

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I  
FACULTE DE PHARMACIE  
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

2003  
THESE n°66

T H E S E

pour le **DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
présentée et soutenue publiquement le 30 juin 2003  
par

**M. PARMANTIER Pierre**  
Né le 23 janvier 1977  
A Rochefort-sur-mer

\*\*\*\*\*

**IMPLICATIONS DE L'ACETYLCHOLINE ET DU MONOXYDE D'AZOTE  
DANS LES INTERACTIONS ENTRE EPILEPSIE-ABSENCE ET SOMMEIL**

\*\*\*\*\*

JURY

**M. RENAUD Bernard**, Professeur  
**M RYVLIN Philippe**, Professeur  
**M. VALATX Jean-Louis**, Directeur de Recherche  
**M. CESPUGLIO Raymond**, Directeur de Recherche

*Je remercie chacun des membres du jury qui ont bien voulu juger ce travail ainsi que la  
Fondation Valerie Chamaillard et la Fédération Française de Recherche sur l'Epilepsie  
qui ont soutenu ce projet de thèse dès le départ.*

*Je remercie particulièrement Raymond Cespuglio pour son soutien et sa confiance  
ainsi que toutes les personnes de l'unité 480 ayant contribué à la bonne réalisation de ces travaux.*

*Je remercie enfin Christian Barres et Claude Julien qui m'ont,  
les premiers, fait connaître les difficultés du métier de chercheur.*

*Je tiens aussi à remercier tous mes amis  
(que je ne citerai pas parce que je ne veux pas devoir les classer  
et que l'idée de désordre dans ce manuscrit me dérange), qui se reconnaîtront au  
fait qu'ils seront vexés de ne pas être cités mais ne m'en tiendront pas rigueur...*

*Merci encore à eux de leur présence.*

*Je profite aussi de cette occasion pour remercier Sophie de sa présence  
et de l'écume qu'elle fait remonter chaque jour.*

*Je dédie cette thèse à mon père, à ma mère et à ma sœur.*

<b><i>INTRODUCTION GENERALE</i></b>	<b>5</b>
<b><i>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</i></b>	<b>8</b>
1. L'ÉPILEPSIE ABSENCE	9
1.1. PRÉAMBULE	9
1.1.1. Evolution théorique	9
1.1.2. Classification des syndromes de type EA	10
1.2. L'EA CHEZ L'HOMME	10
1.3. MÉDICAMENTS UTILISÉS EN MÉDECINE HUMAINE	12
1.3.1. Spécialités disponibles	12
1.3.2. Mécanismes d'action revendiqués par les anti-absences	14
1.4. MODÈLES ANIMAUX	14
1.4.1. Modèles pharmaco-induits	14
1.4.2. Modèles d'EA spontanée	15
1.4.3. Modèle du rat GAERS	15
1.5. BOUCLES THALAMO-CORTICALE ET DPO	15
1.5.1. Le réseau thalamo-cortical	17
1.5.2. Activité de la boucle thalamo-corticale durant les DPO	19
1.6. MÉCANISMES DE L'EMBALLEMENT PAROXYSTIQUE DE LA BOUCLE THALAMO-CORTICALE	21
1.6.1. Propriétés intrinsèques des neurones thalamiques	21
1.6.2. Facteurs externes influençant l'excitabilité des neurones thalamiques	24
2. LES ETATS DE VEILLE ET DE SOMMEIL	26
2.1. ASPECT HISTORIQUE	26
2.1.1. Les théories passives du sommeil	26
2.1.2. Un sommeil actif	27
2.1.3. L'exploration neurochimique du sommeil	27
2.2. L'ÉVEIL	28
2.2.1. Définition	28
2.2.2. Mécanismes neuronaux	29
2.3. LE SOMMEIL LENT	30
2.3.1. Définition	30
2.3.2. Mécanismes neuronaux	32

2.4. <i>LE SOMMEIL PARADOXAL</i>	34
2.4.1. <i>Définition</i>	34
2.4.2. <i>Mécanismes neuronaux</i>	35
3. THALAMUS ET RELATIONS SOMMEIL/EPILEPSIE	37
3.1. <i>DANS LES ÉTATS DÉSYNCHRONISÉS (EV ET SP)</i>	37
3.2. <i>DANS UN ÉTAT SYNCHRONISÉ (SL)</i>	38
4. PHARMACOLOGIE DE L'ACH ET DU NO	39
4.1. <i>DONNÉES GÉNÉRALES</i>	39
4.1.1. <i>Neurobiologie du système cholinergique</i>	39
4.1.2. <i>Neurobiologie du système NO-ergique</i>	41
4.1.3. <i>Interrelation NO/ACh</i>	44
4.2. <i>NO/ACh ET ÉTATS DE VIGILANCE</i>	45
4.2.1. <i>ACh et états de vigilance</i>	45
4.2.2. <i>NO et états de vigilance</i>	47
4.3. <i>NO/ACh ET EA</i>	49
4.3.1. <i>ACh et EA</i>	49
4.3.2. <i>NO et EA</i>	50
NOTRE HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	52
<i>ACh et balance SP/EA</i>	52
<i>NO et balance SP/EA</i>	53
<b><u>MATERIELS ET METHODES</u></b>	<b>55</b>
1. LES ANIMAUX UTILISES	56
1.1. <i>LES RATS GAERS</i>	56
1.2. <i>CONDITIONS D'ÉLEVAGE ET D'OPÉRATION</i>	56
2. PROTOCOLE D'IMPLANTATION ET DE RECUEIL DES TRACES POLYGRAPHIQUES	57
3. INJECTION ET CONTROLE ANATOMIQUE	58

4. TRAITEMENT DES DONNEES POLYGRAPHIQUES	60
4.1. <i>ETUDE DE LA RÉPARTITION DES ÉTATS DE VEILLE ET DE SOMMEIL</i>	60
4.2. <i>ETUDE QUALITATIVE DES ÉTATS DE DE VEILLE ET DE SOMMEIL</i>	60
5. ETUDE ANATOMIQUE	61
5.1. <i>PRÉPARATION DES COUPES</i>	61
5.2. <i>IMMUNOHISTOLOGIE DE LA nNOS</i>	61
5.3. <i>IMMUNOHISTOLOGIE DU TRANSPORTEUR VÉSICULAIRE DE L'ACH</i>	62
6. ETUDE STATISTIQUE	62
<b><u>RESULTATS</u></b>	<b>64</b>
<hr/>	
1. ANATOMIE	65
2. ETUDE DE LA DISTRIBUTION NYCTHEMERALE DES DPO CHEZ LE GAERS	65
3. ETUDE DE L'ACTION DE L'ACH DANS LE NRT	67
3.1. <i>ETUDE DE LA COMPOSANTE NICOTINIQUE</i>	67
3.1.1. <i>Chez le rat témoin</i>	67
3.1.2. <i>Chez le rat GAERS</i>	68
3.2. <i>ETUDE DE LA COMPOSANTE MUSCARINIQUE</i>	70
3.2.1. <i>Chez le rat témoin</i>	70
3.2.2. <i>Chez le rat GAERS</i>	72
3.3. <i>STIMULATION CHOLINERGIQUE MIXTE</i>	74
3.3.1. <i>Chez le rat témoin</i>	74
3.3.2. <i>Chez le rat GAERS</i>	75
4. ETUDE DES EFFETS DU NO DANS LE NRT	77
4.1. <i>EFFETS D'UN APPORT EXOGÈNE DE NO DANS LE NRT</i>	78
4.1.1. <i>Chez le rat témoin</i>	78
4.1.2. <i>Chez le rat GAERS</i>	79
4.2. <i>EFFETS D'UN BLOCAGE DE LA nNOS DANS LE NRT</i>	81
4.2.1. <i>Chez le rat témoin</i>	81
4.2.2. <i>Chez le rat GAERS</i>	82

<b><i>DISCUSSION</i></b>	85
1. INTERPRETATION DES RESULTATS	86
1.1. <i>CONCERNANT L'ÉTUDE ANATOMIQUE</i>	86
1.2. <i>CONCERNANT LE RÔLE DE LA LIBÉRATION D'ACÉTYLCHOLINE DANS LE nRT</i>	86
1.2.1. <i>Au niveau des récepteurs nicotiniques</i>	87
1.2.2. <i>Au niveau des récepteurs muscariniques</i>	87
1.2.3. <i>Bilan du rôle de l'ACh dans le nRT</i>	89
1.3. <i>CONCERNANT LE RÔLE DE LA LIBÉRATION DE NO DANS LE nRT</i>	90
1.3.1. <i>Effet protecteur des donneurs de NO</i>	90
1.3.2. <i>Effet de l'inhibition de la nNOS</i>	91
2. NOUVELLES DONNEES SUR LA REGULATION DES DPO DANS LE nRT	91
2.1. <i>GABA et NO</i>	92
2.2. <i>GABA et ACh</i>	92
3. CONSIDERATIONS PATHOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES	93
3.1. <i>ETIOLOGIE DES DPO CHEZ LES GAERS</i>	93
3.2. <i>PERSPECTIVES THÉRAPEUTIQUES</i>	94
<b><i>CONCLUSIONS</i></b>	95
<b><i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i></b>	97
<b><i>ANNEXES</i></b>	119
1. TABLEAUX DE DONNEES BRUTES	120
2. PLANCHE D'IMMUNOHYSTOLOGIE	125
3. COLLABORATION "LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY AND NO"	127

# **INTRODUCTION GENERALE**

L'épilepsie absence (EA), ou petit-mal, est une épilepsie généralisée apparaissant dès les premières années de la vie et présentant le plus souvent une rémission à l'adolescence mais pouvant évoluer vers d'autres types d'épilepsies généralisées. Ce type d'épilepsie non convulsive se manifeste par des crises caractérisées par une perte de conscience associée, dans la plupart des cas, à un maintien du tonus postural et une amnésie contemporaine de la crise. Pendant les crises, l'électroencéphalogramme (EEG) est caractérisé par une activité paroxystique hypersynchrone appelée décharge de pointes-ondes (DPO) de fréquence supérieure ou égale à 3 Hz (chez l'homme) pouvant durer de 3 à 90 s. Ces DPO sont évocatrices de l'activité phasique hypersynchrone de neurones au sein d'une boucle thalamo-corticale.

La survenue de l'EA semble étroitement liée aux états de veille et de sommeil car elle est observée essentiellement pendant l'éveil (EV) calme ou les stades précoces du sommeil lent (SL). Des travaux récents effectués au laboratoire (Faradji et al., 2000) ont montré que le temps occupé par les DPO était inversement corrélé avec celui occupé par le sommeil paradoxal (SP). Il a également été démontré que la modification expérimentale des quantités de SP (par privation sélective) ou d'EA (par un stress d'immobilisation ou pharmacologiquement) se répercutait respectivement sur l'EA ou le SP, et ce, de manière inversement proportionnelle. Les réseaux neuronaux responsables de la genèse ou du maintien du SP pourraient être impliqués dans la régulation de la survenue de DPO.

Compte tenu des données de la littérature, nous nous proposons de déterminer, chez le rat GAERS, la nature de l'influence exercée par les systèmes de maintien du SP (notamment et en l'occurrence les systèmes cholinergique et NO-ergique) sur les structures impliquées dans la genèse des DPO. Dans ce sens, nos recherches se sont focalisées sur le noyau réticulé du thalamus (nRT) qui participe à la boucle thalamo-corticale génératrice des DPO et recevant des projections en provenance des réseaux neuronaux pontiques (cholinergique et NO-ergique) impliqués dans le déclenchement et le maintien du SP.

Ainsi, des modulations des influences cholinergique et NO-ergique d'origine pontique ont été simulées par des micro-injections locales dans le nRT et les effets induits sur les DPO et les états de veille et de sommeil analysés. Enfin, dans le but de vérifier et de

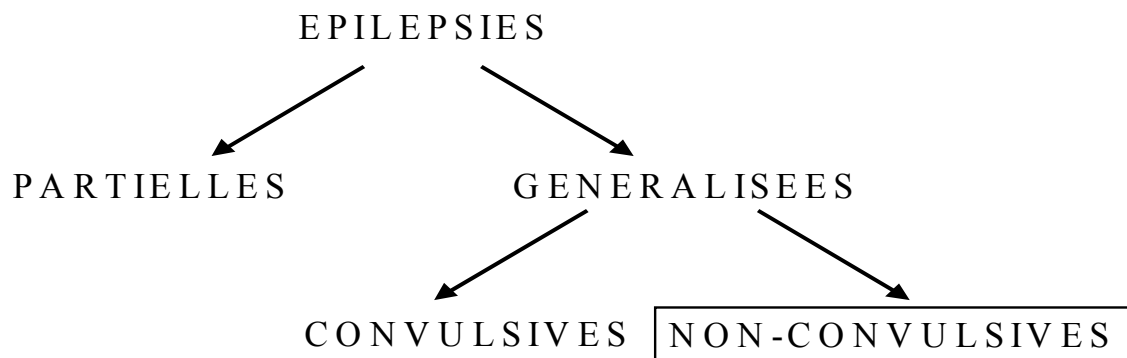
préciser sur le plan immunohistochimique l'importance et la nature des projections pontothalamiques (réseaux latérodorsaux et pédonculopontins sur le nRT) une étude anatomique a été entreprise.

Au terme de cette étude, après la discussion des résultats et la mise en évidence de nos avancées, des propositions sur l'étiologie de l'EA ainsi que sur l'exploitation thérapeutique des connaissances obtenues sur le plan fondamental seront exposées.

## **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

## 1. L'ÉPILEPSIE ABSENCE

Dans un langage courant, le terme "épilepsie absence" regroupe les différentes formes d'épilepsies généralisées (non associées à un foyer épileptique localisable) et non convulsives. En fait, les crises d'EA généralisées sont cliniquement, physiologiquement et pharmacologiquement définies et représentent le type de crise primaire de nombreux syndromes épileptiques. L'EA atteint 8 % des enfants épileptiques soit 8 enfants sur 100 000 parmi la population générale (Michelucci et al., 1996).



**Figure 1:** Classification des épilepsies

### 1.1. Préambule

#### 1.1.1. Evolution théorique

La survenue et la cessation brutales de DPO de fréquence fixe (3 Hz) au sein d'un EEG normal a conduit initialement à penser qu'un "pacemaker" central sous-cortical à projections corticales diffuses serait à l'origine de ces paroxysmes. La théorie "centrencéphalique" était née (Penfield et al., 1954).

Par la suite, Marcus (1966) et Naquet (1972) montrèrent par leurs travaux sur le macaque et le babouin *Papio papio* qu'un générateur thalamique n'est pas indispensable à la synchronisation de toutes les EA bilatérales et que des générateurs corticaux peuvent, si le corps calleux est préservé, synchroniser des DPO. Si la théorie centrencéphalique a ainsi été

remise en question au profit d'une théorie prônant une origine corticale des DPO elle n'a pas été totalement réfutée pour autant (Avanzini et al., 1993).

### **1.1.2. Classification des syndromes de type EA**

On distingue, tant chez l'homme que chez l'animal, de nombreuses variétés d'EA. Bien que l'hypothèse d'un *continuum* biologique entre les différents types d'EA soit proposée (Berkovic et al., 1987), la classification de l'*International League Against Epilepsy* (ILAE) ne distingue que 4 types d'EA (Engel et al., 2001).:

- (1) *Childhood Absence Epilepsy*
- (2) *Juvenile Absence Epilepsy*
- (3) *Juvenile Myoclonic Epilepsy*
- (4) *Epilepsy with Myoclonic Absence*

Cette diversité est un frein pour l'étude expérimentale de cette maladie, puisque : (1) certaines formes comme l'EA infantile ou "petit-mal" ont une morbidité très faible ce qui rend difficile le recrutement pour des études cliniques ; (2) certains types d'EA n'ont pas d'équivalent strict en pathologie animale et (3) la séparation, cliniquement justifiée, des syndromes étudiés entraîne une division des résultats qui peut être artificielle puisque les mécanismes sont souvent communs.

Conscients de ces problèmes, nous nous attacherons, lors de la partie expérimentale de ce travail, à étudier les DPO en tant qu'élément pathologique essentiel des EA et non un syndrome d'EA.

## **1.2. L'EA chez l'homme**

### *L'EA et les autres épilepsies généralisées de l'enfance*

A ce stade, il est important de bien faire la distinction entre l'EA et les autres épilepsies généralisées de l'enfant : syndrome de West chez le nourrisson et syndrome de Lennox-Gastaut après deux ans. L'EA est aussi à distinguer d'un autre type d'absence appelé *Continuous Spikes and Waves during Slow Sleep* (CSWSS) dans lequel 80 à 90 % du SL des enfants est occupé par des DPO.

L'EA infantile, est une épilepsie généralisée apparaissant dès les premières années de la vie (à partir de 2 ans), présentant le plus souvent une rémission à l'adolescence mais pouvant aussi évoluer vers d'autres types d'épilepsies généralisées. Elle est le plus souvent d'un bon pronostic évolutif malgré les retards cognitifs que l'enfant accumule et ne

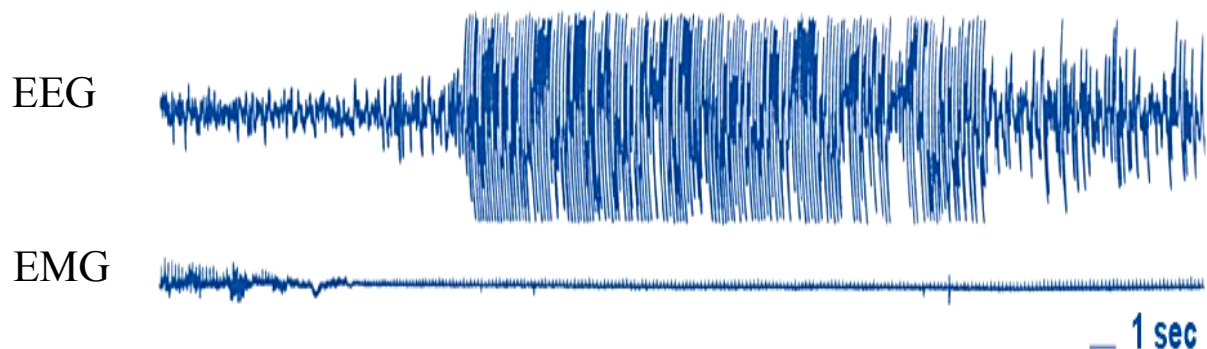
rattrapera pas. L'EA juvénile est d'un moins bon pronostic puisqu'elle évoluera plus fréquemment vers des formes d'épilepsies myocloniques qui perdureront à l'âge adulte.

### *Séméiologie de la crise*

Pendant les crises, l'électroencéphalogramme (EEG) est caractérisé par une activité paroxystique hypersynchrone appelée décharge de pointes-ondes (DPO) de fréquence supérieure ou égale à 3 Hz (chez l'homme) pouvant durer de 3 à 90 s. Ces DPO sont évocatrices de l'activité phasique hypersynchrone de neurones au sein d'une boucle thalamo-corticale.

Les absences se caractérisent par une brève suspension de conscience, pendant laquelle l'enfant interrompt son activité mais peut conserver des automatismes simples tels que le maintien du tonus postural. Il ne garde aucun souvenir de la crise et son état de conscience est alors inconnu. Dans certains cas, l'enfant pourra être sujet à des secousses bilatérales synchrones ("petit mal" myoclonique) ou à une dissolution brutale et brève du tonus musculaire entraînant la chute (crises akinétiques) (Leporier et al., 1993). Ces crises surviennent lorsque l'enfant est calme ou somnolent ou bien endormi plutôt que lorsqu'il est actif.

Durant les crises, l'électro-oculogramme est caractérisé par des éléments remarquables (fixité du regard, déviations oculaires brusques, élévation des yeux (phénomène de Bell)) débutant tout de suite après le début des DPO et s'arrêtant 1 à 2 secondes avant la fin de la crise (Bogacz et Bogacz, 2000). L'EEG est caractérisé par des DPO de fréquence supérieure ou égale à 3 Hz à début et fin brusques, évocatrices de l'activité phasique hypersynchrone de neurones corticaux et thalamiques.



**Figure 2:** Tracé polygraphique contemporain d'une crise d'EA chez l'enfant

### *Retentissement cognitif de la maladie*

Les enfants atteints par cette maladie souffrent de troubles cognitifs et caractériels attribués à des problèmes d'attention et qui perturbent leur intégration familiale et scolaire. Les déficits cognitifs ont récemment été objectivés : il a ainsi été montré que ces enfants souffrent sélectivement de troubles de la mémoire "non-verbale" alors que les capacités de verbalisation sont préservées (Pavone et al., 2001).

L'auteur de cette étude rappelle que les traitements anti-épileptiques sont susceptibles, eux aussi, d'altérer les fonctions cognitives, *a fortiori* à des doses élevées ou en polythérapie. Cependant, dans tous les types d'épilepsies, la persistance des crises est dangereuse et peut aggraver le processus épileptogène sous-jacent. Elle risque aussi d'entraîner un dysfonctionnement puis un retard mental et/ou moteur irréversible compromettant la scolarité et l'insertion sociale du malade. C'est pourquoi, malgré les effets iatrogènes indésirables, la diminution des crises grâce à la mise en place d'un traitement peut tout de même être bénéfique pour l'enfant en termes cognitifs (Sterman et al., 1982).

### **1.3. Médicaments utilisés en médecine humaine**

#### **1.3.1. Spécialités disponibles**

Parmi les mécanismes responsables de la dépolarisation déclenchant l'activation neuronale mais aussi potentiellement des manifestations épileptiques, on retiendra :

- Le rôle des acides aminés excitateurs (glutamate essentiellement)
- La diminution de l'hyperpolarisation membranaire (GABA dépendante).
- L'activation de certains canaux ioniques voltage-dépendants (canaux sodiques, potassiques ou calciques).

Les anti-épileptiques visent à réduire l'hyperexcitabilité des neurones en agissant sur un ou plusieurs de ces mécanismes. Tous ces traitements sont symptomatiques et n'ont pas de propriété curative. Leur mécanisme d'action est pour certains mal connu mais conventionnellement, on effectue un classement de ces médicaments selon ce critère :

- a. Médicaments bloquant les canaux sodiques voltage-dépendants
  - la phénytoïne (DI-HYDAN)
  - la carbamazépine (TEGRETOL)
  - l'oxcarbazépine (TRILEPTAL)
  - la **lamotrigine (LAMICTAL)**

- Le topiramate (EPITOMAX)
- b. Médicaments bloquant les canaux calciques de types T
  - L'éthosuccimide (**ZARONTIN**)
  - le valproate (**DEPAKINE**)
- c. Médicaments favorisant la transmission GABA-Aergique
  - le phénobarbital (GARDENAL)
  - les **benzodiazépines (ou BZD) (URBANYL...)**
  - la primidone (MYSOLINE)
  - le felbamate (TALOXIA)
- d. Médicaments augmentant la concentration du GABA
  - la tiagabine (GABITRIL)
  - le topiramate (EPITOMAX)
  - la vigabatrine (SABRIL)
  - la gabapentine (NEUROTIN)
  - le **valproate (DEPAKINE)**
- e. Médicaments bloquant la transmission glutamatergique
  - Le topiramate (EPITOMAX)
  - le felbamate (TALOXIA)
- f. Médicaments dont le mécanisme d'action est totalement inconnu
  - le lévétiracetam (KEPPRA)

Il est indispensable de noter qu'en France, seuls le valproate, l'éthosuccimide et la lamotrigine (dans de nombreux pays étrangers, les BZD font partie de cette liste) sont indiqués dans le traitement des EA, et de nombreux anti-convulsivants y sont contre-indiqués. Ces données pharmacologiques suggèrent que le mécanisme de déclenchement des EA est différent de celui des épilepsies convulsives et que l'hyperexcitabilité neuronale en cause n'est pas la résultante d'un déséquilibre général simple entre excitation et inhibition comme dans les épilepsies convulsives.

### **1.3.2. Mécanismes d'action revendiqués par les anti-absences**

#### *a. Les anti-convulsivants*

Bien que certains anti-convulsivants soient utilisés aussi dans le cadre de la lutte anti-absence, certains sont formellement contre-indiqués. Il ne semble pas que le mode d'action revendiqué par un anti-convulsivant permette de préjuger de son pouvoir anti-absence.

#### *b. Les anti-absences de référence*

L'éthosuccimide (ZARONTIN) et le valproate de sodium (DEPAKINE) sont les traitements de référence de l'EA et leurs effets sont reconnus et mis à profit. Le mécanisme pharmacodynamique de leur action repose principalement sur le blocage des canaux calciques voltage-dépendants qui protège contre les DPO. La lamotrigine (LAMICTAL), utilisée contre l'EA n'est qu'un faible inhibiteur de ces canaux (Hainsworth et al., 2003). Certains neuroleptiques sont capables de bloquer ces canaux (Santi et al., 2002) mais leur efficacité en tant qu'anti-absence n'est pas étudiée.

#### *c. Les autres molécules*

Les BZD ne sont pas utilisées en France mais leur utilité est reconnue dans le traitement de l'EA dans de nombreux pays. Cet effet est paradoxal puisque les potentialisateurs de la transmission GABAergique sont classiquement considérés comme pro-absences et que, justement, les BZD favorisent, par réarrangement allostérique, le couplage du récepteur GABA-A au canal effecteur chlore.

Soulignons aussi l'effet du lévétiracetam (utilisé dans les épilepsies partielles) dont le mécanisme d'action ne fait l'objet d'aucune hypothèse et dont l'action anti-absence a été prouvée dans deux modèles d'EA chez le rat (Gower et al., 1995).

## **1.4. Modèles animaux**

### **1.4.1. Modèles pharmaco-induits**

Les premiers modèles animaux intéressants pour l'EA ont été développés dans les années 70 par l'administration systémique de pénicilline chez le chat en condition aiguë (Prince et Farrell, 1969). Chez le rongeur, d'autres modèles d'EA ont été développés par injection de AY-9944 (Smith et Bierkamper, 1990 ; Persad, 2001), de Gamma-hydroxybutyrate (GHB) ou de pentylentétrazole (Snead, 1992).

#### **1.4.2. Modèles d'EA spontanée**

La description de modèles d'EA spontanée transmissible (souris Tottering (Noebels et Sidman, 1979 ; Fletcher et al., 1996), souris *lethargic* (Burgess et al., 1997), souris *stargazer* (Letts et al., 1998), souris mocha, souris *ducky* (Barclay et al., 2001), souris *slow-wave epilepsy*, rat GAERS (Vergnes, 1982), rat WAG/Rij (Van Luijtelaar et Coenen, 1986, Midzianovskaia, 2001), rat BS/Orl (Martin 2002)) permet, la réalisation d'études génétiques et l'étude d'une sémiologie plus proche de la pathologie humaine que des modèles pharmaco-induits. Des résultats intéressants ont déjà été obtenus sur l'existence d'anomalies génétiques chez la souris Tottering (Noebels, 1984) ainsi que dans d'autres modèles murins (Upton et Stratton 2003).

#### **1.4.3. Modèle du rat GAERS**

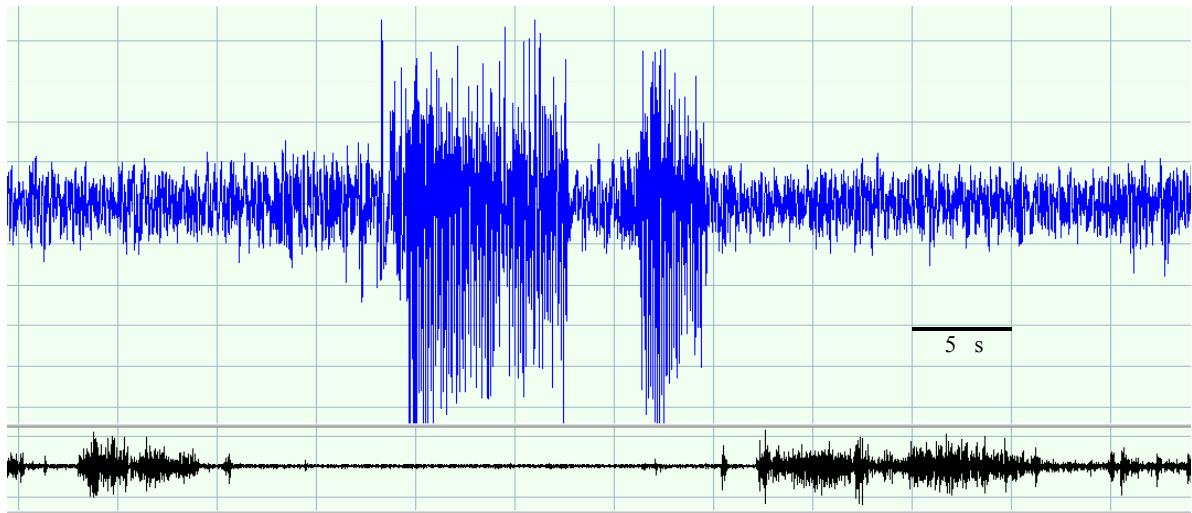
Cette souche a été sélectionnée au laboratoire du professeur Marescaux (INSERM U 398, Strasbourg) à partir de rats Wistar chez lesquels avaient été enregistrées des DPO spontanées comparables à celles observées chez l'homme dans le cadre de l'EA. Son mode de transmission génétique multifactoriel dominant en rend l'élevage accessible mais nécessite certaines précautions telle que la surveillance du taux de consanguinité. Chez 100 % des animaux homozygotes les premières manifestations comitiales apparaissent vers 3 mois et sont maximales à 1 an.

Chez ces animaux, le métabolisme énergétique est perturbé dès les premières semaines puisque 21 jours après la naissance, ils présentent une surconsommation de glucose dans différentes structures cérébrales qui est attribuée à la mise en place de mécanismes compensatoires visant à conserver l'état interictal (Nehlig et al., 1998).

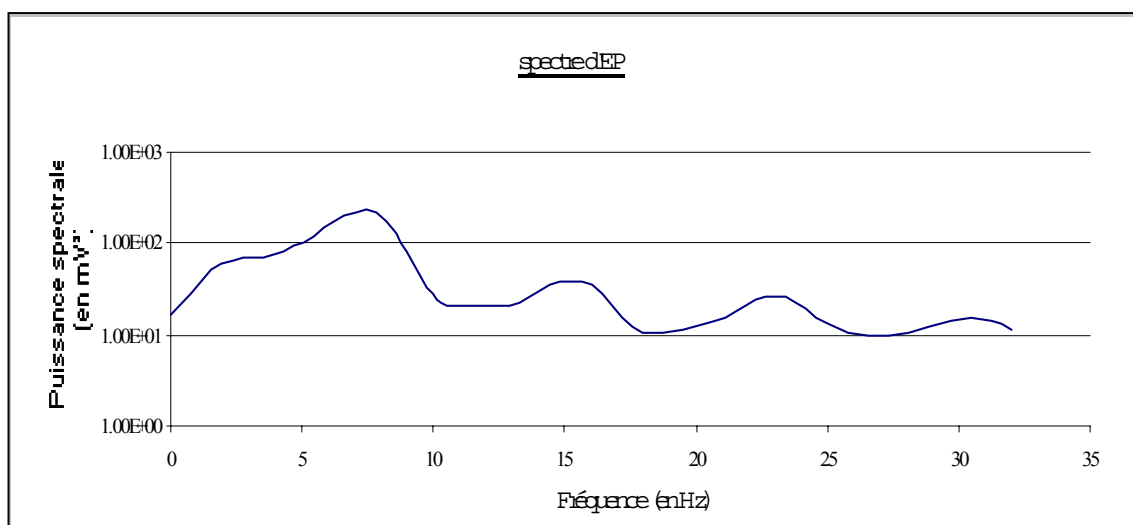
Le modèle du rat GAERS, choisi au laboratoire, présente une symptomatologie et une sensibilité pharmacologique comparables à l'EA humaine (Vergnes et al., 1982): sensibilité aux anti-absences et aggravation par les anti-épileptiques anti-convulsivants.

### **1.5. Boucles thalamo-corticale et DPO**

Les DPO sont la manifestation électro-encéphalographique des crises d'EA. L'EEG représentant la sommation des champs électriques engendrés par les mouvements ioniques dans chaque fente synaptique, les DPO illustrent l'activation hypersynchrone des synapses corticales.



**Figure 3 :** Enregistrement d'un EEG lorsd'un épisode d'EA.



**Figure 4 :** Distribution de puissance spectrale d'un signal EEG enregistré lors d'un épisode épileptique chez un rat GAERS.

La littérature sur les mécanismes des DPO est assez abondante, parfois redondante, et rarement contradictoire. De nombreux articles et revues détaillent la physiopathologie générale de l'EA (et notamment chez le rat GAERS qui est un modèle privilégié) : Marescaux et al., 1992a, Marescaux et al., 1992b, Futatsugi et al., 1998, Crunelli et al., 2002.

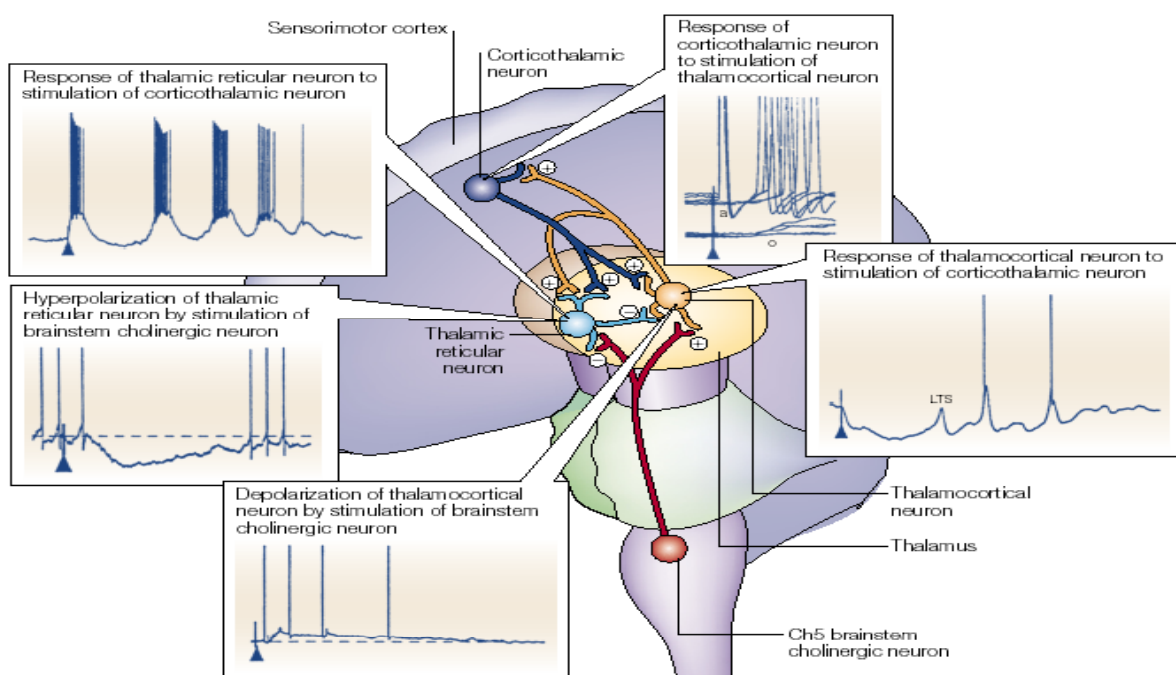
La tendance actuelle est d'attribuer l'origine de ces décharges à l'hypersynchronisation paroxystique d'une boucle de régulation thalamo-corticale normalement impliquée dans différents processus physiologiques. Pierre Gloor exprimait le premier en 1968 l'hypothèse selon laquelle les DPO trouveraient leur origine dans les mécanismes de synchronisation des fuseaux du SL (qui sont eux-mêmes le fruit d'une synchronisation thalamo-corticale par le nRT). Cette hypothèse est toujours d'actualité

(Amzica et Steriade, 1999) et les mécanismes physiologiques et pathologiques sont de mieux en mieux connus.

### 1.5.1. Le réseau thalamo-cortical

Ce réseau inclue des neurones intra-corticaux, des neurones cortico-thalamiques projetant sur le nRT, des neurones du nRT (RE) se projetant sur les neurones relais thalamo-corticaux (TC) plus dorsaux et médians et dont les projections corticales sont diffuses.

#### a. Organisation



**Figure 5 :** Représentation de la boucle thalamocorticale et représentation du type d'activité de chaque neurone.

Les neurones GABAergiques RE ont une tendance naturelle à produire, lorsque leur membrane est hyperpolarisée, des bouffées de potentiels d'action (PA) à la suite d'un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) minimal. Ces PPSE peuvent être provoqués par des récepteurs ionotropiques excitateurs glutamatergiques (NMDA ou AMPA). Les bouffées de PA sont déclenchées par des canaux calciques voltage-dépendants T dits "à bas seuil d'activation".

Ces bouffées de PA provoquent une libération de GABA au niveau des TC qui sont ainsi durablement hyperpolarisés. Ce n'est qu'après cette hyperpolarisation que ces neurones TC présentent une activité "rebond" (générée, elle aussi, par des courants calciques T (Huguenard et Prince, 1992)) qui excite de manière diffuse le cortex (et le nRT) qui, en

retour, libère du glutamate au niveau des RE et des TC : c'est le *feed-back* cortical glutamatergique.

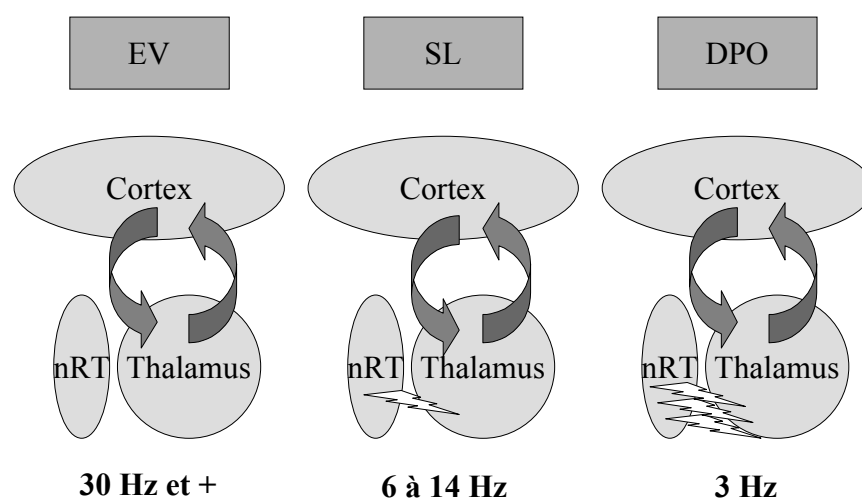
Les neurones thalamiques (RE et TC) ne répondent à ce *feed-back* cortical qu'à la fin de leur période réfractaire qui est assez longue à cause des canaux calciques voltage-dépendants T qui sont long à se réarmer. La fréquence de ces cycles est dépendante de l'inverse de la durée de la période réfractaire des neurones thalamiques.

*b. Rôles dans le contrôle des états de conscience*

Pendant l'éveil, les RE sont peu actifs et le fonctionnement physiologique de la boucle thalamo-corticale permet de réguler le flux d'informations vers le cortex et d'organiser des assemblées asynchrones de neurones au travers d'oscillations dont la fréquence est supérieure à 30 Hz et considérées importantes pour le processus d'émergence de la conscience (Kostopoulos, 2001).

Pendant le sommeil lent, cette boucle organise (grâce au rôle inhibiteur qu'assure alors les RE) des assemblées corticales physiologiques plus lentes à l'origine des fuseaux de 6-14 Hz de l'EEG (cf page 32) et non impliquées dans la conscience.

Pendant l'EA, ce sont probablement les oscillations pathologiques de fréquence très faible imposée par cette boucle (2-4 Hz chez l'homme et 7-10 Hz chez le rat GAERS) qui empêchent l'état de conscience (Kostopoulos, 2001).



**Figure 6 :** Représentation schématique de l'influence du nRT sur le fonctionnemnt de la boucle T-C chez l'homme.

### 1.5.2. *Activité de la boucle thalamo-corticale durant les DPO*

#### *a. Activité des neurones RE durant les DPO*

La destruction exitotoxique du nRT **provoque l'abolition des DPO ipsilatérales** (Avanzini et al., 1993) ce qui démontre l'importance de l'influence hyperpolarisante des RE sur les TC dans la genèse des pointes-ondes. On parle du nRT comme d'un *pacemaker* thalamique.

A l'instant précédant le déclenchement des DPO, pendant lequel l'EEG présente une fréquence préférentielle de 5-9 Hz, les neurones RE ont un mode de décharge de 12-15 Hz (Pinault et al., 2001). Pour des raisons qui restent à définir, leur fréquence de décharge diminue brutalement à 6 Hz au moment du déclenchement des DPO (Pinault et al., 2001). Durant les DPO les neurones du nRT ont une activité en bouffées régulières précédant de 8,3 ms le pic de chaque pointe-onde (Seidenbecher et Pape, 2001).

Il a été montré récemment (Sohal et al., 2002) que l'inter-inhibition des neurones du nRT entre eux garantissait leur non-synchronisation. En effet, pendant la genèse des fuseaux du sommeil lent (cf page 32), les bouffées de PA des neurones du nRT ne sont pas synchrones car les intervalles inter-bouffées sont irréguliers. En revanche, si cette inter-inhibition est supprimée (par administration locale d'inhibiteur des récepteurs GABA-A), les bouffées deviennent synchrones et les intervalles inter-bouffées s'égalisent. La synchronisation de ces bouffées de PA provoque alors des bouffées hyperpolarisantes plus importantes au niveau des TC ce qui conduit à une amplification des bouffées de PA thalamo-corticales et du *feed-back* cortico-thalamique.

#### *b. Activité des neurones TC durant les DPO*

A l'instant précédant le déclenchement des DPO, l'EEG présente une fréquence préférentielle de 5-9 Hz et les neurones TC ont un mode de décharge de 6-8 Hz (Pinault et al., 2001). Tout comme les neurones RE, les neurones TC ont une fréquence de 6 Hz durant les DPO mais, contrairement au propos de Pinault, ces deux populations ne sont probablement pas synchrones puisque les neurones TC ont une activité en bouffée qui est en retard de 13 ms sur chaque pointe des DPO (Seidenbecher et Pape, 2001).

