden, S. Timberlake, L. Fletcher and S.A. Lipton, Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 9855-9860.
- [73] M. Digicaylioglu and S.A. Lipton, Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades, *Nature* 412 (2001) 641-647.
- [74] C. Dinocourt, Z. Petanjek, T.F. Freund, Y. Ben-Ari and M. Esclapez, Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures, *The Journal of comparative neurology* 459 (2003) 407-425.
- [75] M.S. Dordal, F.F. Wang and E. Goldwasser, The role of carbohydrate in erythropoietin action, *Endocrinology* 116 (1985) 2293-2299.
- [76] F.E. Dudek, S. Clark, P.A. Williams and H.L. Grabenstatter, Kainate-induced status epilepticus : a chronic model of acquired epilepsy. In: A. Pitkänen, P. Schwartzkroin and S. Moshé (Eds.), *Models of seizures and epilepsy*, Academic Press, 2006, pp. 415-432.
- [77] J.S. Duncan, J.W. Sander, S.M. Sisodiya and M.C. Walker, Adult epilepsy, *Lancet* 367 (2006) 1087-1100.
- [78] M. Dzierżko, U. Felderhoff-Mueser, M. Siffringer, B. Krutz, P. Bittigau, F. Thor, R. Heumann, C. Bührer, C. Ikonomidou and H.H. Hansen, Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity, *Neurobiol Dis* 15 (2004) 177-187.
- E-
- [79] H. Ehrenreich, D. Degner, J. Meller, M. Brines, M. Behe, M. Hasselblatt, H. Woldt, P. Falkai, F. Knerlich, S. Jacob, N. von Ahsen, W. Maier, W. Bruck, E. Ruther, A. Cerami, W. Becker and A.L. Siren, Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia, *Mol Psychiatry* 9 (2004) 42-54.
- [80] H. Ehrenreich, M. Hasselblatt, C. Dembowski, L. Cepek, P. Lewczuk, M. Stiefel, H.H. Rustenbeck, N. Breiter, S. Jacob, F. Knerlich, M. Bohn, W. Poser, E. Ruther, M. Kochen, O. Gefeller, C. Gleiter, T.C. Wessel, M. De Ryck, L. Itri, H. Prange, A.

- Cerami, M. Brines and A.L. Siren, Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial, *Mol Med* 8 (2002) 495-505.
- [81] H. Ehrenreich, M. Hasselblatt, F. Knerlich, N. von Ahsen, S. Jacob, S. Sperling, H. Woldt, K. Vehmeyer, K.A. Nave and A.L. Siren, A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 862-867.
- [82] T. Eid, M.L. Brines, A. Cerami, D.D. Spencer, J.H. Kim, J.S. Schweitzer, O.P. Ottersen and N.C. de Lanerolle, Increased expression of erythropoietin receptor on blood vessels in the human epileptogenic hippocampus with sclerosis, *J Neuropathol Exp Neurol* 63 (2004) 73-83.
- [83] S. Elliott, T. Lorenzini, D. Chang, J. Barzilay and E. Delorme, Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin, *Blood* 89 (1997) 493-502.
- [84] S. Erbayraktar, G. Grasso, A. Sfacteria, Q.W. Xie, T. Coleman, M. Kreilgaard, L. Torup, T. Sager, Z. Erbayraktar, N. Gokmen, O. Yilmaz, P. Ghezzi, P. Villa, M. Fratelli, S. Casagrande, M. Leist, L. Helboe, J. Gerwein, S. Christensen, M.A. Geist, L.O. Pedersen, C. Cerami-Hand, J.P. Wuerth, A. Cerami and M. Brines, Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 6741-6746.

-F-

- [85] W.C. Faquin, T.J. Schneider and M.A. Goldberg, Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production, *Blood* 79 (1992) 1987-1994.
- [86] T.N. Ferraro and R.J. Buono, Polygenic epilepsy, *Adv Neurol* 97 (2006) 389-398.
- [87] Y.G. Figueroa, A.K. Chan, R. Ibrahim, Y. Tang, M.E. Burow, J. Alam, A.B. Scandurro and B.S. Beckman, NF-kappaB plays a key role in hypoxia-inducible factor-1-regulated erythropoietin gene expression, *Experimental hematology* 30 (2002) 1419-1427.
- [88] J.W. Fisher, Erythropoietin: physiology and pharmacology update, *Exp Biol Med* (Maywood) 228 (2003) 1-14.
- [89] C. Foresta, R. Mioni, P. Bordon, D. Miotto, G. Montini and A. Varotto, Erythropoietin stimulates testosterone production in man, *J Clin Endocrinol Metab* 78 (1994) 753-756.
- [90] S. Frede, J. Fandrey, H. Pagel, T. Hellwig and W. Jelkmann, Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats, *Am J Physiol* 273 (1997) R1067-1071.
- [91] T.F. Freund and G. Buzsaki, Interneurons of the hippocampus, *Hippocampus* 6 (1996) 347-470.
- [92] T.F. Freund, N. Hajos, L. Acsady, T.J. Gorcs and I. Katona, Mossy cells of the rat dentate gyrus are immunoreactive for calcitonin gene-related peptide (CGRP), *The European journal of neuroscience* 9 (1997) 1815-1830.
- [93] D.G. Fujikawa, Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults, *Trends Neurosci* 23 (2000) 410-411.
- [94] D.G. Fujikawa, The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus, *Brain Res* 725 (1996) 11-22.
- [95] D.G. Fujikawa, S.S. Shinmei and B. Cai, Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats, *The European journal of neuroscience* 11 (1999) 1605-1614.