Selon Staak et Pape (2001), c'est l'augmentation de l'importance de l'inhibition des TC par les RE qui provoque le passage progressif de :

- un rythme rapide (fuseaux de 5-10 Hz) où les récepteurs GABA A ionotropiques provoquent des hyperpolarisations brèves des TC

- un rythme lent (DPO de 2-4 Hz) où les récepteurs GABA B métabotropiques, recrutés progressivement, activent des canaux T dont l'ouverture déclenche des DPO généralisées et synchrones

L'administration d'un agoniste GABAergique, mimant l'activité du nRT *via* des récepteurs GABA-B, dans le noyau dorsal thalamique provoque une augmentation des DPO chez le rat GAERS alors qu'un antagoniste les diminue (Liu et al., 1992).

Dans ce type de boucle, un blocage des récepteurs GABA-B au niveau des neurones TC empêche la synchronisation de ces populations de neurones (Debay et al., 2001). L'extension du phénomène à tout le cortex est probablement due à la nature diffuse des projections thalamo-corticales et du *feed-back* cortico-thalamique.

### *c. Activité des neurones cortico-thalamiques durant les DPO*

Les neurones TC et corticaux ont une activité simultanée pendant les DPO (Vergnes et al., 1990). C'est leur activité qui est à l'origine de l'allure de l'EEG caractéristique des DPO : la décharge simultanée de nombreux neurones corticaux donne l'aspect d'une "pointe", et l'hyperpolarisation consécutive, celui d'une "onde". Cette décharge synchrone de neurones corticaux constitue un *feed-back* thalamo-cortical massif prenant indiscutablement part au maintien de des DPO.

Selon certains, ce *feed-back* serait même l'élément déclencheur de la synchronisation thalamo-corticale : un signal glutamatergique fort (d'origine corticale) sur le noyau péri-géniculé (équivalent du nRT dans la boucle thalamo-corticale impliquée dans le système visuel) aurait un rôle de "remise à zéro" et de recalage des neurones du noyau péri-géniculé et du noyau géniculé latéral (équivalent des TC) (Debay et al., 2001).

Dans les RE comme dans les TC, le blocage des récepteurs NMDA diminue le déclenchement des DPO chez le rat GAERS (Koerner et al., 1996) et dans le modèle pharmaco-induit au PTZ (Manjarrez et al., 2001). Il a également été démontré que, dans le modèle pharmaco-induit au GHB, la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA est un élément non négligeable du déclenchement et du maintien des DPO. Dans le thalamus, les récepteurs ionotropiques du glutamate (NMDA ou AMPA) ont donc un rôle important dans

le maintien et le déclenchement des DPO qui sont probablement mis en jeu par le *feed-back* cortico-thalamique.

L'étude de la synchronisation des neurones corticaux a montré que le caractère brutal de la survenue et de la rémission des DPO ne repose que sur des bases électro-encéphalographiques macroscopiques. En effet, Steriade et Amzica ont montré chez le chat en 1994 que l'hypersynchronisation d'assemblées de neurones corticaux est progressive et s'établit grâce à la structure particulière du réseau thalamo-cortical mais aussi grâce aux réseaux intracorticaux. A la fin de la crise, le rétablissement des relations temporelles normales entre ces neurones est progressif.

### **1.6. Mécanismes de l'emballement paroxystique de la boucle thalamo-corticale**

Les origines de l'emballement paroxystique, du maintien de la crise ainsi que de sa rémission sont inconnues. Cependant, on peut répertorier deux facteurs déterminant la propension du thalamus à générer des DPO généralisées :

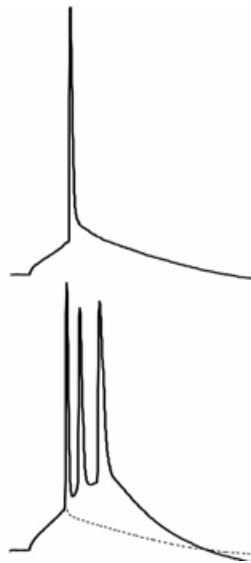
1. Les propriétés intrinsèques des neurones thalamiques.
2. Les facteurs extra-thalamiques influençant l'excitabilité des neurones thalamiques.

#### **1.6.1. Propriétés intrinsèques des neurones thalamiques**

Ce sont les bouffées hypersynchrones des neurones du nRT qui sont à l'origine des DPO. Les décharges en bouffées et la synchronisation des neurones entre eux sont liées aux propriétés cellulaires particulières de ces neurones qui sont mises en évidence lorsqu'ils sont hyperpolarisés.

##### *a. Rôle des canaux calciques voltage-dépendants à bas seuil*

Les canaux voltage-dépendants à bas seuil sont probablement parmi les éléments les plus importants de la synchronisation des oscillations neuronales (Huguenard et al., 1996). Sur les six connus, trois modèles murins de l'EA humaine (Tottering, lethargic, stargazer) se sont avérés porteurs d'une mutation de la séquence codant pour ces canaux (Burgess et al., 1999 ; Jones et al., 2002).



Potentiel d'action  
après une stimulation  
occurrence à l'état basal.

Bouffée de potentiels d'action  
après une stimulation  
occurrence à l'état hyperpolarisé.

**Figure 7:** Modes de décharge des neurones RE et TC selon leur état de polarisation membranaire en réponse à une stimulation identique.

### Dans le thalamus

Chez le rat GAERS, la conductance spécifique des canaux calciques T est plus grande que chez les non-épileptiques (Tsakiridou et al., 1995) et il a été montré que, dans les neurones TC, les ARNm de la sous unité  $\alpha 1G$  des canaux T sont sur-transcrits et que ceux de  $\alpha 1H$  le sont dans les neurones RE (par rapport aux non-épileptiques ; Talley et al., 2000).

Plus récemment, une étude conduite chez des souris mutantes sans sous-unité  $\alpha 1G$  (présente dans les neurones TC), a montré que ces canaux sont indispensables au déclenchement pharmacologique de DPO de type EA pharmacologiquement induite (Kim et al., 2001). Il n'y a cependant aucune preuve de l'implication de ces canaux dans l'origine du déclenchement des DPO dans ce modèle. Chez l'homme, une étude a montré que ce canal ionique n'est pas impliqué dans l'EA humaine de la population étudiée (Chen et al., 2003).

### *Dans le cortex*

Il est juste de noter que les canaux T sont très nombreux dans le cortex et réputés influents sur les oscillations intra-corticales. Certains auteurs, non opposés à une vision corticale du déclenchement des DPO, affirment que ces oscillations sont susceptibles de donner naissance à des DPO par un mécanisme identique à celui du thalamus (Destexhe et al., 2001). La multiplicité des types de DPO déjà évoquée n'exclut pas que ce mécanisme puisse, dans certains modèles, déclencher des DPO ressemblant à celles de l'EA.

### *b. Rôle des récepteurs au GABA*

En 1992, les travaux de Marescaux ont montré que, bien que les agonistes GABA soient anticonvulsivants dans de nombreux modèles d'épilepsie, chez le rat GAERS comme

dans d'autres modèles d'absence, ils provoquent une recrudescence de DPO. Ces données ont été confirmées en 1994 par les travaux de Amzica et Steriade qui ont montré qu'au cours d'une crise la durée des phases d'inhibition augmentait. Toutefois, il est très important de distinguer les effets obtenus par une fixation de GABA sur les récepteurs de type GABA-A et GABA-B.

#### *Action pro-absence des récepteurs GABA-B*

Les antagonistes des récepteurs GABA-B (qui peuvent être couplés, *via* une protéine G à un canal potassium ou calcium), atténuent les DPO (Marescaux et al., 1992c). Dans les neurones TC, ces récepteurs sont tenus pour responsables de l'hyperpolarisation qui active les canaux T (Crunelli et al., 1991), ce qui peut expliquer cet effet. Il est même prouvé qu'une stimulation accrue des récepteurs GABA-B provoque le passage des fuseaux aux DPO (Von Krosigk 1993 Science Wash DC).

Le CGP-36742 (antagoniste GABA-B) est efficace contre les DPO de manière dose dépendante chez le rat GAERS (Vergnes et al., 1997) et chez le rat WAG/Rij (Kaminski et al., 2001).

#### *Action anti-absence par les récepteurs GABA-A*

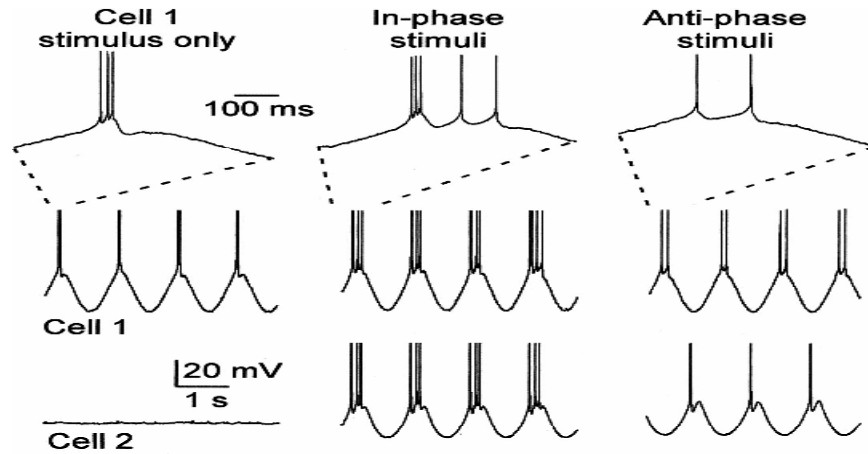
Une activation spécifique des récepteurs GABA A (couplés à un canal chlore) dans la *substantia nigra* ou le nRT supprime les DPO (Marescaux et al., 1992b).

Les BZD augmentent le couplage du site récepteur de GABA-A avec le canal effecteur et facilite ainsi l'effet du GABA. Les agonistes au site des BZD suppriment les DPO de manière dose dépendante alors que les agonistes inverses les favorisent et les antagonistes n'ont pas d'autre effet que celui de supprimer l'action des autres. Cet effet est du à une inhibition préférentielle des neurones RE (*via* des récepteurs GABA-A qui y sont majoritaires) ce qui diminue l'influence hyperpolarisante sur les neurones TC *via* des récepteurs GABA-B (Huguenard et Prince 1994 ; Sohal et Huguenard 2001).

#### *c. Rôle des synapses électriques*

Des travaux très innovants sur les synapses électriques (et non chimiques) ont montré que les neurones GABA-ergiques RE possèdent des interconnexions tout à fait particulières (basées sur des connexines de type 36) favorisant la synchronisation de leur activité (Landisman et al., 2002 ; Deans et al., 2001 ; Srinivas et al., 1999) : deux neurones voisins liés par des connexions de ce type et recevant des stimulations répétées en phase

voient leur activité augmentée alors que des stimulations répétées en opposition de phase la diminuent.



**Figure 8:** Influence du rapport de phase (d'une série de stimulations oscillantes) entre des neurones reliés par des synapses électriques sur leur mode de décharge.

Ce type de jonction "filtre" les PA transmis selon un mode "passe-bas" qui favorise une synchronisation lente (Landisman et al., 2002). Il ne fait aucun doute que ce type de synapse pourrait être rapidement intégré dans les modèles théoriques de l'EA. Les *feed-back* corticaux (essentiels au maintien des DPO) pourraient ainsi être utilisés pour synchroniser les neurones RE de manière physiologique (fuseaux) ou pathologique (DPO).

A ce jour, si les interactions entre des connexines (en particulier 32 et 43) et le NO sont connues (Sladek et al., 1999 ; Haefliger et al., 1999 et Haefliger et Meda, 2000), il n'existe aucune donnée concernant une régulation des connexines 36 par le NO ou l'ACh.

### 1.6.2. Facteurs externes influençant l'excitabilité des neurones thalamiques

L'activité de la boucle thalamo-corticale est régulée par de nombreux systèmes externes tous impliqués dans le contrôle de la transmission sensitive vers le cortex ou dans le contrôle des états de vigilance :

- Le système cholinergique en provenance des noyaux du tegmentum pédonculo-pontin (PPT) et latéro-dorsal (LDT) et du télencéphale basal (TB).
- Les ganglions de la base
- Les projections sérotoninergiques en provenance du noyau du raphé dorsal (nRD).

- Les projections noradrénergiques en provenance du *locus coeruleus alpha* (LC $\alpha$ ).

*a. Le système noradrénergique*

Bien que les projections  $\alpha$ -noradrénergiques atténuent les DPO et que les récepteurs  $\beta$ -noradrénergiques ne semblent pas impliqués dans l'EA (Kleinlogel et al., 1985), dans tous les modèles d'EA, la lésion du système noradrénergique favorise transitoirement les DPO (excepté chez la souris Tottering, caractérisée par une arborisation surdimensionnée des projections noradrénergiques, qui voit alors les DPO supprimées). La noradrénaline est donc bien un système non négligeable impliqué dans le contrôle des DPO (Qiao et Noebels, 1991). Son action pourrait reposer sur une excitation corticale intense généralisée non spécifique interdisant la survenue du SL ou des DPO. Elle pourrait aussi être à l'origine d'une légère dépolarisation des neurones RE qui bloquerait les canaux calciques T (Pape et McCormick, 1989).

*b. Le système sérotoninergique*

Si les neurones RE sont activés par l'application de sérotonine ce qui entraîne une suppression des DPO (Marescaux et al., 1992b ; Pape et McCormick 1989), il ne semble pas que le système sérotoninergique soit impliqué dans la régulation physiopathologique de l'EA (Marescaux et al., 1992b).

*c. Le système dopaminergique*

En accord avec des observations cliniques qui expliquent que l'enfant ne fera pas de crise d'EA pendant une activité ludique, physique ou intellectuelle, une exploration du rôle des ganglions de la base a été conduite. Elle a montré qu'une activation pharmacologique de la voie directe des ganglions de la base (Putamen – Globus Pallidus interne) ou une inhibition de la voie indirecte (Putamen - Globus Pallidus externe – noyau sub-thalamique – Globus Pallidus interne) atténuent les DPO (Deransart et al., 1998). Le mécanisme pourrait passer par une activation du noyau acumbens du striatum (Deransart et al., 2000). Il semble que ce mécanisme dopaminergique puisse avoir un effet protecteur vis-à-vis des crises d'absences audiogéniques (Deransart et al., 2001).

*d. Le système cholinergique*

Les implications de l'ACh sont primordiales dans la régulation des DPO. D'un point de vue général, l'administration de carbachol (agoniste cholinergique) par voie intrapéritonéale (i.p.) atténue les DPO de manière dose-dépendante (Danover et al., 1993). Par la

même voie, les antagonistes cholinergiques peuvent avoir une action protectrice vis-à-vis des DPO (antagonistes muscariniques à forte dose), une action facilitatrice des DPO (antagonistes muscariniques à faible dose) ou bien rester sans effet (antagonistes nicotiniques).

Les afférences cholinergiques au nRT proviennent du PPT, du LDT et du NB. Les neurones du NB ont une activité en bouffée qui précède le pic de chaque DPO de 17,8 ms. (Seidenbecher et Pape, 2001). La dualité des afférences (Pont et NB) et leurs mécanismes d'interrégulation (le pont envoie des projections cholinergiques sur le NB) complique l'appréhension du système ACh-DPO. Les détails de l'influence de l'ACh sur l'EA sont présentés dans le chapitre 4..

## **2. LES ETATS DE VEILLE ET DE SOMMEIL**

### **2.1. Aspect historique**

Si la distinction comportementale entre le sommeil et l'éveil semble évidente, la distinction électroencéphalographique entre ces deux états ne fut établie qu'au début des années trente par H Berger. Le rêve, phénomène observé "scientifiquement" dès l'antiquité (Lucretius -98 à -55 avant JC) a longtemps été empreint de mysticisme (cette tendance s'est rationalisée avec l'interprétation freudienne des rêves) et son entrée en physiologie moderne date des années 30 quand Jacobson enregistra électriquement pendant le sommeil des mouvements oculaires associés au rêve.

#### **2.1.1. Les théories passives du sommeil**

Probablement en se basant sur la prééminence comportementale et sociologique de l'éveil sur le sommeil, les premiers théoriciens considéraient que le sommeil n'était que la conséquence d'une diminution de l'activité corticale due à la diminution des influx sensoriels excitateurs. Les démonstrations de cette théorie se basaient sur une préparation dite "cerveau isolé" (section au niveau du mésencéphale en arrière des nerfs oculomoteurs) grâce à laquelle l'EEG présentait un aspect caractéristique d'un sommeil profond permanent (Bremer, 1935). C'est ainsi qu'à l'époque l'importance des afférences sensorielles dans le maintien de l'éveil était suggérée.

L'hypothèse d'un sommeil passif fut enrichie en 1949 par l'expérience de Moruzzi et Magoun qui mirent en évidence le système réticulé activateur ascendant. Cette structure allongée s'étend du bulbe rachidien à la partie antérieure du mésencéphale. Désignée alors

"centre de l'éveil", elle était supposée conditionner en permanence l'activité corticale grâce à des projections thalamiques et extra-thalamiques. Dans la continuité de la théorie précédente, ce sont les influx sensoriels qui activeraient la formation réticulée, en accord avec sa localisation. La cessation de l'activité de ce système était supposée conduire à l'endormissement.

### *2.1.2. Un sommeil actif*

La même année pourtant, la conception d'un sommeil passif était mise à mal puisque Hess montrait que l'on pouvait induire le sommeil en stimulant l'hypothalamus. En 1953, Aserinsky et Kleitman décrivent un état de sommeil accompagné de mouvements oculaires rapides associés, pour la première fois, à un EEG désynchronisé. Cet état fut ensuite défini en tant que deuxième état de sommeil en 1958 par Dement et son existence fut prouvée chez l'animal en 1959 par Jouvét M et Michel F qui lui donnèrent le nom de "sommeil paradoxal".

En 1959, il fut démontré qu'une section médio-pontine prétrigéminalale pouvait induire un état d'éveil permanent (Batini et al., 1959): l'existence d'un centre du sommeil au niveau bulbaire s'imposait.

Actuellement, chez l'homme, cinq stades de sommeil sont décrits (4 stades qualifiés de SL et un stade de SP). Chez le rat, seuls deux stades de sommeil sont conventionnellement retenus (SL et SP) mais certains auteurs justifient (dans certains buts expérimentaux) la distinction de sept stades de vigilance chez le rat (Gottesmann, 1992).

### *2.1.3. L'exploration neurochimique du sommeil*

La découverte des neurotransmetteurs monoaminergiques dans les années 60 puis la confrontation de ces données neuropharmacologiques nouvelles avec les données neurophysiologiques permirent d'élaborer la théorie sérotoninergique du sommeil selon laquelle la sérotonine serait responsable du sommeil à onde lente et du déclenchement du sommeil paradoxal (Jouvét 1969).

La sérotonine a un rôle de neurotransmetteur synchronique de l'éveil et un rôle de facilitateur diachronique favorisant la synthèse de facteurs peptidiques hypnogènes (Jouvét 1984). La théorie peptidergique à laquelle s'apparente ces résultats remonte en fait au début du vingtième siècle (1913) lorsque Legendre et Pieron ont montré que l'injection du liquide céphalo-rachidien prélevé à un chien privé de sommeil provoquait un sommeil profond chez le chien receveur.

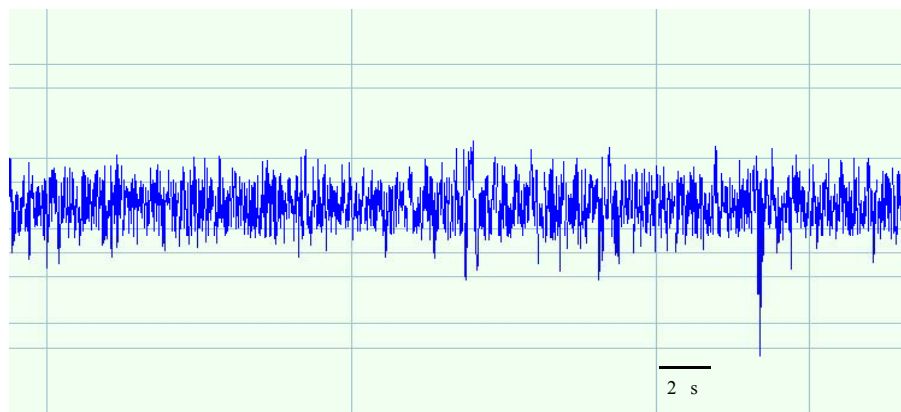
Une très grande connaissance des mécanismes de régulation des états de vigilance a été développée depuis quarante ans et on connaît maintenant assez bien les principes de déclenchement et de maintien des états de sommeil et d'éveil.

## **2.2. L'éveil**

### **2.2.1. Définition**

Chez le rat adulte, l'éveil (EV) occupe environ les deux tiers de la période d'obscurité et un tiers de la période d'éclaircissement. L'animal est alors réceptif aux stimuli et peut présenter une activité musculaire marquée ou rester calme, immobile et les yeux ouverts.

L'EEG est de fréquence élevée (20 à 60 Hz) et de bas voltage. L'EV est caractérisé par une activité hippocampique de type thêta (6 à 9 Hz chez le rat) dont la fréquence s'élève avec l'activité de l'animal. L'EEG est aussi marqué par des oscillations plus rapides dites de type bêta (13 à 32 Hz chez le rat) et de bas voltage dont l'intensité est supposée refléter l'importance de l'insomnie (Bastien et Bonnet, 2001).



**Figure 9 :** Enregistrement d'un EEG lors d'un épisode d'EV.

L'EMG est caractérisé par un tonus musculaire important et les fréquences cardiaques et respiratoires sont élevées.

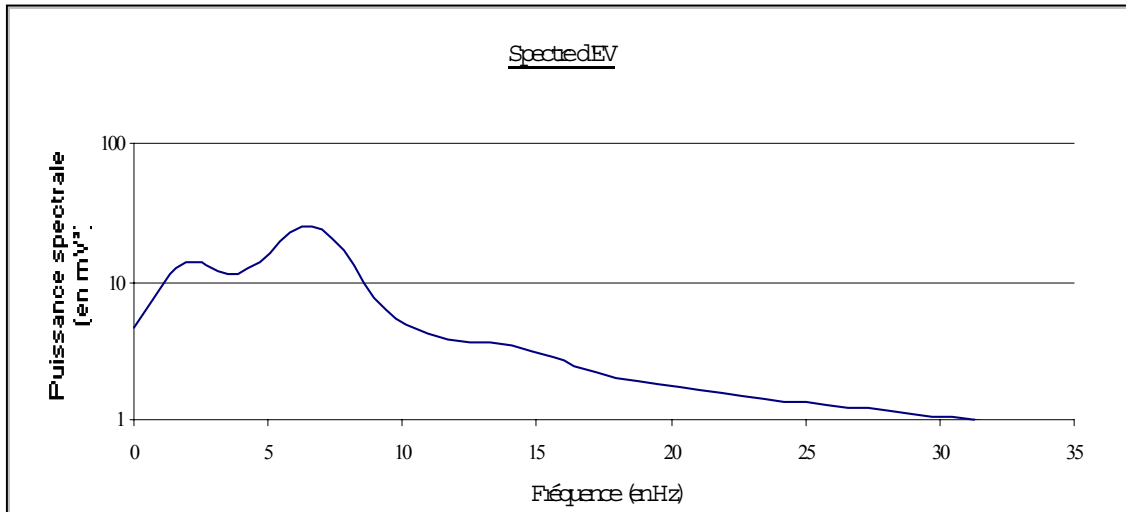


Figure 10 : Distribution de la puissance spectrale d'un signal EEG caractéristique de l'EV.

### 2.2.2. Mécanismes neuronaux

Plusieurs structures cérébrales sont impliquées dans l'activation corticale contemporaine de l'EV : des neurones adrénérgiques (du LC), cholinergiques (du PPT LDT et NB), sérotoninergiques (du raphé dorsal (nRD)), histaminergiques, orexinergiques (de l'hypothalamus postérieur (HP)) et aspartatergiques et glutamatergiques (des formations réticulées mésencéphaliques (FRM) et intra-laminaire thalamique (FIL)). Aucune de ces structures n'est responsable, à elle seule, de la mise en place et du maintien de l'EV.

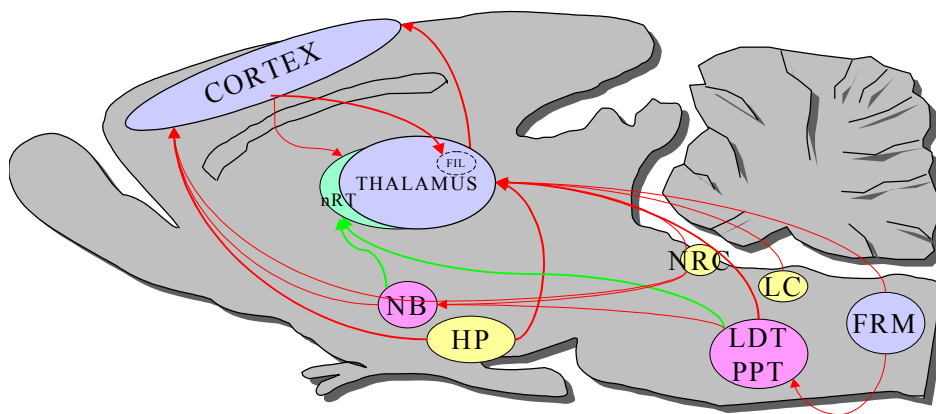


Figure 11 : Représentation schématique des voies nerveuses excitatrices (en rouge) et inhibitrices (en vert)

mises en jeu lors du déclenchement ou du maintien de l'EV.

La formation des noyaux thalamiques intra-laminaires (FIL) est composée de neurones thalamo-corticaux qui libèrent des acides aminés excitateurs tels que le glutamate ou l'aspartate dans tout le cortex (Steriade et Llinas 1988).

L'HP contient la totalité des neurones histaminergiques. Ces neurones envoient des projections diffuses dans tout l'encéphale et participent au maintien de l'éveil en relation avec des modifications de l'environnement et des défis comportementaux (Parmentier et al., 2002). Ces neurones ont une activité tonique de fréquence basse pendant l'éveil qui diminue pendant le SL et disparaît pendant le SP (Lin et al., 1988). Dans cette même structure, de nombreux neurones à orexine sont actifs pendant l'éveil et participent à son maintien. Un déficit en orexine pourrait provoquer des accès de narcolepsie.

Le NB contient des neurones cholinergiques projetant sur le cortex et le thalamus où ils participent au blocage des oscillations rythmiques des neurones GABAergiques du nRT ainsi qu'à l'activation des neurones de la FIL (McCormick, 1992).

Les noyaux mésencéphaliques du pont (PPT et LDT) ont une action inhibitrice muscarinique sur les neurones RE (McCormick et Prince, 1986) et une action activatrice nicotinique sur les neurones TC (McCormick et Prince, 1987). D'autres structures mésencéphaliques, telles que le noyau du Raphé ou le LC participent à l'activation corticale par leurs projections sérotoninergiques et adrénérgiques.

Toutes ces structures facilitent la désynchronisation corticale, par une action directe ou bien *via* une libération tonique de neurotransmetteurs au niveau de relais thalamiques. Cette libération conduit à une abolition des ondes lentes et des fuseaux par l'inhibition des neurones RE et la dépolarisation des neurones TC qui sont donc plus facilement excitables par les afférences sensorielles. La transmission de l'information sensorielle est alors favorisée et le thalamus joue pleinement son rôle de relais vers le cortex.

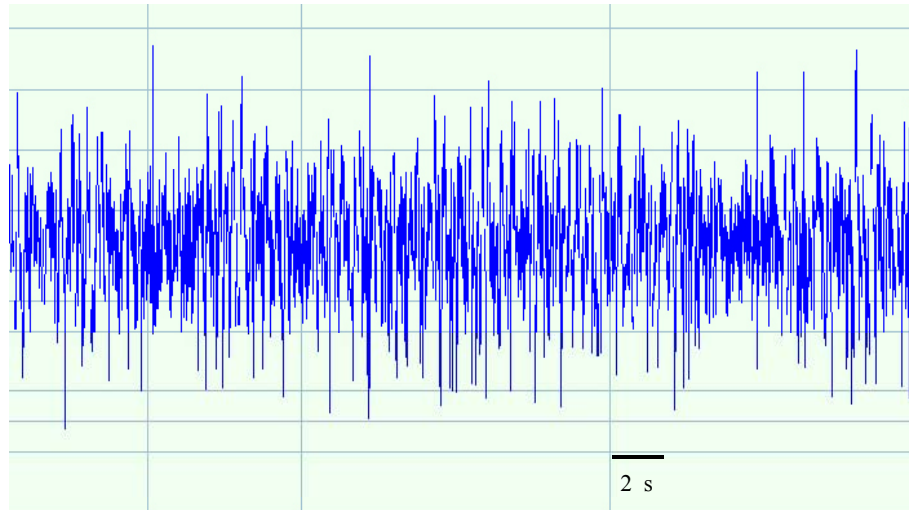
Au niveau néocortical, la désynchronisation se traduit par un mode de décharge neuronal tonique rapide et une tendance moindre à produire des bouffées de PA (Steriade et al., 2001)

## **2.3. Le sommeil lent**

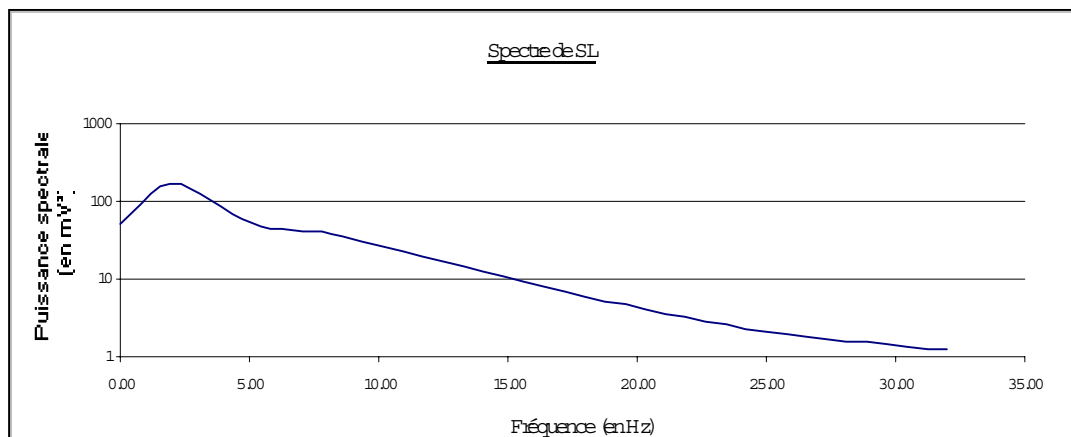
### **2.3.1. Définition**

Chez le rat adulte, le sommeil à ondes lentes occupe 30 % de la période d'obscurité et 60 % de la période d'éclaircissement. Au cours d'une phase de SL, l'animal est de moins en moins sensible aux stimuli environnementaux. L'animal est immobile et adopte une posture caractéristique de son espèce : chez les rongeurs la tête est repliée sous le corps ou en

position ventrale semi-enroulée avec le museau au niveau de la queue. Cette posture contribue à l'homéothermie de l'organisme et varie donc en fonction de la température ambiante (Valatx et al., 1973).



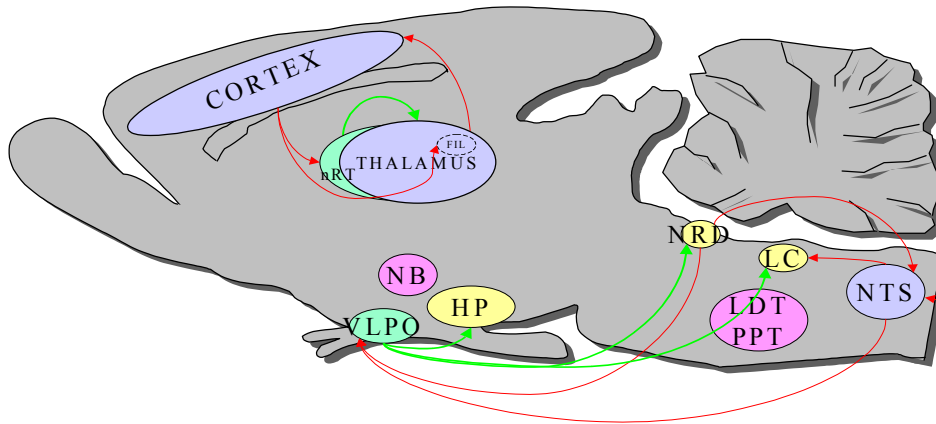
**Figure 12 :** Enregistrement d'un EEG lors d'un épisode de SL.



**Figure 13 :** Distribution de la puissance spectrale d'un signal EEG caractéristique du SL.

Le sommeil lent est caractérisé, chez le rat, par l'apparition d'une activité électroencéphalographie dite "en fuseaux" (de fréquence comprise entre 9 et 15 Hz) puis d'ondes lentes (de grande amplitude et de fréquence comprise entre 0,5 et 4 Hz) qui viennent s'y superposer progressivement. Les signaux de l'électromyogramme (EMG) sont de plus en plus faibles et les fréquences cardiaques et respiratoires diminuent. Les températures corporelle et centrale sont plus basses que pendant l'éveil.

### 2.3.2. Mécanismes neuronaux



**Figure 14 :** Représentation schématique des voies nerveuses excitatrices (en rouge) et inhibitrices (en vert) mises en jeu lors du déclenchement ou du maintien du SL.

#### *a. Les réseaux neuronaux à l'origine de l'endormissement*

##### *L'aire préoptique ventrolatérale (VLPO)*

Ces réseaux semblent avoir pour point de départ une zone appelée aire préoptique (POA) (Von Economo 1929 [56]). La partie ventrolatérale de la POA (VLPO) est considérée comme étant la plus représentative de cette activité puisque, dans les autres régions de la POA, on peut trouver des neurones cholinergiques (NB), impliqués dans la désynchronisation corticale antinomique du SL, mêlés aux neurones GABAergiques "SL-ON" (qui caractérisent le VLPO). L'importance du VLPO est incontestable puisque sa lésion par l'acide iboténique provoque une insomnie durable mais pharmacologiquement compensable par administration de muscimol (agoniste GABA-A) dans l'HP. Les neurones GABA-ergiques "SL-ON" projettent sur l'HP, le nRD et le LC (Okamura et al., 1990) et leur activité est synchronisée du SL (Szymusiak et al., 1991). Les structures activatrices de l'EV sont alors inhibées.

##### *Contrôle synchronique et diachronique du VLPO*

Le VLPO est contrôlé de manière synchronique par des neurones du noyau supra-chiasmatique et des neurones locaux sensibles à la baisse de température locale. L'activation

de ces neurones locaux semble nécessaire et suffisante pour déclencher et maintenir le sommeil lent (McGinty et Szymusiak, 2001).

Il est aussi contrôlé par des mécanismes diachroniques (sérotoninergiques) en provenance du raphé dorsal. La lésion du Raphé provoque une insomnie durable dont la durée est fonction de l'importance de la lésion (Jouvet, 1962). La libération par le Raphé de sérotonine dans la POA pendant l'éveil favoriserait la production de facteurs hypnogènes eux-mêmes directement responsables du déclenchement du sommeil (Jouvet, 1984). La libération de sérotonine en provenance du Raphé dans la POA est donc hypnogène de façon indirecte.

Enfin, le noyau du faisceau solitaire (riche lui aussi en terminaisons sérotoninergiques) reçoit des afférences du nerf vague et émet des éfferences noradrénergiques vers le noyau préoptique et le locus coeruleus. La stimulation du bout central du nerf vague aboutit au sommeil (endormissement vago-aortique de Dell). Le rôle du NFS serait lié aux régulations végétatives (Jones et Cuello, 1989) telles que l'assoupissement postprandial.

#### *b. Les réseaux responsables des fuseaux et des ondes lentes du SL*

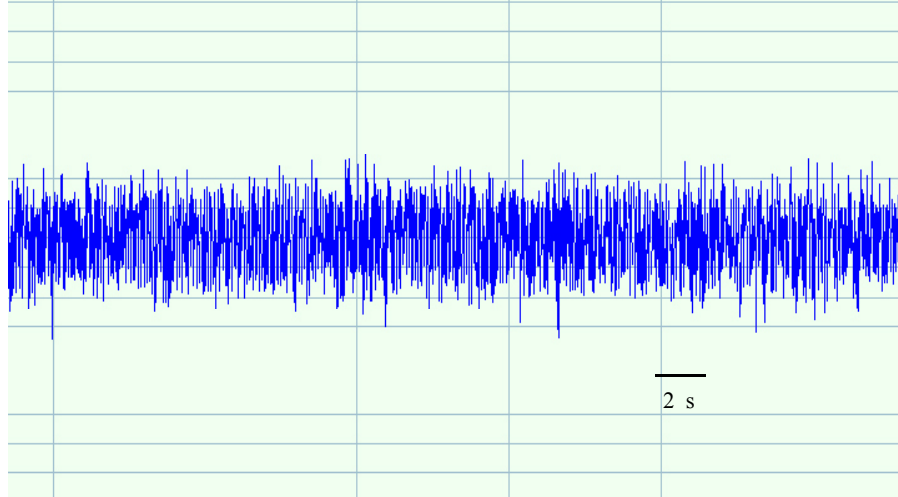
Ils s'inscrivent dans une boucle thalamo-corticale qui a déjà été décrite à la page 17 de ces rappels.

Les fuseaux, observés dès le début du sommeil lent, sont générés par les interneurons du nRT (Steriade et Llinas, 1988). Ces neurones ont une activité rythmique de type "pacemaker" (8 à 12 Hz) qui survient en phase avec les fuseaux et qui hyperpolarisent de manière cyclique les neurones thalamocorticaux (Steriade et McCarley, 1990). Cette inhibition des neurones thalamocorticaux explique le blocage ou le "brouillage" des informations sensorielles et sous-thalamiques au lieu de jouer son rôle de relais.

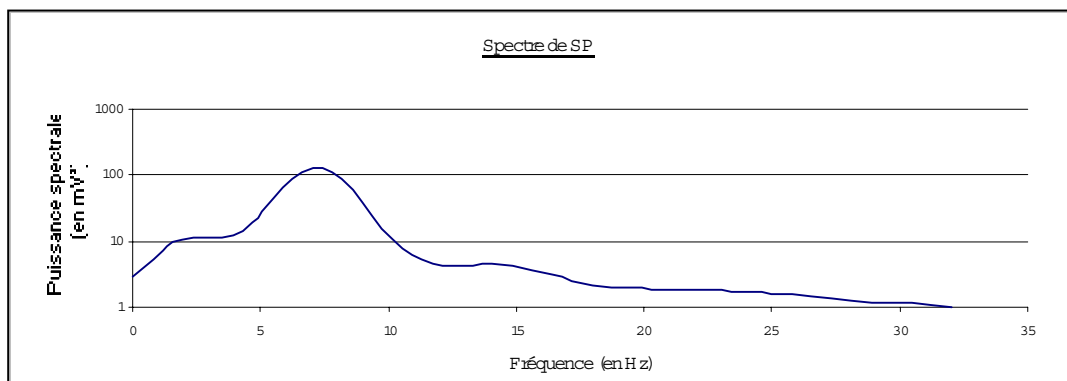
Les ondes lentes, qui sont observées dans tout l'encéphale, sont générées dans le néocortex puisque seule une néodécortication totale peut les supprimer (Jouvet, 1962 ; Steriade et Llinas, 1988 ; Steriade et al., 1993). Des interneurons GABA-ergiques corticaux en seraient à l'origine en hyperpolarisant les neurones pyramidaux de la couche V du cortex (Steriade et McCarley, 1990) qui ont une activité spontanée proche de la fréquence  $\delta$ .

## 2.4. Le sommeil paradoxal

### 2.4.1. Définition



**Figure 15 :** Enregistrement EEG d'un épisode de SP.



**Figure 16 :** Distribution de la puissance spectrale d'un signal EEG caractéristique du SP.

Le sommeil paradoxal fut ainsi dénommé parce qu'il présente les aspects comportementaux d'un sommeil profond (plus profond que le SL puisque le seuil d'éveil est plus élevé) et certaines caractéristiques polygraphiques évocatrices de l'éveil. Cet état (qui est le moment d'apparition d'une activité onirique intense) apparaît toujours après une période de SL et se caractérise par des phénomènes phasiques et des phénomènes toniques. Il occupe 10 % de la période d'éclaircissement et 4 % de la période d'obscurité. Les phases de SP sont fréquemment suivies par une phase d'éveil de courte durée (micro-éveils).

Les phénomènes "toniques" (qui durent pendant tout l'épisode) du sommeil paradoxal se définissent par l'occurrence simultanée d'un tracé EEG de type éveil (avec une très forte prédominance d'ondes thêta 7-8 Hz) et d'une suppression complète de l'activité musculaire squelettique appelée atonie musculaire.

Les phénomènes "phasiques" (qui sont intermittents) sont représentés par : la survenue de mouvements oculaires rapides caractéristiques qui sont à l'origine de l'appellation anglo-saxonne de cet état (*Rapid Eye Movement sleep ou REM-sleep*), des secousses musculaires au niveau des extrémités des membres et de la face et l'existence d'érections péniennes récemment objectivées chez le rat (Schmidt et al., 1994). Ces manifestations sont associées au niveau central à l'apparition aléatoire d'une activité EEG originale dite "ponto-géniculo-occipitale" (PGO).

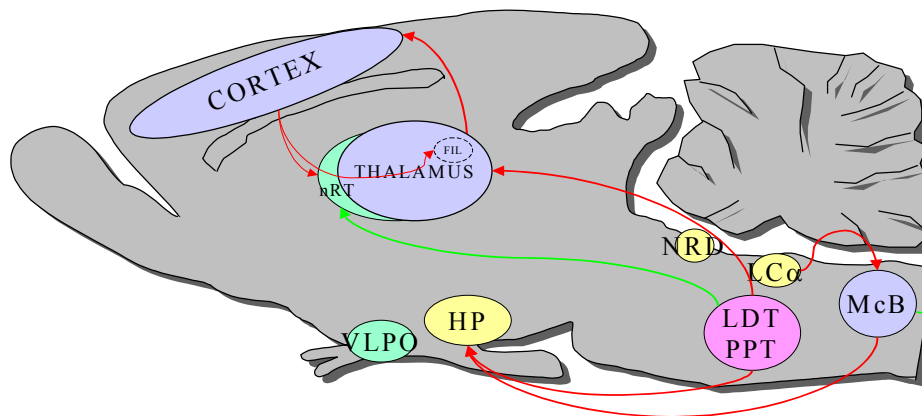
Sur le plan végétatif, la respiration devient irrégulière et la fréquence cardiaque, qui reste basse, subit des accélérations transitoires lors des phénomènes phasiques.

Sur le plan phylogénétique l'apparition du sommeil paradoxal coïncide avec l'apparition de l'homéothermie. A cet égard il est intéressant de remarquer que, pendant le SP, les systèmes de thermorégulation sont inactifs et que l'organisme est en état d'ectothermie. La consommation énergétique est très élevée et la température centrale est augmentée consécutivement à une vasoconstriction cérébrale (Denoyer et al., 1991).

Sur le plan ontogénétique, on considère que l'évolution de l'organisation du sommeil nocturne est un bon reflet des phénomènes de maturation et de l'organisation rythmique des régulations chez l'individu en développement. Cette évolution peut être perturbée par certaines pathologies de l'enfance, ce qui sous-tend à chaque fois une dysrégulation nerveuse. Chez l'enfant sain, l'influence des phénomènes de maturation se traduit par une diminution de l'éveil intra-sommeil, une augmentation du sommeil lent et une diminution continue de la quantité de sommeil paradoxal qui passe de 50% du sommeil total chez le nourrisson, sous une forme particulière appelée sommeil sismique, à 20 % chez l'adulte.

#### ***2.4.2. Mécanismes neuronaux***

Le sommeil paradoxal est régulé par deux systèmes : un système de déclenchement où les réseaux cholinergiques dominent (appelé système "exécutif") et un système inhibiteur incluant les réseaux noradrénergique et sérotoninergique (appelé système "permissif" puisque susceptible d'autoriser le SP pendant son inactivité) : ainsi, pendant le SP, les neurones "SP-OFF" s'arrêtent de fonctionner et l'inhibition du système exécutif est levée. Dans cette situation, les neurones "SP-ON" peuvent s'activer (Hobson et al., 1975). Toutefois, un modèle plus évolutif propose une inter-inhibition et une inter-excitation entre ces deux systèmes (Sakai, 1988).



**Figure 17 :** Représentation schématique des voies nerveuses excitatrices (en rouge) et inhibitrices (en vert)

mises en jeu lors du déclenchement ou du maintien du SP.

*a. Les systèmes permissifs*

Les composantes noradrénergique du LC et sérotoninergique du nRD sont sous la dépendance d'afférences histaminergiques provenant de l'hypothalamus postérieur ventrolatéral. Ce dernier est lui-même influencé par les facteurs hypnogènes synthétisés sous l'influence des afférences sérotoninergique issues du raphé (cf p32). Ainsi, la libération de ces facteurs hypnogènes (galanine et GABA notamment), synthétisés pendant l'éveil sous l'influence de la sérotonine, initie le sommeil en bloquant, entre autres, l'action activatrice de l'histamine sur les systèmes inhibiteurs (dits permissifs) du SP. La sérotonine prépare donc le sommeil pendant l'éveil.

*b. Le système exécutif*

Le système exécutif du sommeil paradoxal concerne la genèse des phénomènes toniques et phasiques concomitants du SP.

*Les phénomènes toniques (l'atonie musculaire et l'activation corticale)*

L'apparition de l'atonie musculaire fait appel à un système inhibiteur à trois étages comprenant la région postéro-ventrale du locus coeruleus (LC $\alpha$ ), la formation réticulée inhibitrice bulbaire (n. magnocellulaire bulbaire ou NMB) et les motoneurones crâniens et spinaux (Sakai et Jouvet, 1980). Ce système inhibiteur ne concerne pas les motoneurones oculaires.

L'activation corticale est le fruit de l'activation de neurones du McB (projetants sur l'HP) et de neurones du LDT et du PPT (projetant sur le thalamus). Dans le PPT, on peut

distinguer les neurones actifs pendant l'EV et le SP (type I) et les neurones actifs sélectivement pendant le SP (type II) (Sakai, 1988).

#### *Les phénomènes phasiques : l'activité PGO et les saccades oculaires*

Le générateur de l'activité PGO est constitué chez le chat de neurones cholinergiques situés dans le péri-LC $\alpha$ , le noyau parabrachialis lateralis, l'aire X du PPT et le LDT. Ces neurones déchargent en bouffées juste avant l'apparition des PGO et leur influence est centrée sur trois cibles essentielles : les noyaux oculaires moteurs (qui provoquent les saccades oculaires associées aux PGO), les corps géniculés latéraux (qui projette sur le cortex visuel) et un troisième groupe constitué du pulvinar et du noyau centralis lateralis thalamique.

### **3. THALAMUS ET RELATIONS SOMMEIL/EPILEPSIE**

#### **3.1. Dans les états désynchronisés (EV et SP)**

##### *Implications physiologiques*

Dans le thalamus, de nombreux neurotransmetteurs excitateurs (NA, ACh, His, 5-HT mais surtout le glutamate) participent, par leur libération dans le thalamus, au maintien de l'EV (McCormick 1992), et au maintien de l'activité onirique (en ce qui concerne l'ACh).

Dans le nRT comme dans le reste du thalamus, le passage à l'état désynchronisé est accompagné par une élévation du potentiel de membrane de l'ordre de 5 à 20 mV ce qui inhibe les canaux calciques T et empêche les décharges de PA en bouffées. La stimulation des noyaux cholinergiques et noradrénergiques du tronc prolonge cette dépolarisation et peut interrompre un épisode de SL en cours (Steriade et al., 1993).

##### *Implication dans la physiopathologie de l'EA*

Pendant l'EV actif, les DPO sont très rares (Pollen et al., 1963).

Une étude révèle l'implication directe du nRT dans la régulation entre les DPO et les états de vigilance chez le rat GAERS (Lin et al., 2002). Dans cette étude, il est montré que la prolactine (injectée dans le nRT) est capable de favoriser l'EV et de supprimer les DPO. Ces données montrent que le *prolactin-releasing-peptide* limite le rôle du nRT dans la synchronisation de la boucle thalamocorticale et empêche ainsi l'établissement d'un état synchronisé ainsi que les DPO pouvant s'y associer.

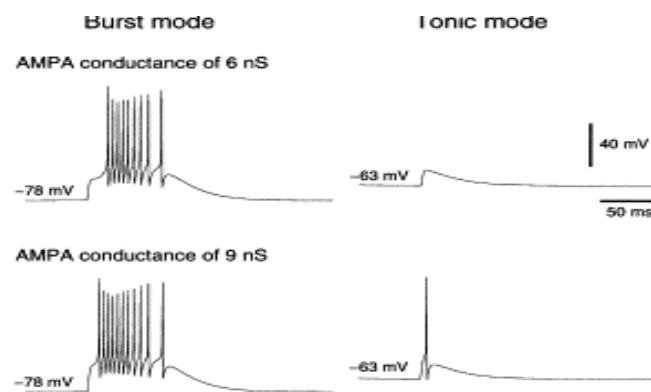
Différents articles annoncent une diminution des DPO en relation avec la survenue de SP (Faradji et al., 2000 ; Kumar et Raju, 2001) mais aucun ne met en question les

variations de l'état membranaire des neurones RE au cours du SP dans cet effet protecteur vis-à-vis des DPO.

### 3.2. Dans un état synchronisé (SL)

#### *Implications physiologiques*

En 1993, Steriade explique très bien le déclenchement de l'activité oscillatoire de type "fuseaux du SL" par les afférences glutamatergiques corticales déclenchant les canaux T. Par un modèle mathématique, Destexhe décrit précisément comment, lorsque la membrane des neurones du nRT est hyperpolarisée (spécialement au niveau des dendrites qui portent plus de canaux calciques T), des influx glutamatergiques peuvent déclencher des bouffées de PA participant à l'activité *pace-maker* du nRT au sein de la boucle thalamo-corticale (Destexhe, 2000).



**Figure 18:** Représentation du mode de décharge d'un neurone thalamique en réponse à une application d'AMPA selon son potentiel de membrane

Ce mécanisme est le même que celui décrit par Steriade 7 ans plus tôt et là encore, son modèle n'inclut pas les afférences cholinergiques et leur effet sur l'état de polarisation de la membrane des neurones du nRT.

#### *Implications dans la genèse des DPO*

Pendant le SL profond, les DPO ne sont jamais observées (Jando et al., 1995). Le rôle du nRT dans la relation SL/DPO est très fort : selon Steriade, les DPO sont une "perversion des fuseaux du SL". Un excès de bouffées de PA GABAergiques arrivant au niveau des TC provoque une décharge excessive (épileptogène) de glutamate dans le cortex (Steriade 1993). Cette théorie est plus que jamais d'actualité puisqu'une équipe japonaise a montré que, chez l'homme aussi, le nRT peut être en cause dans la survenue de l'EA (Nakamura et al., 2003).

Cette hypothèse est reprise dans de nombreux articles et revues (Kostopoulos, 2000 ; Avanzini, 2000) mais il reste cependant à déterminer la cause de l'hyperexcitabilité et de la synchronisation des neurones RE chez le rat GAERS. Pinault émet l'hypothèse de facteurs génétiques (Pinault et al., 2001).

#### **4. PHARMACOLOGIE DE L'ACH ET DU NO**

##### **4.1. Données générales**

###### *4.1.1. Neurobiologie du système cholinergique*

###### *a. Données anatomiques*

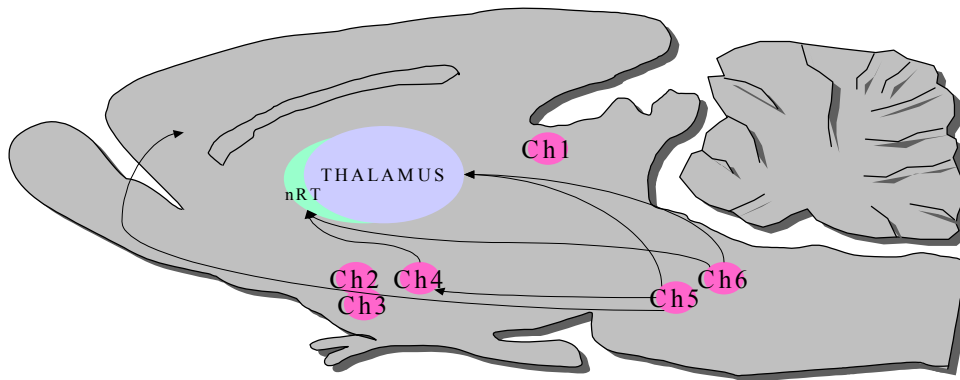
Les structures cholinergiques du pont (la formation réticulée ascendante, le LDT et le PPT) inervent directement toutes les régions du thalamus, de l'hypothalamus et du télencéphale basal et ce de façon plus importante pendant l'éveil et le SP que pendant le SL (Williams et al., 1994).

Dans le thalamus, toutes les zones sensorielles (géniculé médian, géniculé latéral et ventrobasal), motrices (ventro-antérieur, ventrolatéral et ventro-médian), associatives (médo-dorsal, pulvinar et latéral postérieur) et limbiques (antéro-médian et antéro-ventral) reçoivent des projections des neurones cholinergiques de la zone parabrachiale du PPT. De plus, les zones associatives et limbiques reçoivent des afférences cholinergiques du LDT (Hallanger et al., 1987). Les structures cholinergiques mésopontiques (LDT et PPT) sont la source principale d'ACh pour les neurones TC (Steriade et al., 1988).

L'hypothalamus, impliqué dans de nombreuses fonctions de régulation de l'organisme, joue un rôle important dans la mise en place et le maintien de l'éveil. Les afférences cholinergiques en provenance du pont ont probablement un rôle non négligeable dans la modulation de l'activité nyctémérale de l'hypothalamus puisque la libération d'ACh par le PPT et le LDT varie selon les états de veille et de sommeil.

Le télencéphale basal reçoit lui aussi de l'ACh en provenance du PPT et du LDT (Busaki et al., 1988). Cette structure est, elle aussi, cholinergique et joue un rôle de relais puisque, sous l'influence des structures pontiques, elle libère selon les états de vigilance de l'ACh dans toutes les régions du néocortex ainsi que dans le nRT. Le télencéphale basal est une structure hétérogène qui comporte aussi des neurones non-cholinergiques (GABAergiques notamment) qui projettent sur le néo-cortex et le nRT (Chen et Bentivoglio, 1993). Il est intéressant de noter que 10 % à 20 % des neurones du TB qui projettent sur le

nRT contiennent le facteur de croissance neurotrophique (NGF) et que les neurones du nRT chez l'adulte contiennent un précurseur du NGF. Le NGF est un messager rétrograde impliqué dans les phénomènes de maturation des synapses. Il est possible que le nRT, par le biais du NGF, participe activement à la régulation à long terme de ses afférents cholinergiques (Chen et Bentivoglio, 1993).



**Figure 19 :** Représentation schématique des principales structures cholinergiques et de leur principales efférences.

Il apparaît donc que le nRT reçoit trois types d'influences cholinergiques variables selon les états de veille et de sommeil et toutes trois sont sous le contrôle des neurones du pont. Deux de ces influences sont directes (en provenance du PPT et du LDT) et l'une est indirecte puisque relayée par le télencéphale basal.

#### *b. Données biochimiques*

La synthèse de l'ACh s'effectue dans le cytoplasme des terminaisons à partir de choline et d'acétylcoenzyme A (AcCoA) sous l'action de la choline-acétyl-transférase (ChAT).

Dans les conditions physiologiques la ChAT n'est pas saturée par son substrat. La choline est transportée à partir du milieu extracellulaire par un mécanisme spécifique qui est l'élément limitant de la synthèse de l'ACh. Dans le système nerveux central, l'ACh est stockée dans des vésicules d'exocytose. Le transport vésiculaire de l'ACh est assuré par un transporteur spécifique (VAcHT). La libération se fait, sous l'influence d'une stimulation, par exocytose calcium-dépendante. Elle est régulée par des autorécepteurs et des hétérorécepteurs présynaptiques. Dans la fente synaptique, l'ACh est très rapidement hydrolysée par l'ACh-estérase (AChE) en choline. La choline est recaptée par la membrane présynaptique et participe à la néosynthèse d'ACh.

### *c. Les récepteurs à ACh*

#### *Les récepteurs nicotiques*

Ce sont des canaux ioniques dont l'ouverture, déclenchée par la fixation d'ACh ou de nicotine, permet l'entrée de sodium dans la cellule et provoque une dépolarisation membranaire rapide, importante et courte.

Ces canaux sont constitués d'un arrangement de 5 sous-unités protéiques, qui peuvent être alpha, bêta, gamma ou delta, et arrangées en rosette autour d'un canal aqueux. Ces sous-unités sont constituées de 4 domaines trans-membranaires homologues reliés par 3 domaines non-homologues. Le site récepteur de l'ACh se trouve au niveau de l'extrémité N-terminale extracellulaire de certaines sous-unités alpha (Paterson et Nordberg 2000).

Dans le système nerveux central, la plupart des récepteurs nicotiques sont présynaptiques et exercent un rétrocontrôle positif sur la libération d'ACh.

#### *Les récepteurs muscariniques*

Ce sont des récepteurs métabotropiques à 7 hélices alpha trans-membranaires liés aux protéines G. Les 7 segments hydrophobes sont composés de 20 à 28 acides aminés et sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires et deux boucles cytoplasmiques. L'extrémité aminoterminal est extracellulaire et l'extrémité carboxyterminale est intracellulaire.

Les segments hydrophobes comportent un ou plusieurs sites de reconnaissance pour les agonistes, une zone de liaison avec les éléments de couplage et des sites de régulation. La queue carboxyterminale comporte des sites de phosphorylation.

Il existe 5 sous-types de récepteurs (M1, M2, M3, M4 et M5). Le récepteur muscarinique le plus rencontré en tant qu'auto-récepteur est le M2 qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la libération d'ACh. Le sous-type M3 est localisé le plus souvent en position post-synaptique. Les récepteurs muscariniques sont couplés à des protéines G dont la nature est variable et qui sont couplées à des effecteurs protéiques.

### **4.1.2. Neurobiologie du système NO-ergique**

Depuis plusieurs dizaines d'années, le NO a révélé de très nombreuses implications dans les processus biologiques, et ce, quel que soit l'embranchement ou le règne. On peut même imaginer (vu son origine minérale) qu'il constituait une molécule signal avant même d'être synthétisé par une structure vivante. Le très grand intérêt qu'il a suscité récemment est pour une grande part dû à la découverte, qui le popularisa, de son activité vasodilatatrice qui

valut à Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad le prix Nobel de médecine en 1998. Sa nature gazeuse et radicalaire en fait un messager cellulaire d'un type original qui oblige à quitter le mode de raisonnement classique "synapse - neurotransmetteurs - récepteurs - effecteurs".

#### *a. Données anatomiques*

Dans le pont (PPT et LDT), de nombreux neurones cholinergiques contiennent une activité NADPH-diaphorase caractéristique de l'activité des NOS (Vincent et al., 1983b). Certaines données indiquent que la très grande quantité de NOS présente dans le LDT pourrait être un élément de signalisation paracrine (Leonard et al., 2001). Les projections thalamiques de ces structures sont connues et des terminaisons NADPH-diaphorase ont été observées à proximité des neuropiles des neurones thalamiques (Mengual et al 1993 Miyazaki et al., 1996). Dans le nRT, des fibres axonales présentant une activité NADPH diaphorase ont été décelées au laboratoire (résultats non publiés).

Certaines structures monoaminergiques colocalisent aussi une activité NADPH-diaphorase dans certains neurones (comme le noyau du raphé dorsal sérotoninergique). Ces structures sont impliquées dans les mécanismes de préparation ou d'exécution des états de vigilance (Johnson et Ma, 1993).

L'implication du nRT dans l'EA place, potentiellement, l'ACh et le NO à un carrefour anatomique entre la régulation des états de vigilance et le contrôle des DPO. Aucune étude à ce jour n'a prouvé que les neurones pontiques colocalisant nNOS et choline-acétyl-transférase (CAT, enzyme de synthèse de l'ACh) étaient bien ceux qui émettaient des projections vers le nRT.

Il faut signaler une étude très complète sur l'aspect ontogénétique des neurones marqués à la NOS chez le rat : Terada et al., 2001.

#### *b. Données biochimiques*

Le NO est synthétisé par des homodimères de NOS. Il existe 3 types de NOS identifiables par leur poids moléculaire et présentant 50 à 60 % d'homologie entre eux, et chacun 90 % d'homologie interspécifique. Chaque isoforme peut subir des modifications traductionnelles ou post-traductionnelles (phosphorylation et, pour la eNOS, myristoylation ou palmitoylation) qui peuvent influencer sa localisation ou son activité. Elles contiennent toutes la séquence de la cytochrome P450 oxydase et une activité réductase nécessitant des

cosubstrats complexes tels que le NADPH, le FAD, le FMN, l'oxygène, l'hème, la tétrahydrobioptérine et la calmoduline.

Cette famille d'enzyme assure la transformation équimolaire de la L-arginine en L-citrulline et NO (Griffith et Stuehr, 1995). Actuellement, trois isoformes essentielles ont été répertoriées :

(1) La NOS neuronale (nNOS codée par le gène NOS-1) est exprimée de manière constitutive dans certains neurones. Son activité, mesurée dans la fraction cytosolique des neurones est calcium et calmoduline dépendante (Griffith et Stuehr 1995). Cette NOS fut d'abord caractérisée sous forme soluble mais peut aussi s'accrocher aux membranes par l'intermédiaire d'un fragment PDZ N-terminal à des protéines telles que PSD-95, PSD-93 (Hecker et al., 1994) ou bien la syntrophine. La nNOS est aussi très puissamment régulée par la *Protein Inhibitor of NOS* (PIN) qui est capable de déstabiliser les dimères de nNOS et donc de rendre l'enzyme inactive (Jaffrey et Snyder, 1996).

(2) La NOS endothéliale (eNOS codée par le gène NOS-3) est localisée au niveau des membranes des cellules endothéliales (Sessa, 1994). Comme la nNOS, son expression est constitutive et son activité est dépendante de la liaison au complexe calmoduline/calcium (Griffith et Stuehr, 1995). Son rôle est majeur dans la vasodilatation, la limitation de l'agrégation plaquettaire la bronchodilatation et le relâchement stomacal postprandial.

L'activation des NOS constitutives est dépendante de la phosphorylation de résidus tyrosine (Griffith et Stuehr, 1995).

(3) La NOS inductible (iNOS codée par le gène NOS-2) est exprimée dans les cellules du système immunitaire. Son activité enzymatique ne dépend ni du calcium ni de la calmoduline. Son expression dépend de la fixation d'un facteur de transcription (nFκB) au niveau de l'ADN. Le nFκB est activé par des endotoxines ou des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL2, IL6 , TNFα et INFγ). L'expression de la iNOS peut donc être induite par une réaction inflammatoire. L'expression de la iNOS peut être bloquée par le NO (provenant des NOS constitutives dans les conditions physiologiques ou par la iNOS) lui-même qui inactive le nFκB (Katsuyama et al., 1998).

Au niveau neuronal, la production de NO est activée par l'entrée de Ca<sup>2+</sup> induite par la fixation de glutamate sur les récepteurs NMDA. Contrairement aux neurotransmetteurs conventionnels, il n'existe pas de système de stockage ni de recapture pour le NO. Une fois produit, le NO diffuse librement au travers des membranes biologiques jusqu'à ce qu'il exerce son action sur une molécule ou qu'il soit dégradé. Sa demi-vie est de 10<sup>-6</sup> s.

### *c. Mécanisme d'action du NO*

Le premier mécanisme d'action mis en évidence pour ce composé simple a concerné sa capacité d'activation de la guanylate-cyclase soluble qui favorise la conversion du GTP en GMPc. Cette augmentation de la production de GMPc est un signal intracellulaire capable de déclencher différentes cascades de réactions enzymatiques (Garthwaite et al., 1988 ; Knowles et al., 1989) et de réguler l'activité de la protéine kinase G.

Le NO est aussi capable d'une action directe : il peut activer ou inactiver certaines protéines par S-Nitrosylation sur des résidus L-Cystéine, par tyrosine-nitration ou bien par fixation aux métaux de transition.

Son mode d'action peut être synaptique (antérograde ou rétrograde) ou paracrine. Il existe maintenant de nombreuses preuves de l'existence d'un nouveau mode de transmission dans le système nerveux central. Cette transmission, non-synaptique, est basée sur la diffusion du NO et son atteinte, dans des neurones voisins, de cibles protéiques pouvant : réguler la transcription de certains gènes, réguler l'activité de protéines ou d'enzymes par phosphorylation ou modifier l'efficacité de la transmission de neurotransmetteurs conventionnels comme la NA (Kiss et al., 1996 ; Lonart et Johnson, 1995), la 5HT , la DA (Sandor et al., 1995 ; Segieth et al., 1999) l'ACh, le Glutamate ou le GABA (Prast et Philippu, 2000).

### *d. Catabolisme du NO*

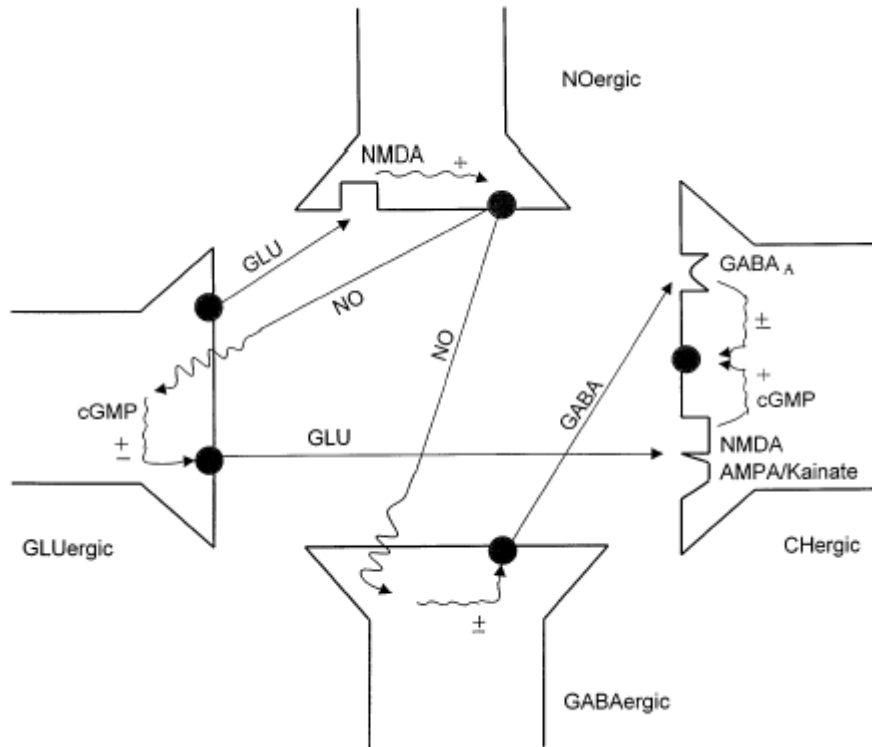
Le NO est une molécule gazeuse, instable qui en présence d'oxygène est transformée spontanément en nitrite  $\text{NO}^{2-}$  puis en nitrate  $\text{NO}^{3-}$  qui sont éliminés par voie urinaire.

#### **4.1.3. Interrelation NO/ACh**

Il est connu depuis longtemps que, dans le système cardio-vasculaire, l'ACh provoque une augmentation de la libération de NO. (Prix Nobel de médecine 1998). Dans le système nerveux central, de nombreuses interrelations entre ces deux messagers ont été mises en évidence :

- Colocalisation fonctionnelle au niveau des neuropiles (Villani et al., 1994)
- Potentialisation de la libération d'ACh par le NO par un mécanisme GMPc dépendant (Leonard et Lydic, 1995).
- Existence d'un système métasynaptique de régulation de la libération d'ACh par la nNOS (Csillik et al., 1998)

- Mise en évidence (*in vitro*) d'un système indirect par lequel le NO faciliterait la libération de glutamate et diminuerait la libération de GABA ce qui augmenterait la libération d'ACh (Prast et al., 1992 ; Prast et al., 1995 ; Prast et al., 1998 ; Prast et Philippu, 2001 ; Krauss et Prast, 2001)



**Figure 20 :** Représentation de l'interdépendance entre les libérations de NO, ACh, Glutamate et GABA (mécanismes métaboliques).

Toutefois, des travaux montrent, chez le chat, qu'une inhibition de la nNOS dans le TB provoque une augmentation de la libération d'ACh dans le TB (Vazquez et al., 2002).

Si le NO peut avoir une action *per se* sur les états de vigilance, il peut aussi avoir une action très importante en modulant la libération d'ACh avec laquelle il entretient des relations privilégiées. La potentialisation de la libération d'ACh par le NO est un mécanisme prouvé d'augmentation de la durée des épisodes de SP par la NOS (Leonard et Lydic 1997).

## 4.2. NO/ACh et états de vigilance

### 4.2.1. ACh et états de vigilance

#### *Action de l'ACh aux niveaux cortical et thalamique*

Au cours de l'éveil et du SP, le système cholinergique ponto-mésencéphalique (constitué des noyaux laterodorsaux (LDT) et pédonculopontins (PPT) du tégumentum

pontique) participe à l'activation corticale de manière directe et empêche l'instauration d'une activité de type "fuseaux" caractéristique du sommeil lent et de l'endormissement.

La participation de l'ACh à l'activation corticale se fait par une stimulation directe du néocortex par le télencéphale basal qui est lui-même activé par le PPT et le LDT (cf page 40).

L'activité de type fuseaux est bloquée au niveau thalamique par des afférences pontiques et au niveau du nRT par des afférences pontiques et du TB. Elle est médiée par des récepteurs muscariniques (Hu et al., 1989) car seuls des récepteurs métabotropiques (et non ionotropiques comme les récepteurs nicotiques) provoquent une dépolarisation suffisamment longue pour inactiver les courants calciques T impliqués dans la régulation des fuseaux (Zhan et al., 2000 et 1.5.2.). L'inactivation de ces courants calciques T dans le nRT et les TC favorise chez ces neurones un mode de décharge tonique plutôt que phasique et donc une activité thalamo-corticale désynchronisée plutôt qu'en fuseaux.

On ne peut toutefois pas exclure une participation des récepteurs nicotiques dans le déclenchement d'une activité thalamique phasique : dans un système analogue, Bouhassira a montré (Bouhassira et al., 1988) que l'activité PGO contemporaine du SP (cf page 36), qui est médiée au niveau thalamique par le corps géniculé latéral (CGL analogue fonctionnel des neurones TC), est bloquée par l'administration d'antagoniste nicotique dans le CGL. Outre une action nicotique excitatrice des neurones du CGL, l'ACh a une action muscarinique inhibitrice sur le noyau périgéniculé (analogue fonctionnel du nRT) (Hu et al., 1989b).

Il est important de noter que l'effet de la libération d'ACh dans le nRT varie selon le potentiel de membrane du nRT. Elle aura un effet hyperpolarisant à un certain potentiel et, si le potentiel de membrane est trop bas, un effet dépolarisant (McCormick et Prince, 1986). De ce fait l'ACh a un rôle stabilisateur du potentiel post-synaptique des neurones RE.

### *Afférences cholinergiques au thalamus*

#### *a. Au niveau mésopontique*

Les neurones cholinergiques du pont forment plusieurs populations distinctes contrôlées par leurs afférences monoaminergiques cholinergiques et glutamatergiques (Koyama et Sakai, 2000 ; Mihailescu et al., 2001) et ayant des modes de décharge particuliers variables selon l'état de vigilance (Sakai, 1988).

Le rôle de l'ACh dans le déclenchement du SP est mis en évidence par l'effet d'agents cholinergiques (physostigmine, arécoline, carbachol) administrés pendant le

sommeil lent. Ces injections, antagonisées par la scopolamine, réduisent le délai d'apparition du prochain épisode de SP (Sakai, 1988). En revanche, lorsque l'agent cholinergique est administré durant le SP, le sujet s'éveille. Cet effet peut être dû à des autorécepteurs muscariniques qui sont capables de bloquer les activités PGO (Sakai et al., 1994) probablement en favorisant un mode de décharge tonique plutôt que phasique en dépolarisant durablement la membrane somatique (cf page 47).

Quoiqu'il en soit, le taux de décharge de ces neurones dans le thalamus est maximal pendant l'éveil et le SP et plus faible pendant le SL. Il est aussi dépendant du calcium et sodium (Williams et al., 1994). De plus, des bouffées de PA sont enregistrées dans certains de ces neurones juste avant l'enregistrement EEG de PGO. Elles en sont les initiatrices en libérant au niveau du CGL de grandes quantités d'ACh.

#### *b. Au niveau du TB*

Les neurones cholinergiques du TB reçoivent, selon l'état de vigilance, de l'ACh libérée par les neurones mésopontins. Toutefois, ils sont aussi soumis à une inhibition tonique adénoenergique et GABA-ergique permanente. Pendant l'éveil, leur taux de décharge est positivement corrélé avec l'activité motrice de l'animal qui est responsable de la plus grande partie de la variance de leur activité (Szymusiak et al., 2000). Puisque ces neurones ont des projections dans le nRT, on peut imaginer que c'est grâce à ces neurones que l'activité musculaire peut être prise en compte par le nRT pour la génération ou le blocage d'une activité de type fuseaux ou DPO.

#### *4.2.2. NO et états de vigilance*

Le taux de NO mesuré dans le cortex est maximal pendant l'éveil, plus faible pendant le SL (-6 %) et minimal pendant le SP (-9 %) (Cespuglio et al., 1996 ; Burlet et al., 1997). Si la participation du NO à la régulation du cycle veille sommeil est démontrée, elle est encore discutée puisque les auteurs attribuent au NO, soit un pouvoir hypnogène ciblé sélectivement sur le SP, soit un pouvoir hypnogène facilitant à la fois le SP et le SL.

#### *Effet hypnogène du NO*

En fait, l'action hypnogène du NO varie selon le site considéré. La microinjection d'un inhibiteur de la nNOS dans le nRD diminue la durée du SP (Burlet et Cespuglio, 1997) probablement en diminuant la libération de sérotonine locale (Smith et Whitton, 2000). Dans le PPT, une telle injection provoque une diminution du sommeil total alors qu'un donneur de NO aura un effet hypnogène (Datta et al., 1997) probablement en diminuant la libération

d'ACh au niveau pontique (Leonard et Lydic, 1997). Il faut souligner la présence dans ces structures mésopontiques de quelques neurones glutamatergiques (Clements et Grant, 1990) qui, peut-être en relation avec les fortes quantités de NOS dans les neurones cholinergiques, peuvent influencer le mode de décharge des neurones cholinergiques.

Des travaux récents obtenus chez des souris KO pour les gènes codant la NOS ont montré que, physiologiquement, l'influence du NO sur le SP était dépendante de la nNOS et non de la iNOS car seuls les KO nNOS présentent une diminution de SP (Chen et al., 2002). Toutefois, ces souris, étudiées au laboratoire, ne semblent pas produire moins de NO que leurs homologues sauvages.

A notre connaissance, un seul article a prétendu qu'une inhibition de la production de NO dans le pont augmente le SP (Okabe et al., 1998). Dans cette étude, un examen approfondi des résultats permet de constater qu'au cours des 3 h suivant l'injection de L-NAME (inhibiteur des NOS constitutives), la quantité de SP diminue (ce qui serait conforme aux autres données de la littérature sus-citées) mais qu'après 3 h une très forte augmentation du SP est observée. Ce délai n'est pas sans évoquer le temps d'activation de la iNOS qui peut être induite par une diminution du taux de NO que le L-NAME a induite. La forte augmentation du SP pourrait être attribuée à la iNOS qui n'est plus régulable après sa synthèse.

A toute fin utile, il semble important de remarquer que l'effet éveillant de l'inhibition de la nNOS peut être compensé par un pré-traitement avec un agoniste GABA-A : le muscimol (Monti et al., 2001)

Le NO libéré dans les structures supérieures (cortex et thalamus) peut provenir de nombreuses régions du cerveau dont le tectum, le nRD, le LDT et le PPT. Parmi ces trois dernières structures (qui sont les seules parmi les sus-citées à avoir une cyclicité nycthémerale clairement définie) les neurones cholinergiques du PPT et du LDT représentent la majeure partie des influx NO-ergiques vers le thalamus (Vincent et Kimura, 1992).

#### *NO et mode de décharge des neurones thalamiques*

En 1992, Pape et Mager, ont mis en évidence que le NO, *via* le GMPc, altérait le déclenchement des canaux voltage-dépendants. Ce mécanisme permet le passage des neurones TC d'un mode de décharge phasique (ou "en bouffées") à un mode de décharge tonique qui favorise la désynchronisation corticale.

L'activité du LDT (qui apporte du NO et de l'ACh) est dépendante des états de sommeil et d'EV : elle est élevée durant l'EV et le SP mais plus faible pendant le SL. La libération de NO qui peut en être attendue est dépendante du calcium ainsi que de l'arrivée de PA dans le thalamus car elle est bloquée par la tétrodotoxine qui inhibe les canaux sodiques voltages-dépendants (Williams et al., 1997). Dans le thalamus, il a été démontré que le NO favorisait la réponse des neurones relais aux influx sensoriels (Do et al., 1994) et aux acides aminés excitateurs (Shaw et Salt, 1997). El-Husseini a montré par ces nombreux travaux sur le NO que la kinase GMPC dépendante de type II est régulée par le NO et est responsable du contrôle de la phosphorylation de nombreuses protéines (El-Husseini et al., 1998).

Le rôle du NO dans les mécanismes de synchronisation des neurones a été mis en évidence par Cudeiro en 2000 : le NO aurait, localement, la capacité d'augmenter très fortement le taux de décharge de neurones corticaux et thalamiques tout en leur faisant perdre leur rythmicité. Cette action est mimée par le 8-Br-GMPc (analogue diffusible du GMPC).

### **4.3. NO/ACh et EA**

#### **4.3.1. ACh et EA**

Dans une étude publiée en 1993 sur le rat GAERS, Laurence Danober a montré que :

- L'administration i.p. de cholinomimétiques (nicotiques, muscariniques ou mixtes) atténue la survenue des DPO de manière dose dépendante.
- L'administration d'antagonistes nicotiques est sans influence significative alors que les antagonistes muscariniques potentialisent de manière dose dépendante les DPO.
- Paradoxalement l'administration d'antagonistes muscariniques à forte dose supprime aussi les DPO.

#### *Au niveau mésopontique*

La destruction bilatérale chez le rat GAERS du PPT et/ou du LDT ne semble pas augmenter ou atténuer les DPO ni même modifier le comportement de l'animal (Danober et

al., 1995). Toutefois, ces mesures n'ont pas été effectuées sur 24 h et il est possible que la répartition nycthémerale de l'apparition des DPO soit modifiée.

L'activation des structures mésopontiques (LDT et PPT) par le kaïnate (agoniste glutamatergique) entraîne une baisse des DPO pendant la première heure (Danober et al., 1995). Cette suppression de l'épilepsie est accompagnée par une modification comportementale de l'animal : l'animal est éveillé, immobile et insensible aux stimuli extérieurs. De même, une désinhibition par la picrotoxine (antagoniste GABAergique) entraîne une baisse des DPO (Danober et al., 1995).

#### *Au niveau thalamique*

Il est maintenant admis que l'ACh libérée au niveau du nRT provoque une diminution de l'activité des neurones GABAergiques (McCormick et al., 1992) qui sont à l'origine de la synchronisation des ondes lentes et des DPO (Steriade et al., 1993). L'administration thalamique de carbachol (agoniste cholinergique) supprime de manière dose dépendante les DPO chez le rat GAERS. Cet effet est partiellement bloqué par la scopolamine (antagoniste muscarinique) alors que la scopolamine seule dans le thalamus n'a pas d'effet sur les DPO chez le rat GAERS (Danober et al., 1993).

L'ACh, est donc un modulateur puissant de l'EA. Lorsque la libération d'ACh au niveau thalamique est élevée (par exemple pendant un éveil actif ou le SP) ou nulle (pendant un SL profond) il n'y a pas de déclenchement de DPO (Halasz et al., 2002). Ces situations peuvent être mimées par une administration par voie générale de carbachol ou d'une forte dose de scopolamine. En revanche, dans le cas d'une libération faible mais non nulle d'ACh dans le thalamus (comme dans le cas d'une somnolence ou de SL léger), des DPO sont possibles. Cette situation peut être mimée par une administration de scopolamine à faible dose par voie générale.

#### **4.3.2. NO et EA**

Depuis de nombreuses années, l'implication du NO dans le système nerveux central s'est révélée être majeure, aussi bien au titre de vasodilatateur qu'au titre de messenger neuronal (Bredt et Snyder, 1994). Son importance dans le déclenchement et le maintien du SP (Burllet et Cespuglio, 1997 ; Datta et al., 1997 ; Leonard et Lydic, 1997) n'est qu'un exemple de son influence sur l'excitabilité du SNC. Son rôle a aussi été démontré dans la régulation du flux sanguin cérébral (Adachi et al., 1992), la plasticité synaptique (O'Dell et

al., 1991), le recadrage de l'horloge circadienne (Ding et al., 1994) et les phénomènes oscillatoires thalamocorticaux (Pape et Mager, 1992).

#### *Des données ambivalentes*

La possibilité d'une action anti-convulsivante du NO endogène est assez ancienne (Buisson et al., 1993). En 1995, Rundfeldt évoquait les potentialités pro- et anti-convulsivantes des inhibiteurs des NOS sur le seuil de déclenchement de crises dans un modèle d'épilepsie convulsive. Il mettait en parallèle cet effet biphasique avec celui observé pour de nombreux anti-convulsivants (phénytoïne, carbamazépine, antagonistes NMDA) et mettait donc en garde contre l'utilisation de donneurs de NO en tant qu'anti-épileptiques.

L'idée d'un rôle ambivalent du NO a été entretenue par des données qui montraient, dans des foyers épileptiques, une surexpression de la iNOS et un déficit en NOS constitutive identifiant ainsi la iNOS comme épileptogène et les NOS constitutives comme anti-épileptique (Murashima et al., 2000). Si ces résultats sont très intéressants, les conclusions qui en sont tirées doivent être considérées avec prudence.

#### *Une action anti-épileptique observée*

Il a aussi été montré que la synthèse endogène de NO était un des éléments pharmacodynamiques de l'effet anti-épileptique de l'ESM puisque l'inhibition de la NOS par le N-Nitro-L-Arginine (NNA) en diminue l'efficacité (Czuczwar et al., 1999). Il a aussi été montré que le NO était impliqué dans l'effet anti-épileptique de la morphine dans le modèle des convulsions induites par électrochocs (Khavandgar et al., 2003). En revanche, cette dépendance vis-à-vis de la NOS (partielle puisqu'il n'est pas possible de supprimer totalement l'effet de l'ESM par le NNA) n'est pas vérifiée pour d'autres anti-épileptiques (carbamazépine, phénobarbital, VPA) et s'accompagne de troubles moteurs déjà observés lors de l'association d'anti-convulsivants et d'inhibiteurs de NOS (Borowicz et al., 1998) et même de cataplexie (Marras et al., 1995).

Néanmoins, une augmentation de la production de NO a été observée après administration d'un agoniste GABA-A anti-absence : le diazepam (Paul et al., 2001). Parallèlement, il a été observé après administration i.p. de VPA (200 mg/kg) une augmentation du taux de NO au niveau cortical (Faradji et al., 2000). Ces résultats ont permis à l'auteur de suggérer que le NO pourrait avoir un rôle clef dans la prévention de l'EA.