-G-

- [96] D.S. Gary, A.J. Bruce-Keller, M.S. Kindy and M.P. Mattson, Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor, *J Cereb Blood Flow Metab* 18 (1998) 1283-1287.
- [97] K. Genc, S. Genc, H. Baskin and I. Semin, Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes, *Physiol Res* 55 (2006) 33-38.
- [98] S. Genc, T.F. Koroglu and K. Genc, Erythropoietin and the nervous system, *Brain Research* 1000 (2004) 19-31.
- [99] S. Genc, F. Kuralay, K. Genc, M. Akhisaroglu, S. Fadiloglu, K. Yorukoglu, M. Fadiloglu and A. Gure, Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production, *Neurosci Lett* 298 (2001) 139-141.
- [100] P. Ghezzi and M. Brines, Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine, *Cell Death and Differentiation* 11 Suppl 1 (2004) S37-44.
- [101] J.W. Gibbs, 3rd, M.D. Shumate and D.A. Coulter, Differential epilepsy-associated alterations in postsynaptic GABA(A) receptor function in dentate granule and CA1 neurons, *Journal of neurophysiology* 77 (1997) 1924-1938.
- [102] J.M. Gil, M. Leist, N. Popovic, P. Brundin and A. Petersen, Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice, *BMC Neurosci* 5 (2004) 17.
- [103] M.D. Ginsberg and R. Busto, Rodent models of cerebral ischemia, *Stroke* 20 (1989) 1627-1642.
- [104] D. Giulian, Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival, *Glia* 7 (1993) 102-110.
- [105] D. Giulian, J. Li, X. Li, J. George and P.A. Rutecki, The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS, *Dev Neurosci* 16 (1994) 128-136.
- [106] A. Gorio, N. Gokmen, S. Erbayraktar, O. Yilmaz, L. Madaschi, C. Cichetti, A.M. Di Giulio, E. Vardar, A. Cerami and M. Brines, Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 9450-9455.
- [107] A. Gorio, L. Madaschi, B. Di Stefano, S. Carelli, A.M. Di Giulio, S. De Biasi, T. Coleman, A. Cerami and M. Brines, Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 16379-16384.
- [108] E. Gothie, D.E. Richard, E. Berra, G. Pages and J. Pouyssegur, Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha, *The Journal of biological chemistry* 275 (2000) 6922-6927.
- [109] G. Grasso, M. Buemi, C. Alafaci, A. Sfacteria, M. Passalacqua, A. Sturiale, G. Calapai, G. De Vico, G. Piedimonte, F.M. Salpietro and F. Tomasello, Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 5627-5631.
- [110] G. Grasso, A. Sfacteria, M. Passalacqua, A. Morabito, M. Buemi, B. Macri, M.L. Brines and F. Tomasello, Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin, *Neurosurgery* 56 (2005) 821-827; discussion 821-827.

- [111] C. Grimm, A. Wenzel, M. Groszer, H. Mayser, M. Seeliger, M. Samardzija, C. Bauer, M. Gassmann and C.E. Reme, HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration, *Nat Med* 8 (2002) 718-724.

-H-

- [112] K.W. Harris and J.C. Winkelmann, Enzyme-linked immunosorbent assay detects a potential soluble form of the erythropoietin receptor in human plasma, *Am J Hematol* 52 (1996) 8-13.
- [113] M. Hasselblatt, H. Ehrenreich and A.L. Siren, The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease, *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 18 (2006) 132-138.
- [114] M. Hatakeyama, H. Mori, T. Doi and T. Taniguchi, A restricted cytoplasmic region of IL-2 receptor beta chain is essential for growth signal transduction but not for ligand binding and internalization, *Cell* 59 (1989) 837-845.
- [115] W.A. Hauser, Status epilepticus: epidemiologic considerations, *Neurology* 40 (1990) 9-13.
- [116] D.H. Henry and R.I. Abels, Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer and chemotherapy-induced anemia: results of double-blind and open-label follow-up studies, *Semin Oncol* 21 (1994) 21-28.
- [117] D.C. Henshall, T. Araki, C.K. Schindler, J.Q. Lan, K.L. Tiekoter, W. Taki and R.P. Simon, Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death, *J Neurosci* 22 (2002) 8458-8465.
- [118] D.C. Henshall, D.P. Bonislawski, S.L. Skradski, J.Q. Lan, R. Meller and R.P. Simon, Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures, *Neurobiol Dis* 8 (2001) 568-580.
- [119] D.C. Henshall, R.S. Clark, P.D. Adelson, M. Chen, S.C. Watkins and R.P. Simon, Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy, *Neurology* 55 (2000) 250-257.
- [120] D.C. Henshall and R.P. Simon, Epilepsy and apoptosis pathways, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25 (2005) 1557-1572.
- [121] D.C. Hesdorffer, G. Logroscino, G. Cascino, J.F. Annegers and W.A. Hauser, Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus, *Ann Neurol* 44 (1998) 908-912.
- [122] J. Hort, G. Brozek, V. Komarek, M. Langmeier and P. Mares, Interstrain differences in cognitive functions in rats in relation to status epilepticus, *Behav Brain Res* 112 (2000) 77-83.
- [123] C.R. Houser, Neuronal loss and synaptic reorganization in temporal lobe epilepsy, *Adv Neurol* 79 (1999) 743-761.

-I & J-

- [124] S. Imagawa, M.A. Goldberg, J. Doweiko and H.F. Bunn, Regulatory elements of the erythropoietin gene, *Blood* 77 (1991) 278-285.
- [125] N. Ishizuka, W.M. Cowan and D.G. Amaral, A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus, *The Journal of comparative neurology* 362 (1995) 17-45.
- [126] M. Isokawa, Decrement of GABAA receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in dentate granule cells in epileptic hippocampus, *Journal of neurophysiology* 75 (1996) 1901-1908.