Le rôle anti-épileptique propre au NO chez les rats GAERS a été mis en évidence par Faradji en 2000. En effet, l'administration i.p. d'un inhibiteur de la NOS (L-ANA 100 mg/kg) est capable de provoquer une forte recrudescence des décharges de pointes ondes (DPO). Réciproquement l'administration intracérébroventriculaire d'un donneur de NO (molsidomine 100 ng/2 µL) diminue la survenue de DPO.

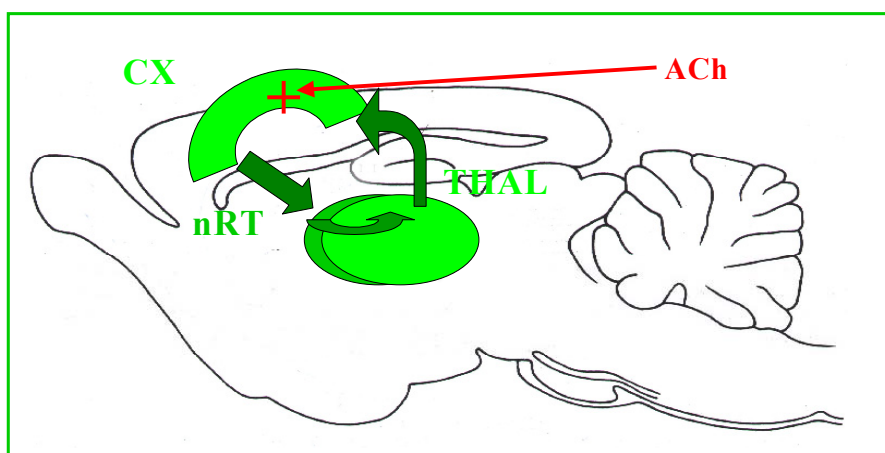
### ***Notre hypothèse de travail***

#### ***ACh et balance SP/EA***

Des données assez anciennes indiquent que, parmi les mécanismes cellulaires régissant l'excitabilité du nRT, le système réticulé à projection diffuses expliquerait la modulation de la survenue des paroxysmes par le cycle veille sommeil (Gloor et Fariello, 1988).

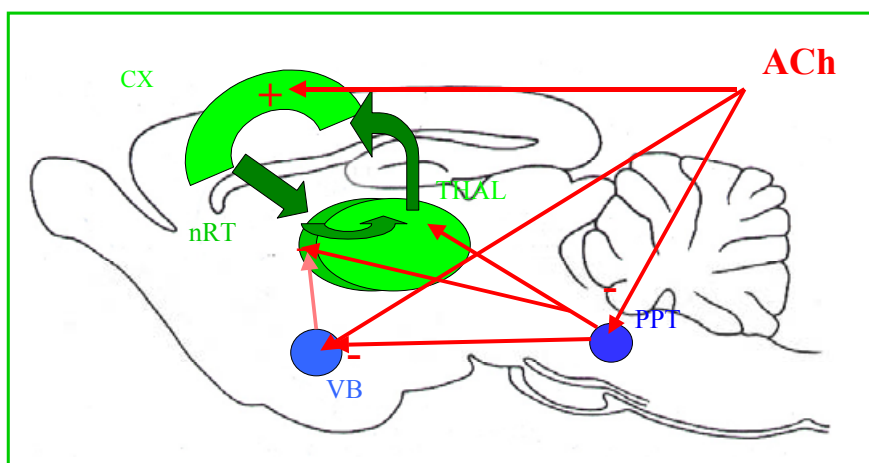
Si en 1993 Laurence Danover n'explique pas le mécanisme d'action de l'ACh dans ce contrôle des DPO, elle le met cependant en relation directe avec l'effet de l'ACh sur l'état de vigilance de l'animal. En effet, la stimulation du système cholinergique par voie générale entraîne chez l'animal une excitation générale avec un EEG désynchronisé incompatible avec la survenue spontanée des DPO. En revanche, une atténuation de ce tonus amène l'animal dans un état calme proche de l'endormissement. A ce stade, la survenue des DPO est plus fréquente. Ces données confirment donc que la survenue des DPO intervient pendant que l'animal est inattentif, inactif ou somnolent (Vergnes et al., 1991) c'est à dire lorsque l'activation cholinergique est faible.

Toutefois, si ces résultats sont cohérents, ils n'expliquent pas les résultats obtenus avec des doses fortes d'antagonistes muscariniques.



**Figure 21 :** Schéma explicatif, selon Danober, du rôle de l'ACh sur les DPO .

Il est possible que la pluralité des afférences cholinergiques au nRT (NB et pont) ou bien qu'un effet de l'ACh sur des structures non corticales (l'ACh inhibe les neurones cholinergiques du pont et du TB) soient à l'origine de cette réponse variable selon la dose. Quoiqu'il en soit, l'étude pharmacologique doit être poussée à un niveau anatomique plus fin pour espérer apporter des réponses satisfaisantes et, peut-être, réévaluer le rôle de l'ACh dans le nRT.



**Figure 22 :** Rôle potentiel de l'ACh sur des structures non-diencephaliques

### *NO et balance SP/EA*

Les relations étroites entre le SP et l'EA ont été découvertes il y a trois ans au laboratoire chez les rats GAERS (Faradji et al., 2000). Dans ce modèle, il a été mis en évidence qu'il y a une opposition stricte entre les périodes où l'animal est en SP et les périodes où l'animal est victime d'EA .

Dans toutes les situations présentées dans ce travail, les diminutions de DPO s'accompagnaient d'une augmentation du SP. Ceci a permis à l'auteur de suggérer que le NO favorise le SP aux dépens de l'EA et que le VPA (qui présente un profil d'action comparable) pouvait agir, au moins en partie, par une libération de NO.

Dans la suite logique de ce travail, notre étude s'est attachée à essayer de définir, dans une structure clef de la genèse des DPO (le nRT) les mécanismes d'action du NO et de l'ACh.

## **MATERIELS ET METHODES**

## **1. LES ANIMAUX UTILISES**

### **1.1. Les rats GAERS**

Le développement récent chez le rat de modèles d'EA transmissibles génétiquement, permet la réalisation d'études plus proches (d'un point de vue physiopathologique et pharmacologique) de la pathologie humaine que celles réalisées sur des modèles pharmacologiques induits. Dans ce sens, le modèle du rat GAERS (*Genetic Absence Epileptic Rat from Strasbourg*), est un modèle très intéressant d'EA dans lequel 100 % des animaux homozygotes présentent des manifestations comitiales (Vergnes et al., 1982).

Pour les expériences réalisées, les animaux utilisés provenaient d'un élevage réalisé au laboratoire, de rats GAERS et de rats témoins non-épileptiques. L'élevage de rats GAERS a pu être développé au laboratoire grâce à des animaux provenant du laboratoire strasbourgeois où la souche a été sélectionnée (Unité INSERM 398 dirigée par le Pr. Marescaux). Le choix de cette souche en tant que modèle d'étude des DPO typiques de l'EA est validé par de nombreux articles (Marescaux et al., 1992 ; Nehlig et al., 1998).



**Figure 23 :** Rat GAERS équipé d'un système d'enregistrement polygraphique implanté

### **1.2. Conditions d'élevage et d'opération**

Les animaux étaient maintenus à une température constante de  $21 \pm 1$  °C et soumis à un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h. La nourriture et l'eau leur étaient fournies *ad*

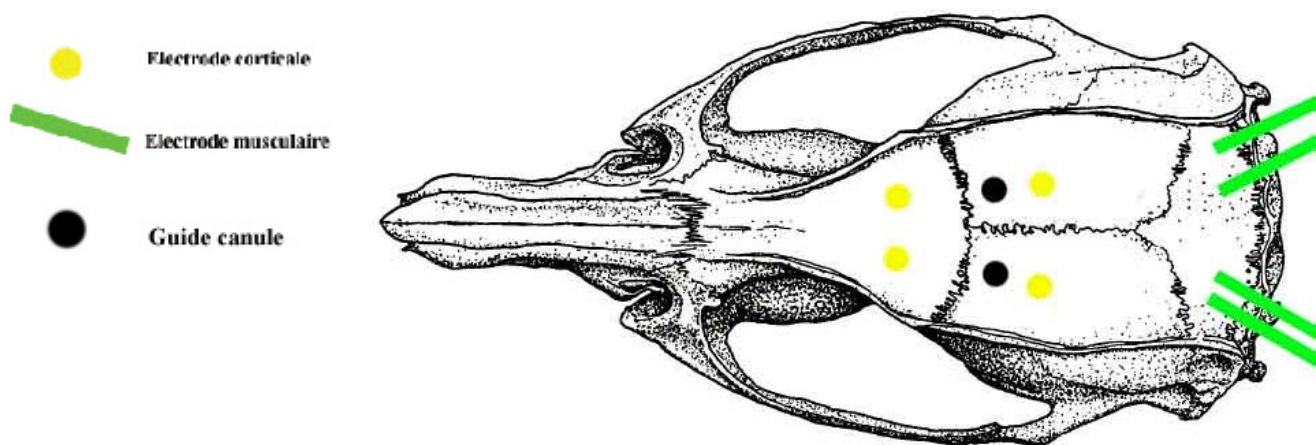
*libitum*. Lors de l'ensemble des phases opératoires, l'anesthésie était effectuée par une dose initiale d'hydrate de chloral (400 mg/kg i.p., Merck, Darmstadt, Allemagne) et entretenue par des doses supplémentaires de 20 mg. La température corporelle de l'animal était maintenue à 37 °C grâce à une couverture homéothermique asservie à une sonde rectale.

Dix-sept animaux (8 GAERS épileptiques et 9 issus de la souche témoin non-épileptiques) ont été utilisés. Ils étaient âgés de 5 à 9 mois et pesaient  $344 \pm 22$  g pour les non-épileptiques et  $322 \pm 32$  g pour les GAERS.

## **2. PROTOCOLE D'IMPLANTATION ET DE RECUEIL DES TRACES POLYGRAPHIQUES**

Sous anesthésie générale, les animaux étaient équipés d'un implant permettant, grâce à des guide-canules, de procéder à des micro-injections locales (procédé détaillé plus loin) et, grâce à des électrodes, de procéder à un enregistrement polygraphique permettant de caractériser en continu, par l'enregistrement de différents paramètres (EEG et EMG), l'état de veille ou de sommeil et la survenue des DPO.

L'activité EEG est représentative de l'intensité du champ électrique généré par les déplacements de charges électriques dans l'encéphale. Ces déplacements de charges se font au niveau de la transmission axonale du signal mais aussi et surtout au niveau de la transmission synaptique. L'EEG était enregistré au moyen de 4 électrodes en acier inoxydable (Anthogyr, Sallanches, France) placées stéréotaxiquement (cf figure 24) en contact avec la dure-mère et vissées dans le crâne.



**Figure 24 :** Représentation des sites d'implantation des différentes électrodes polygraphiques.

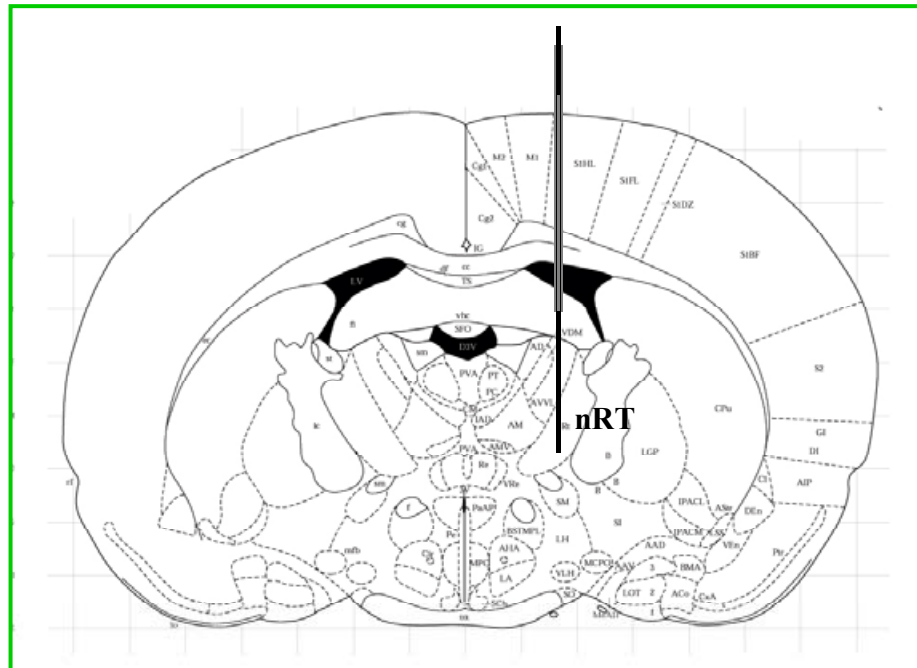
L'activité EMG est représentative de l'intensité du courant électrique généré au niveau des plaques neuromusculaires au moment de contractions musculaires. L'EMG était enregistré au moyen de 3 électrodes en fil d'acier inoxydable (Cooner Wire, Chatsworth, CA, E-U ; modèle AS632) enroulé en une petite boucle (de 2 mm de diamètre) sertie d'une petite boule d'étain. Ces électrodes étaient placées au contact de la masse musculaire de la nuque de l'animal.

Ces électrodes étaient reliées à un connecteur maintenu sur la tête de l'animal grâce à du ciment dentaire (KRON-FIX N ; Merz dental, Lütjenburg, Allemagne). L'ancrage au crâne était renforcé par des vis et une résine polymérisée (Super-bond C&B ; Sun Medical co, Shiga, Japon). Après une période de récupération de 5 à 7 jours, un câble d'enregistrement était connecté à la tête de l'animal. Après une période de 7 jours, au cours de laquelle l'animal s'habitue au câble, les enregistrements débutaient.

Les câbles d'enregistrement étaient insérés dans une spirale métallique afin de protéger les fils des dents du rongeur et des champs électriques engendrés par les différents équipements environnants (éclairage, climatiseur...). Ils étaient reliés à un connecteur tournant situé au-dessus de l'animal et lui offrant toute latitude de mouvement dans sa cage sans risquer d'enrouler le câble sur lui-même. Les signaux étaient transmis à un modem EMBLA (société Flaga ; Reykjavik, Islande) numérisant l'information à la fréquence de 200 Hz. L'enregistrement des données polygraphiques (EEG et EMG) était effectué selon un mode bipolaire (couplant une électrode frontale et une électrode pariétale homolatérale pour l'EEG et deux électrodes musculaires pour l'EMG) en continu et 24 h sur 24 h grâce au logiciel d'acquisition Somnologica (société Flaga ; Reykjavik, Islande).

### **3. INJECTION ET CONTROLE ANATOMIQUE**

Les canules-guide (diamètre 300  $\mu$ m ; longueur 16 mm) étaient implantées et maintenues par du ciment dentaire de manière à ce que leur extrémité inférieure se situe 2,5 mm au-dessus du site d'injection. Les canules d'injection, plus longues que les canules-guide (+2,5 mm), introduites deux minutes environ avant l'injection atteignaient les coordonnées du point visé (cf figure 25) : A=7,6 mm ; L=1,8 mm ; H=3,5 mm (Paxinos et Watson, 1996).



**Figure 25 :** Représentation du système de micro-injection dans le nRT

L'injection en elle-même était mise en œuvre au moyen d'une seringue Hamilton (de volume 1  $\mu\text{L}$ ) reliée, par un cathéter de 20 cm, à une canule métallique terminée par une aiguille en silice (diamètre 150  $\mu\text{m}$ ). Après l'injection (d'un volume constant de 0,1  $\mu\text{L}$ ), la canule était maintenue en place pendant une minute avant son retrait.

Toutes les substances ont été injectées dans la demi-heure précédant le passage à l'obscurité. Toutes les injections ont été réalisées avec des substances dissoutes dans une solution isotonique de NaCl. Entre chaque injection, une période de récupération d'au moins 4 jours était respectée. Pour chaque rat, chaque substance était injectée à 2 reprises considérées d'un point de vue statistique comme des mesures répétées. Les produits suivants ont été utilisés :

NaCl (Aguettant, Lyon) : 9 g/L

Carbachol (CAR) (Sigma, France) : 10 mg/mL - Agoniste cholinergique mixte (muscarinique et nicotinique)

Hexamethonium (HEX) (Sigma, France) : 72,4 mg/mL - Antagoniste des récepteurs nicotiques

Scopolamine (SCO) (Sigma, France) : 1 mg/mL - Antagoniste des récepteurs muscariniques

Bromo-7-nitro-indazole (BNI) (Sigma, France) : 0,1 mg/mL – Inhibiteur spécifique de la NOS neuronale

Molsidomine (MOL) (Sigma, France) : 2 mg/mL – Donneur de NO

En fin d'expérience, une solution de bleu de méthylène était perfusée dans les conditions usuelles au niveau des sites d'injection afin de déceler *post-mortem* les erreurs de stéréotaxie et, le cas échéant, d'écarter les résultats obtenus avec ces animaux.

#### **4. TRAITEMENT DES DONNEES POLYGRAPHIQUES**

##### **4.1. Etude de la répartition des états de vigilance**

La détermination des 4 états d'activités cérébrales considérés (3 états de vigilance : EV, SL et SP, et un état pathologique : les DPO) s'est faite par lecture visuelle (supportée par le logiciel Somnologica) et par fenêtre de 5 s. La quantification des différents paramètres (quantité horaire, nombre de phases, durée moyenne, latence d'apparition) était effectuée, selon les paramètres, à l'aide de Somnologica ou d'un tableur classique.

##### **4.2. Etude qualitative des états de vigilance**

L'analyse spectrale a été réalisée par transformation du signal selon la méthode de transformé de Fourier rapide gérée par Somnologica sur des périodes consécutives de 1.28 s se recouvrant à 50 %. Afin de mettre en relation l'analyse spectrale avec les états d'activité cérébrale, nous avons étudié la somme des spectres des périodes appartenant à des fenêtres de 5 s soit 6 périodes complètes et une 7<sup>ème</sup> période complétée par la méthode du "0 padding" pour chaque fenêtre de 5 s.

Pour chaque fenêtre de 5 s, il a donc été possible de mettre en relation avec l'état d'activité constaté, un spectre de puissance en fonction de la fréquence allant de 0 à 100 Hz et de pas 0,78 Hz. Seules ont été considérées les fenêtres ne présentant pas d'artefact et ne contenant qu'un seul état de sommeil ou d'éveil.

## **5. ETUDE ANATOMIQUE**

### **5.1. Préparation des coupes**

Afin de mettre en évidence les activités cholinergique et NOergique dans les structures qui nous intéressent (nRT, PPT et LDT) il a été procédé au marquage immunohistologique de la NOS neuronale (nNOS) ainsi que celui de la protéine de transport vésiculaire de l'ACh. Ces marquages ont été réalisés chez les rats GAERS (n=3) et chez les rats de la souche témoin (n=2).

Après anesthésie au pentobarbital monosodique (6 % ; 1,5 mL/kg, i.p.), les animaux subissaient une perfusion intracardiaque avec, successivement, 150 mL d'une solution de Ringer hépariné (0,5 mL/L), puis 400 mL d'une solution de tampon phosphate (pH=7,4) de paraformaldehyde à 4% contenant 0.1% de glutaraldehyde.

Après ouverture de la boîte crânienne, les cerveaux étaient prélevés puis postfixés dans une solution de paraformaldehyde à 4% pendant une nuit. Les cerveaux étaient ensuite placés pendant 72 h dans une solution de tampon phosphate contenant 20% de sucrose appelée solution de cryoprotection.

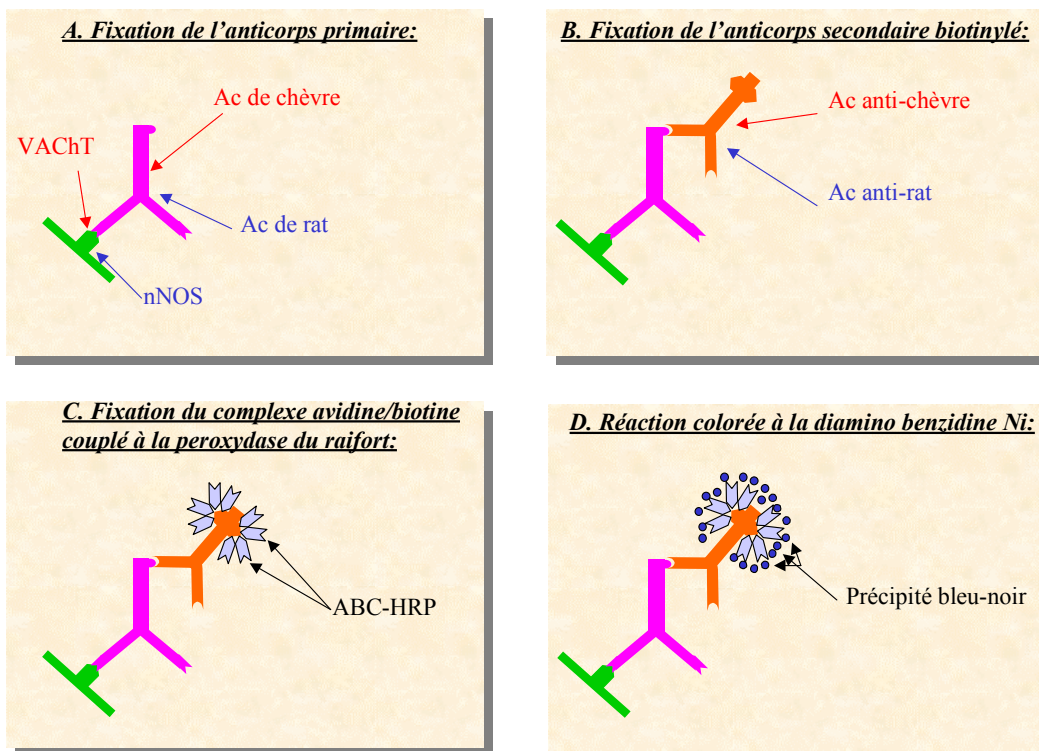
Les cerveaux étaient congelés par immersion dans de l'isopentane refroidi entre -50 °C et -40 °C avec de l'azote liquide. A l'aide d'un cryostat (MICROM, mod. HM 500 OM) des coupes frontales de 20 µm d'épaisseur sont déposées dans un bain de tampon phosphate salin additionné d'azide à 0,05%.

### **5.2. Immunohistologie de la nNOS**

Pour le marquage de la nNOS un anticorps monoclonal primaire, a été développé au laboratoire chez le rat (Léger et al., 1998). Il était appliqué sur les coupes flottantes à la dilution de 1/10 000 pendant 3 jours. L'anticorps secondaire (anti-rat) biotinylé était ensuite appliqué à la concentration de 1/2000 pendant une nuit afin d'assurer leur bonne fixation aux anticorps primaires. Dans une troisième étape et afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, un complexe biotine/avidine (ABC) (Vector, Etats-Unis) ainsi qu'une solution de peroxydase du raifort (HRP) étaient couplés à la biotine fixée à l'anticorps secondaire. Enfin, la révélation était réalisée par la mise en évidence de l'activité enzymatique de la HRP qui était déclenchée en présence de 3,3'-diaminobenzidine (DAB). Cette activité, renforcée par le sulfate d'ammonium nickel, provoquait une coloration bleu-violet des zones marquées où s'est fixé l'anticorps primaire.

### 5.3. Immunohistologie du transporteur vésiculaire de l'ACh

Afin de mettre en évidence les corps cellulaires des neurones cholinergiques mais aussi les fibres cholinergiques, il avait été décidé d'utiliser, non pas un anticorps spécifique de la CAT mais un anticorps spécifique du transporteur vésiculaire de l'ACh. L'anticorps primaire utilisé était donc le VACHT (Promega, EU) à la dilution de 1/2 000 et l'anticorps secondaire correspondant était un anticorps anti-chèvre dilué au 1/2 000. Les principes d'amplification (ABC) et de révélation (HRP) étaient identiques.



**Figure 26 :** Protocole de marquage immunologique à deux anticorps révélés biochimiquement.

Les coupes étaient ensuite montées entre lame et lamelle de verre à l'aide de DePeX, puis photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique couplé à un microscope optique.

## 6. ETUDE STATISTIQUE

Les données individuelles enregistrées pour chaque rat sont rapportées aux données du nycthemère précédent, moyennées puis exprimées en pourcentage de la valeur moyenne du témoin NaCl. Les données sont ensuite présentées de manière brute (quantités horaires) et cumulées bien que le protocole statistique ne concerne, afin d'éviter le phénomène de multiplicité des tests, que les valeurs brutes. Les barres d'erreurs des figures représentent l'écart standard à la moyenne.

Les données sont comparées par analyse normalisée de la variance à 2 voies. Dans les figures, un point marqué d'une étoile sera significativement différente du témoin avec une valeur de p inférieure à 0,05, de deux étoiles pour une valeur de p inférieure à 0,01 et de trois étoiles pour une valeur de p inférieure à 0,001.

## **RESULTATS**

Sont présentés ici les premiers résultats de notre étude sur les implications du NO et de l'ACh dans la régulation entre le sommeil et l'EA. Ces résultats concernent :

1/ La détermination anatomique des afférences NO-ergique et cholinergiques au niveau du nRT.

2/ La détermination des potentialités facilitatrices ou protectrices de ces deux messagers neuronaux vis-à-vis de la survenue des DPO.

## **1. ANATOMIE**

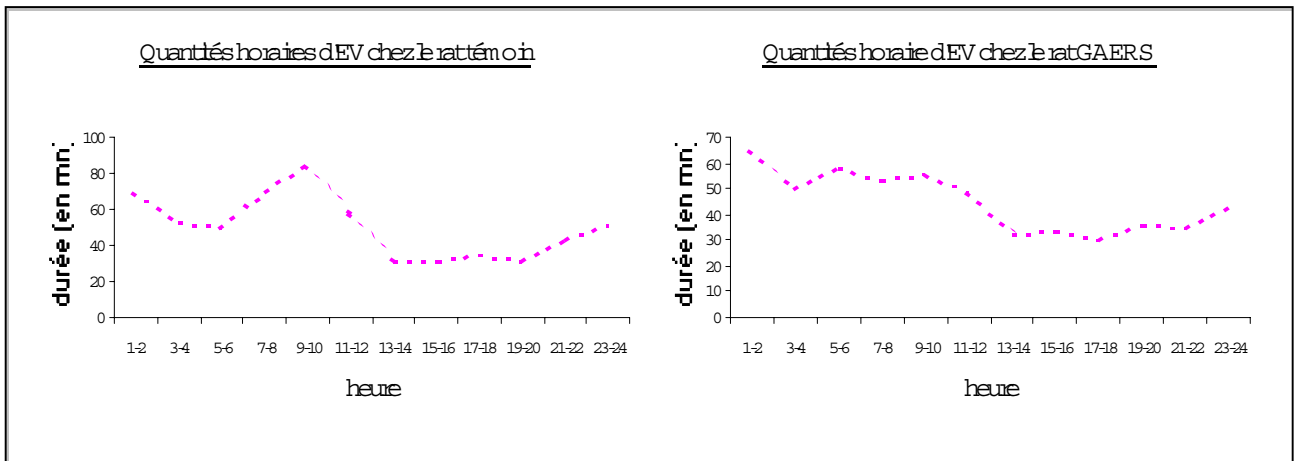
Chez les animaux témoins, le LDT et le PPT comportent de nombreux neurones marqués par le VAcHT spécifique du transporteur vésiculaire de l'ACh (photos 1 et 3) mais aussi par l'anticorps spécifique de la NOS neuronale (photos 5 et 7). Des résultats identiques sont obtenus chez le rat GAERS, tant pour le marquage par le VAcHT (photos 2 et 4) que pour le marquage de la nNOS (photos 6 et 8).

Dans le nRT des animaux témoins, le marquage par le VAcHT ne permet pas l'observation de neurones. Cependant, avec un grossissement adapté, des fibres nerveuses, ayant l'allure d'axones apparaissent de façon évidente. Le marquage de la nNOS chez ces mêmes animaux ne met en évidence ni neurones ni fibres nerveuses alors que le marquage histochimique de l'activité NADPH diaphorase dévoile de nombreuses fibres contenant la NOS (résultats du laboratoire non publiés). Dans cette structure, des résultats strictement identiques sont obtenus chez les rats GAERS et chez les rats témoins.

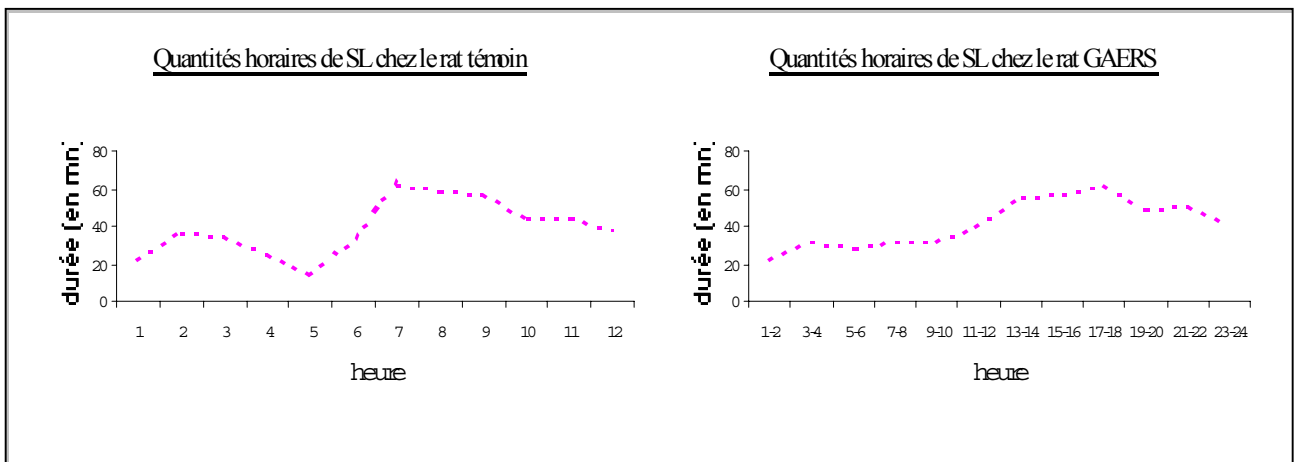
Il existe donc dans le LDT et le PPT des rats GAERS, comme chez les rats témoins, des neurones contenant la nNOS et/ou de l'ACh.

## **2. ETUDE DE LA DISTRIBUTION NYCTHEMERALE DES DPO CHEZ LE RAT GAERS**

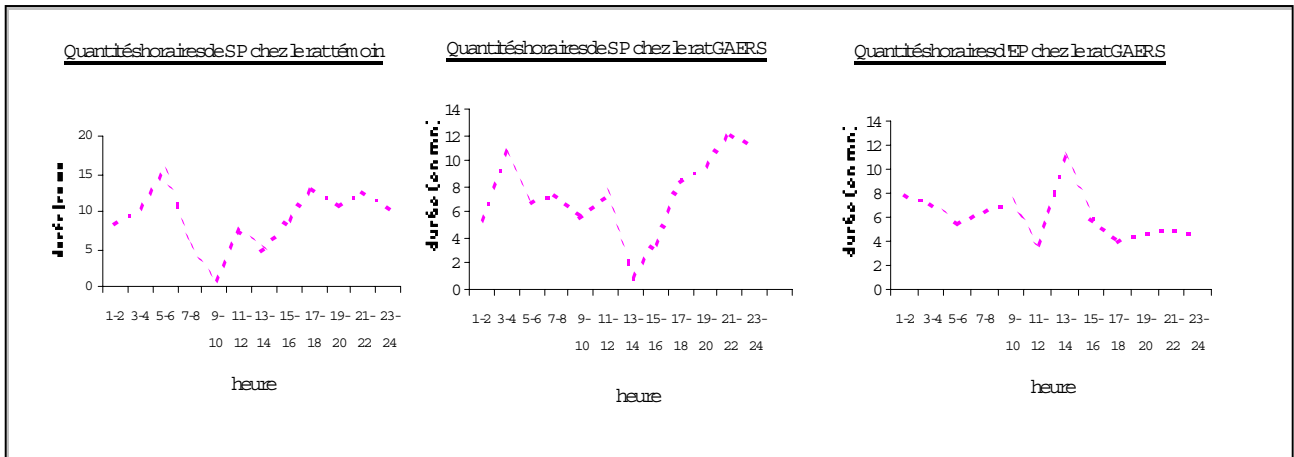
Dans cette figure sont représentées les distributions sur 24 h des 3 états de sommeil et d'éveil chez le rat témoin et le rat GAERS puis la distribution des DPO chez le rat GAERS.



**Figure 27 :** Représentation des durées horaires d'EV



**Figure 28 :** Représentation des durées horaires de SL.



**Figure 29 :** Représentation des durées horaires de SP et d'EP.

Il apparaît que, dans nos conditions expérimentales, la répartition des états de sommeil et d'éveil est conforme aux données classiques chez le rat, à savoir : un rythme d'éveil nocturne (66 % d'EV, 26 % de SL et 8 % de SP) et un sommeil majoritairement diurne (35 % d'EV, 55 % de SL et 10 % de SP).

Chez le rat GAERS, la distribution des états de veille et de sommeil semble affectée de manière uniforme par la survenue des DPO : pendant l'obscurité 55 % d'EV, 31 % de SL, 8 % de SP et 6 % d'EP et pendant l'éclairement 33,3 % d'EV, 53,3 % de SL, 7,1 % de SP et 6,3 % d'EP. Il est intéressant de remarquer que la transition obscurité/lumière est marquée chez tous les rats GAERS, par une recrudescence temporaire de DPO et que la répartition différentielle entre les périodes d'obscurité et de lumière est moins marquée.

### 3. ETUDE DE L'ACTION DE L'ACH DANS LE NRT

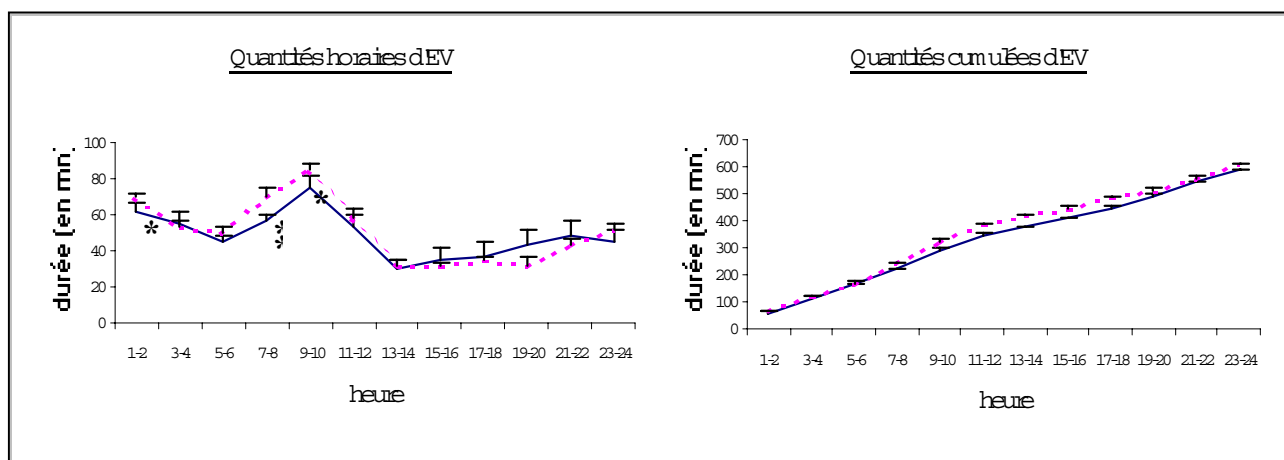
Toute étude de la transmission cholinergique doit tenir compte du fait que l'ACH peut agir *via* des récepteurs muscariniques et nicotiniques et que les conséquences d'une fixation à l'un ou l'autre de ces récepteurs engendre des effets fondamentalement différents et qui peuvent coexister dans une même structure cérébrale. Nous avons donc dû distinguer ces deux composantes de la transmission cholinergique en étudiant séparément les effets d'un blocage pharmacologique de chacun de ces types de récepteurs dans le nRT.

#### 3.1. Etude de la composante nicotinique

Afin de déterminer le rôle de la fixation physiologique de l'ACH sur les récepteurs nicotiniques du nRT et sa potentialité facilitatrice ou protectrice vis-à-vis des DPO, il a été décidé d'empêcher la fixation de l'ACH endogène par l'administration locale d'un antagoniste spécifique des récepteurs nicotiniques : l'Hexamethonium (HEX).

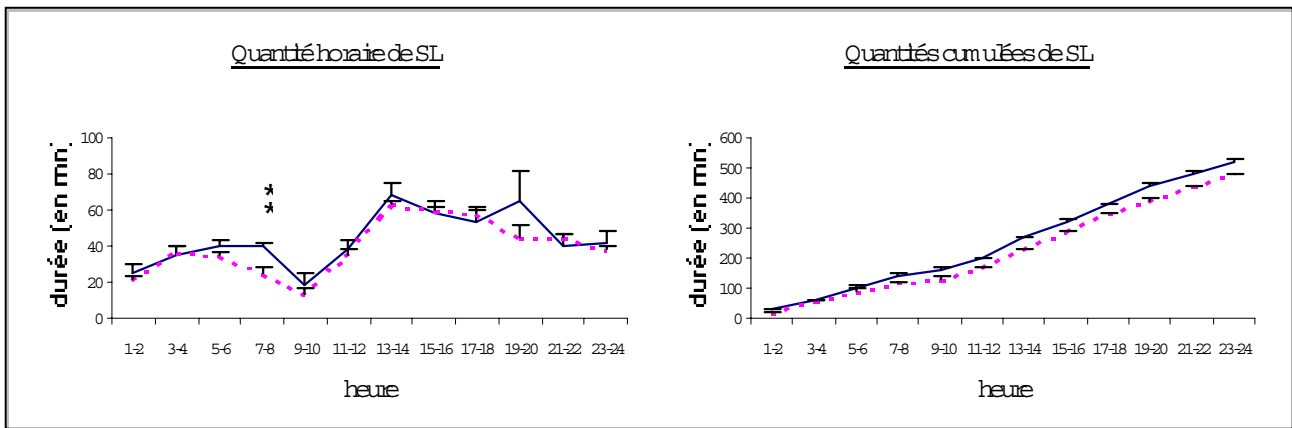
##### 3.1.1. Chez le rat témoin

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 200 mM d'HEX dans un volume de 0,1 µL) sur les états de vigilance d'un rat sain.



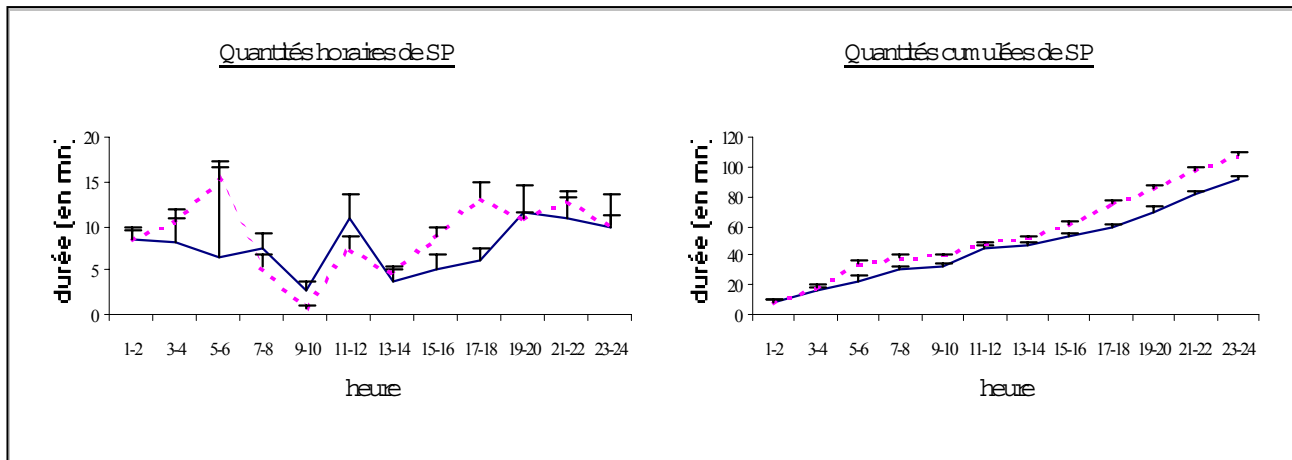
**Figure 30 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).



**Figure 31 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).



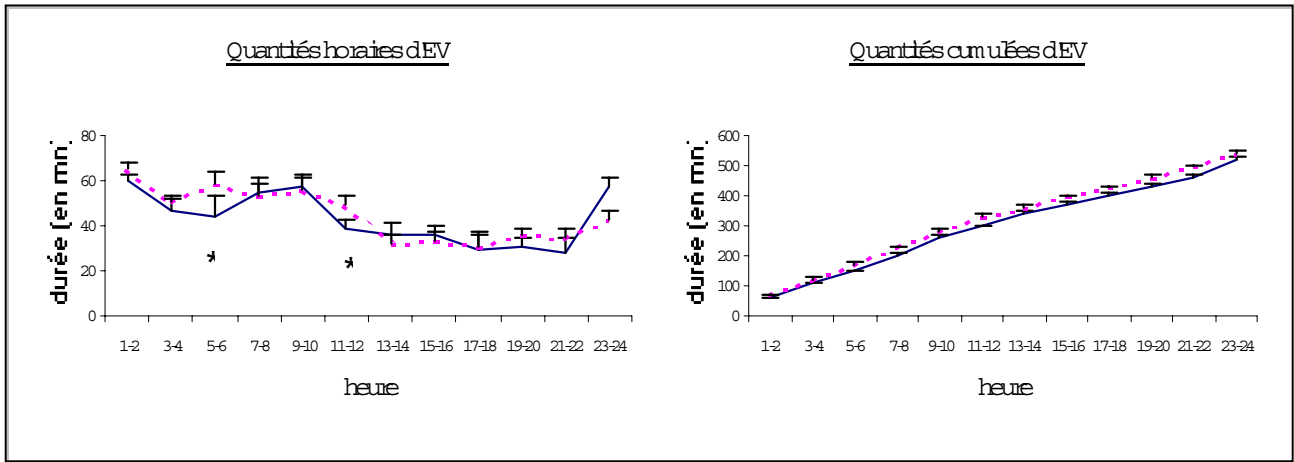
**Figure 32 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).

(1) Il apparaît que l'injection d'HEX ne provoque pas de modification remarquable du cycle veille sommeil chez le rat témoin. La fixation de l'ACh endogène sur les récepteurs nicotiques du nRT n'est donc pas un facteur déterminant de régulation des états de veille et de sommeil chez le rat témoin.

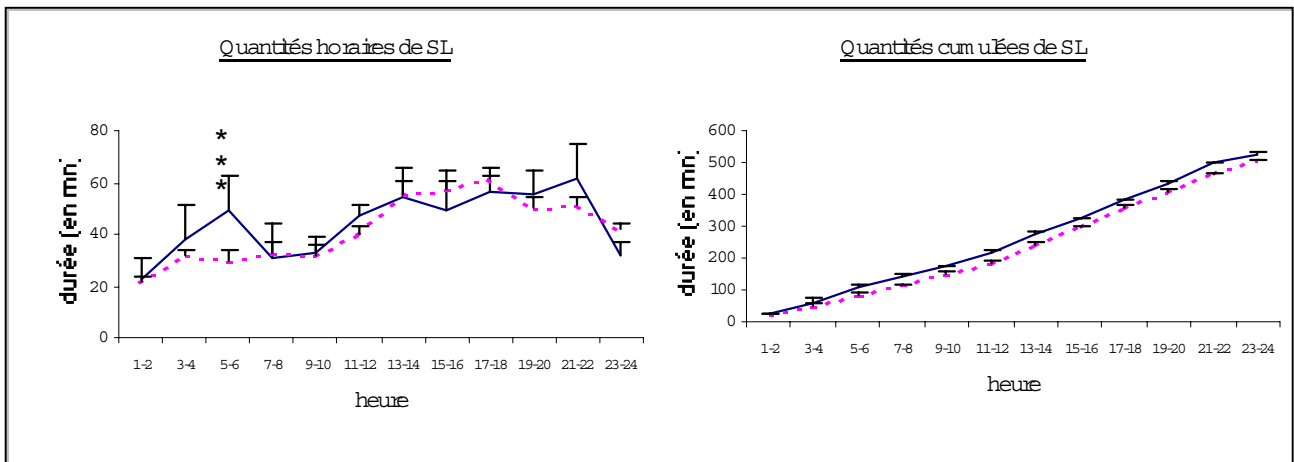
### 3.1.2. Chez le rat GAERS

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 200 mM d'HEX dans un volume de 0,1µL) sur les états de veille et de sommeil et la survenue de DPO chez un rat GAERS.



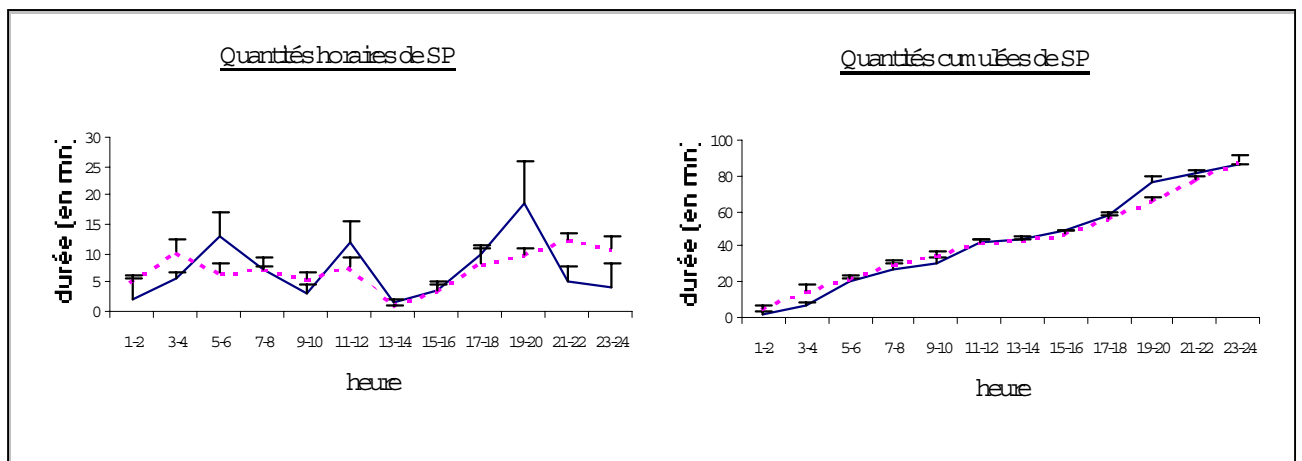
**Figure 33 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).



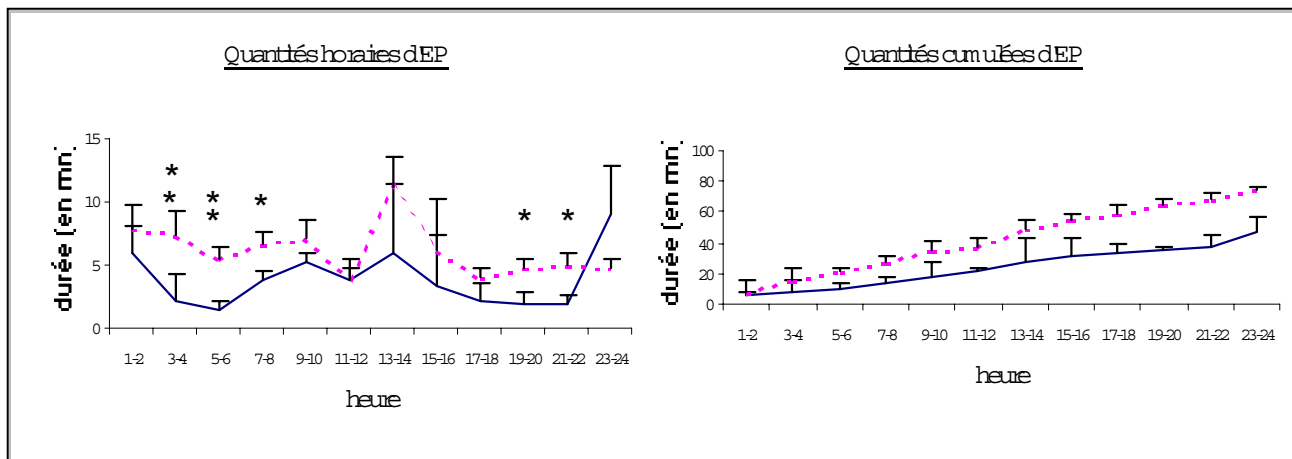
**Figure 34 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).



**Figure 35 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).



**Figure 36 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EP chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou d'HEX (trait plein).

(1) Comme chez le rat témoin, l'HEX ne semble pas affecter significativement la distribution des 3 états étudiés (EV, SL et SP).

(2) L'injection d'HEX provoque une diminution remarquable de la survenue de DPO de l'ordre de 50 % et d'une durée proche de 24 h. Toutefois il faut remarquer que le pic de survenue de DPO observé lors de la transition obscurité-lumière n'est pas affecté par l'HEX. La fixation de l'ACh endogène sur les récepteurs nicotiques du nRT est donc un facteur important en faveur de la survenue des DPO chez le rat GAERS puisque son blocage provoque une diminution importante du nombre des DPO.

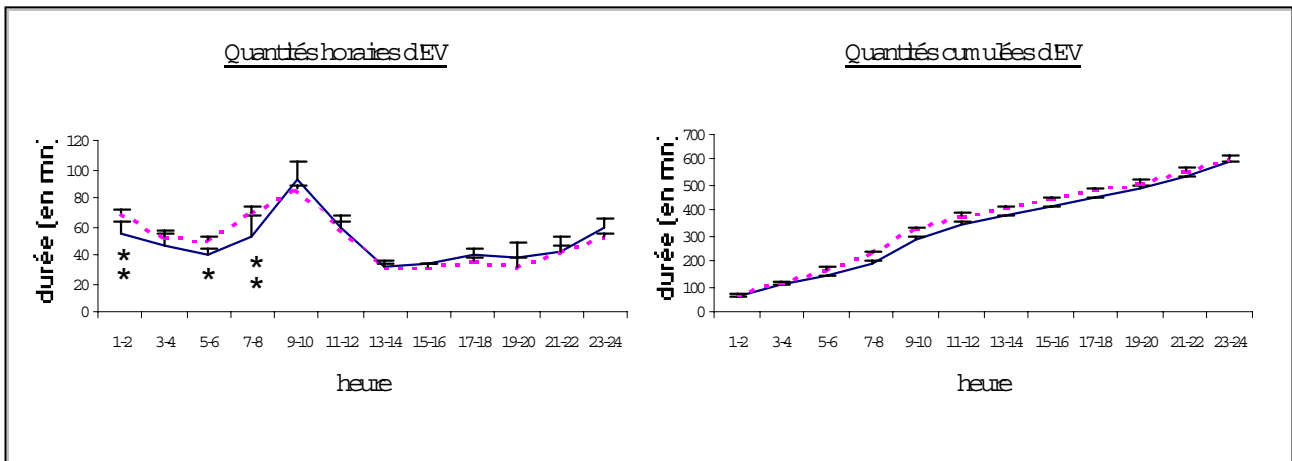
Les données obtenues indiquent donc que chez le rat sain comme chez le rat GAERS, la fixation d'ACh endogène sur les récepteurs nicotiques n'est pas un élément décisif pour la régulation du cycle veille sommeil. Cependant, elle peut être responsable du déclenchement des DPO puisque son blocage est protecteur vis-à-vis de leur survenue.

### **3.2. Etude de la composante muscarinique**

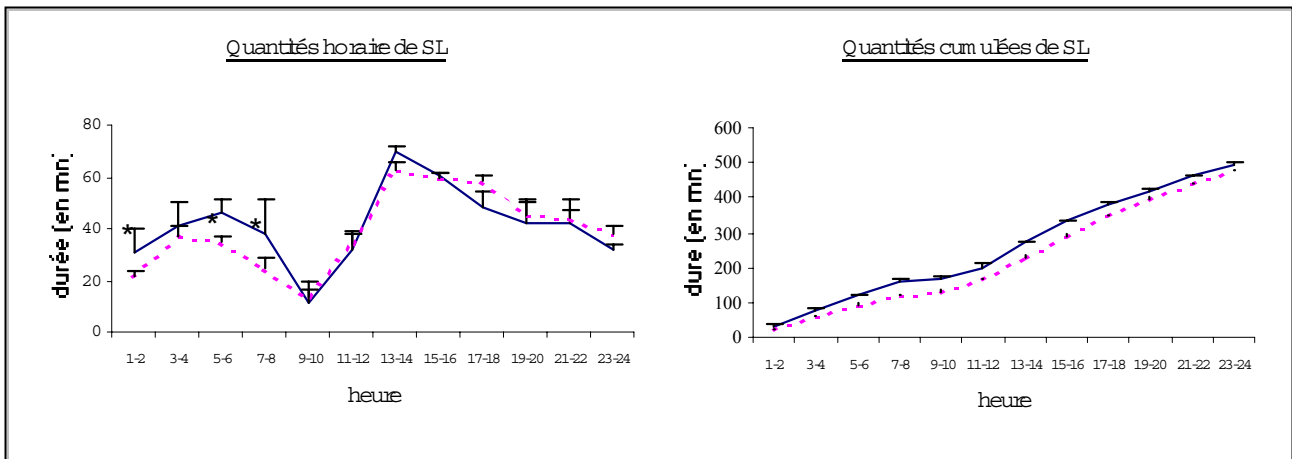
Afin de déterminer le rôle de la fixation physiologique de l'ACh sur les récepteurs muscariniques du nRT et sa potentialité facilitatrice ou protectrice vis-à-vis des DPO, il a été décidé d'empêcher la fixation de l'ACh endogène par l'administration locale d'un antagoniste spécifique des récepteurs muscariniques : la scopolamine (SCO).

#### **3.2.1. Chez le rat témoin**

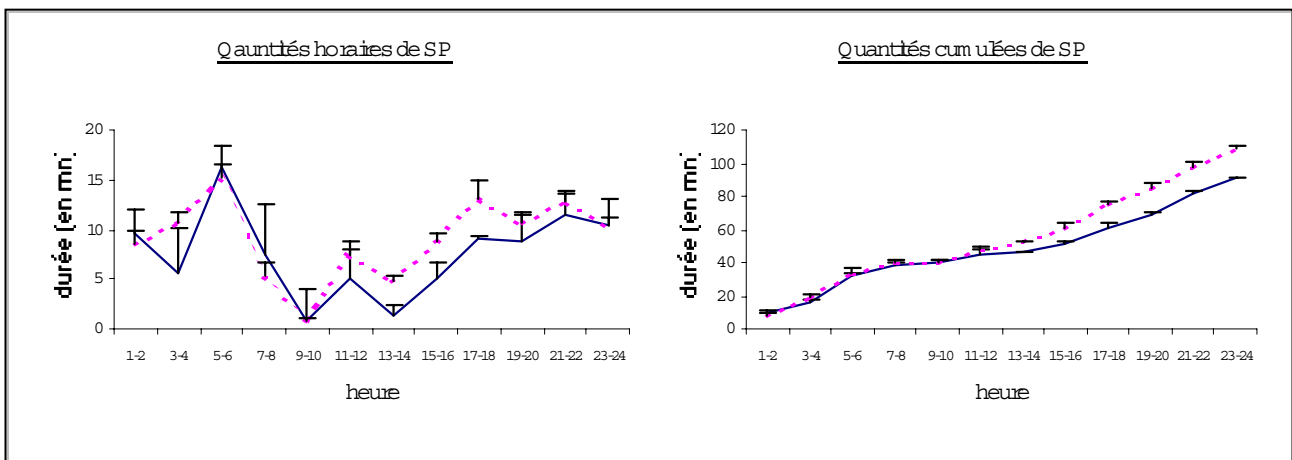
Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 0,1 µg de SCO dans un volume de 0,1 µL) sur les états de veille et de sommeil d'un rat témoin.



**Figure 37 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).



**Figure 38 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).

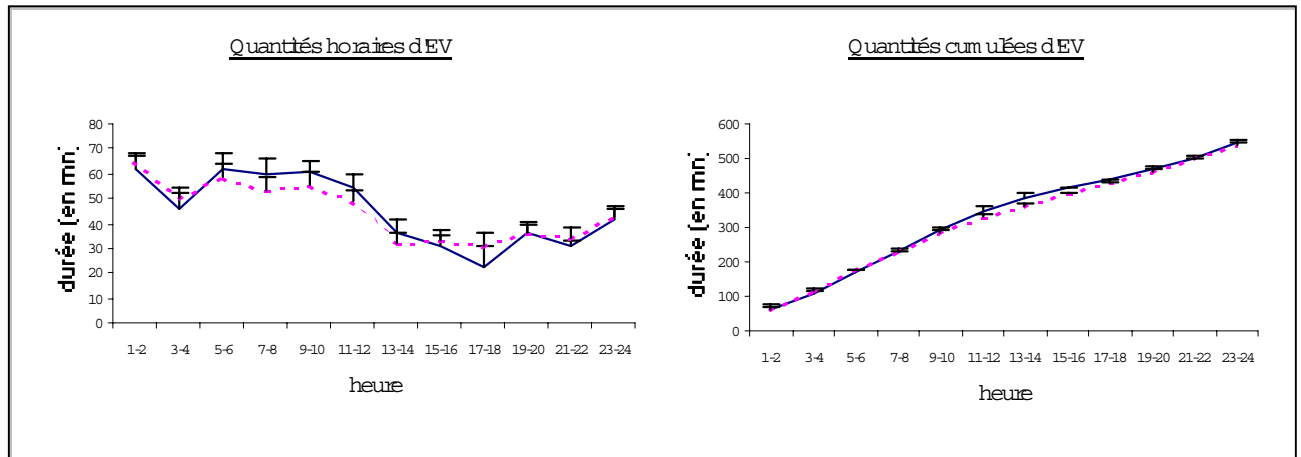


**Figure 39 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).

(1) Il apparaît que l'injection de SCO provoque, pendant les 12 h suivant l'injection, une augmentation sensible du SL ainsi qu'une diminution équivalente de l'EV. Les 12 dernières heures sont marquées par une inversion de cette tendance qui pourrait être considérée comme un phénomène de régulation homéostatique du SL ou du SP qui semble lui augmenté sur cette période, bien que les valeurs ne soient pas significatives. La fixation de l'ACh endogène sur les récepteurs muscariniques du nRT peut donc être un facteur éveillant puisque son blocage favorise l'endormissement.

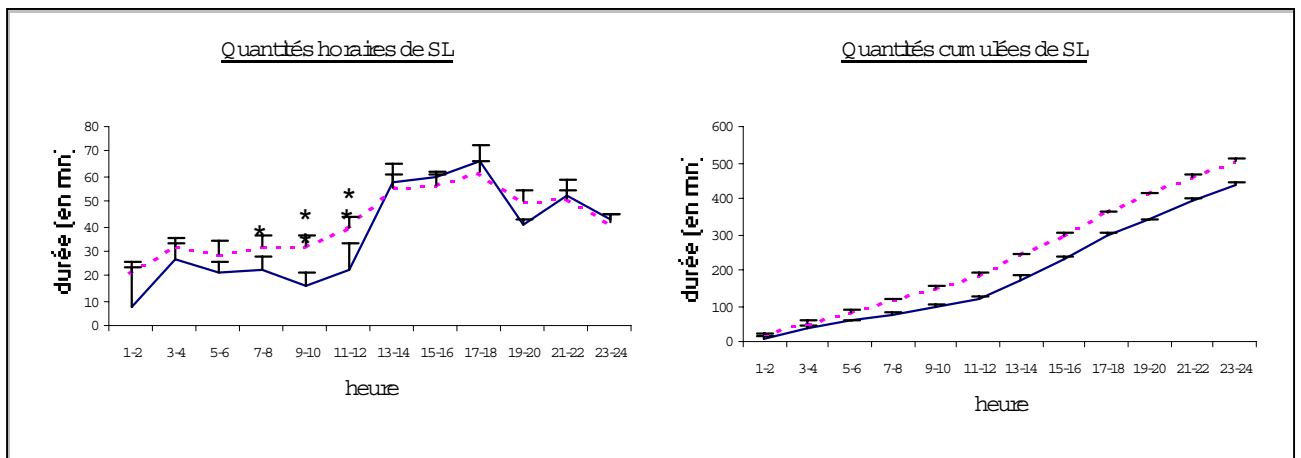
### 3.2.2. Chez le rat GAERS

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 0,1 µg de SCO dans un volume de 0,1µL) sur les états de veille et de sommeil et la survenue des DPO chez un rat GAERS.



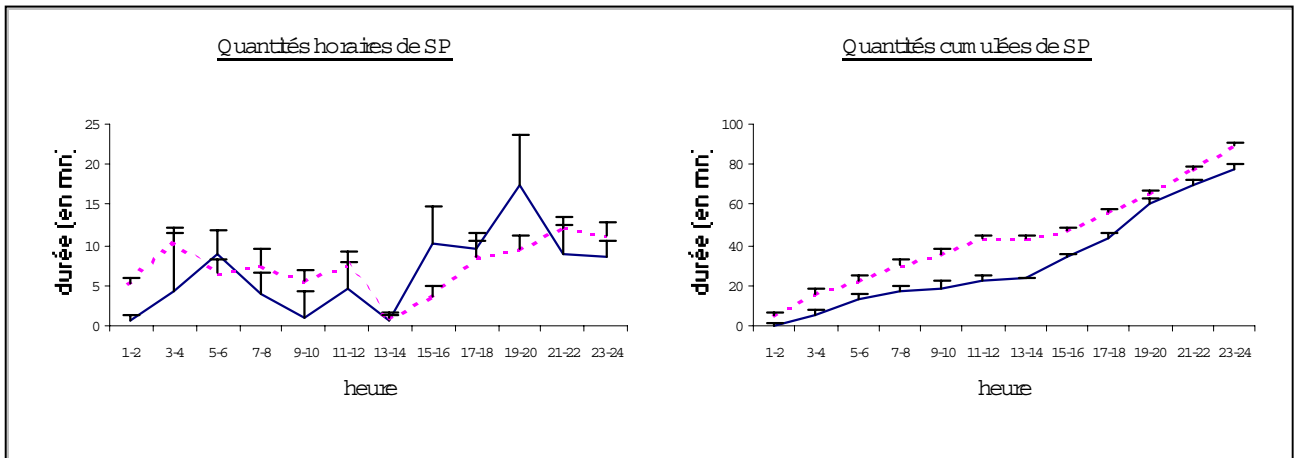
**Figure 40 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).



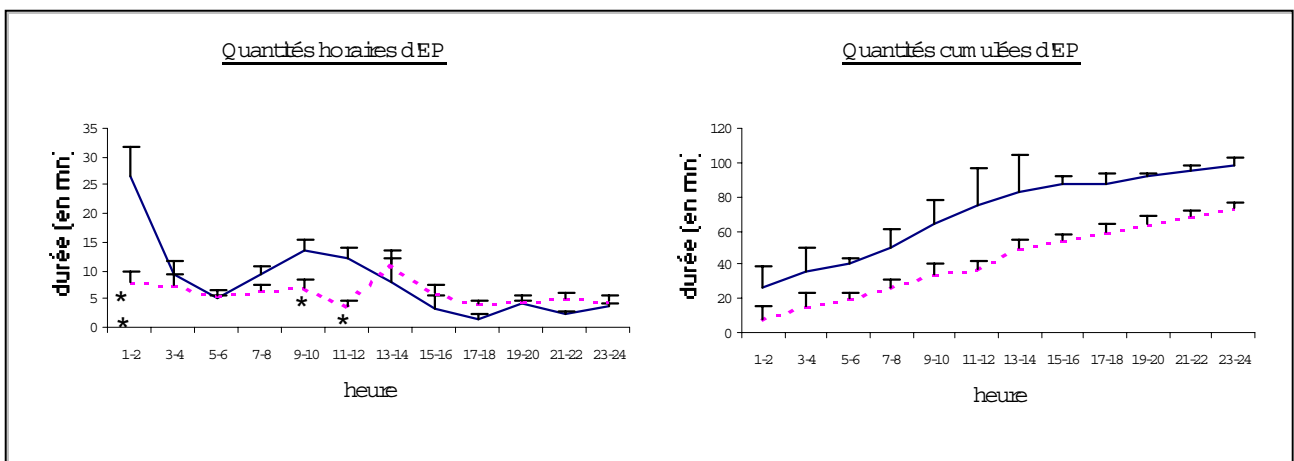
**Figure 41 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).



**Figure 42 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).



**Figure 43 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EP chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de SCO (trait plein).

(1) L'injection de SCO provoque une augmentation remarquable de la survenue de DPO (+ 50 %) pendant les 12 heures suivant l'injection. Les 12 heures suivantes sont caractérisées par une diminution notable des DPO. La fixation de l'ACh endogène sur les récepteurs muscariniques du nRT peut donc avoir un rôle protecteur contre les DPO puisque son blocage les favorise.

(2) Il est également à remarquer que, contrairement à ce qui était observé chez l'animal témoin, la SCO n'a pas d'effet hypnogène mais provoque au contraire une diminution du SL et du SP pendant 12 heures.

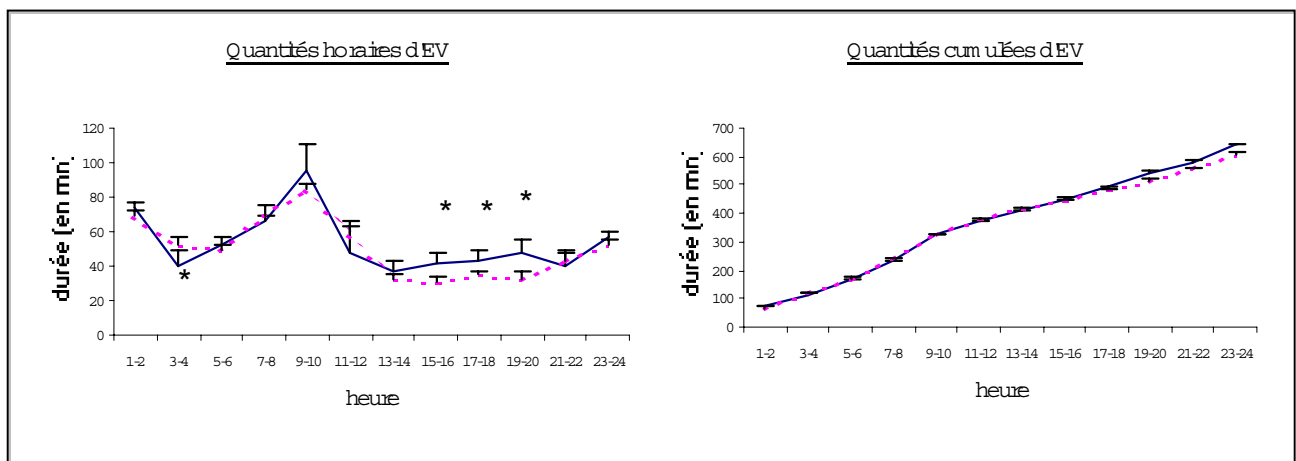
Chez l'animal témoin, la fixation d'ACh endogène sur les récepteurs muscariniques favorise l'éveil. Cet effet n'est plus observable chez le rat GAERS, où le blocage des récepteurs muscariniques provoque une recrudescence de DPO et une diminution significative de SL. Le blocage des récepteurs muscariniques par la SCO favorise donc le SL chez les rats sains et les DPO chez les rats GAERS.

### 3.3. Stimulation cholinergique mixte

Afin de mimer les conséquences d'une libération massive d'ACh dans le nRT (telle qu'il est possible de l'observer pendant l'EV ou le SP) nous avons procédé à une stimulation non spécifique des récepteurs muscariniques et nicotiniqes par micro-injection de 1 µg de carbachol (CAR).

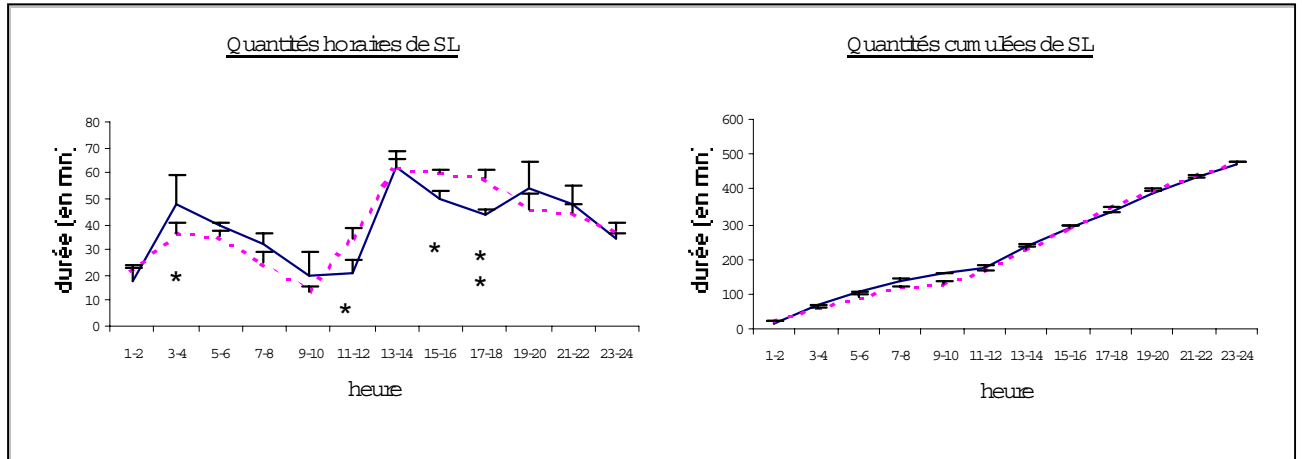
#### 3.3.1. Chez le rat témoin

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 1 µg de CAR dans un volume de 0,1 µL) sur les états de veille et de sommeil d'un rat témoin.

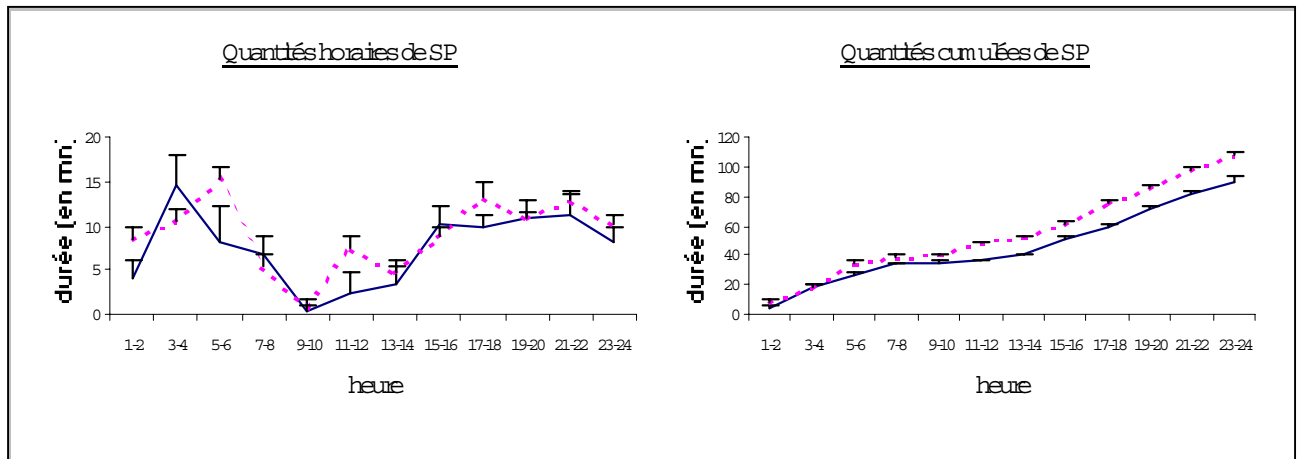


**Figure 44 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).



**Figure 45 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).

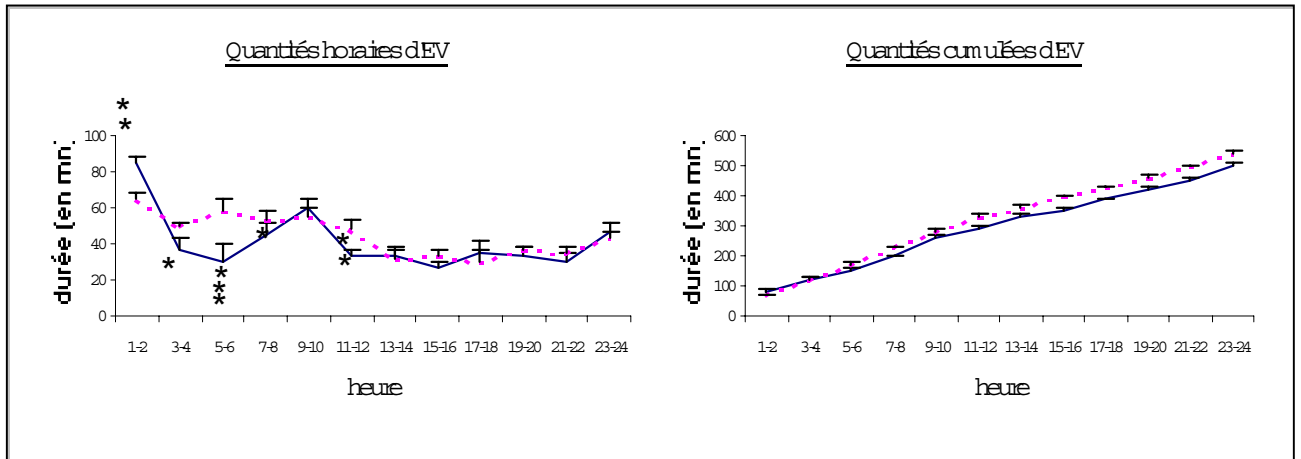


**Figure 46 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).

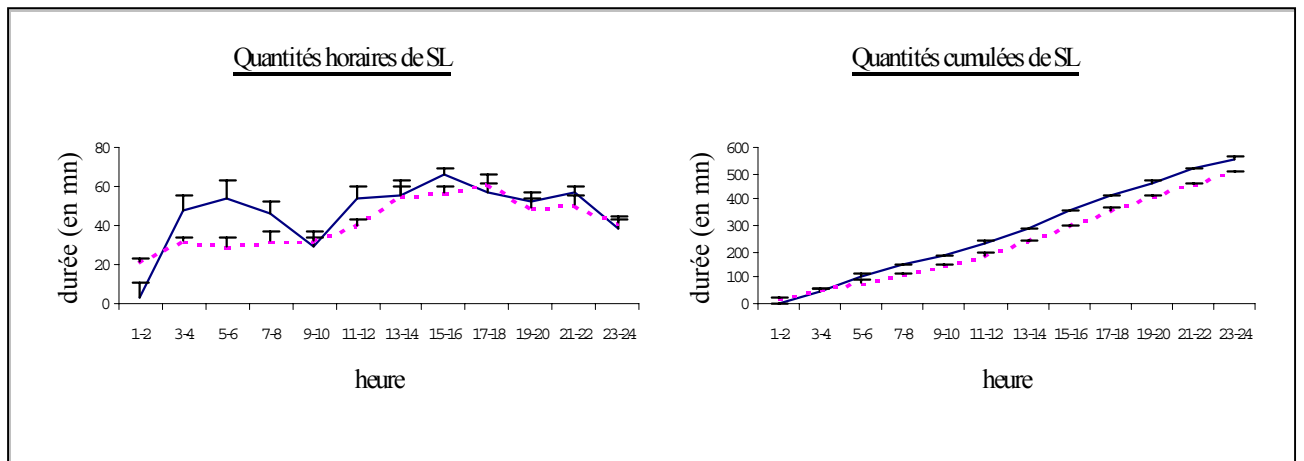
L'injection de CAR n'influence pas les quantités horaires de l'EV, du SL et du SP. La stimulation pharmacologique simultanée des récepteurs nicotiques et muscariniques du nRT chez le rat est donc sans effet sur la succession nyctémérale des états de veille et de sommeil chez le rat.

### 3.3.2. Chez le rat GAERS

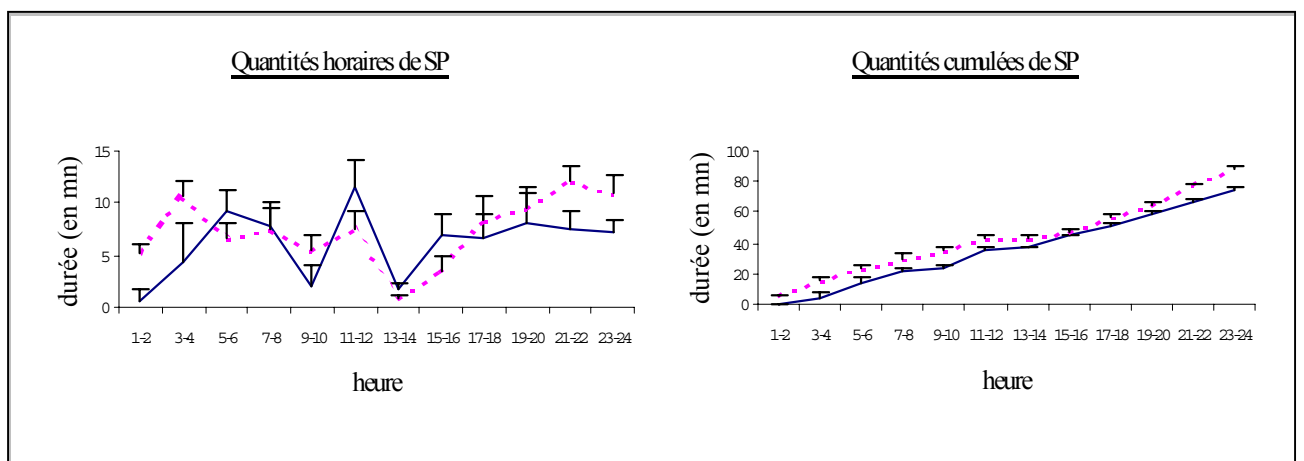
Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 1  $\mu\text{g}$  de CAR dans un volume de 0,1  $\mu\text{L}$ ) sur les états de veille et de sommeil et sur la survenue de DPO chez un rat GAERS.



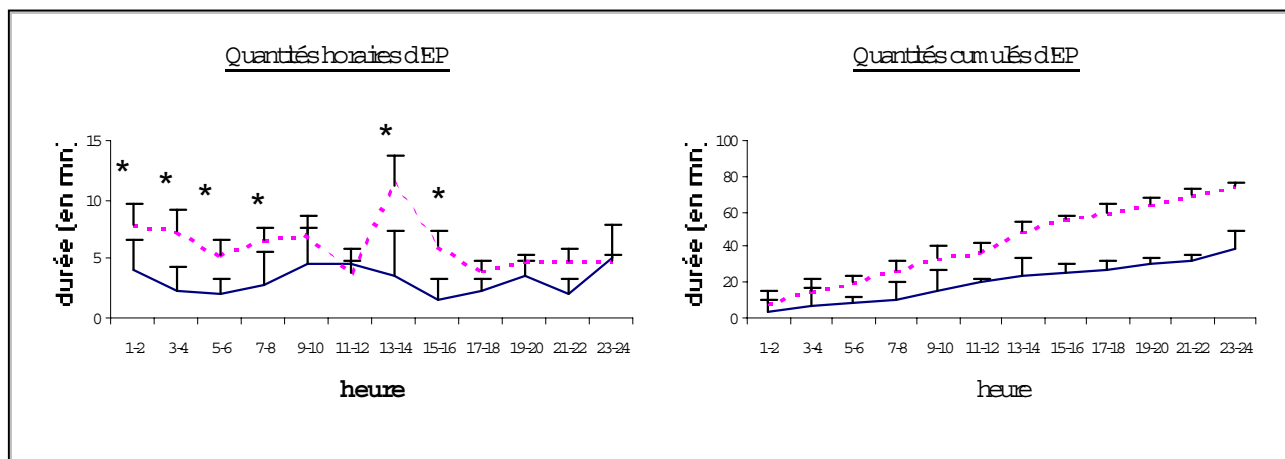
**Figure 47 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).



**Figure 48 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).



**Figure 49 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).



**Figure 50 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EP chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de CAR (trait plein).

(1) Chez l'animal épileptique, la micro-injection de CAR dans le nRT est suivie, d'une longue période d'hypersomnie en SL (+ 66 % pendant 8 h) qui survient au détriment de l'EV (- 40 %), du SP (-25 %) et de l'EP (- 50 %).

(2) La baisse de survenue des DPO demeure observable sur la quasi-totalité du nyctémère qui suit l'injection.

Il apparaît donc que les micro-injections de CAR dans le nRT provoquent, chez le rat GAERS, une hypersomnie en SL au détriment de l'EV, du SP et surtout des DPO alors qu'elles restent sans effet chez le rat témoin.

L'étude de la transmission cholinergique dans le nRT a donc montré que chez le rat témoin l'ACh pouvait avoir un rôle éveillant, par le biais des récepteurs muscariniques (cf page 68), et que chez le rat GAERS elle pouvait avoir un rôle protecteur contre les DPO (au profit du SL) par le biais des récepteurs muscariniques (cf page 70 et 71) ou un rôle déclencheur par le biais des récepteurs nicotiniques (cf page 67).

Dans le cas d'une stimulation mixte, chez le rat GAERS, c'est l'effet muscarinique qui s'impose (cf page 75).

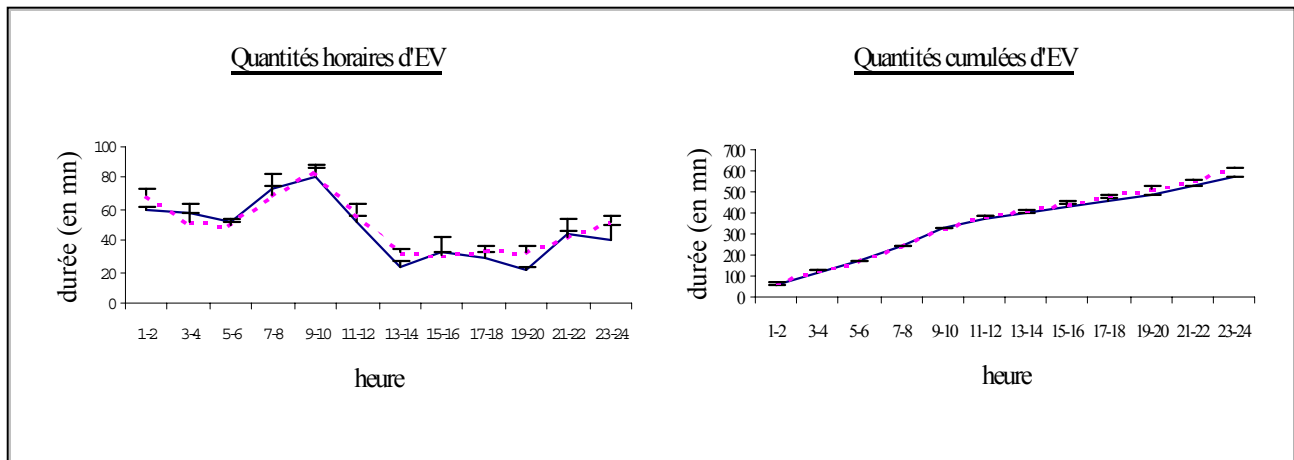
#### **4. ETUDE DES EFFETS DU NO DANS LE nRT**

#### 4.1. Effets d'un apport exogène de NO dans le nRT

Afin de déterminer le rôle facilitateur ou protecteur du NO vis-à-vis des DPO, nous avons procédé à une micro-injection dans le nRT de 0,2 µg de molsidomine (MOL) qui libère spontanément du NO.