- [127] K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S.D. Neill, R.J. Kaufman, A. Mufson, J. Sehra, S.S. Jones, R. Hewick, E.F. Fritsch and et al., Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin, *Nature* 313 (1985) 806-810.
- [128] J.L. Jankowsky and P.H. Patterson, The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae, *Prog Neurobiol* 63 (2001) 125-149.
- [129] W. Jelkmann, Erythropoietin: structure, control of production, and function, *Physiol Rev* 72 (1992) 449-489.
- [130] W. Jelkmann, Molecular biology of erythropoietin, *Intern Med* 43 (2004) 649-659.
- [131] M. Jiang, A.A. Oliva, Jr., T. Lam and J.W. Swann, GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: morphologic features and multiple fates, *The Journal of comparative neurology* 439 (2001) 176-192.
- [132] P.T. Jubinsky, O.I. Krijanovski, D.G. Nathan, J. Tavernier and C.A. Sieff, The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor, *Blood* 90 (1997) 1867-1873.
- [133] A.K. Junk, A. Mammis, S.I. Savitz, M. Singh, S. Roth, S. Malhotra, P.S. Rosenbaum, A. Cerami, M. Brines and D.M. Rosenbaum, Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 10659-10664.
- [134] S. Juul, Erythropoietin in the central nervous system, and its use to prevent hypoxic-ischemic brain damage, *Acta Paediatr Suppl* 91 (2002) 36-42.
- [135] S.E. Juul, D.K. Anderson, Y. Li and R.D. Christensen, Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system, *Pediatr Res* 43 (1998) 40-49.
- [136] S.E. Juul, R.J. McPherson, F.X. Farrell, L. Jolliffe, D.J. Ness and C.A. Gleason, Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin, *Biology of the neonate* 85 (2004) 138-144.
- [137] S.E. Juul, A.T. Yachnis and R.D. Christensen, Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus, *Early Hum Dev* 52 (1998) 235-249.
- [138] S.E. Juul, A.T. Yachnis, A.M. Rojiani and R.D. Christensen, Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain, *Pediatr Dev Pathol* 2 (1999) 148-158.

-K-

- [139] E.S. Kandel and N. Hay, The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB, *Experimental cell research* 253 (1999) 210-229.
- [140] J.Q. Kang, Z.Z. Chong and K. Maiese, Akt1 protects against inflammatory microglial activation through maintenance of membrane asymmetry and modulation of cysteine protease activity, *J Neurosci Res* 74 (2003) 37-51.
- [141] E. Kaptanoglu, I. Solaroglu, O. Okutan, H.S. Surucu, F. Akbiyik and E. Beskonakli, Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings, *Neurosurg Rev* 27 (2004) 113-120.
- [142] M. Kawakami, M. Sekiguchi, K. Sato, S. Kozaki and M. Takahashi, Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 39469-39475.
- [143] N. Kertesz, J. Wu, T.H. Chen, H.M. Sucov and H. Wu, The role of erythropoietin in regulating angiogenesis, *Developmental biology* 276 (2004) 101-110.

- [144] W. Knabe, F. Knerlich, S. Washausen, T. Kietzmann, A.L. Siren, G. Brunnett, H.J. Kuhn and H. Ehrenreich, Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain, *Anat Embryol (Berl)* 207 (2004) 503-512.
- [145] K. Koshimura, Y. Murakami, M. Sohmiya, J. Tanaka and Y. Kato, Effects of erythropoietin on neuronal activity, *J Neurochem* 72 (1999) 2565-2572.
- [146] T. Kotti, T. Tapiola, P.J. Riekkinen, Sr. and R. Miettinen, The calretinin-containing mossy cells survive excitotoxic insult in the gerbil dentate gyrus. Comparison of excitotoxicity-induced neuropathological changes in the gerbil and rat, *The European journal of neuroscience* 8 (1996) 2371-2378.
- [147] A. Kretz, C.J. Happold, J.K. Marticke and S. Isenmann, Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation, *Mol Cell Neurosci* 29 (2005) 569-579.
- [148] A. Kumral, N. Uysal, K. Tugyan, A. Sonmez, O. Yilmaz, N. Gokmen, M. Kiray, S. Genc, N. Duman, T.F. Koroglu, H. Ozkan and K. Genc, Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats, *Behavioural Brain Research* 153 (2004) 77-86.

-L-

- [149] D.M. Landis, The early reactions of non-neuronal cells to brain injury, *Annu Rev Neurosci* 17 (1994) 133-151.
- [150] J.N. Langley and T. Kato, The rate of loss of weight in skeletal muscle after nerve section with some observations on the effect of stimulation and other treatment, *J Physiol* 49 (1915) 432-440.
- [151] M.L. Law, G.Y. Cai, F.K. Lin, Q. Wei, S.Z. Huang, J.H. Hartz, H. Morse, C.H. Lin, C. Jones and F.T. Kao, Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 6920-6924.
- [152] C.B. Lawrence, S.M. Allan and N.J. Rothwell, Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat, *The European journal of neuroscience* 10 (1998) 1188-1195.
- [153] M. Leist, P. Ghezzi, G. Grasso, R. Bianchi, P. Villa, M. Fratelli, C. Savino, M. Bianchi, J. Nielsen, J. Gerwien, P. Kallunki, A.K. Larsen, L. Helboe, S. Christensen, L.O. Pedersen, M. Nielsen, L. Torup, T. Sager, A. Sfacteria, S. Erbayraktar, Z. Erbayraktar, N. Gokmen, O. Yilmaz, C. Cerami-Hand, Q.W. Xie, T. Coleman, A. Cerami and M. Brines, Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic, *Science* 305 (2004) 239-242.
- [154] C. Leranthe and J. Kiss, A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic, *J Neurosci* 16 (1996) 7699-7710.
- [155] I.P. Levshina, N.V. Pasikova and N.N. Shuikin, Acquisition of a conditioned avoidance reflex and morphometric characteristics of the sensorimotor cortex in rats subjected to social deprivation in early ontogenesis, *Neurosci Behav Physiol* 36 (2006) 693-701.
- [156] P. Lewczuk, M. Hasselblatt, H. Kamrowski-Kruck, A. Heyer, C. Unzicker, A.L. Siren and H. Ehrenreich, Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin, *Neuroreport* 11 (2000) 3485-3488.
- [157] W. Li, Y. Maeda, R.R. Yuan, S. Elkabes, S. Cook and P. Dowling, Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis, *Ann Neurol* 56 (2004) 767-777.