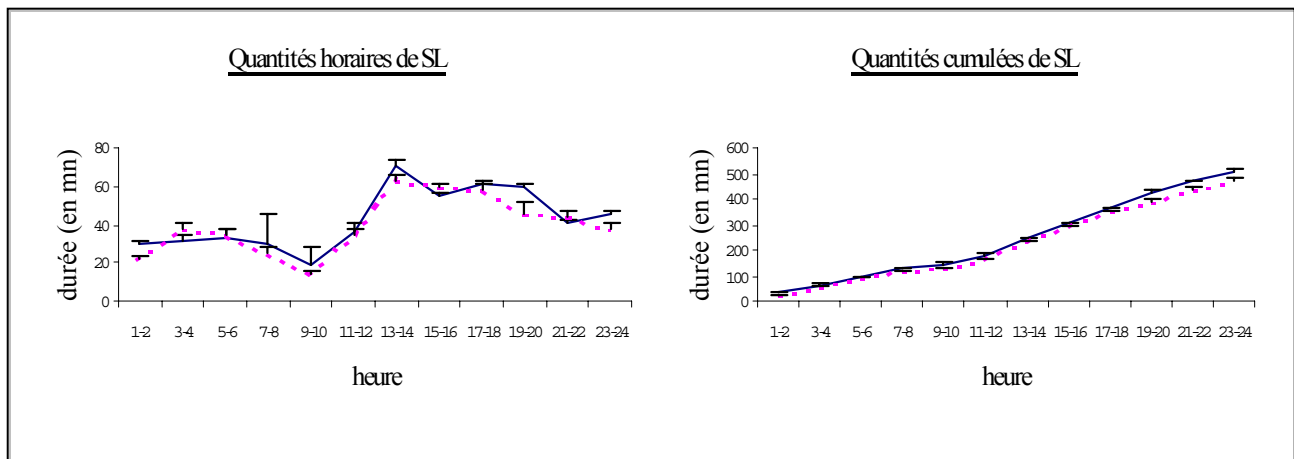
##### 4.1.1. Chez le rat témoin

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 0,2 µg de MOL dans un volume de 0,1 µL) sur les états veille et de sommeil d'un rat témoin.



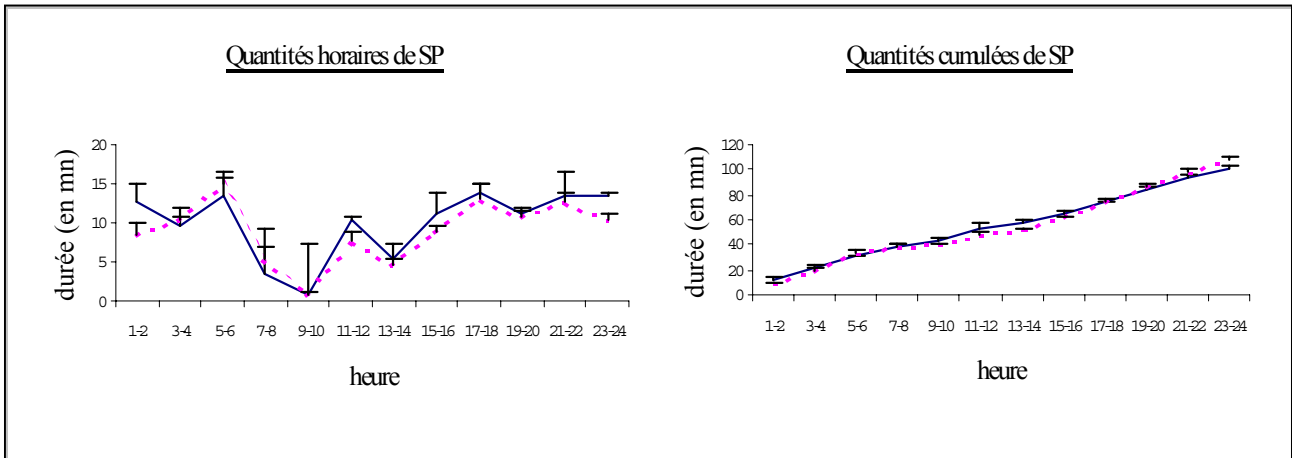
**Figure 51 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).



**Figure 52 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).



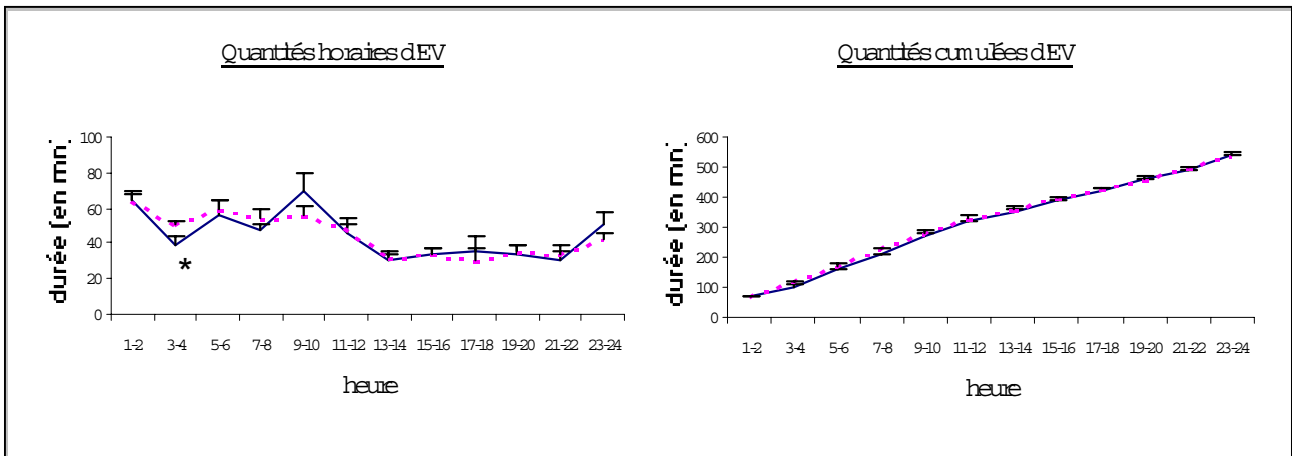
**Figure 53 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).

Il apparaît que l'injection de MOL dans le nRT ne provoque aucune variation dans la survenue des états de veille et de sommeil chez le rat témoin. Un apport exogène de NO ne semble donc pas modifier le rôle que joue le nRT dans le déclenchement du sommeil lent.

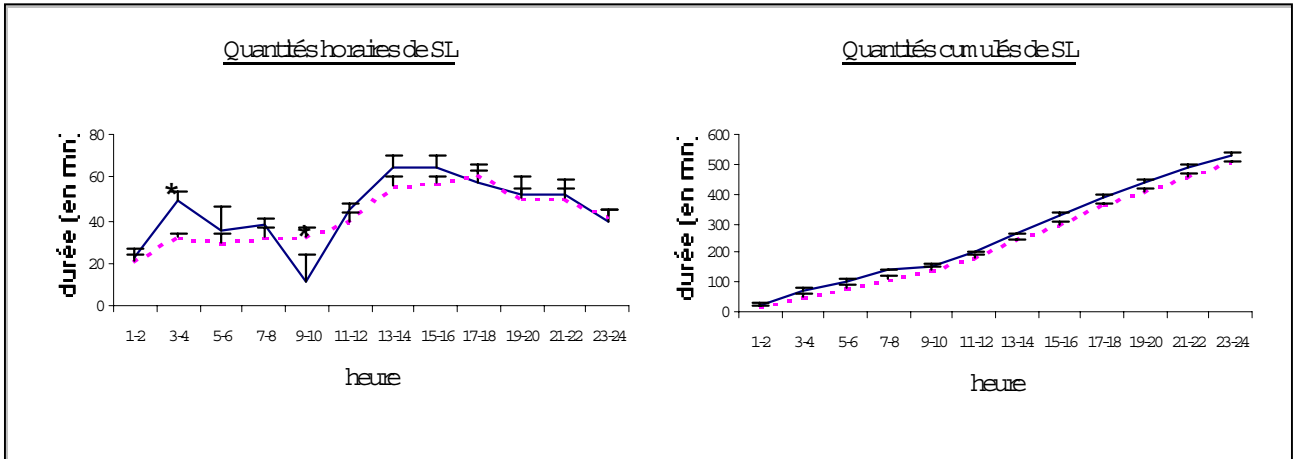
#### 4.1.2. Chez le rat GAERS

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 0,2  $\mu$ g de MOL dans un volume de 0,1 $\mu$ L) sur les états de veille et de sommeil d'un rat GAERS ainsi que sur la survenue de DPO.

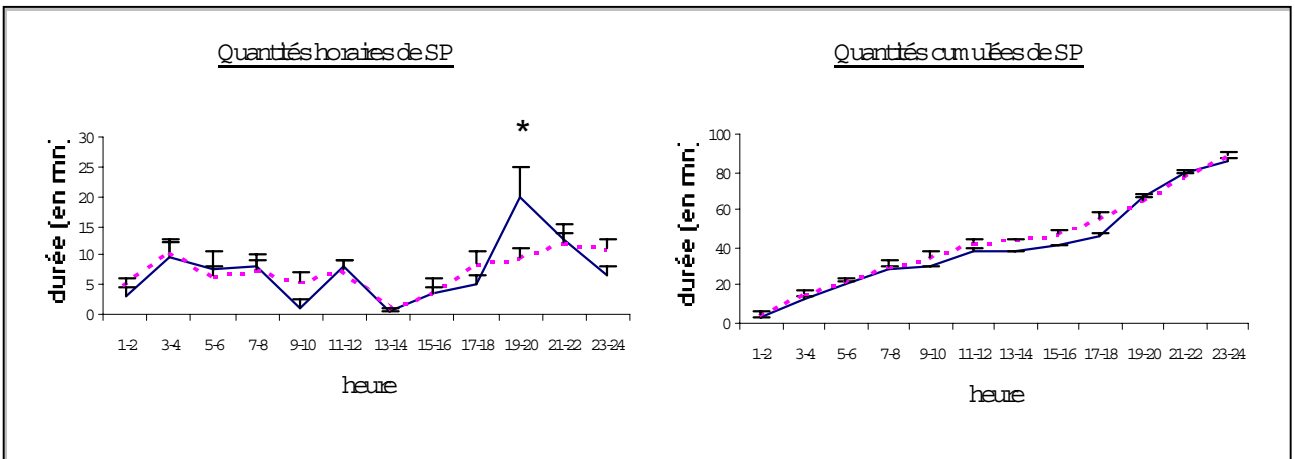


**Figure 54 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats GAERS

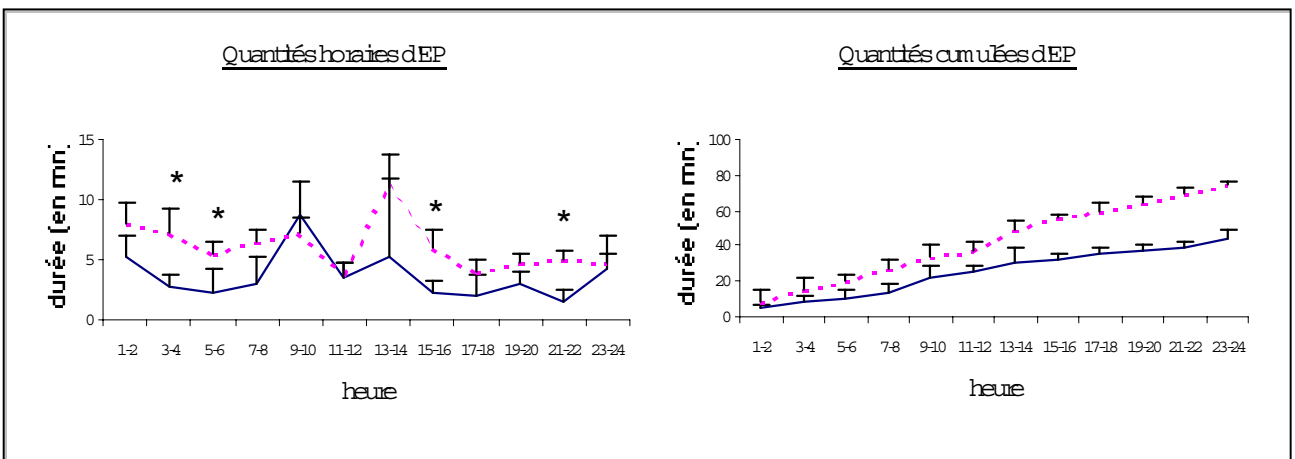
après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).



**Figure 55 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).



**Figure 56 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).



**Figure 57 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EP chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de MOL (trait plein).

Comme chez le rat témoin, il ne semble pas qu'un apport exogène de NO puisse modifier la répartition nycthémerale des états de veille et de sommeil chez le rat GAERS. Toutefois, cette injection n'est pas sans conséquence puisqu'une diminution de plus de 50 % de la survenue des DPO est observée pendant les 6 heures suivant l'injection. Il semble donc que le NO a la possibilité, chez le rat GAERS, d'empêcher la survenue de DPO sans influencer le rapport éveil/sommeil.

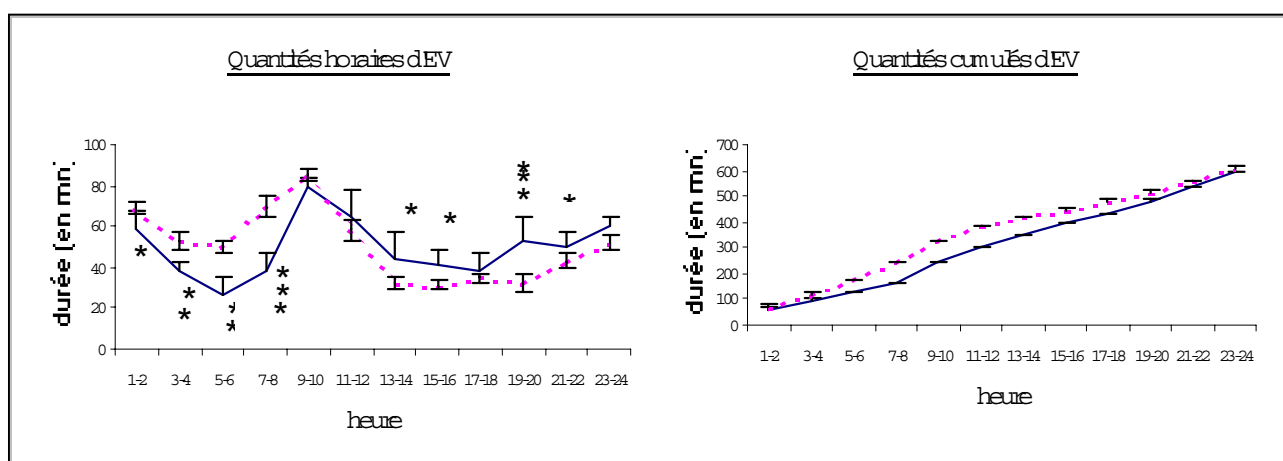
Il peut donc être un facteur intéressant de protection contre les DPO chez le rat GAERS.

#### 4.2. Effets d'un blocage de la nNOS dans le nRT

Afin d'estimer l'importance du rôle protecteur du NO vis-à-vis des DPO chez le rat GAERS, nous avons procédé à une micro-injection dans le nRT de 10 ng de bromo-7-nitro-indazole (BNI) qui inhibe spécifiquement la nNOS.

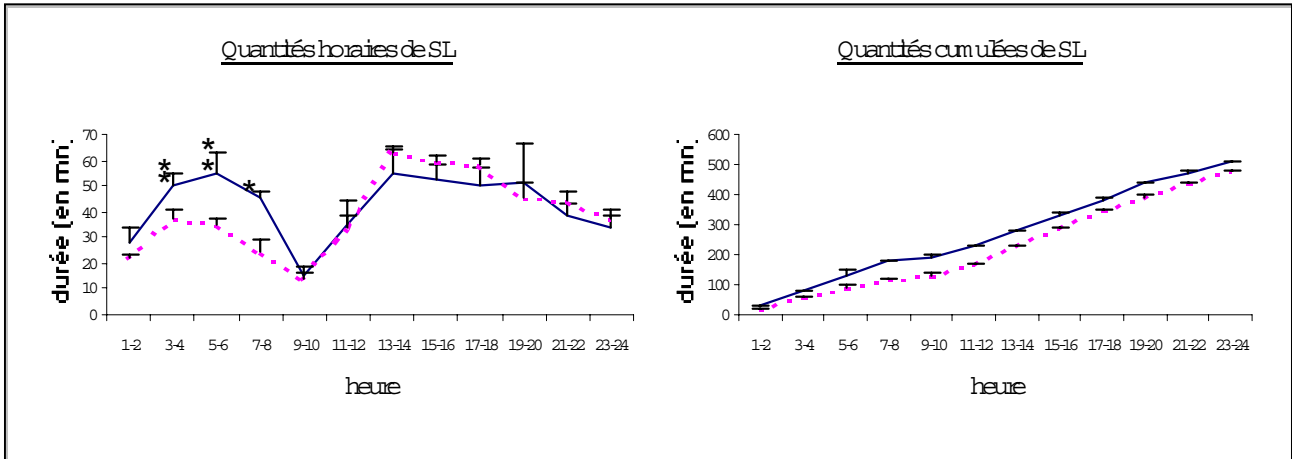
##### 4.2.1. Chez le rat témoin

Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 10 ng de BNI dans un volume de 0,1  $\mu$ L) sur les états de veille et de sommeil d'un rat témoin.

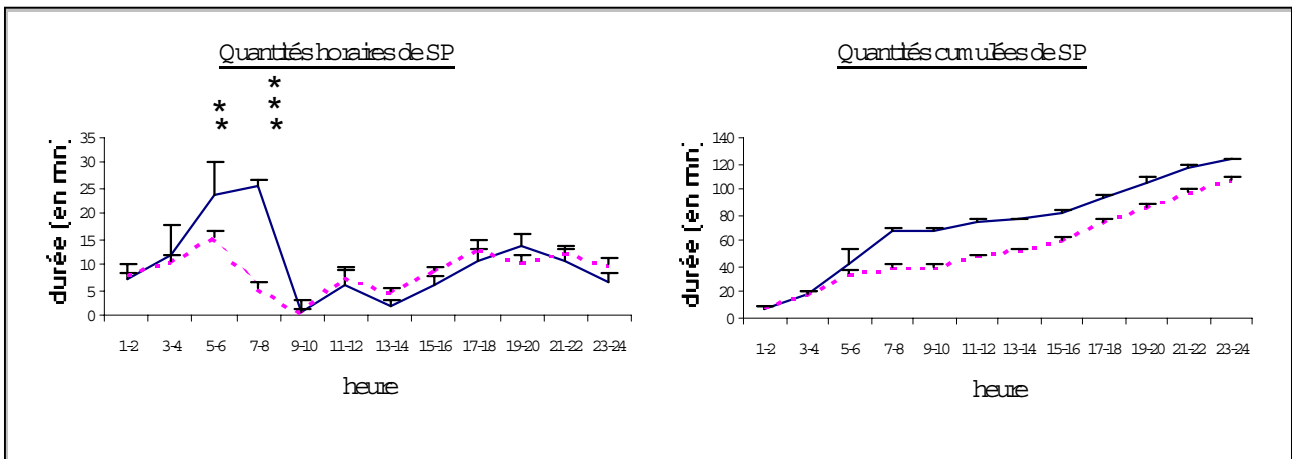


**Figure 58 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats témoins

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).



**Figure 59 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).

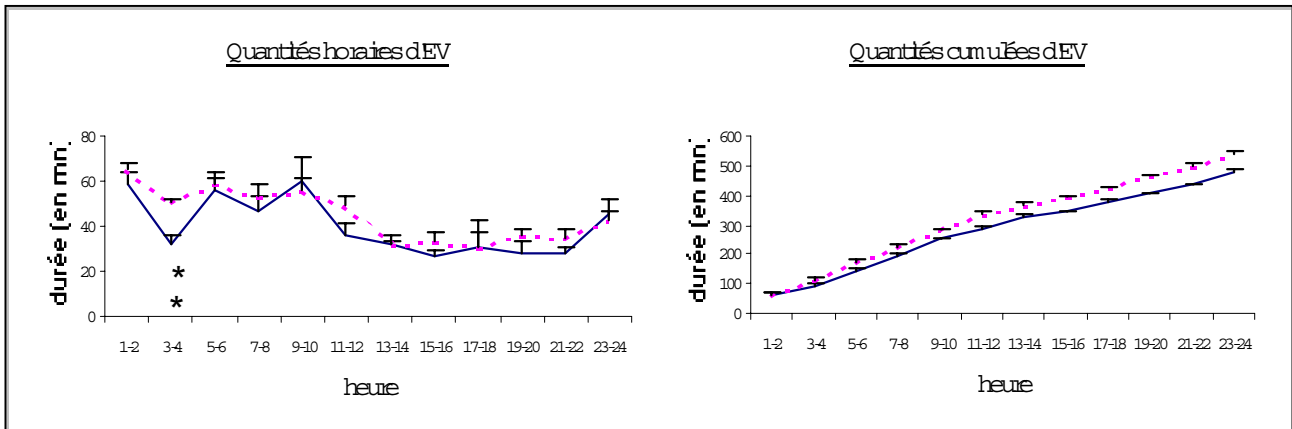


**Figure 60 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats témoins après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).

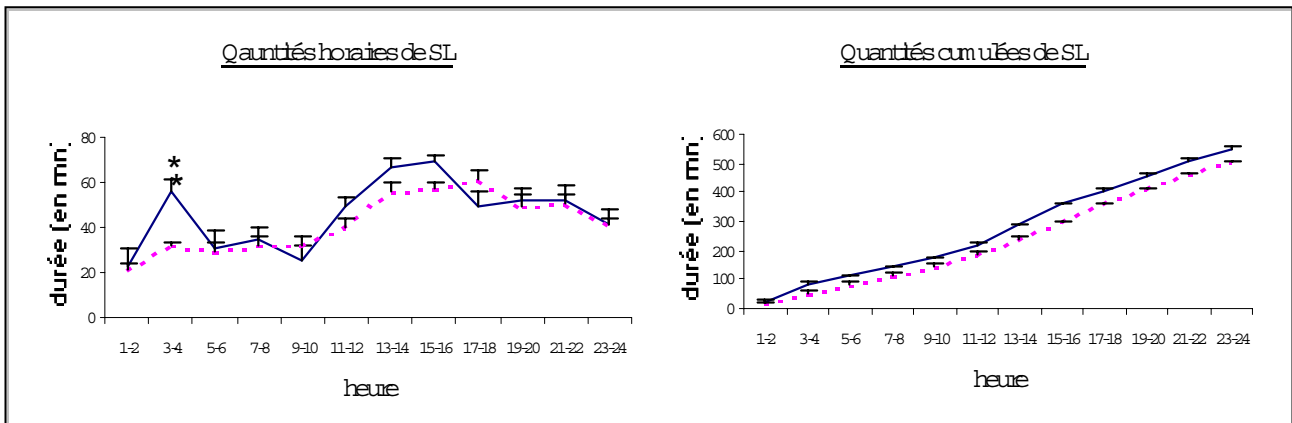
Il apparaît clairement que l'injection de BNI dans le nRT a un fort pouvoir hypnogène (aussi bien pour le SL que pour le SP) pendant les 10 h qui suivent l'injection. Le reste du nyctémère est marqué par une augmentation de l'éveil et une diminution du SL mais pas du SP. Cet effet biphasique pourrait être dû à un phénomène de régulation homéostatique du SL et de l'EV.

#### 4.2.2. Chez le rat GAERS

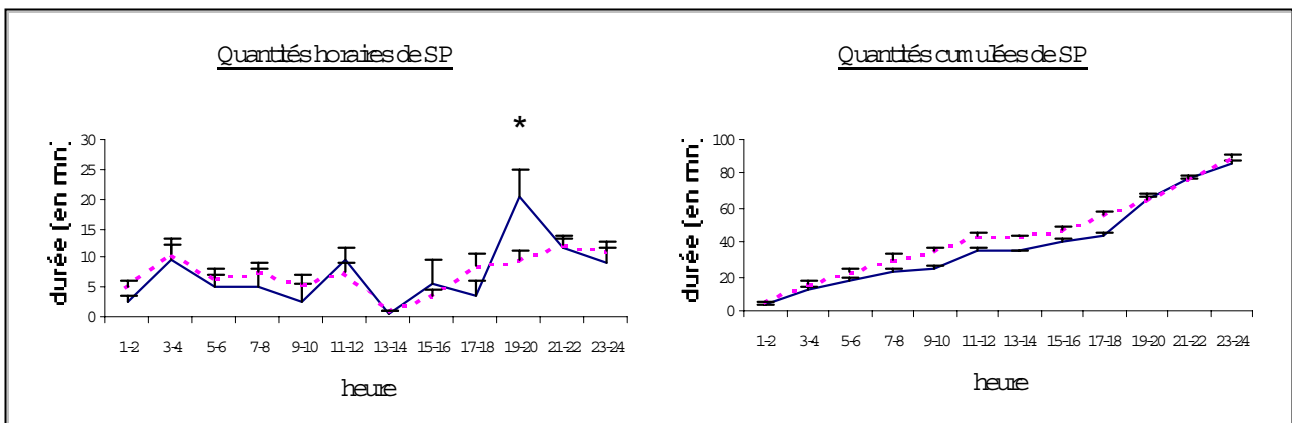
Dans cette figure sont représentés les effets d'une micro-injection (de 10 ng de BNI dans un volume de 0,1  $\mu$ L) sur les états de veille et de sommeil d'un rat GAERS ainsi que sur la survenue des DPO.



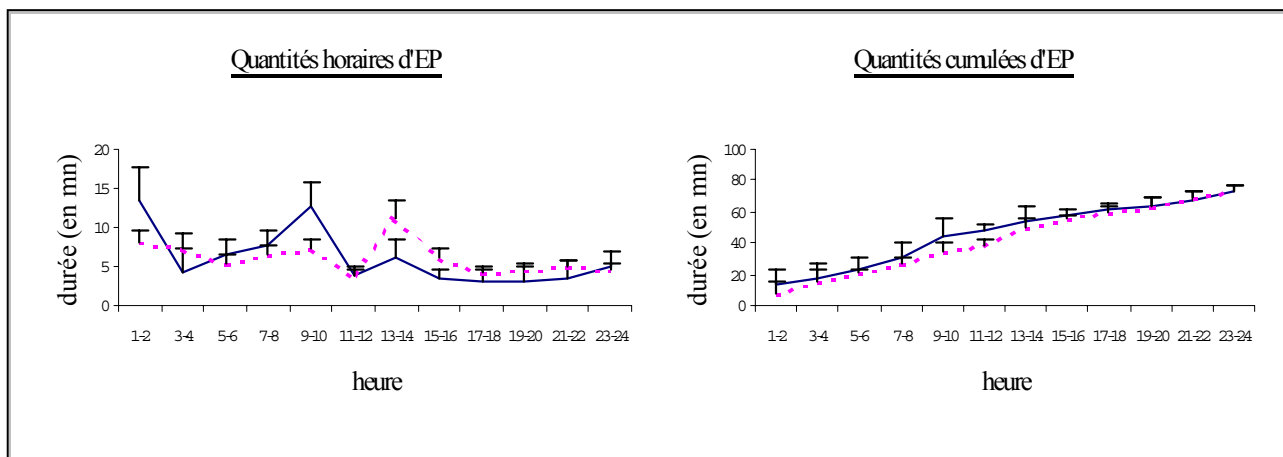
**Figure 61 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EV chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).



**Figure 62 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SL chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).



**Figure 63 :** Représentation des durées horaires et cumulées de SP chez les rats GAERS après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).



**Figure 64 :** Représentation des durées horaires et cumulées d'EP chez les rats GAERS

après une injection de NaCl (trait pointillé) ou de BNI (trait plein).

Contrairement aux résultats observés chez les animaux témoins, aucun effet hypnogène n'a été observé chez les rats GAERS. Aucun effet facilitateur des DPO n'a été mis en évidence non plus ce qui nous permet de dire que, paradoxalement, l'injection dans le nRT des rats GAERS d'un inhibiteur de la nNOS est sans effet sur la répartition des états de veille et de sommeil ou la survenue des DPO.

Ainsi, bien que la nNOS soit, dans le nRT, un élément de régulation des états de veille et de sommeil chez les rats témoins, son inhibition est sans aucun effet chez le rat GAERS.

Si un apport exogène de NO semble avoir un rôle protecteur contre les DPO, il ne semble pas qu'une telle approche puisse amplifier les effets physiologiques du NO puisque nous n'observons pas l'effet éveillant de la MOL que nous pourrions attendre au regard de l'effet hypnogène du BNI. Il est très intéressant de remarquer que, bien que la dose administrée soit efficace chez les rats témoins, il ne semble pas qu'une réponse soit mesurable chez les rats GAERS.

## **DISCUSSION**

Comme cela a été signalé dans les rappels bibliographiques, les facteurs déterminant la propension du thalamus à déclencher des DPO sont : -1- les connexions thalamo-corticales particulières ; -2- les propriétés intrinsèques des neurones du nRT et -3- les facteurs extra-thalamiques influençant l'excitabilité des neurones thalamiques.

Les données que nous avons obtenues en simulant pharmacologiquement une variation des facteurs extra-thalamiques influençant le nRT nous renseignent (-3-) sur le rôle de ces facteurs (en l'occurrence ACh et NO) dans le contrôle des DPO. Les rôles propres de l'ACh et du NO seront discutés dans la première partie de cette discussion (interprétation des résultats) où ils seront mis en relation avec l'influence des états de veille et de sommeil.

Les effets observés nous renseignent aussi sur les propriétés intrinsèques des neurones du nRT (-2-) en réponse à ces variations de conditions. Les données sur les propriétés des neurones du nRT seront discutées dans la seconde partie où les phénomènes de polarisation membranaire de ces neurones ainsi que les connectivités particulières seront abordées.

## **1. INTERPRETATION DES RESULTATS**

### **1.1. Concernant l'étude anatomique**

Nous savons maintenant que le nRT contient des fibres cholinergiques et NO-ergiques. Pour avancer dans notre hypothèse, il est désormais important pour nous de savoir si ces afférences proviennent des neurones pontiques impliqués dans la régulation des états de vigilance. Pour ce faire, nous avons d'ores et déjà commencé une étude en double marquage (nNOS et Choline-Acétyl-Transférase).

Afin de localiser ces neurones le double marquage est complété par la révélation en fluorescence d'un marqueur rétrograde injecté dans le nRT. Les techniques de fluorescence permettront de visualiser de manière synoptique les neurones NO-ergiques et/ou cholinergiques et afférents au nRT.

### **1.2. Concernant le rôle de la libération d'acétylcholine dans le nRT**

Malgré le très faible volume injecté (0,1  $\mu$ L) et donc le volume de diffusion limité (diamètre estimé à 230  $\mu$ m (Martin et al., 1991)), nous pouvons estimer que nos injections ont touché toute la partie rostrale du nRT (soit 50 % environ). Malgré cela, nous avons pu mettre en évidence certains effets importants.

### 1.2.1. Au niveau des récepteurs nicotiniques

Il apparaît que, si les récepteurs nicotiniques du nRT ne sont pas impliqués dans la régulation des états de vigilance (cf page 65 et 67), ils n'en sont pas moins impliqués dans le déclenchement des DPO. En effet, leur blocage pharmacologique diminue de moitié la survenue des DPO (cf page 67). L'ACh peut donc, par le biais de ces récepteurs, déclencher des DPO.

Ainsi, comme cela a été prouvé pour d'autres récepteurs ionotropiques (AMPA ou NMDA) la fixation de l'agoniste sur ce récepteur et l'entrée rapide de sodium consécutive peuvent conduire à l'initiation d'une bouffée de PA au niveau du nRT si les conditions membranaires sont réunies (hyperpolarisation et activation des canaux T) et donc potentiellement une DPO (Zhan et al., 2000).

### 1.2.2. Au niveau des récepteurs muscariniques

*Chez le rat sain.*

Nous avons montré que, dans le nRT, les récepteurs muscariniques ont un rôle éveillant puisque leur blocage favorise l'endormissement. Des travaux effectués en *patch-clamp* avaient montrés que l'ACh est capable, dans le nRT, de bloquer le déclenchement de l'activité neuronale correspondant aux fuseaux du SL (Hu et al., 1989). Il semble donc que la facilitation des fuseaux favorise l'endormissement chez l'animal vigile libre de ses mouvements.

Cet effet, lié aux récepteurs muscariniques, corrobore d'autres travaux effectués en *patch-clamp* (dans une autre structure thalamique que le nRT il est vrai) selon lesquels seuls des récepteurs métabotropiques, provoquant une sortie de potassium, sont capables d'élever le potentiel de membrane pendant une période suffisamment longue pour désactiver les canaux de type T à l'origine de décharges phasiques de PA, (Budde et al., 1992).

Par analogie avec ce dernier modèle, il peut être suggéré que, dans notre situation expérimentale, le blocage des récepteurs muscariniques par la SCO dans le nRT provoque une hyperpolarisation facilitatrice des bouffées de PA et initiatrice d'une phase de SL associée à une activité corticale de type fuseaux.

Si, dans les modèles de Steriade et de Destehxe, l'hyperpolarisation des neurones du nRT lors de l'endormissement provient d'une baisse de l'apport en glutamate cortical et thalamique (Mc Cormick 1990), il semble que la diminution de l'apport en ACh pontique

(que nous avons mimé pharmacologiquement) prend part à l'hyperpolarisation de ces neurones et au déclenchement des fuseaux au début du SL.

#### *Chez le rat GAERS*

Nous avons montré que, chez le rat GAERS, le blocage des récepteurs par la SCO ne provoque pas une augmentation de SL mais une augmentation très importante des DPO. Pour une raison inconnue, le fait de favoriser un mode de décharge phasique dans le nRT ne déclenche pas du SL (mécanisme physiologique) mais des DPO (mécanisme pathologique).

Nos résultats contribuent à la validation *in vivo* d'une théorie assez ancienne selon laquelle les DPO seraient le produit d'une déviance des fuseaux du SL (Gloor 1968 Steriade, 1993). Au niveau du nRT, l'ACh pourrait donc être le protecteur naturel face à cette déviance.

L'ACh a donc le pouvoir de stabiliser, *via* les récepteurs muscariniques, le potentiel de membrane des neurones du nRT à un potentiel auquel les canaux T sont inactifs (diminution des fuseaux et des DPO). Ou bien ces deux effets sont le fruit de deux mécanismes distincts, ou bien un même mécanisme (bloqué par l'ACh) mène aux fuseaux et aux DPO en cas d'excès.

Lors de l'endormissement, l'apport en glutamate thalamique et cortical diminue. Lorsque ces afférences se raréfient (en fin d'EV par exemple), le potentiel post-synaptique est assez bas pour que les canaux T s'ouvrent et génèrent une activité de type fuseaux ou des DPO. L'activité cholinergique, qui diminue de l'EV actif au SL profond, limite ce phénomène en provoquant des dépolarisations membranaires durables.

Lors du SL profond, la boucle thalamo-corticale (qui présente une activité de type delta) fournit assez de glutamate au nRT pour maintenir la membrane des neurones RE à un potentiel où les canaux T sont inactivés.

Lors du SP, le pont a une activité importante et on peut supposer qu'il provoque la libération de beaucoup d'ACh dans le nRT et ni les fuseaux ni les DPO ne sont observés.

L'ACh joue donc un rôle de protecteur lors de la transition EV/SL pendant laquelle les afférences glutamatergiques de l'activité consciente sont amoindries en attendant que ces mêmes afférences, impliquées dans un rythme "neutre" (activité delta du SL) soient réactivées.

### 1.2.3. Bilan du rôle de l'ACh dans le nRT

Vis-à-vis des DPO, l'ACh peut donc jouer au niveau du nRT deux rôles essentiels : protecteur par le biais des récepteurs muscariniques et facilitateur par le biais des récepteurs nicotiques. Le fait d'observer un effet opposé entre antagonistes nicotiques et muscariniques tient aux différences déjà évoquées entre récepteurs ionotropiques et métabotropiques dont Zhan (Zhan et al., 2000) et ses collaborateurs ont montré l'importance dans l'activation, l'inactivation ou le déclenchement des canaux T.

Puisque, à priori, il n'y a pas de raison de penser que physiologiquement ces récepteurs ne sont pas stimulés au même moment, il était important de tester les effets d'une stimulation simultanée de ces deux types de récepteurs afin de statuer sur le rôle de l'ACh vis-à-vis de l'EA.

#### *Chez le rat témoin*

La stimulation exogène par micro-injection dans le nRT de CAR n'a pas provoqué d'éveil excessif ce qui nous permet de suggérer que, si l'ACh peut empêcher la genèse des fuseaux par le biais des récepteurs muscariniques, elle n'exerce pas un effet suffisant pour bloquer le SL. Ce n'est donc pas à proprement parler un rôle éveillant mais un rôle de maintien de l'éveil. Une étude quantitative de la survenue des fuseaux dans nos conditions expérimentales pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.

#### *Chez le rat GAERS*

L'effet observé est représentatif, au regard des résultats précédents, d'une stimulation des récepteurs muscariniques puisqu'une diminution des DPO et une augmentation de la survenue du SL sont observées. Chez le rat GAERS, il est donc possible pharmacologiquement de rétablir le SL en diminuant de moitié les DPO.

Le passage des DPO aux fuseaux pourrait être facilité par une diminution du nombre de neurones RE ayant un mode de décharge tonique ou bien par une action désynchronisante sur les bouffées de PA. Ces deux hypothèses correspondent chacune à une conception de la genèse des DPO. Nous verrons dans la deuxième partie de la discussion comment l'ACh peut avoir une action désynchronisante sur les neurones du nRT.

En bloquant les DPO au profit des fuseaux, il est observé un excès de SL et un déficit en EV. Ceci laisse penser qu'un mécanisme de compensation s'est peut-être mis en place afin d'augmenter les décharges en bouffée pour tenter l'établissement de fuseaux afin de maintenir une quantité de SL suffisante malgré la privation relative que représentent les

DPO. Il est possible aussi que ce mécanisme ne soit pas compensatoire mais, au contraire, impliqué directement dans l'étiologie de l'EA.

### **1.3. Concernant le rôle de la libération de NO dans le nRT**

#### **1.3.1. Effet protecteur des donneurs de NO**

Chez le rat sain, l'administration de MOL n'a provoqué aucune modification de la distribution des états de veille et de sommeil.

Chez le rat GAERS, ces injections ont été suivies par une diminution importante des DPO sur une durée aussi longue que l'injection de CAR. De la même manière que pour le CAR, une légère augmentation du SL est observée mais elle est moins ample et plus courte. Le NO est donc capable d'atténuer les DPO au profit du SL sans entraîner d'hypersomnie durable.

#### *Effet du NO sur les canaux voltage-dépendants*

En 1992, Pape et Mager ont montré que le NO pouvait modifier la dépendance au voltage des canaux cationiques voltage-dépendants et ainsi diminuer les oscillations dues à des activations phasiques des neurones. Les canaux calciques T rentrent dans cette catégorie et leur activité est susceptible d'être diminuée par le NO. Cependant, certaines données obtenues sur des coupes de bulbe olfactif proposent pour le NO un rôle potentialisateur (GMPc dépendant) des canaux calciques T tant en terme de seuil d'activation que d'intensité de la réponse (Kawai et Miyachi, 2001). Toutefois, pour plusieurs canaux ioniques (dont d'autres canaux calciques voltage-dépendants), le NO s'est avéré avoir un rôle activateur ou inhibiteur selon la localisation cérébrale et les messagers protéiques intermédiaires en présence (Ahern et al., 2002).

#### *Effet du NO sur la transmission de PA inhibiteurs au sein du nRT*

Un autre mécanisme possible par lequel le NO pourrait avoir un rôle anti-DPO dans le nRT pourrait consister en la potentialisation de l'interinhibition des neurones GABA-ergiques du nRT. En effet, les connexions dendro-dendritiques assurant cette inhibition sont très arborescentes et les dendrites ne sont pas des structures spécialisées dans le transfert de trains de PA. Autant de facteurs qui multiplient les risques d'échec de transmission de bouffées complètes de PA au niveau terminal. Dans ce sens, il a été montré que le NO, par un mécanisme GMPc-dépendant, pouvait éviter l'arrêt prématuré de la transmission des bouffées de PA en accentuant l'hyperpolarisation post-PA (Klyachko et al., 2001). Ceci

pourrait accélérer la réactivation des canaux sodiques voltage-dépendants impliqués dans le transfert des bouffées de PA au niveau axonal ou dendritique (Klyachko et al., 2001).

### *1.3.2. Effet de l'inhibition de la nNOS*

Chez le rat témoin, il est clair que l'inhibition de la nNOS a un effet hypnogène majeur (en SL mais aussi en SP) qui incite à penser que la nNOS a un rôle éveillant important dans le nRT. Cet effet peut être dû à un effet propre du NO (cf page 88) ou à une potentialisation de la libération d'ACh (Prast et Philippu, 2001).

Chez le rat GAERS, cet effet est très partiellement retrouvé ce qui pourrait laisser penser que la nNOS joue un rôle mineur dans la limitation du déclenchement du SL contrairement au rat témoin. Dans la mesure où la voie d'action du NO dans le nRT est fonctionnelle chez le rat GAERS (cf page 88), ce défaut d'efficacité peut être dû à un défaut de nNOS ou à un défaut de son activation par un cofacteur (BH<sub>4</sub>, FAD, FMN, NADPH...).

D'autre part, l'effet pro-épileptique attendu (au regard des précédents résultats) n'est pas observé. Il est donc possible d'envisager que cette suppression de l'activité nNOS ne constitue pas un stress supplémentaire pour les neurones du nRT chez le rat GAERS. C'est un argument supplémentaire pour l'hypothèse d'un déficit constitutionnel en activité nNOS chez le GAERS.

## **2. NOUVELLES DONNEES SUR LA REGULATION DES DPO DANS LE nRT**

Si les données que nous avons obtenues nous renseignent sur l'influence de l'ACh et du NO sur les neurones RE, elles ne nous renseignent pas moins sur d'autres aspects du contrôle de leur activité. En effet, le mode de décharge de ces neurones est la réponse de l'intégration de multiples facteurs concomitants.

Quel que soit le mécanisme anti-absence des agonistes GABA-A, il est difficile de nier que ces récepteurs sont au centre du mécanisme pathologique car une des rares différences fonctionnelles objectivées au niveau cellulaire entre les rats GAERS et les rats témoins est (avec la différence de conductance calcique dans le nRT) une plus grande sensibilité à l'effet pro-DPO des agonistes inverses du site BZD du récepteur GABA-A (Vergnes et al., 2001).

Pourtant, le GABA, qui hyperpolarise les neurones du nRT, devrait avoir une action pro-DPO. Cette contradiction peut trouver une explication grâce à nos données.

### 2.1. GABA et NO

Nous avons vu dans les rappels bibliographiques que, par le biais des récepteurs GABA-A, l'inter-inhibition des neurones du nRT limite la synchronisation des bouffées de PA et donc le passage des fuseaux aux DPO. Or, il est connu que de fortes concentrations en donneur de NO peuvent augmenter la libération de GABA (Getting et al., 1996). Il est donc possible de suggérer que l'effet anti-absence que nous observons après injection de MOL est, en partie, médié par une potentialisation de l'inter-inhibition des neurones du nRT.

Réciproquement, il est prouvé que la stimulation des récepteurs GABA-A potentialise la production de NO par la NOS (Paul et al., 2001). Ainsi, il est probable que l'effet anti-DPO des agonistes GABA-A et des BZD passe par une libération accrue de NO qui agirait directement sur les canaux voltage dépendant.

L'inter-potentialisation des systèmes GABA-ergique et NO-ergique peut, par les deux mécanismes évoqués, limiter la survenue de DPO.

### 2.2. GABA et ACh

Les interactions entre GABA et ACh au niveau du nRT peuvent avoir lieu au niveau synaptique. Dans ce contexte, il est connu que, selon le potentiel post-synaptique, l'ACh peut augmenter la conductance au potassium (qui provoque une hyperpolarisation donc un risque de décharge en bouffée) ou la diminuer (qui provoque une dépolarisation donc une protection contre les bouffées de PA) (McCormick et Prince, 1986). Il en résulte une possibilité de stabiliser le potentiel post-synaptique au potentiel d'inversion de cet effet (-90 mV *in vitro*). Cependant, en deçà de 70/80 mV les canaux T sont activés (Kim et al., 2001) ce qui revient à dire que l'ACh stabilise le potentiel de membrane à un potentiel où les décharges en bouffées sont favorisées. Ces données sont en contradiction avec nos résultats puisque l'ACh a un effet anti-DPO.

Si on admet que les afférences GABA-ergiques arrivent à proximité des récepteurs muscariniques, l'hyperpolarisation (courte car due à GABA-A) engendrée fera passer les récepteurs muscariniques d'un mode hyperpolarisant à un mode dépolarisant (durable car métabotropique) protecteur contre les décharges en bouffées. Ainsi, un neurone du nRT déchargeant en bouffée influencera les neurones adjacents, par des projections collatérales ou des connexions dendro-dendritiques en leur fournissant du GABA qui leur permet de ne pas décharger en bouffée au même moment.

Ce modèle, qui repose sur une disposition synaptique hypothétique, a le mérite de résoudre la contradiction de l'effet anti-DPO du GABA et de l'ACh qui sont actuellement censés hyperpolariser les neurones du nRT mais qui sont pourtant protecteurs vis-à-vis des DPO. Une meilleure connaissance de la disposition des afférences au nRT serait indispensable à une validation de cette hypothèse. De nombreux travaux se sont proposés de répondre aux interrogations qui demeurent (Liu et Jones, 1999 ; Pinault et al., 1997 ; Deschenes et al., 1985) mais aucun n'a abordé l'emplacement des synapses cholinergiques.

### **3. CONSIDERATIONS PATHOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES**

#### **3.1. Etiologie des DPO chez les GAERS**

Nos résultats nous permettent de proposer différents mécanismes responsables de la survenue de DPO chez les rats GAERS :

##### *ACh*

Tout d'abord, la mise en évidence de l'effet pro-DPO de l'antagoniste muscarinique et anti-absence du CAR peut laisser supposer l'existence d'un déficit critique au niveau des afférences cholinergiques au nRT chez les GAERS. (1) Ce déficit favoriserait les décharges en bouffées des neurones RE et donc les DPO. (2) Il pourrait aussi empêcher la désynchronisation entre les neurones RE et donc favoriser l'amplification (grâce aux synapses électriques ou par simple extension à d'autres zones corticales ou thalamiques) des bouffées de neurones RE pour aboutir aux DPO. (3) Il est aussi possible que les afférences cholinergiques soient intactes mais que le processus de désynchronisation soit touché (au travers d'une mauvaise configuration des synapses déjà évoquée). Cette hypothèse n'est cependant pas privilégiée car le CAR peut tout de même jouer un rôle anti-DPO.

Une étude immuno-histologique des structures cholinergiques afférentes au nRT chez le rat GAERS ainsi qu'une étude de la configuration des synapses au niveau des neurones RE permettraient de vérifier cette hypothèse.

##### *NO*

Il est probable que les rats GAERS souffrent d'un déficit de production de NO par la nNOS qui peut être dû à un déficit de l'enzyme, un déficit de sa dimérisation ou un déficit de l'un de ses cofacteurs car les systèmes de transmission du signal NO semblent fonctionnels. Une étude de la nNOS au niveau du nRT chez le GAERS s'avère indispensable afin de vérifier cette hypothèse. L'origine de ce déficit peut être recherchée,

comme celui en ACh, par l'immunohistologie des afférences NO-ergiques et des NOS présentes dans le nRT. Des quantifications *in situ* ou *ex vivo* des différents cofacteurs ou de l'état d'activation des NOS peuvent aussi être réalisées.

Après la connaissance de l'origine de ce déficit, puisque le mécanisme d'action du NO contre les DPO n'est pas connu, il restera à définir comment ce déficit devient pathologique. (1) Ce déficit peut être à l'origine d'une diminution de la libération d'ACh. (2) Il peut aussi provoquer un dysfonctionnement des canaux voltage-dépendants. (3) Il peut aussi diminuer les quantités de GABA libérées au sein du nRT. Des études électrophysiologiques simples permettraient de répondre à ces questions.

### **3.2. Perspectives thérapeutiques**

Quelle que soit la validité des propositions d'étiologie que nous venons d'énoncer, le pragmatisme autorise à penser qu'une augmentation des apports en ACh ou en NO diminuerait les DPO.

Toutefois, il semble que les agonistes muscariniques (le CAR en tout cas) modifient les états de vigilance en révélant peut-être une tendance excessive chez le GAERS à générer des fuseaux. Cet effet hypnogène est une limitation sérieuse à une utilisation en médecine humaine.

Une étude très récente a montré que l'utilisation d'antagonistes nicotiques était efficace dans la lutte contre l'épilepsie convulsive généralisée dans un modèle animal (Löscher et al., 2003).

En 2000, une équipe du laboratoire a montré que la DEPAKINE pouvait augmenter le taux de NO intra-cérébral mais, à ce jour, aucune étude clinique n'a proposé l'utilisation de donneur de NO en tant qu'anti-épileptique. Nos données rendent pourtant indispensable l'exploration chez l'animal de cette voie qui pourrait déboucher sur une nouvelle méthode de lutte contre les DPO dans différents syndromes épileptiques. L'utilisation thérapeutique actuelle des donneurs de NO dans certaines affections cardio-vasculaires permet déjà de dire que ces molécules ont très peu d'effets secondaires importants et une toxicité très faible ce qui est une qualité très rare parmi les anti-épileptiques.

Outre une diminution des effets indésirables, cette nouvelle catégorie d'anti-absence pourrait apporter un nouvel espoir pour le traitement des EA pharmacorésistantes.

## **CONCLUSIONS**

## CONCLUSIONS

THESE SOUTENUE PAR : M PARMANTIER Pierre

La survenue des décharges de pointes-ondes caractéristiques de l'épilepsie-absence est étroitement corrélée avec les rythmes d'éveil et de sommeil. En effet, elles apparaissent principalement (tant chez l'homme que dans le modèle *Genetic Absence Epileptic Rat from Strasbourg* ou GAERS) en fin d'éveil ou au début du sommeil lent. Lors de cette transition physiologique, une structure thalamique (le noyau réticulé thalamique ou nRT) assure la genèse de l'activité électroencéphalographique dite en "fuseaux" dont les décharges de pointes-ondes pourraient être une déviance.

Les données préexistantes sur les effets anti-absence de l'acétylcholine et du monoxyde d'azote (qui sont très impliqués dans la régulation des états de veille et de sommeil) nous ont poussés à étudier l'influence de ces deux messagers neuronaux sur le nRT dans la régulation des décharges de pointe-ondes.

Nos travaux ont suggéré que l'acétylcholine libérée dans le nRT pendant l'éveil empêche la genèse des fuseaux et des décharges de pointes-ondes probablement en diminuant l'activité phasique des neurones du nRT. L'acétylcholine peut donc être le déterminant commun entre décharges de pointes-ondes et fuseaux du sommeil lent.

Nos travaux ont montré aussi que le monoxyde d'azote exogène peut, chez le rat GAERS, favoriser les fuseaux du sommeil et empêcher les décharges de pointes-ondes sans modifier la succession physiologique des états de veille et de sommeil. Nous avons vu aussi que l'enzyme neuronale de synthèse du monoxyde d'azote était peut-être absente ou inactive chez le rat GAERS. Le monoxyde d'azote peut donc être le déterminant différentiel entre décharges de pointes-ondes et fuseaux du sommeil lent.

Après quelques considérations sur l'étiologie de l'épilepsie-absence, nous proposons un mécanisme expliquant la contradiction apparente entre l'effet connu hyperpolarisant membranaire du GABA et de l'acétylcholine dans le nRT et leur pouvoir anti-absence avéré. Nous proposons aussi et surtout l'étude de l'utilisation des molécules activant la voie du monoxyde d'azote en tant qu'anti-absence.

**Le Président de la thèse,**

Vu et permis d'imprimer, Lyon, le 21 mai 2003

Nom :

VU, LE DIRECTEUR DE L'INSTITUT DES SCIENCES

Signature :

PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES, FACULTE DE PHARMACIE

Pour le Président de l'Université CLAUDE BERNARD LYON I,

**Professeur F. LOCHER**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

ADACHI TF, INANAMI OF, SATO A:

Nitric oxide (NO) is involved in increased cerebral cortical blood flow following stimulation of the nucleus basalis of Meynert in anesthetized rats.

*Neurosci Lett* 1992, 139:201-204.

AHERN GP, KLYACHKO VA, JACKSON MB:

cGMP and S-nitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO.

*Trends Neurosci* 2002, 25:510-517.

AMZICA F, STERIADE M:

Spontaneous and artificial activation of neocortical seizures.

*J Neurophysiol* 1999, 82:3123-3138.

ANAGNOSTOU E:

On absence seizures and oculomotor phenomena.

*Clin Neurophysiol* 2001, 112:563-564.

ASERINSKY E, KLEITMAN N.

Regularly occurring periods of motility and concomitant phenomena during sleep.

*Science* 118, 273-274. 1953.

AVANZINI G, VERGNES M, SPREAFICO R, MARESCAUX C:

Calcium-dependent regulation of genetically determined spike and waves by the reticular thalamic nucleus of rats.

*Epilepsia* 1993, 34:1-7.

AVANZINI G, PANZICA F, DE CURTIS M:

The role of the thalamus in vigilance and epileptogenic mechanisms.

*Clin Neurophysiol* 2000, 111 Suppl 2:S19-S26

BARCLAY JF, BALAGUERO NF, MIONE MF, ACKERMAN SLF, LETTS VAF, BRODBECK JF, CANTI CF, MEIR AF, PAGE KMF, KUSUMI KF, PEREZ-REYES EF, LANDER ESF, FRANKEL WNF, GARDINER RMF, DOLPHIN ACF, REES M:

Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells .

*J Neurosci* 2001, 21:6095-6104.

BASTIEN CH, BONNET MH:

Do increases in beta EEG activity uniquely reflect insomnia? A commentary on "Beta EEG activity and insomnia" (M. L. Perlis et al.).

*Sleep Med Rev* - 2001, 5:375-377.

BATINI C., MORUZZI G., PALESTINI M., ROSSI G.F., and ZANCHETTI A.

Effects of complete pontine transection on the sleep-wakefulness rhythm : the midpontine pretrigeminal cat.

*Arch Ital Biol* 97, 13-25. 1959.

BERGER H.

Über das Elektroenkephalogramm des menschen.

*Arch.Psychiat.* 87, 527-570. 1929.

BERKOVIC SF, ANDERMANN F, ANDERMANN E, GLOOR P:

Concepts of absence epilepsies: discrete syndromes or biological continuum?

*Neurology* 1987, 37:993-1000.

BOGACZ J, BOGACZ D, BOGACZ A:

Oculomotor phenomena in petit-mal.

*Clin Neurophysiol* 2000, 111:959-963.

BOROWICZ KK, STAROWNIK R, KLEINROK Z, CZUCZWAR SJ:

The influence of L-NG-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthase, upon the anticonvulsive activity of conventional antiepileptic drugs against maximal electroshock in mice.

*J Neural Transm* 1998, 105:1-12.

BREDT DS, SNYDER SH:

Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium.

*Neuron* 1994, 13:301-313.

BREMER F.

Cerveau "isolé" et physiologie du sommeil.

*C.R.Soc.Biol.(Paris)* 1935. 118, 1235-1241.

BUDDE T, MAGER R, PAPE HC:

Different Types of Potassium Outward Current in Relay Neurons Acutely Isolated from the Rat Lateral Geniculate Nucleus.

*Eur J Neurosci* 1992, 4:708-722.

BUISSON A, LAKHMECHE N, VERRECCHIA C, PLOTKINE M, BOULU RG:

Nitric oxide: an endogenous anticonvulsant substance.

*Neuroreport* 1993, 4:444-446.

BURGESS DL, NOEBELS JL:

Single gene defects in mice: the role of voltage-dependent calcium channels in absence models.

*Epilepsy Res* 1999, 36:111-122.

BURGESS DLF, JONES JMF, MEISLER MHF, NOEBELS JL:

Mutation of the Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit gene *Cchb4* is associated with ataxia and seizures in the lethargic (lh) mouse.

*Cell* 1997, 88:385-392.

BURLET S, CESPUGLIO R:

Voltammetric detection of nitric oxide (NO) in the rat brain: its variations throughout the sleep-wake cycle.

*Neurosci Lett* 1997, 226:131-135.

BUZSAKI GF, PONOMAREFF GF, BAYARDO FF, SHAW TF, GAGE FH:

Suppression and induction of epileptic activity by neuronal grafts.

*Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:9327-9330.

CESPUGLIO R, BURLET S, MARINESCO S, ROBERT F, JOUVET M:

Détection voltamétrique du NO cérébral chez le rat. Variations du signal au cours du cycle veille sommeil.

*C R Acad Sci III* 1996, 319:191-200.

CHEN, L, MAJDE, JD, and KRUEGER, JM.

Spontaneous sleep in neuronal and inductible nitric oxide synthase knockout mice.

*Sleep Abstract Supplement*, A170. 2002.

CHEN S, BENTIVOGLIO M:

Nerve growth factor receptor-containing cholinergic neurons of the basal forebrain project to the thalamic reticular nucleus in the rat.

*Brain Res* 1993, 606:207-212.

CHEN Y, LU J, ZHANG Y, PAN H, WU H, XU K, LIU X, JIANG Y, BAO X, ZHOU J, LIU W, SHI G, SHEN Y, WU X:

T-type calcium channel gene alpha (1G) is not associated with childhood absence epilepsy in the Chinese Han population.

*Neurosci Lett* 2003, 341:29-32.

CLEMENTS JR, GRANT S:

Glutamate-like immunoreactivity in neurons of the laterodorsal tegmental and pedunculopontine nuclei in the rat.

*Neurosci Lett* 1990, 120:70-73.

COULTER DA, HUGUENARD JR, PRINCE DA:

Differential effects of petit mal anticonvulsants and convulsants on thalamic neurones: calcium current reduction.

*Br J Pharmacol* 1990, 100:800-806.

COULTER DA, HUGUENARD JR, PRINCE DA:

Differential effects of petit mal anticonvulsants and convulsants on thalamic neurones: GABA current blockade.

*Br J Pharmacol* 1990, 100:807-813.

CRUNELLI V, LERESCHE N:

A role for GABAB receptors in excitation and inhibition of thalamocortical cells.

*Trends Neurosci* 1991, 14:16-21.

- CRUNELLI VF, LERESCHE N:  
Childhood absence epilepsy: genes, channels, neurons and networks.  
*Nat Rev Neurosci* 2002, 3:371-382.
- CSILLIK B, NEMCSOK J, BONCZ I, KNYIHAR-CSILLIK E:  
Nitric oxide synthase and the acetylcholine receptor in the prefrontal cortex: metasynaptic organization of the brain.  
*Neurobiology* 1998, 6:383-404.
- CUDEIRO JF, RIVADULLA CF, GRIEVE KL:  
A possible role for nitric oxide at the sleep/wake interface.  
*Sleep* 2000, 23:829-835.
- CZUCZWAR SJ, TUTKA P, KLONOWSKI P, KLEINROK Z:  
N(G)-nitro-L-arginine impairs the anticonvulsive action of ethosuximide against pentylenetetrazol.  
*Eur J Pharmacol* 1999, 366:137-142.
- DANOBER L, DEPAULIS A, MARESCAUX C, VERGNES M:  
Effects of cholinergic drugs on genetic absence seizures in rats.  
*Eur J Pharmacol* 1993, 234:263-268.
- DANOBER L, DEPAULIS A, VERGNES M, MARESCAUX C:  
Mesopontine cholinergic control over generalized non-convulsive seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat.  
*Neuroscience* 1995, 69:1183-1193.
- DANOBER LF, VERGNES MF, DEPAULIS AF, MARESCAUX C:  
Nucleus basalis lesions suppress spike and wave discharges in rats with spontaneous absence-epilepsy.  
*Neuroscience* 1994, 59:531-539.
- DATTA S, PATTERSON EH, SIWEK DF:  
Endogenous and exogenous nitric oxide in the pedunculo-pontine tegmentum induces sleep.  
*Synapse* 1997, 27:69-78.
- DEANS MR, GIBSON JR, SELLITTO C, CONNORS BW, PAUL DL:  
Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36.  
*Neuron* 2001, 31:477-485.
- DEBAY D, DESTEXHE A, BAL T:  
Corticothalamic feedback can induce hypersynchronous low-frequency rhythms in the physiologically intact thalamus.  
*Neurocomputing* 2001, 38-40:529-538.

DEMENT WC.

The occurrence of low voltage, fast electroencephalogram patterns during behavioral sleep in the cat.

*Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10, 291-296. 1958.

DENOYER M, SALLANON M, BUDA C, DELHOMME G, DITTMAR A, JOUVET M:

The posterior hypothalamus is responsible for the increase of brain temperature during paradoxical sleep.

*Exp Brain Res* 1991, 84:326-334.

DERANSART C, VERCUEIL L, MARESCAUX C, DEPAULIS A:

The role of basal ganglia in the control of generalized absence seizures.

*Epilepsy Res* 1998, 32:213-223.

DERANSART C, LE-PHAM BT, HIRSCH E, MARESCAUX C, DEPAULIS A:

Inhibition of the substantia nigra suppresses absences and clonic seizures in audiogenic rats, but not tonic seizures: evidence for seizure specificity of the nigral control.

*Neuroscience* 2001, 105:203-211.

DERANSART CF, RIBAN VF, LE BF, MARESCAUX CF, DEPAULIS A:

Dopamine in the striatum modulates seizures in a genetic model of absence epilepsy in the rat.

*Neuroscience* 2000, 100:335-344.

DESCHENES M, MADARIAGA-DOMICCH A, STERIADE M:

Dendrodendritic synapses in the cat reticularis thalami nucleus: a structural basis for thalamic spindle synchronization.

*Brain Res* 1985, 334:165-168.

DESTEXHE A:

Modelling corticothalamic feedback and the gating of the thalamus by the cerebral cortex.

*J Physiol Paris* 2000, 94:391-410.

DESTEXHE AF, RUDOLPH MF, FELLOUS JMF, SEJNOWSKI TJ:

Fluctuating synaptic conductances recreate in vivo-like activity in neocortical neurons.

*Neuroscience* 2001, 107:13-24.

DICHTER MA, BRODIE MJ:

New antiepileptic drugs.

*N Engl J Med* 1996, 334:1583-1590.

DING JMF, CHEN DF, WEBER ETF, FAIMAN LEF, REA MAF, GILLETTE MU:

Resetting the biological clock: mediation of nocturnal circadian shifts by glutamate and NO.

*Science* 1994, 266:1713-1717.

DO KQ, BINNS KE, SALT TE:

Release of the nitric oxide precursor, arginine, from the thalamus upon sensory afferent stimulation, and its effect on thalamic neurons in vivo.

*Neuroscience* 1994, 60:581-586.

EL-HUSSEINI AE, BLADEN C, WILLIAMS JA, REINER PB, VINCENT SR:  
Nitric oxide regulates cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylation in rat brain.  
*J Neurochem* 1998, 71:676-683.

ENGEL JJ:  
A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology.  
*Epilepsia* 2001, 42:796-803.

FARADJI H, ROUSSET C, DEBILLY G, VERGNES M, CESPUGLIO R:  
Sleep and epilepsy: A key role for nitric oxide?  
*Epilepsia* 2000, 41:794-801.

FLETCHER CFF, LUTZ CMF, O'SULLIVAN TNF, SHAUGHNESSY JDJ, HAWKES RF, FRANKEL WNF, COPELAND NGF, JENKINS NA:  
Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects.  
*Cell* 1996, 87:607-617.

FUTATSUGI YF, RIVIELLO JJJ:  
Mechanisms of generalized absence epilepsy.  
*Brain Dev* 1998, 20:75-79.

GARTHWAITE J, CHARLES SL, CHESS-WILLIAMS R:  
Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.  
*Nature* 1988, 336:385-388.

GETTING SJ, SEGIETH J, AHMAD S, BIGGS CS, WHITTON PS:  
Biphasic modulation of GABA release by nitric oxide in the hippocampus of freely moving rats in vivo.  
*Brain Res* 1996, 717:196-199.

GLOOR P:  
Generalized cortico-reticular epilepsies. Some considerations on the pathophysiology of generalized bilaterally synchronous spike and wave discharge.  
*Epilepsia* 1968, 9:249-263.

GOTTESMANN C:  
Detection of seven sleep-waking stages in the rat.  
*Neurosci Biobehav Rev* 1992, 16:31-38.

GOTTESMANN C:  
The golden age of rapid eye movement sleep discoveries. 1. Lucretius--1964.  
*Prog Neurobiol* 2001, 65:211-287.

GOWER AJF, HIRSCH EF, BOEHRER AF, NOYER MF, MARESCAUX C:  
Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models of epilepsy.  
*Epilepsy Res* 1995, 22:207-213.

GRIFFITH OW, STUEHR DJ:

Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism.

*Annu Rev Physiol* 1995, 57:707-736.

HAEFLIGER JA, MEDA P, FORMENTON A, WIESEL P, ZANCHI A, BRUNNER HR, NICOD P, HAYOZ D:

Aortic connexin43 is decreased during hypertension induced by inhibition of nitric oxide synthase.

*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:1615-1622.

HAEFLIGER JA, MEDA P:

Chronic hypertension alters the expression of Cx43 in cardiovascular muscle cells.

*Braz J Med Biol Res* 2000, 33:431-438.

HAINSWORTH AH, MCNAUGHTON NC, PEREVERZEV A, SCHNEIDER T, RANDALL AD:

Actions of sipatrigine, 202W92 and lamotrigine on R-type and T-type Ca(2+) channel currents.

*Eur J Pharmacol* 2003, 467:77-80.

HALASZ P, TERZANO MG, PARRINO L:

Spike-wave discharge and the microstructure of sleep-wake continuum in idiopathic generalised epilepsy.

*Neurophysiol Clin* 2002, 32:38-53.

HALLANGER AE, LEVEY AI, LEE HJ, RYE DB, WAINER BH: T

he origins of cholinergic and other subcortical afferents to the thalamus in the rat.

*J Comp Neurol* 1987, 262:105-124.

HARS B:

Endogenous nitric oxide in the rat pons promotes sleep.

*Brain Res* 1999, 816:209-219.

HECKER M, MULSCH A, BASSENGE E, FORSTERMANN U, BUSSE R:

Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications.

*Biochem J* 1994, 299 ( Pt 1):247-252.

HECKER M, MULSCH A, BUSSE R:

Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase.

*J Neurochem* 1994, 62:1524-1529.

HOBSON JA, MCCARLEY RW, WYZINSKI PW:

Sleep cycle oscillation: reciprocal discharge by two brainstem neuronal groups.

*Science* 1975, 189:55-58.

HU B, BOUHASSIRA D, STERIADE M, DESCHENES M:  
The blockage of ponto-geniculo-occipital waves in the cat lateral geniculate nucleus by  
nicotinic antagonists.  
*Brain Res* 1988, 473:394-397.

HU B, STERIADE M, DESCHENES M:  
The effects of brainstem peribrachial stimulation on perigeniculate neurons: the blockage of  
spindle waves.  
*Neuroscience* 1989, 31:1-12.

HU B, STERIADE M, DESCHENES M:  
The cellular mechanism of thalamic ponto-geniculo-occipital waves.  
*Neuroscience* 1989, 31 :25-35.

HU B, STERIADE M, DESCHENES M:  
The effects of brainstem peribrachial stimulation on neurons of the lateral geniculate  
nucleus.  
*Neuroscience* 1989, 31:13-24.

HU BF, STERIADE MF, DESCHENES M:  
The effects of brainstem peribrachial stimulation on perigeniculate neurons: the blockage of  
spindle waves.  
*Neuroscience* 1989, 31:1-12.

HU RQ, CORTEZ MA, MAN HY, RODER J, JIA Z, WANG YT, SNEAD OC:  
Gamma-hydroxybutyric acid-induced absence seizures in GluR2 null mutant mice.  
*Brain Res* 2001, 897:27-35.

HUGUENARD JR, PRINCE DA:  
A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic  
neurons of rat thalamic reticular nucleus.  
*J Neurosci* 1992, 12:3804-3817.

HUGUENARD JR, PRINCE DA:  
Clonazepam suppresses GABAB-mediated inhibition in thalamic relay neurons through  
effects in nucleus reticularis.  
*J Neurophysiol* 1994, 71:2576-2581.

HUGUENARD JR:  
Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons.  
*Annu Rev Physiol* 1996, 58:329-348.

JACOBSON E.  
Electrical measurements of neuromuscular states during mental activities.  
*Amer.j.Physiol.* 95, 694-702. 1930.

JAFFREY SR, SNYDER SH:  
PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase.  
*Science* 1996, 274:774-777.

JANDO GF, CARPI DF, KANDEL AF, URIOSTE RF, HORVATH ZF, PIERRE EF, VADI DF, VADASZ CF, BUZSAKI G:

Spike-and-wave epilepsy in rats: sex differences and inheritance of physiological traits.  
*Neuroscience* 1995, 64:301-317.

JOHNSON MD, MA PM:

Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain.  
*J Comp Neurol* 1993, 332:391-406.

JOHNSON MDF, MA PM:

Localization of NADPH diaphorase activity in monoaminergic neurons of the rat brain.  
*J Comp Neurol* 1993, 332:391-406.

JONES BE, CUELLO AC:

Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons.  
*Neuroscience* 1989, 31:37-61.

JONES OT:

Ca(2+) channels and epilepsy.  
*Eur J Pharmacol* 2002, 447:211-225.

JOUVET M, MICHEL F.

Corrélations électromyographiques du sommeil chez le chat décortiqué et mésencéphalique chronique.  
*C.R.Soc.Biol.(Paris)* 153, 422-425. 1959.

JOUVET M.

Recherche sur les structures nerveuses et les mécanismes responsables des différentes phases du sommeil physiologique.  
*Arch Ital Biol* 100, 125-206. 1962.

JOUVET M:

Biogenic amines and the states of sleep.  
*Science* 1969, 163:32-41.

JOUVET M:

Neuromédiateurs et facteurs hypnogéniques.  
*Rev Neurol (Paris)* 1984, 140:389-400.

KAMINSKI RMF, VAN RIJN CMF, TURSKI WAF, CZUCZWAR SJF, VAN LUIJTELAAR G:

AMPA and GABA(B) receptor antagonists and their interaction in rats with a genetic form of absence epilepsy.  
*Eur J Pharmacol* 2001, 430:251-259.

- KATSUYAMA K, SHICHIRI M, MARUMO F, HIRATA Y:  
NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation and degradation of IkappaB-alpha.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18:1796-1802.
- KAWAI F, MIYACHI E:  
Modulation by cGMP of the voltage-gated currents in newt olfactory receptor cells.  
*Neurosci Res* 2001, 39:327-337.
- KELLY KM, GROSS RA, MACDONALD RL:  
Valproic acid selectively reduces the low-threshold (T) calcium current in rat nodose neurons.  
*Neurosci Lett* 1990, 116:233-238.
- KHAVANDGAR S, HOMAYOUN H, DEHPOUR AR:  
Mediation of nitric oxide in inhibitory effect of morphine against electroshock-induced convulsions in mice.  
*Pharmacol Biochem Behav* 2003, 74:795-801.
- KIM D, SONG I, KEUM S, LEE T, JEONG MJ, KIM SS, MCENERY MW, SHIN HS:  
Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels.  
*Neuron* 2001, 31:35-45.
- KISS JP, SERSHEN H, LAJTHA A, VIZI ES:  
Inhibition of neuronal nitric oxide synthase potentiates the dimethylphenylpiperazinium-evoked carrier-mediated release of noradrenaline from rat hippocampal slices.  
*Neurosci Lett*, 215:115-118.
- KISS JP, VIZI ES:  
Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission.  
*Trends Neurosci* 2001, 24:211-215.
- KLEINLOGEL H:  
Spontaneous EEG paroxysms in the rat: effects of psychotropic and alpha-adrenergic agents.  
*Neuropsychobiology* 1985, 13:206-213.
- KLYACHKO VA, AHERN GP, JACKSON MB:  
cGMP-mediated facilitation in nerve terminals by enhancement of the spike afterhyperpolarization.  
*Neuron* 2001, 31:1015-1025.
- KNOWLES RG, PALACIOS M, PALMER RM, MONCADA S:  
Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, 86:5159-5162.

KOERNER C, DANOBER L, BOEHRER A, MARESCAUX C, VERGNES M:  
Thalamic NMDA transmission in a genetic model of absence epilepsy in rats.  
*Epilepsy Res* 1996, 25:11-19.

KOSTOPOULOS GK:  
Spike-and-wave discharges of absence seizures as a transformation of sleep spindles: the continuing development of a hypothesis.  
*Clin Neurophysiol* 2000, 111 Suppl 2:S27-S38

KOSTOPOULOS GK:  
Involvement of the thalamocortical system in epileptic loss of consciousness.  
*Epilepsia* 2001, 42 Suppl 3:13-19.

KOYAMA Y, SAKAI K:  
Modulation of presumed cholinergic mesopontine tegmental neurons by acetylcholine and monoamines applied iontophoretically in unanesthetized cats.  
*Neuroscience* 2000, 96:723-733.

KRAUS MM, PRAST H:  
The nitric oxide system modulates the in vivo release of acetylcholine in the nucleus accumbens induced by stimulation of the hippocampal fornix/fimbria-projection.  
*Eur J Neurosci* 2001, 14:1105-1112.

KUMAR P, RAJU TR:  
Seizure susceptibility decreases with enhancement of rapid eye movement sleep.  
*Brain Res* 2001, 922:299-304.

KWAN P, SILLS GJ, BRODIE MJ:  
The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs.  
*Pharmacol Ther* 2001, 90:21-34.

LANDISMAN CE, LONG MA, BEIERLEIN M, DEANS MR, PAUL DL, CONNORS BW:  
Electrical synapses in the thalamic reticular nucleus.  
*J Neurosci* 2002, 22:1002-1009.

LEONARD CS, MICHAELIS EK, MITCHELL KM:  
Activity-dependent nitric oxide concentration dynamics in the laterodorsal tegmental nucleus in vitro.  
*J Neurophysiol* 2001, 86:2159-2172.

LEONARD TO, LYDIC R:  
Nitric oxide synthase inhibition decreases pontine acetylcholine release.  
*Neuroreport* 1995, 6:1525-1529.

LEONARD TO, LYDIC R:  
Pontine nitric oxide modulates acetylcholine release, rapid eye movement sleep generation, and respiratory rate.  
*J Neurosci* 1997, 17:774-785.

- LIN JS, SAKAI K, JOUVET M:  
Evidence for histaminergic arousal mechanisms in the hypothalamus of cat.  
*Neuropharmacology* 1988, 27:111-122.
- LIN JS, ROUSSEL B, AKAOKA H, FORT P, DEBILLY G, JOUVET M:  
Role of catecholamines in the modafinil and amphetamine induced wakefulness, a comparative pharmacological study in the cat.  
*Brain Res* 1992, 591:319-326.
- LIN SH, ARAI AC, ESPANA RA, BERRIDGE CW, LESLIE FM, HUGUENARD JR, VERGNES M, CIVELLI O:  
Prolactin-releasing peptide (PrRP) promotes awakening and suppresses absence seizures.  
*Neuroscience* 2002, 114:229-238.
- LIU XB, JONES EG:  
Predominance of corticothalamic synaptic inputs to thalamic reticular nucleus neurons in the rat.  
*J Comp Neurol* 1999, 414:67-79.
- LIU ZF, VERGNES MF, DEPAULIS AF, MARESCAUX C:  
Involvement of intrathalamic GABA<sub>B</sub> neurotransmission in the control of absence seizures in the rat.  
*Neuroscience* 1992, 48:87-93.
- LONART G, JOHNSON KM:  
Characterization of nitric oxide generator-induced hippocampal [<sup>3</sup>H]norepinephrine release. I. The role of glutamate.  
*J Pharmacol Exp Ther* 1995, 275:7-13.
- LOSCHER W, POTSCHKA H, WLAZ P, DANYSZ W, PARSONS CG:  
Are neuronal nicotinic receptors a target for antiepileptic drug development? Studies in different seizure models in mice and rats.  
*Eur J Pharmacol* 2003, 466:99-111.
- MANJARREZ J, ALVARADO R, CAMACHO-ARROYO I:  
Differential effects of NMDA antagonists microinjections into the nucleus reticularis pontis caudalis on seizures induced by pentylenetetrazol in the rat.  
*Epilepsy Res* 2001, 46:39-44.
- MARESCAUX C, VERGNES M, DEPAULIS A:  
Neurotransmission in rats' spontaneous generalized nonconvulsive epilepsy .  
*Epilepsy Res Suppl* 1992, 8:335-343.
- MARESCAUX C, VERGNES M, BERNASCONI R:  
GABA<sub>B</sub> receptor antagonists: potential new anti-absence drugs.  
*J Neural Transm Suppl* 1992, 35:179-188.

MARESCAUX C, VERGNES M, DEPAULIS A:  
Genetic absence epilepsy in rats from Strasbourg--a review.  
*J Neural Transm Suppl* 1992, 35:37-69.

MARRAS RA, MARTINS AP, DEL BEL EA, GUIMARAES FS:  
L-NOARG, an inhibitor of nitric oxide synthase, induces catalepsy in mice.  
*Neuroreport* 1995, 7:158-160.

MARTIN JH:  
Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat.  
*Neurosci Lett* 1991, 127:160-164.

MCCORMICK DA, PRINCE DA:  
Mechanisms of action of acetylcholine in the guinea-pig cerebral cortex in vitro.  
*J Physiol* 1986, 375:169-194.

MCCORMICK DA, PRINCE DA:  
Acetylcholine induces burst firing in thalamic reticular neurones by activating a potassium conductance.  
*Nature* 1986, 319:402-405.

MCCORMICK DA, PRINCE DA:  
Post-natal development of electrophysiological properties of rat cerebral cortical pyramidal neurones.  
*J Physiol* 1987, 393:743-762.  
McCormick, D. A. 1990.

MCCORMICK DA:  
Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex and their role in neuromodulation of thalamocortical activity.  
*Prog Neurobiol* 1992, 39:337-388.

MCCORMICK DA, HUGUENARD JR:  
A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons.  
*J Neurophysiol* 1992, 68:1384-1400.

MCCORMICK DA:  
Neurotransmitter actions in the thalamus and cerebral cortex.  
*J Clin Neurophysiol* 1992, 9:212-223.

MCCORMICK DA, VON KROSIGK M:  
Corticothalamic activation modulates thalamic firing through glutamate "metabotropic" receptors.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89:2774-2778.

MCCORMICK DA:

Cellular mechanisms underlying cholinergic and noradrenergic modulation of neuronal firing mode in the cat and guinea pig dorsal lateral geniculate nucleus.

*J Neurosci* 1992, 12:278-289.

MCGINTY D, SZYMUSIAK R:

Brain structures and mechanisms involved in the generation of NREM sleep: focus on the preoptic hypothalamus.

*Sleep Med Rev* 2001, 5:323-342.

MENGUAL E, VELAYOS JL, REINOSO-SUAREZ F:

Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphatase activity matches acetylcholinesterase-rich patches in the medial thalamic nuclei of the cat.

*Brain Res* 1993, 625:165-168.

MICHELUCCI RF, RUBBOLI GF, PASSARELLI DF, RIGUZZI PF, VOLPI LF, PARMEGGIANI LF, RIZZI RF, GARDELLA EF, TASSINARI CA:

Electroclinical features of idiopathic generalised epilepsy with persisting absences in adult life.

*J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996, 61:471-477.

MIDZIANOVSKAIA IS, KUZNETSOVA GD, COENEN AM, SPIRIDONOV AM, VAN LUIJTELAAR EL:

Electrophysiological and pharmacological characteristics of two types of spike-wave discharges in WAG/Rij rats .

*Brain Res* 2001, 911:62-70.

MIHAILESCU S, GUZMAN-MARIN R, DRUCKER-COLIN R:

Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons.

*Eur Neuropsychopharmacol* 2001, 11:359-366.

MIYAZAKI M, KAYAMA Y, KIHARA T, KAWASAKI K, YAMAGUCHI E, WADA Y, IKEDA M:

Possible release of nitric oxide from cholinergic axons in the thalamus by stimulation of the rat laterodorsal tegmental nucleus as measured with voltammetry.

*J Chem Neuroanat* 1996, 10:203-207.

MONTI JM, JANTOS H, MONTI D: I

ncrease of waking and reduction of NREM and REM sleep after nitric oxide synthase inhibition: prevention with GABA(A) or adenosine A(1) receptor agonists.

*Behav Brain Res* 2001, 123:23-35.

MORUZZI G and MAGOUN HW.

Brainstem reticular formation and activation of the EEG.

*Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1, 455-743. 1949.

MURASHIMA YL, YOSHII M, SUZUKI J:  
Role of nitric oxide in the epileptogenesis of EL mice.  
*Epilepsia* 2000, 41 Suppl 6:S195-S199

NAKAMURA M, UCHIDA S, MAEHARA T, KAWAI K, HIRAI N, NAKABAYASHI T,  
ARAKAKI H, OKUBO Y, NISHIKAWA T, SHIMIZU H:  
Sleep spindles in human prefrontal cortex: an electrocorticographic study.  
*Neurosci Res* 2003, 45:419-427.

NAQUET R:  
Photosensitive epilepsy of the baboon *Papio papio*.  
*Proc R Soc Med* 1972, 65:180-Naquet, R.

NEHLIG A, VERGNES M, BOYET S, MARESCAUX C:  
Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS.  
*Epilepsy Res* 1998, 32:206-212.

NOEBELS JL, SIDMAN RL:  
Inherited epilepsy: spike-wave and focal motor seizures in the mutant mouse tottering.  
*Science* 1979, 204:1334-1336.

NOEBELS JL:  
A single gene error of noradrenergic axon growth synchronizes central neurones.  
*Nature* 1984, 310:409-411.

O'DELL TJF, HAWKINS RDF, KANDEL ERF, ARANCIO O:  
Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger .  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, 88:11285-11289.

OKABE S, SANFORD LD, VEASEY SC, KUBIN L:  
Pontine injections of nitric oxide synthase inhibitor l-name consolidate episodes of rem sleep in the rat.  
*Sleep Res Online* 1998, 1:41-48.

OKAMURA H, ABITBOL M, JULIEN JF, DUMAS S, BEROD A, GEFFARD M,  
KITAHAMA K, BOBILLIER P, MALLET J, WIKLUND L:  
Neurons containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by in situ hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus.  
*Neuroscience* 1990, 39:675-699.

PAPE HC, MCCORMICK DA:  
Noradrenaline and serotonin selectively modulate thalamic burst firing by enhancing a hyperpolarization-activated cation current.  
*Nature* 1989, 340:715-718.

PAPE HC, MAGER R:

Nitric oxide controls oscillatory activity in thalamocortical neurons.

*Neuron* 1992, 9:441-448.

PARE D, SMITH Y, PARENT A, STERIADE M:

Projections of brainstem core cholinergic and non-cholinergic neurons of cat to intralaminar and reticular thalamic nuclei.

*Neuroscience* 1988, 25:69-86.

PARMENTIER R, OHTSU H, DJEBBARA-HANNAS Z, VALATX JL, WATANABE T, LIN JS:

Anatomical, physiological, and pharmacological characteristics of histidine decarboxylase knock-out mice: evidence for the role of brain histamine in behavioral and sleep-wake control.

*J Neurosci* 2002, 22:7695-7711.

PATERSON D, NORDBERG A:

Neuronal nicotinic receptors in the human brain.

*Prog Neurobiol* 2000, 61:75-111.