- [158] W.Q. Li, Q. Jiang, A.R. Khaled, J.R. Keller and S.K. Durum, Interleukin-7 inactivates the pro-apoptotic protein Bad promoting T cell survival, *The Journal of biological chemistry* 279 (2004) 29160-29166.
- [159] X. Li, S.L. Gonias and W.M. Campana, Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury, *Glia* 51 (2005) 254-265.
- [160] Y. Li, G. Takemura, H. Okada, S. Miyata, R. Maruyama, L. Li, M. Higuchi, S. Minatoguchi, T. Fujiwara and H. Fujiwara, Reduction of inflammatory cytokine expression and oxidative damage by erythropoietin in chronic heart failure, *Cardiovasc Res* 71 (2006) 684-694.
- [161] Z. Li, K. Inenaga, S. Kawano, H. Kannan and H. Yamashita, Interleukin-1 beta directly excites hypothalamic supraoptic neurons in rats in vitro, *Neuroreport* 3 (1992) 91-93.
- [162] C. Liu, K. Shen, Z. Liu and C.T. Noguchi, Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 32395-32400.
- [163] J. Liu, P. Narasimhan, F. Yu and P.H. Chan, Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin, *Stroke* 36 (2005) 1264-1269.
- [164] Y. Liu, N. Fujise and T. Kosaka, Distribution of calretinin immunoreactivity in the mouse dentate gyrus. I. General description, *Exp Brain Res* 108 (1996) 389-403.
- [165] B. Longo, L. Covolan, G. Chadi and L.E. Mello, Sprouting of mossy fibers and the vacating of postsynaptic targets in the inner molecular layer of the dentate gyrus, *Exp Neurol* 181 (2003) 57-67.
- [166] A.S. Lossinsky and R.R. Shivers, Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review, *Histol Histopathol* 19 (2004) 535-564.
- [167] D.H. Lowenstein, Status epilepticus: an overview of the clinical problem, *Epilepsia* 40 Suppl 1 (1999) S3-8; discussion S21-22.
- [168] D. Lu, A. Mahmood, C. Qu, A. Goussev, T. Schallert and M. Chopp, Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 22 (2005) 1011-1017.

-M-

- [169] P.J. Magistretti, Neuron-glia metabolic coupling and plasticity, *J Exp Biol* 209 (2006) 2304-2311.
- [170] Z. Magloczky and T.F. Freund, Selective neuronal death in the contralateral hippocampus following unilateral kainate injections into the CA3 subfield, *Neuroscience* 56 (1993) 317-335.
- [171] K. Maiese, F. Li and Z.Z. Chong, Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled?, *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (2004) 577-583.
- [172] K. Maiese, F. Li and Z.Z. Chong, New avenues of exploration for erythropoietin, *Jama* 293 (2005) 90-95.
- [173] H.H. Marti, Erythropoietin and the hypoxic brain, *Journal of Experimental Biology* 207 (2004) 3233-3242.
- [174] H.H. Marti, R.H. Wenger, L.A. Rivas, U. Straumann, M. Digicaylioglu, V. Henn, Y. Yonekawa, C. Bauer and M. Gassmann, Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain, *The European journal of neuroscience* 8 (1996) 666-676.
- [175] O.M. Martinez-Estrada, E. Rodriguez-Millan, E. Gonzalez-De Vicente, M. Reina, S. Vilaro and M. Fabre, Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against

- VEGF-induced permeability, *The European journal of neuroscience* 18 (2003) 2538-2544.
- [176] S. Masuda, M. Nagao and R. Sasaki, Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production, *Int J Hematol* 70 (1999) 1-6.
- [177] S. Masuda, M. Nagao, K. Takahata, Y. Konishi, F. Gallyas, Jr., T. Tabira and R. Sasaki, Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells, *The Journal of biological chemistry* 268 (1993) 11208-11216.
- [178] S. Masuda, M. Okano, K. Yamagishi, M. Nagao, M. Ueda and R. Sasaki, A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes, *The Journal of biological chemistry* 269 (1994) 19488-19493.
- [179] L.M. Masukawa, L.J. Burdette, P. McGonigle, H. Wang, W. O'Connor, M.R. Sperling, M.J. O'Connor and K. Uruno, Physiological and anatomical correlates of the human dentate gyrus: consequences or causes of epilepsy, *Adv Neurol* 79 (1999) 781-794.
- [180] G.W. Mathern, T.L. Babb, J.P. Leite, K. Pretorius, K.M. Yeoman and P.A. Kuhlman, The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy, *Epilepsy Res* 26 (1996) 151-161.
- [181] A.M. Mazarati, K.W. Thompson, L. Suchomelova, R. Sankar, Y. Shirasaka, J. Nissinen, A. Pitkanen, E. Bertram and C.G. Wasterlain, Status epilepticus : electrical stimulation models. In: A. Pitkänen, P. Schwartzkroin and S. Moshé (Eds.), *Models of seizures and epilepsy*, Academic Press, 2006, pp. 449-464.
- [182] J.O. McNamara, Cellular and molecular basis of epilepsy, *J Neurosci* 14 (1994) 3413-3425.
- [183] R.J. McPherson, E.J. Demers and S.E. Juul, Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model, *Neonatology* 91 (2006) 36-43.
- [184] L.E. Mello, E.A. Cavalheiro, A.M. Tan, W.R. Kupfer, J.K. Pretorius, T.L. Babb and D.M. Finch, Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting, *Epilepsia* 34 (1993) 985-995.
- [185] J.E. Merrill and E.N. Benveniste, Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful, *Trends Neurosci* 19 (1996) 331-338.
- [186] M. Mikkonen, H. Soininen, R. Kalvianen, T. Tapiola, A. Ylinen, M. Vapalahti, L. Paljarvi and A. Pitkanen, Remodeling of neuronal circuitries in human temporal lobe epilepsy: increased expression of highly polysialylated neural cell adhesion molecule in the hippocampus and the entorhinal cortex, *Ann Neurol* 44 (1998) 923-934.
- [187] B.A. Miller, D.L. Barber, L.L. Bell, B.K. Beattie, M.Y. Zhang, B.G. Neel, M. Yoakim, L.I. Rothblum and J.Y. Cheung, Identification of the erythropoietin receptor domain required for calcium channel activation, *The Journal of biological chemistry* 274 (1999) 20465-20472.
- [188] M. Minami, Y. Kuraishi and M. Satoh, Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain, *Biochemical and biophysical research communications* 176 (1991) 593-598.
- [189] M. Minami, Y. Kuraishi, T. Yamaguchi, S. Nakai, Y. Hirai and M. Satoh, Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain, *Biochemical and biophysical research communications* 171 (1990) 832-837.
- [190] K. Miyashita, A. Tojo, K. Kimura, A. Goto, M. Omata, K. Nishiyama and T. Fujita, Blood pressure response to erythropoietin injection in hemodialysis and predialysis patients, *Hypertens Res* 27 (2004) 79-84.

- [191] T. Miyazaki, M. Maruyama, G. Yamada, M. Hatakeyama and T. Taniguchi, The integrity of the conserved 'WS motif' common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction, *Embo J* 10 (1991) 3191-3197.
- [192] J. Mladenovic and N.E. Kay, Erythropoietin induces rapid increases in intracellular free calcium in human bone marrow cells, *J Lab Clin Med* 112 (1988) 23-27.
- [193] D.R. Mole, P.H. Maxwell, C.W. Pugh and P.J. Ratcliffe, Regulation of HIF by the von Hippel-Lindau tumour suppressor: implications for cellular oxygen sensing, *IUBMB Life* 52 (2001) 43-47.
- [194] A. Morales, C. Bonnet, N. Bourgoin, T. Touvier, J. Nadam, A. Laglaine, F. Navarro, C. Moulin, B. Georges, J.M. Pequignot and L. Bezin, Unexpected expression of orexin-B in basal conditions and increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis, *Brain Res* 1109 (2006) 164-175.
- [195] K. Morimoto, M. Fahnstock and R.J. Racine, Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain, *Prog Neurobiol* 73 (2004) 1-60.
- [196] E. Morishita, S. Masuda, M. Nagao, Y. Yasuda and R. Sasaki, Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death, *Neuroscience* 76 (1997) 105-116.
- [197] K.C. Mun and T.A. Golper, Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation, *Blood Purif* 18 (2000) 13-17.

-N & O-

- [198] J. Nadam, F. Navarro, P. Sanchez, C. Moulin, B. Georges, A. Laglaine, J.M. Pequignot, A. Morales, P. Ryvlin and L. Bezin, Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus, *Neurobiol Dis* 25 (2007) 412-426.
- [199] A. Nagai, E. Nakagawa, H.B. Choi, K. Hatori, S. Kobayashi and S.U. Kim, Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture, *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 60 (2001) 386-392.
- [200] M. Nagao, H. Suga, M. Okano, S. Masuda, H. Narita, K. Ikura and R. Sasaki, Nucleotide sequence of rat erythropoietin, *Biochim Biophys Acta* 1171 (1992) 99-102.
- [201] L.M. Neckers, aHIF: the missing link between HIF-1 and VHL?, *J Natl Cancer Inst* 91 (1999) 106-107.
- [202] J. Niquet, Y. Ben-Ari and A. Represa, Glial reaction after seizure induced hippocampal lesion: immunohistochemical characterization of proliferating glial cells, *J Neurocytol* 23 (1994) 641-656.
- [203] S.H. Orkin, GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells, *Blood* 80 (1992) 575-581.

-P-

- [204] P.K. Panegyres and J. Hughes, The neuroprotective effects of the recombinant interleukin-1 receptor antagonist rhIL-1ra after excitotoxic stimulation with kainic acid and its relationship to the amyloid precursor protein gene, *J Neurol Sci* 154 (1998) 123-132.
- [205] M.H. Park, S.M. Lee, J.W. Lee, D.J. Son, D.C. Moon, D.Y. Yoon and J.T. Hong, ERK-mediated production of neurotrophic factors by astrocytes promotes neuronal stem cell differentiation by erythropoietin, *Biochemical and biophysical research communications* 339 (2006) 1021-1028.
- [206] G. Paxinos and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn., Academic Press, 1998, 256 pp.

- [207] V.L. Pearson, N.J. Rothwell and S. Toulmond, Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death, *Glia* 25 (1999) 311-323.
- [208] J. Peltola, M. Hurme, A. Miettinen and T. Keranen, Elevated levels of interleukin-6 may occur in cerebrospinal fluid from patients with recent epileptic seizures, *Epilepsy Res* 31 (1998) 129-133.
- [209] C.N. Pierce and D.F. Larson, Inflammatory cytokine inhibition of erythropoiesis in patients implanted with a mechanical circulatory assist device, *Perfusion* 20 (2005) 83-90.
- [210] A. Pitkanen and T.P. Sutula, Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy, *Lancet Neurol* 1 (2002) 173-181.
- [211] J.L. Poirier, R. Capek and Y. De Koninck, Differential progression of Dark Neuron and Fluoro-Jade labelling in the rat hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus, *Neuroscience* 97 (2000) 59-68.
- [212] H. Pollard, S. Cantagrel, C. Charriaut-Marlangue, J. Moreau and Y. Ben Ari, Apoptosis associated DNA fragmentation in epileptic brain damage, *Neuroreport* 5 (1994) 1053-1055.
- [213] K. Prass, A. Scharff, K. Ruscher, D. Lowl, C. Muselmann, I. Victorov, K. Kapinya, U. Dirnagl and A. Meisel, Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin, *Stroke* 34 (2003) 1981-1986.
- [214] L. Probert, K. Akassoglou, M. Pasparakis, G. Kontogeorgos and G. Kollias, Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 11294-11298.
- [215] G.V. Putcha, M. Deshmukh and E.M. Johnson, Jr., BAX translocation is a critical event in neuronal apoptosis: regulation by neuroprotectants, BCL-2, and caspases, *J Neurosci* 19 (1999) 7476-7485.

-R-

- [216] R.J. Racine, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure, *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (1972) 281-294.
- [217] A.H. Ratzliff, V. Santhakumar, A. Howard and I. Soltesz, Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?, *Trends Neurosci* 25 (2002) 140-144.
- [218] J.C. Reed, Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery, *Trends Mol Med* 7 (2001) 314-319.
- [219] A. Represa, J. Niquet, H. Pollard and Y. Ben-Ari, Cell death, gliosis, and synaptic remodeling in the hippocampus of epileptic rats, *J Neurobiol* 26 (1995) 413-425.
- [220] C.E. Ribak and L. Seress, Five types of basket cell in the hippocampal dentate gyrus: a combined Golgi and electron microscopic study, *J Neurocytol* 12 (1983) 577-597.
- [221] M. Rizzi, C. Perego, M. Aliprandi, C. Richichi, T. Ravizza, D. Colella, J. Veliskova, S.L. Moshe, M.G. De Simoni and A. Vezzani, Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development, *Neurobiol Dis* 14 (2003) 494-503.
- [222] C. Roch, C. Leroy, A. Nehlig and I.J. Namer, Predictive value of cortical injury for the development of temporal lobe epilepsy in 21-day-old rats: an MRI approach using the lithium-pilocarpine model, *Epilepsia* 43 (2002) 1129-1136.
- [223] F. Rossignol, E. de Laplanche, R. Mounier, J. Bonnefont, A. Cayre, C. Godinot, H. Simonnet and E. Clottes, Natural antisense transcripts of HIF-1alpha are conserved in rodents, *Gene* 339 (2004) 121-130.

- [224] O.G. Rossler, K.M. Giehl and G. Thiel, Neuroprotection of immortalized hippocampal neurones by brain-derived neurotrophic factor and Raf-1 protein kinase: role of extracellular signal-regulated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase, *J Neurochem* 88 (2004) 1240-1252.
- [225] K. Ruscher, D. Freyer, M. Karsch, N. Isaev, D. Megow, B. Sawitzki, J. Priller, U. Dirnagl and A. Meisel, Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model, *J Neurosci* 22 (2002) 10291-10301.

-S-

- [226] Y. Sadamoto, K. Igase, M. Sakanaka, K. Sato, H. Otsuka, S. Sakaki, S. Masuda and R. Sasaki, Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery, *Biochemical and biophysical research communications* 253 (1998) 26-32.
- [227] M. Sakanaka, T.C. Wen, S. Matsuda, S. Masuda, E. Morishita, M. Nagao and R. Sasaki, In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 4635-4640.
- [228] V. Santhakumar and I. Soltesz, Plasticity of interneuronal species diversity and parameter variance in neurological diseases, *Trends Neurosci* 27 (2004) 504-510.
- [229] H.E. Scharfman, Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells are excitatory and innervate both granule cells and interneurons, *Journal of neurophysiology* 74 (1995) 179-194.
- [230] P.E. Schauwecker, Complications associated with genetic background effects in models of experimental epilepsy, *Prog Brain Res* 135 (2002) 139-148.
- [231] C. Schindler, Cytokines and JAK-STAT signaling, *Experimental cell research* 253 (1999) 7-14.
- [232] A. Schousboe, N. Westergaard, U. Sonnewald, S.B. Petersen, A.C. Yu and L. Hertz, Regulatory role of astrocytes for neuronal biosynthesis and homeostasis of glutamate and GABA, *Prog Brain Res* 94 (1992) 199-211.
- [233] C.L. Scott, L. Robb, B. Papaevangeliou, R. Mansfield, N.A. Nicola and C.G. Begley, Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor, *Blood* 96 (2000) 1588-1590.
- [234] G. Semenza, Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1, *Biochem Pharmacol* 64 (2002) 993-998.
- [235] F.R. Sharp and M. Bernaudin, HIF1 and oxygen sensing in the brain, *Nat Rev Neurosci* 5 (2004) 437-448.
- [236] T. Shingo, S.T. Sorokan, T. Shimazaki and S. Weiss, Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells, *J Neurosci* 21 (2001) 9733-9743.
- [237] S. Shinoda, T. Araki, J.Q. Lan, C.K. Schindler, R.P. Simon, W. Taki and D.C. Henshall, Development of a model of seizure-induced hippocampal injury with features of programmed cell death in the BALB/c mouse, *J Neurosci Res* 76 (2004) 121-128.
- [238] A.L. Siren, F. Knerlich, W. Poser, C.H. Gleiter, W. Bruck and H. Ehrenreich, Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain, *Acta Neuropathol (Berl)* 101 (2001) 271-276.
- [239] R.S. Sloviter, Apoptosis: a guide for the perplexed, *Trends Pharmacol Sci* 23 (2002) 19-24.

- [240] R.S. Sloviter, Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy, *Science* 235 (1987) 73-76.
- [241] R.S. Sloviter, The functional organization of the hippocampal dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal lobe epilepsy, *Annals of Neurology* 35 (1994) 640-654.
- [242] R.S. Sloviter, The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge, *Comptes Rendus Biologies* 328 (2005) 143-153.
- [243] R.S. Sloviter, Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the "dormant basket cell" hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy, *Hippocampus* 1 (1991) 41-66.
- [244] R.S. Sloviter, Status epilepticus-induced neuronal injury and network reorganization, *Epilepsia* 40 Suppl 1 (1999) S34-39; discussion S40-31.
- [245] R.S. Sloviter, C.A. Zappone, B.D. Harvey, A.V. Bumanglag, R.A. Bender and M. Frotscher, "Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat, *Journal of Comparative Neurology* 459 (2003) 44-76.
- [246] A. Sola, M. Rogido, B.H. Lee, T. Genetta and T.C. Wen, Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats, *Pediatr Res* 57 (2005) 481-487.
- [247] E. Spandou, Z. Papadopoulou, V. Soubasi, G. Karkavelas, C. Simeonidou, A. Pazaiti and O. Guiba-Tziampiri, Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats, *Brain Research* 1045 (2005) 22-30.
- [248] S.S. Spencer, When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically?, *Lancet Neurol* 1 (2002) 375-382.
- [249] J.B. Springborg, X. Ma, P. Rochat, G.M. Knudsen, O. Amtorp, O.B. Paulson, M. Juhler and N.V. Olsen, A single subcutaneous bolus of erythropoietin normalizes cerebral blood flow autoregulation after subarachnoid haemorrhage in rats, *Br J Pharmacol* 135 (2002) 823-829.
- [250] S.C. Steffensen, I.L. Campbell and S.J. Henriksen, Site-specific hippocampal pathophysiology due to cerebral overexpression of interleukin-6 in transgenic mice, *Brain Res* 652 (1994) 149-153.
- [251] P.J. Stohlawetz, L. Dzirlo, N. Hergovich, E. Lackner, C. Mensik, H.G. Eichler, E. Kabrna, K. Geissler and B. Jilma, Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans, *Blood* 95 (2000) 2983-2989.
- [252] G. Stoll, S. Jander and M. Schroeter, Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system, *Adv Exp Med Biol* 513 (2002) 87-113.
- [253] A. Strasser, L. O'Connor and V.M. Dixit, Apoptosis signaling, *Annu Rev Biochem* 69 (2000) 217-245.
- [254] M. Sugawa, Y. Sakurai, Y. Ishikawa-Ieda, H. Suzuki and H. Asou, Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation, *Neuroscience research* 44 (2002) 391-403.
- [255] N. Suzuki, O. Ohneda, S. Takahashi, M. Higuchi, H.Y. Mukai, T. Nakahata, S. Imagawa and M. Yamamoto, Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality, *Blood* 100 (2002) 2279-2288.

-T & U-

- [256] R. Tabakman, H. Jiang, I. Shahar, H. Arien-Zakay, R.A. Levine and P. Lazarovici, Neuroprotection by NGF in the PC12 in vitro OGD model: involvement of mitogen-activated protein kinases and gene expression, *Ann N Y Acad Sci* 1053 (2005) 84-96.
- [257] N.A. Thornberry and Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312-1316.
- [258] A. Tojo, H. Fukamachi, M. Kasuga, A. Urabe and F. Takaku, Identification of erythropoietin receptors on fetal liver erythroid cells, *Biochemical and biophysical research communications* 148 (1987) 443-448.
- [259] A.R. Towne, J.M. Pellock, D. Ko and R.J. DeLorenzo, Determinants of mortality in status epilepticus, *Epilepsia* 35 (1994) 27-34.
- [260] L. Turski, E.A. Cavalheiro, S.J. Czuczwar, W.A. Turski and Z. Kleinrok, The seizures induced by pilocarpine: behavioral, electroencephalographic and neuropathological studies in rodents, *Pol J Pharmacol Pharm* 39 (1987) 545-555.
- [261] W.A. Turski, E.A. Cavalheiro, M. Schwarz, S.J. Czuczwar, Z. Kleinrok and L. Turski, Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study, *Behav Brain Res* 9 (1983) 315-335.
- [262] G. Uzum, A. Sarper Diler, N. Bahcekapili and Y. Ziya Ziylan, Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures, *Life Sci* 78 (2006) 2571-2576.

-V-

- [263] P. van der Meer, A.A. Voors, E. Lipsic, T.D. Smilde, W.H. van Gilst and D.J. van Veldhuisen, Prognostic value of plasma erythropoietin on mortality in patients with chronic heart failure, *J Am Coll Cardiol* 44 (2004) 63-67.
- [264] B. Vanhaesebroeck and M.D. Waterfield, Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases, *Experimental cell research* 253 (1999) 239-254.
- [265] F. Verdier, P. Walrafen, N. Hubert, S. Chretien, S. Gisselbrecht, C. Lacombe and P. Mayeux, Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors, *The Journal of biological chemistry* 275 (2000) 18375-18381.
- [266] A. Vezzani, M. Conti, A. De Luigi, T. Ravizza, D. Moneta, F. Marchesi and M.G. De Simoni, Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures, *J Neurosci* 19 (1999) 5054-5065.
- [267] A. Vezzani and T. Granata, Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence, *Epilepsia* 46 (2005) 1724-1743.
- [268] P. Villa, P. Bigini, T. Mennini, D. Agnello, T. Laragione, A. Cagnotto, B. Viviani, M. Marinovich, A. Cerami, T.R. Coleman, M. Brines and P. Ghezzi, Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis, *J Exp Med* 198 (2003) 971-975.
- [269] P. Villa, J. van Beek, A.K. Larsen, J. Gerwien, S. Christensen, A. Cerami, M. Brines, M. Leist, P. Ghezzi and L. Torup, Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives, *J Cereb Blood Flow Metab* (2006).
- [270] B. Voutsinos-Porche, E. Koning, H. Kaplan, A. Ferrandon, M. Guenounou, A. Nehlig and J. Motte, Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Neurobiol Dis* 17 (2004) 385-402.

-W-

- [271] C.H. Wang, C.L. Liang, L.T. Huang, J.K. Liu, P.H. Hung, A. Sun and K.S. Hung, Single intravenous injection of naked plasmid DNA encoding erythropoietin provides neuroprotection in hypoxia-ischemia rats, *Biochemical and biophysical research communications* 314 (2004) 1064-1071.
- [272] C.Y. Wang, M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel and A.S. Baldwin, Jr., NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science* 281 (1998) 1680-1683.
- [273] G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue and G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 5510-5514.
- [274] L. Wang, Z. Zhang, Y. Wang, R. Zhang and M. Chopp, Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats, *Stroke* 35 (2004) 1732-1737.
- [275] X. Wang, C. Zhu, J.G. Gerwien, A. Schratzenholz, M. Sandberg, M. Leist and K. Blomgren, The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin, *J Neurochem* 91 (2004) 900-910.
- [276] C.M. Wiener, G. Booth and G.L. Semenza, In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1, *Biochemical and biophysical research communications* 225 (1996) 485-488.
- [277] U.C. Wiesmann, F.G. Woermann, L. Lemieux, S.L. Free, P.A. Bartlett, S.J. Smith, J.S. Duncan, J.M. Stevens and S.D. Shorvon, Development of hippocampal atrophy: a serial magnetic resonance imaging study in a patient who developed epilepsy after generalized status epilepticus, *Epilepsia* 38 (1997) 1238-1241.
- [278] D.M. Wojchowski, R.C. Gregory, C.P. Miller, A.K. Pandit and T.J. Pircher, Signal transduction in the erythropoietin receptor system, *Experimental cell research* 253 (1999) 143-156.
- [279] A.H. Wyllie, J.F. Kerr and A.R. Currie, Cell death: the significance of apoptosis, *Int Rev Cytol* 68 (1980) 251-306.

-Y & Z-

- [280] K. Yabuuchi, M. Minami, S. Katsumata and M. Satoh, In situ hybridization study of interleukin-1 beta mRNA induced by kainic acid in the rat brain, *Brain Res Mol Brain Res* 20 (1993) 153-161.
- [281] R. Yamaji, T. Okada, M. Moriya, M. Naito, T. Tsuruo, K. Miyatake and Y. Nakano, Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA, *Eur J Biochem* 239 (1996) 494-500.
- [282] H. Yamanaka, Y. Yanagawa and K. Obata, Development of stellate and basket cells and their apoptosis in mouse cerebellar cortex, *Neuroscience research* 50 (2004) 13-22.
- [283] I. Yatsiv, N. Grigoriadis, C. Simeonidou, P.F. Stahel, O.I. Schmidt, A.G. Alexandrovitch, J. Tsenter and E. Shohami, Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury, *Faseb J* 19 (2005) 1701-1703.
- [284] H. Youssoufian, G. Longmore, D. Neumann, A. Yoshimura and H.F. Lodish, Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor, *Blood* 81 (1993) 2223-2236.
- [285] H. Youssoufian, L.I. Zon, S.H. Orkin, A.D. D'Andrea and H.F. Lodish, Structure and transcription of the mouse erythropoietin receptor gene, *Mol Cell Biol* 10 (1990) 3675-3682.

- [286] C. Yu, M. Rahmani, Y. Dai, D. Conrad, G. Krystal, P. Dent and S. Grant, The lethal effects of pharmacological cyclin-dependent kinase inhibitors in human leukemia cells proceed through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent process, *Cancer research* 63 (2003) 1822-1833.
- [287] X. Yu, J.J. Shacka, J.B. Eells, C. Suarez-Quian, R.M. Przygodzki, B. Beleslin-Cokic, C.S. Lin, V.M. Nikodem, B. Hempstead, K.C. Flanders, F. Costantini and C.T. Noguchi, Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development, *Development (Cambridge, England)* 129 (2002) 505-516.
- [288] C.A. Zappone and R.S. Sloviter, Translamellar disinhibition in the rat hippocampal dentate gyrus after seizure-induced degeneration of vulnerable hilar neurons, *J Neurosci* 24 (2004) 853-864.
- [289] F. Zhang, A.P. Signore, Z. Zhou, S. Wang, G. Cao and J. Chen, Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms, *J Neurosci Res* 83 (2006) 1241-1251.
- [290] H. Zhou, X.M. Li, J. Meinkoth and R.N. Pittman, Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level, *J Cell Biol* 151 (2000) 483-494.
- [291] D.K. Zucker, G.F. Wooten and E.W. Lothman, Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures, *Exp Neurol* 79 (1983) 422-433.

RESUME

Notre travail de thèse est le premier à mettre en évidence chez le rat ayant subi un état de mal cérébral (EMC), que la production locale et réactionnelle d'érythropoïétine (Epo) par les astrocytes, quand elle est accompagnée de l'administration exogène d'Epo, représente une condition optimale pour le maintien des populations neuronales les plus fragiles. La neuroprotection induite par l'Epo implique un récepteur spécifique qui serait composé par l'association entre le récepteur à l'Epo (Epo-R) et la chaîne bêta commune (β c). L'absence de régulation coordonnée entre l'Epo-R et la β c que nous dénonçons, aussi bien dans des conditions physiologiques (développement et vieillissement du SNC) que physiopathologiques (EMC), est un argument fort permettant de réfuter l'hypothèse selon laquelle la β c constituerait une des sous-unités du récepteur de l'Epo impliqué dans la neuroprotection.

The cerebral EPOergic system : characterization and implication in the neuronal protection during epileptogenesis

ABSTRACT

Our work performed in rats submitted to a severe *status epilepticus* (SE) is the first to provide evidence that reactive production of erythropoietin (Epo) by local astrocytes is the optimal condition to support the most vulnerable neuronal population, when combined with exogenous administration of Epo. The receptor mediating Epo-induced neuroprotection is believed to be composed of Epo receptor (Epo-R) and common β chain (β c). The absence of coordinated regulation that we noted between Epo-R and β c, throughout postnatal development and ageing on one hand, and in response to SE on the other hand, refute the hypothesis that β c may constitute part of receptor mediating neuroprotective effect of Epo.

DISCIPLINE : PHYSIOLOGIE

MOTS-CLES : érythropoïétine, hippocampe, épilepsie, neuroprotection, développement

KEYWORDS : erythropoietin, hippocampus, epilepsy, neuroprotection, development

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire UMR5123 CNRS et UCBL
Campus de la Doua – 43 boulevard du 11 novembre 1918 – 69100 Villeurbanne