PAUL V, SUBRAMANIAN EH, RAJASEKARAN K:

Pharmacological evidence for a role of gamma-aminobutyric acid A receptor mechanism in modulating nitric oxide synthase activity in rat brain.

*Neurochem Int* 2001, 38:209-211.

PAVONE P, BIANCHINI R, TRIFILETTI RR, INCORPORA G, PAVONE A, PARANO E:

Neuropsychological assessment in children with absence epilepsy.

*Neurology* 2001, 56:1047-1051.

PERLIS ML:

Response to "Do increases in beta EEG activity uniquely reflect insomnia?" (C. H. Bastien and M. H. Bonnet).

*Sleep Med Rev* 2001, 5:379-383.

PERSAD V, CORTEZ MA, SNEAD OC:

A chronic model of atypical absence seizures: studies of developmental and gender sensitivity.

*Epilepsy Res* 2002, 48:111-119.

PINAULT D, SMITH Y, DESCHENES M:

Dendrodendritic and axoaxonic synapses in the thalamic reticular nucleus of the adult rat.

*J Neurosci* 1997, 17:3215-3233.

PINAULT D, VERGNES M, MARESCAUX C:

Medium-voltage 5-9-Hz oscillations give rise to spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy: in vivo dual extracellular recording of thalamic relay and reticular neurons.

*Neuroscience* 2001, 105:181-201.

PRAST HF, PHILIPPU A:

Nitric oxide releases acetylcholine in the basal forebrain.

*Eur J Pharmacol* 1992, 216:139-140.

PRAST HF, FISCHER HF, WERNER EF, WERNER-FELMAYER GF, PHILIPPU A:

Nitric oxide modulates the release of acetylcholine in the ventral striatum of the freely moving rat.

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995, 352:67-73.

PRAST HF, TRAN MHF, FISCHER HF, PHILIPPU A:

Nitric oxide-induced release of acetylcholine in the nucleus accumbens: role of cyclic GMP, glutamate, and GABA.

*J Neurochem* 1998, 71:266-273.

PRAST HF, PHILIPPU A:

Nitric oxide as modulator of neuronal function.

*Prog Neurobiol* 2001, 64:51-68.

PRINCE DA:

Electrophysiology of "epileptic" neurons: spike generation.

*Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1969, 26:476-487.

PRINCE DA:

Cortical inhibitory electrogenesis and focal epilepsy.

*Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1969, 26:334-Prince, D.

QIAO XX, NOEBELS JL:

Genetic and phenotypic heterogeneity of inherited spike-wave epilepsy: two mutant gene loci with independent cerebral excitability defects.

*Brain Res* 1991, 555:43-50.

RODRIGUEZ M, MANTOLAN-SARMIENTO B, GONZALEZ-HERNANDEZ T:

Effects of ethylcholine mustard azirinium ion (AF64A) on the choline acetyltransferase and nitric oxide synthase activities in mesopontine cholinergic neurons of the rat.

*Neuroscience* 1998, 82:853-866.

RUNDFELDT CF, KOCH RF, RICHTER AF, MEVISSSEN MF, GERECKE UF, LOSCHER W:

Dose-dependent anticonvulsant and proconvulsant effects of nitric oxide synthase inhibitors on seizure threshold in a cortical stimulation model in rats.

*Eur J Pharmacol* 1995, 274:73-81.

SAKAI K, JOUVET M:

Brain stem PGO-on cells projecting directly to the cat dorsal lateral geniculate nucleus.

*Brain Res* 1980, 194:500-505.

SAKAI K:

Executive mechanisms of paradoxical sleep.

*Arch Ital Biol* 1988, 126:239-257.

SAKAI K, EL MANSARI M, JOUVET M:

Inhibition by carbachol microinjections of presumptive cholinergic PGO-on neurons in freely moving cats.

*Brain Res* 1990, 527:213-223.

SANDOR NT, BRASSAI A, PUSKAS A, LENDVAI B:

Role of nitric oxide in modulating neurotransmitter release from rat striatum.

*Brain Res Bull* 1995, 36:483-486.

SANTI CM, CAYABYAB FS, SUTTON KG, MCRORY JE, MEZEYOVA J, HAMMING KS, PARKER D, STEA A, SNUTCH TP:

Differential inhibition of T-type calcium channels by neuroleptics.

*J Neurosci* 2002, 22:396-403.

SCHMIDT MHF, VALATX JLF, SCHMIDT HSF, WAUQUIER AF, JOUVET M:

Experimental evidence of penile erections during paradoxical sleep in the rat.

*Neuroreport* 1994, 5:561-564.

SEGIETH JF, FOWLER LF, WHITTON PF, PEARCE B:

Nitric oxide-mediated regulation of dopamine release in the hippocampus in vivo.

*Neuropharmacology* 2000, 39:571-577.

SEIDENBECHER T, PAPE HC:

Contribution of intralaminar thalamic nuclei to spike-and-wave-discharges during spontaneous seizures in a genetic rat model of absence epilepsy.

*Eur J Neurosci* 2001, 13:1537-1546.

SESSA WC:

The nitric oxide synthase family of proteins.

*J Vasc Res* 1994, 31:131-143.

SHAW PJ, SALT TE:

Modulation of sensory and excitatory amino acid responses by nitric oxide donors and glutathione in the ventrobasal thalamus of the rat.

*Eur J Neurosci* 1997, 9:1507-1513.

SLADEK SM, WESTERHAUSEN-LARSON A, ROBERTS JM:

Endogenous nitric oxide suppresses rat myometrial connexin 43 gap junction protein expression during pregnancy.

*Biol Reprod* 1999, 61:8-13.

SMITH JC, WHITTON PS:

Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat.

*Neurosci Lett* 2000, 291:5-8.

SMITH KA, BIERKAMPER GG:

Paradoxical role of GABA in a chronic model of petit mal (absence)-like epilepsy in the rat.

*Eur J Pharmacol* 1990, 176:45-55.

SNEAD OC:

Pharmacological models of generalized absence seizures in rodents.  
*J Neural Transm Suppl* 1992, 35:7-19.

SOHAL VS, HUGUENARD JR:

It takes T to tango.  
*Neuron* 2001, 31:3-4.

SOHAL VSF, KEIST RF, RUDOLPH UF, HUGUENARD JR:

Dynamic GABAA Receptor Subtype-Specific Modulation of the Synchrony and Duration of Thalamic Oscillations.  
*J Neurosci* 2003, 23:3649-3657.

SRINIVAS M, ROZENTAL R, KOJIMA T, DERMIETZEL R, MEHLER M, CONDORELLI DF, KESSLER JA, SPRAY DC:

Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36.  
*J Neurosci* 1999, 19:9848-9855.

STAAK R, PAPE HC:

Contribution of GABA(A) and GABA(B) receptors to thalamic neuronal activity during spontaneous absence seizures in rats.  
*J Neurosci* 2001, 21:1378-1384.

STERIADE M, LLINAS RR:

The functional states of the thalamus and the associated neuronal interplay.  
*Physiol Rev* 1988, 68:649-742.

STERIADE M, PARE D, PARENT A, SMITH Y:

Projections of cholinergic and non-cholinergic neurons of the brainstem core to relay and associational thalamic nuclei in the cat and macaque monkey.  
*Neuroscience* 1988, 25:47-67.

STERIADE M, DATTA S, PARE D, OAKSON G, CURRO DR:

Neuronal activities in brain-stem cholinergic nuclei related to tonic activation processes in thalamocortical systems.  
*J Neurosci* 1990, 10:2541-2559.

STERIADE M, PARE D, DATTA S, OAKSON G, CURRO DR:

Different cellular types in mesopontine cholinergic nuclei related to ponto-geniculo-occipital waves.  
*J Neurosci* 1990, 10:2560-2579.

STERIADE M, MCCORMICK DA, SEJNOWSKI TJ:

Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain.  
*Science* 1993, 262 :679-685.

STERIADE M, CONTRERAS D, CURRO DR, NUNEZ A:  
The slow (< 1 Hz) oscillation in reticular thalamic and thalamocortical neurons: scenario of sleep rhythm generation in interacting thalamic and neocortical networks.  
*J Neurosci* 1993, 13:3284-3299.

STERIADE M, NUNEZ A, AMZICA F:  
Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram.  
*J Neurosci* 1993, 13:3266-3283.

STERIADE M, NUNEZ A, AMZICA F:  
A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components.  
*J Neurosci* 1993, 13:3252-3265.

STERIADE M:  
Sleep oscillations in corticothalamic neuronal networks and their development into self-sustained paroxysmal activity.  
*Rom J Neurol Psychiatry* 1993, 31:151-161.

STERIADE M, AMZICA F:  
Dynamic coupling among neocortical neurons during evoked and spontaneous spike-wave seizure activity.  
*J Neurophysiol* 1994, 72:2051-2069.

STERIADE M:  
Sleep oscillations and their blockage by activating systems.  
*J Psychiatry Neurosci* 1994, 19:354-358.

STERIADE M, CONTRERAS D, AMZICA F:  
Synchronized sleep oscillations and their paroxysmal developments.  
*Trends Neurosci* 1994, 17:199-208.

STERIADE M, AMZICA F, CONTRERAS D:  
Cortical and thalamic cellular correlates of electroencephalographic burst-suppression.  
*Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1994, 90:1-16.

STERIADE M, TIMOFEEV I, GRENIER F:  
Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons.  
*J Neurophysiol* 2001, 85:1969-1985.

STERNAM , MB., MARGARET N.SHOUSE, and PASSOUANT , P.  
*Sleep and epilepsy*. 1982. Academic press.

SZYMUSIAK R, DANOWSKI J, MCGINTY D:  
Exposure to heat restores sleep in cats with preoptic/anterior hypothalamic cell loss.  
*Brain Res* 1991, 541:134-138.

SZYMUSIAK R, ALAM N, MCGINTY D:

Discharge patterns of neurons in cholinergic regions of the basal forebrain during waking and sleep.

*Behav Brain Res* 2000, 115:171-182.

TERADA H, NAGAI T, OKADA S, KIMURA H, KITAHAMA K:

Ontogenesis of neurons immunoreactive for nitric oxide synthase in rat forebrain and midbrain.

*Brain Res Dev Brain Res* 2001, 128:121-137.

TITUS LUCRECIUS CARUS.

De rerum natura.

*Tographeo Clarendoniano*. 1900.

UPTON NF, STRATTON S:

Recent developments from genetic mouse models of seizures.

*Curr Opin Pharmacol* 2003, 3:19-26.

VERGNES MF, MARESCAUX CF, MICHELETTI GF, REIS JF, DEPAULIS AF, RUMBACH LF, WARTER JM:

Spontaneous paroxysmal electroclinical patterns in rat: a model of generalized non-convulsive epilepsy.

*Neurosci Lett* 1982, 33:97-101.

VERGNES MF, MARESCAUX CF, DEPAULIS A:

Mapping of spontaneous spike and wave discharges in Wistar rats with genetic generalized non-convulsive epilepsy.

*Brain Res* 1990, 523:87-91.

VERGNES MF, BOEHRER AF, HE XF, GRENEY HF, DONTENWILL MF, COOK JF, MARESCAUX C:

Differential sensitivity to inverse agonists of GABA(A)/benzodiazepine receptors in rats with genetic absence-epilepsy.

*Epilepsy Res* 2001, 47:43-53.

VINCENT SR, SATOH K, ARMSTRONG DM, FIBIGER HC:

NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for the cholinergic neurons of the pontine reticular formation.

*Neurosci Lett* 1983, 43:31-36.

ZHAN XJF, COX CLF, SHERMAN SM:

Dendritic depolarization efficiently attenuates low-threshold calcium spikes in thalamic relay cells.

*J Neurosci* 2000, 20:3909-3914.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1

### TABLEAUX DE VALEURS

Dans ces tableaux sont présentées les valeurs brutes des proportions de chacun des états considérés : éveil (EV), sommeil lent (SL), sommeil paradoxal (SP) ou épilepsie (EP) durant les 24 h qui ont suivi les injections. Ces valeurs ne sont pas des pourcentages, elles sont obtenues selon la méthode décrite page 62.

Pour chacune des heures, la somme des parts de chaque état n'est pas égale à 100 puisque les moyennes entre les individus sont effectuées à partir du logarithme des rapports "nycthémère après injection" sur "nycthémère avant injection". La moyenne des rapports obtenue est ensuite multipliée par le pourcentage basal pour l'état, la tranche horaire et la souche considérés (GAERS ou Témoin).

<b>CAR</b>	<b>TEMOIN</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>		<b>TOTAL</b>
	1-2	73.43	17.28	4.20		94.91
	3-4	40.62	47.81	14.49		102.92
	5-6	52.19	39.58	8.03		99.80
	7-8	65.50	32.21	6.94		104.65
	9-10	94.70	19.70	0.35		114.75
	11-12	47.59	20.80	2.48		70.87
	13-14	36.37	61.86	3.35		101.58
	15-16	41.02	49.74	10.16		100.92
	17-18	43.13	43.34	9.90		96.37
	19-20	48.28	54.13	10.95		113.37
	21-22	40.12	47.78	11.35		99.25
	23-24	56.56	34.56	8.11		99.23
	<b>GAERS</b>					
<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>	<b>EP</b>	<b>TOTAL</b>	
1-2	84.51	3.29	0.47	3.99	92.25	
3-4	37.29	48.18	4.31	2.30	92.08	
5-6	30.51	53.16	9.37	1.93	94.97	
7-8	45.58	46.39	7.71	2.68	102.35	
9-10	60.44	28.94	2.00	4.68	96.07	
11-12	33.46	53.42	11.66	4.46	103.01	
13-14	33.36	54.76	1.81	3.66	93.59	
15-16	26.70	65.64	6.83	1.48	100.66	
17-18	35.51	57.45	6.67	2.27	101.90	
19-20	33.90	52.19	8.19	3.64	97.92	
21-22	30.28	56.69	7.62	1.94	96.53	
23-24	46.30	38.46	7.27	5.13	97.17	
<b>NACL</b>	<b>TEMOIN</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>		<b>TOTAL</b>
	1-2	72.31	20.88	8.56		101.76
	3-4	54.67	35.12	10.54		100.33
	5-6	51.57	33.56	15.17		100.30
	7-8	72.55	23.75	5.29		101.60
	9-10	88.72	13.19	0.83		102.74
	11-12	60.62	32.58	7.50		100.70
	13-14	33.75	59.86	4.70		98.31
	15-16	32.55	56.95	8.90		98.40
	17-18	36.20	55.26	13.06		104.52
	19-20	39.90	43.29	10.79		93.99
	21-22	44.78	42.10	12.74		99.62
	23-24	53.99	36.09	10.27		100.35
	<b>GAERS</b>					
<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>	<b>EP</b>	<b>TOTAL</b>	
1-2	67.75	20.63	5.28	7.92	101.57	
3-4	52.05	30.53	10.60	7.30	100.48	
5-6	61.02	27.86	6.70	5.38	100.95	
7-8	55.58	30.98	7.41	6.62	100.59	
9-10	57.84	30.11	5.61	7.16	100.72	
11-12	50.82	37.95	7.58	3.71	100.06	
13-14	33.50	53.12	0.90	11.12	98.63	
15-16	34.69	54.29	3.53	6.10	98.62	
17-18	31.83	59.02	8.41	4.12	103.38	
19-20	37.42	47.49	9.62	4.72	99.26	
21-22	35.88	48.67	12.16	4.94	101.65	
23-24	44.67	39.72	11.09	4.75	100.23	

<b>HEX</b>	<b>TEMOIN</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>		<b>TOTAL</b>
	1-2	60.91	25.64	8.44		94.99
	3-4	55.46	34.55	8.06		98.07
	5-6	45.52	40.28	6.35		92.16
	7-8	56.30	39.80	7.39		103.49
	9-10	74.57	17.68	2.60		94.85
	11-12	53.79	38.84	10.94		103.57
	13-14	29.48	68.39	3.60		101.46
	15-16	35.42	58.86	5.07		99.35
	17-18	37.08	52.50	6.03		95.62
	19-20	42.88	64.41	11.53		118.82
	21-22	48.78	40.83	10.75		100.36
	23-24	45.39	42.09	9.94		97.43
	<b>GAERS</b>					
<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>	<b>EP</b>	<b>TOTAL</b>	
1-2	59.44	22.36	1.98	5.86	89.64	
3-4	46.56	37.63	5.54	2.03	91.76	
5-6	43.93	49.63	12.93	1.36	107.85	
7-8	54.57	30.69	7.28	3.91	96.45	
9-10	57.58	32.71	3.17	5.24	98.69	
11-12	38.32	46.83	12.07	3.88	101.10	
13-14	35.34	54.59	1.61	5.99	97.53	
15-16	36.27	48.82	3.78	3.45	92.32	
17-18	29.89	56.39	9.66	2.19	98.13	
19-20	31.04	55.76	18.48	1.97	107.25	
21-22	28.56	61.09	5.42	1.91	96.98	
23-24	56.83	31.67	3.98	9.06	101.55	
<b>SCO</b>	<b>TEMOIN</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>		<b>TOTAL</b>
	1-2	54.78	31.16	9.58		95.52
	3-4	46.99	41.16	5.62		93.77
	5-6	40.17	46.55	16.29		103.01
	7-8	53.02	38.43	7.45		98.89
	9-10	92.11	11.49	0.74		104.34
	11-12	58.09	32.11	4.97		95.17
	13-14	31.58	69.78	1.40		102.76
	15-16	34.24	60.07	5.11		99.42
	17-18	39.23	47.78	9.13		96.14
	19-20	37.41	41.57	8.92		87.90
	21-22	43.00	42.45	11.60		97.05
	23-24	59.87	31.39	10.35		101.62
	<b>GAERS</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>	<b>EP</b>	<b>TOTAL</b>
	1-2	62.28	7.48	0.54	26.77	97.08
	3-4	46.05	26.70	4.39	9.12	86.26
	5-6	62.32	21.43	8.73	4.93	97.41
	7-8	60.21	21.91	4.00	9.25	95.37
	9-10	60.78	15.91	0.82	13.54	91.05
	11-12	54.19	22.75	4.53	11.94	93.41
	13-14	35.80	57.32	0.80	7.76	101.69
	15-16	31.30	59.48	10.25	3.41	104.45
	17-18	22.52	65.87	9.38	1.20	98.97
19-20	36.44	40.78	17.34	4.17	98.72	
21-22	30.64	52.07	8.88	2.27	93.86	
23-24	41.13	42.78	8.55	3.54	96.00	

<b><u>BNI</u></b>	<b>TEMOIN</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>		<b>TOTAL</b>
	1-2	59.50	27.74	6.89		94.13
	3-4	37.70	49.85	12.01		99.56
	5-6	26.71	54.45	23.46		104.62
	7-8	38.43	45.71	25.39		109.53
	9-10	79.05	15.54	0.64		95.23
	11-12	64.21	34.48	5.94		104.62
	13-14	44.84	54.46	1.94		101.24
	15-16	41.61	52.10	5.78		99.49
	17-18	38.00	50.33	10.69		99.03
	19-20	52.87	51.61	13.38		117.86
	21-22	50.28	38.10	10.67		99.05
	23-24	59.66	33.42	6.39		99.48
<b>GAERS</b>						
<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>	<b>EP</b>	<b>TOTAL</b>	
1-2	58.74	22.94	2.64	13.49	97.81	
3-4	31.42	56.37	9.45	4.15	101.37	
5-6	56.61	31.22	5.01	6.36	99.20	
7-8	46.26	34.61	5.17	7.55	93.59	
9-10	60.32	25.73	2.58	12.68	101.30	
11-12	35.95	49.98	9.79	3.83	99.54	
13-14	31.43	66.98	0.58	6.28	105.27	
15-16	26.15	69.48	5.78	3.45	104.87	
17-18	30.78	49.69	3.69	3.03	87.19	
19-20	27.98	51.75	20.22	3.05	103.01	
21-22	27.73	52.65	11.51	3.59	95.48	
23-24	45.53	41.69	9.38	5.07	101.67	
<b><u>MOL</u></b>	<b>TEMOIN</b>					
	<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>		<b>TOTAL</b>
	1-2	58.80	29.42	12.70		100.92
	3-4	58.36	30.91	9.66		98.92
	5-6	52.15	33.26	13.63		99.03
	7-8	72.94	30.19	3.55		106.68
	9-10	81.63	19.14	0.59		101.36
	11-12	52.65	36.26	10.21		99.11
	13-14	24.00	70.54	5.37		99.90
	15-16	32.26	55.23	11.05		98.54
	17-18	29.73	61.65	14.03		105.41
	19-20	20.49	59.48	11.23		91.20
	21-22	45.05	40.72	13.30		99.06
	23-24	40.13	44.74	13.31		98.18
<b>GAERS</b>						
<b>HEURE</b>	<b>EV</b>	<b>SL</b>	<b>SP</b>	<b>EP</b>	<b>TOTAL</b>	
1-2	65.07	22.97	3.01	5.26	96.31	
3-4	38.27	48.55	9.74	2.84	99.40	
5-6	55.36	34.49	7.48	2.26	99.59	
7-8	47.20	38.09	8.15	2.91	96.35	
9-10	68.99	11.26	1.16	8.72	90.13	
11-12	46.03	44.75	8.03	3.56	102.37	
13-14	31.30	64.53	0.25	5.21	101.30	
15-16	34.53	65.19	3.46	2.28	105.46	
17-18	34.79	57.36	5.16	1.99	99.30	
19-20	33.98	52.03	20.07	2.99	109.07	
21-22	29.80	51.58	12.88	1.49	95.75	
23-24	50.27	39.37	6.73	4.17	100.54	

ANNEXE 2

PLANCHE D'IMMUNOHYSTOLOGIE



ANNEXE 3

COLLABORATION

"LIVER ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY AND NO"

# Hepatic Ischemia Is Associated with an Increase in Liver Parenchyma Nitric Oxide That Is in Part Enzyme-Independent

Franck Lhuillier, M.D.,\* Pierre Parmantier, Pharm.D.,\* Joelle Goudable, Ph.D.,† Philippe Crova, M.D.,\* Bertrand Delafosse, M.D., Ph.D.,‡ Guy Annat, M.D., Ph.D.,§ Raymond Cespuoglio, Ph.D.,|| Jean Paul Viale, M.D., Ph.D.#

**Background:** Nitric oxide (NO) might be involved in liver response to local ischemia-reperfusion injury.

**Methods:** A specific NO-sensitive electrode was inserted into liver parenchyma of anesthetized rabbits. After a 45-min period of stable NO signal, the vascular pedicle of the caudal lobe of the liver was clamped for 45 min, then the clamp was removed. Perfusion of the right upper lobe was left unchanged. The same procedure was applied in other animals after administration of a long-acting nonspecific NO synthase inhibitor NAPNA.

**Results:** Occlusion of the caudal pedicle was associated with a mean threefold increase in NO signal measured in the caudal lobe. After unclamping, this signal returned within 8 min to baseline value and remained stable for the next 6 h. In the right upper lobe, NO signal was unaffected by caudal lobe ischemia. By the end of the 6-h reperfusion period, administration of the NO inhibitor L-NAME led to a suppression of the NO signal, thus demonstrating the specificity of the measurement. Plasma nitrate and nitrite concentrations remained almost unchanged during the study period in all groups. In animals whose NO synthases had been previously inhibited by NAPNA, clamping the caudal pedicle for 45 min was still associated with a significant increase in caudal lobe NO signal.

**Conclusion:** Nitric oxide is present in liver parenchyma, and its generation is dramatically affected by an ischemia injury. The increased NO generation during local ischemia is, at least in part, independent of NO synthases.

LIVER ischemia-reperfusion injury is a clinical syndrome occurring most commonly as a result of trauma, hypovolemic shock, liver resection, or liver transplantation. Several studies have suggested that nitric oxide (NO) is involved in liver response to local ischemia-reperfusion injury, but controversial results have been published. In certain circumstances, NO has been reported to have beneficial effects on ischemia-reperfusion injury,<sup>1,2</sup> while other groups have described a cytotoxic role of NO.<sup>3-5</sup>

From a methodologic point of view, estimation of NO production has been usually performed by tissue measurement of the NO synthase (NOS) activity or of derived products such as nitrites and nitrates in blood or

biologic fluids. These methods suffer at least from two main limitations: no results could be obtained during the ischemic period itself, and, moreover, the information they give is delayed with respect to the time of ischemia.

In the current study we describe the kinetics and magnitude of NO production occurring in the liver parenchyma as well as the NOS contribution to NO signal by using a NO-specific electrode in an experimental model of ischemic-reperfusion injury.

## Materials and Methods

### Acute Liver Ischemia Reperfusion Model

The study was performed on 32 New Zealand White rabbits of either sex (weight, 3.0 kg) in an authorized animal care laboratory according to the French health authority and was approved by the University research committee.

The animals were premedicated with xylazine (5 mg/kg administered intramuscularly) and anesthetized with ketamine HCl (50 mg/kg administered intramuscularly). The marginal ear vein was cannulated (20-gauge cannula) for the continuous administration of medium-molecular-weight hydroethyl starch (15 ml/h Elohes 6%; Fresenius France Pharma, Sèvres, France) and to maintain anesthesia by infusion of a mixture of ketamine (3 mg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>) and xylazine (1.5 mg · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>). Adequate depth of anesthesia was ensured before any surgical procedures by the absence of pedal and palpebral reflexes. After tracheostomy, animals were mechanically ventilated (Servo ventilator 900B; Siemens-Elma, Sweden) with 50% oxygen. The tidal volume was set at 15 ml/kg and the respiratory rate at 35 strokes/min. Then the respiratory rate was adjusted to keep the end-tidal carbon dioxide within the physiologic range. End-tidal gas concentrations were measured continuously using a gas analyzer (Capnomac Ultima; Datex, Helsinki, Finland). Systemic blood pressure was monitored using a Gould pressure transducer connected to a 1-mm fluid-filled catheter inserted in the right carotid artery. This catheter was used to take blood samples during the experiment. Body temperature, recorded through a thermistor inserted into the esophagus, was maintained between 38.0 and 39.5°C by means of a heater located above the animal. Limb lead II of the electrocardiogram was continually monitored by means of subcutaneous needle electrodes. Local Xylocaine anesthetic (Astra-Zeneca, Rueil-Malmaison, France) was injected before a

\* Research Fellow, † Assistant Professor of Biochemistry, § Professor of Physiology, UPRES EA 1896, # Professor of Anesthesiology and Intensive Care, || Head of INSERM Unit 480, Université Claude Bernard de Lyon I, Lyon. ‡ Intensivist, Department of Anesthesiology and Intensive Care, Hôpital E Herriot, Lyon, France.

Received from the Laboratoire de Physiologie, Université Claude Bernard de Lyon I, Lyon, France. Submitted for publication May 2, 2002. Accepted for publication August 20, 2002. Supported by a grant from the Société Française d'Anesthésie-Réanimation, Paris, France.

Address reprint requests to Dr. Viale: Department of Anesthesiology and Intensive Care, Hôpital de la Croix-Rousse, 103 Grande rue de la Croix-Rousse, 69317 Lyon, France. Address electronic mail to: jean-paul.viale@chu-lyon.fr. Individual article reprints may be purchased through the Journal Web site, www.anesthesiology.org.

right subcostal laparotomy to provide adequate analgesia. The caudal lobe was identified, and elastic was passed around the caudal pedicle of the liver (around 30% of the total weight of the liver). The elastic ends were threaded through a vinyl tube to make a snare to perform further occlusion and reperfusion.

At the end of the reperfusion period, a nonspecific NOS inhibitor was injected to check the specificity for NO of the voltametric signal recorded. The caudal pedicle was then reoccluded, and diluted Uniprise blue (Ciba-Geigy, Hawthorne, NY) was injected in the ear vein to verify the vascular exclusion of the caudal lobe during ischemia. With this technique, the previously perfused lobes during all the experiments appear blue, whereas the caudal lobe remains unstained. Anesthetized rabbits were then killed by an intravenous injection of KCl.

#### *Measurement of Blood Flow*

Blood flow was measured using a direct laser Doppler velocimetry probe (Perimed, Jarfalla, Sweden). After calibration with a Perimed motility standard kit, a laser Doppler probe, including a small plastic suction disc allowing a nontraumatic contact, was placed on the surface of the hepatic caudal lobe. This probe was connected to a 632-nm helium-neon laser tube and measured flow velocity to a depth of 1 mm before, during, and after the ischemic period.<sup>6</sup>

#### *Nitric Oxide Measurement of the Rabbit Liver*

Nitric oxide generated in the liver parenchyma was measured using a pulse voltametric method, *i.e.*, differential normal pulse voltametry. This method is based on the measurement of the oxidation current yielded by the application of a potential ramp to oxidizable compounds.<sup>7</sup>

Measurements were performed using a three-electrode potentiostatic system displaying the NO sensor as working electrode, a platinum wire (diameter = 100  $\mu\text{m}$ ) as auxiliary electrode, and an Ag/AgCl (diameter = 200  $\mu\text{m}$ ) as reference electrode.

The NO sensor was prepared on the basis of the carbon fiber sensor described elsewhere for catecholamines and 5-hydroxyindoles.<sup>7,8</sup> Its active part, consisting of a carbon fiber (diameter = 30  $\mu\text{m}$ , length = 500  $\mu\text{m}$ ; Textron systems, Wilmington, MA), was first pretreated with a triangular current in 10 mM phosphate-buffered saline and then coated successively with porphyrine-nickel (Interchim, Montluçon, France) and Nafion<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich chimie, Lyon, France), as described previously.<sup>9</sup> The specific NO oxidation current occurred at a potential of +650 mV and was proportional to the NO concentration of the medium.

Differential normal pulse voltametry measurements were performed in the caudal part or the upper right lobe of the liver. The working electrode was inserted into the parenchyma (5-mm depth). Reference and aux-

iliary electrodes were placed in contact with the subcutaneous cellular tissue.

Measurements were taken every 2 min. The carbon fiber surface treatments and the voltametric measurements (peak height) were performed using a Biopulse<sup>®</sup> (Radiometer-Tacussel Society, Villeurbanne, France). After a 45-min steady state of the NO signal, the mean of the last five measurements (10 min) was used as the baseline reference.

#### *Blood Samples*

Transaminases (aspartate amino transferase and alanine amino transferase) were determined in blood samples with a biochemical multianalyzer. The concentration of nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) in plasma was determined by the Griess reaction, as follows. After deproteination by a solution of zinc sulfate, samples were incubated with cadmium granules to reduce nitrate to nitrite; the total nitrite was measured at 540 nm absorbance by diazotization with Griess reagent.<sup>10</sup> The results are expressed as the sum of the *N*-oxides of NO (NO<sub>x</sub>). Serum total proteins were measured to detect a hemodilution by volume loading during the whole procedure. This allowed us to correct the biologic value according to the initial protein concentration and to rule out any dilution effect.

#### *Animal Protocol*

Thirty-two rabbits were divided into five groups. In the caudal ischemia-reperfusion group ( $n = 7$ ), NO electrode was inserted into the caudal parenchyma before a 45-min caudal pedicle occlusion and 6 h of reperfusion. In the upper right lobe group ( $n = 7$ ), NO electrode was inserted into the hepatic upper right lobe parenchyma before a 45-min caudal pedicle occlusion and 6 h of reperfusion. In the control group ( $n = 7$ ), the NO electrode was inserted into the caudal parenchyma without any ischemia. For these first three groups, the specificity for NO of the electrode was tested by injecting intravenously a nonspecific NOS inhibitor, L-NAME (200 mg/kg *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) at the end of the reperfusion period.

To determine whether NOSs are involved in NO production during ischemia-reperfusion, NAPNA (*N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine P-nitro-anilide; Sigma-Aldrich), a long life nonspecific NOS inhibitor, was used. In the NAPNA ischemia-reperfusion group ( $n = 6$ ), the NO electrode was inserted into the caudal parenchyma before infusion of 40 mg/kg intravenous NAPNA during 45 min. This group underwent a 45-min caudal pedicle occlusion and 6 h of reperfusion. In the NAPNA control group ( $n = 5$ ), the NO electrode was inserted into the caudal parenchyma before infusion of 40 mg/kg intravenous NAPNA during 45 min. No ischemia was performed in this group. Blood samples (3 ml) were taken on the right

carotid before ischemia, before reperfusion, 2 min after reperfusion, and then each hour after reperfusion.

#### Drug Treatments

NAPNA, dissolved in 400  $\mu$ l dimethylsulfoxide (Sigma-Aldrich), was diluted in 50 ml saline and slowly administered (45 min) intravenously.

#### Statistical Analysis

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. For biologic data, effect of time was analyzed using a two-way analysis of variance for repeated measurements. Interaction analysis revealed whether effects of ischemia were different between groups. For the NO concentrations, a two-way analysis of variance for repeated measurements was also performed to analyze the effects of ischemia: one for the three groups of animals experiencing ischemia or control, and another one for the two groups experiencing NAPNA inhibition. When the F value was significant, comparisons between means were conducted by a Newman-Keuls test. Statistical significance was assumed at a  $P$  value  $< 0.05$ . Statistical analysis was performed using Statistica version 5 software (StatSoft, Maisons-Alfort, France).

## Results

#### Biologic Data

The time course of protein concentration in plasma showed a continuous decrease ( $P < 0.05$  after 2 h of reperfusion *vs.* time before ischemia for each group) relating to hemodilution during the anesthesia of the rabbits (approximately 9 h). The decrease of plasma protein concentration was not statistically different between the groups.

Aspartate amino transferase and alanine amino transferase plasma concentrations were, respectively, three and five times higher ( $P < 0.05$ ) after 4 h of reperfusion than in the control group (fig. 1). NOx concentrations were significantly increased at 6 h, but interaction analysis of the analysis of variance did not show any group effect (fig. 2).

#### Hepatic Blood Flow and Nitric Oxide Concentrations during Ischemia-Reperfusion

Clamping the caudal pedicle of the liver led to a 60% decrease in caudal blood flow. From the 10th minute after the unclamping, the blood flow returned to pre-clamping level (fig. 3). The evolution of hepatic blood flow during ischemia-reperfusion was the same when rabbits were treated with NAPNA (data not shown).

An immediate and continuous increase in NO concentration in the caudal lobe was induced by the clamping of the caudal hepatic pedicle (fig. 3). By 10 min after clamping, a plateau was reached. It remained stable until

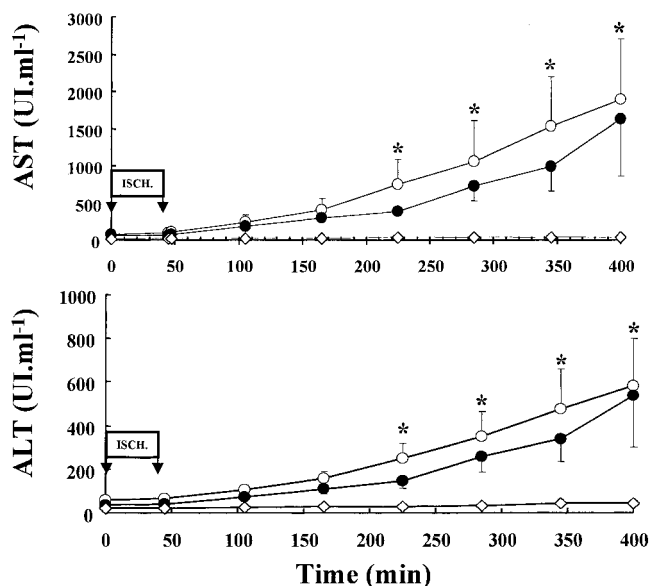


Fig. 1. Time course of aspartate amino transferase and alanine amino transferase (mean  $\pm$  SEM) following a 45-min period of ischemia (Isch) in three groups of animals: animals with a caudal ischemia while the nitric oxide (NO) concentration of the caudal lobe was recorded (open circles), same ischemia while the upper lobe NO concentration was recorded (closed circles), and no ischemia (open diamonds). Plasma activity is expressed in international units per milliliter of plasma at constant protein concentration to include hemodilution effect.  $P < 0.05$  after 4 h of reperfusion compared with the control group.

reperfusion was initiated. However, as indicated by a large SEM, the maximum NO increase varied from one animal to another, ranging from 175 to 480% of the preclamping value. Within 8 min after unclamping, the NO concentration decreased to baseline value and remained stable during the 6 h of reperfusion (fig. 3). Conversely, the NO concentration remained stable in the upper right lobe during the caudal lobe ischemia and reperfusion and in the control group (fig. 3). At the end of the reperfusion period, administration of L-NAME led to a complete suppression of the NO signal.

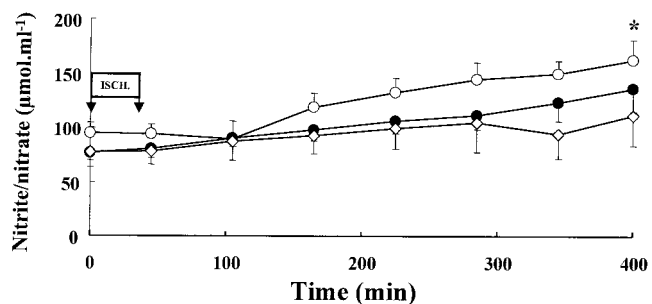


Fig. 2. Time course of nitrites–nitrates concentration (mean  $\pm$  SEM) following a 45-min period of ischemia (Isch). Same symbols as in figure 1 for the three groups of animals. Concentration was statistically higher than baseline after 6 h of reperfusion. No difference was found between the groups.

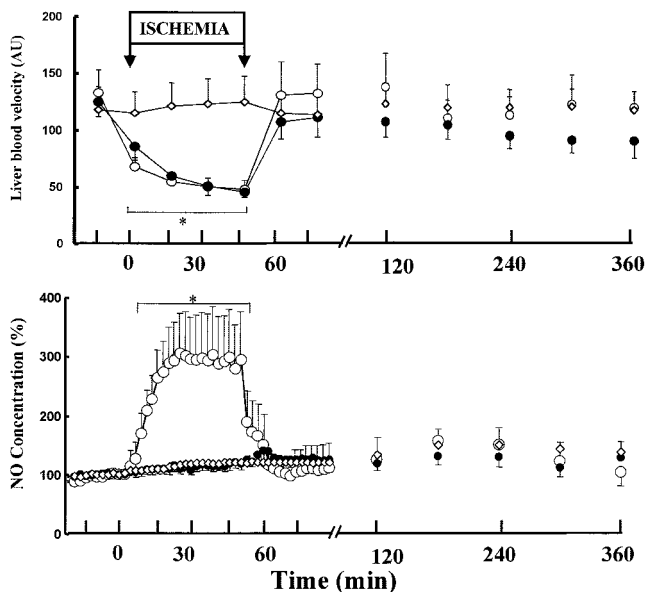


Fig. 3. Liver blood velocity and nitric oxide (NO) concentration before, during, and after ischemia (Isch) in three groups of animals. In the caudal ischemia-reperfusion group (open circles), the NO recordings were performed in the caudal lobe; in the upper right lobe group (closed circles), the NO concentration recordings were made in the upper lobe; in the control group (open diamonds), no ischemia was performed. Values of blood velocity are expressed in arbitrary units (AU). For clarity, SEM of the control group are not displayed. \* $P < 0.05$  for comparison of blood velocities and NO concentration in the caudal lobe before *versus* during ischemia for caudal and upper groups.

#### Effect of NAPNA on Nitric Oxide Concentrations in Liver Parenchyma

Treatment with a 45-min continuous infusion of NAPNA (40 mg/kg) reduced the NO concentration in the liver parenchyma to zero after 45 min, and this effect persisted for at least 150 min (fig. 4). When caudal pedicle was clamped, a continuous increase in NO concentration occurred from the eighth minute of ischemia

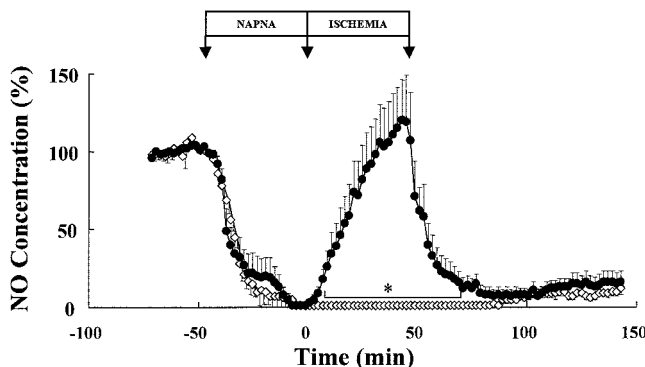


Fig. 4. Time course evolution of nitric oxide (NO) concentrations after infusion of a nonselective NO synthase inhibitor (NAPNA) over a 45-min period in two groups of animals. This administration was followed by an ischemia for 45 min (ischemia) in a group (closed circles), while the other group experienced no ischemia (open diamonds). Values are expressed as percentage of the reference values. \* $P < 0.05$  for comparison of values measured before *versus* during ischemia.

until reperfusion. Within 40 min after unclamping, the NO concentration decreased to zero and remained stable for 90 min. Of the animals treated with NAPNA, four developed intermittent ventricular tachycardia at the end of the NAPNA inhibition period, and four in each group died beyond the 150th minute of reperfusion (data not reported).

## Discussion

The main findings of this study using an NO-sensitive electrode are three. First, NO is present in the normally perfused liver. Second, the concentration of NO increases rapidly following ischemia in the liver, remains elevated during the full time course of ischemia, and is reduced upon reperfusion. Third, the NO production triggered by ischemia is at least partially NOS-independent.

#### Evaluation of Nitric Oxide Production by the Liver

In this study we used a pulse voltametric method yielding a continuous recording of NO concentration. The NO electrode, used together with this voltametric method, was first developed to define the NO concentration in the brain tissue. It has been checked for having an excellent sensitivity and specificity toward the NO biologically released *in vivo*. A linear relation between the voltametric height of the NO signal and the NO concentration has been shown over a range of pH from 4 to 9.<sup>7</sup> The specificity was assessed by its suppression following the injection of nonspecific inhibitors of NOSS at the end of the procedure (L-NAME) or before ischemia (NAPNA). However, our measurements could not presume the type of hepatic cell involved in this NO production because of the space of diffusion of this molecule. Indeed, the diameter of the NO-sensitive electrode was 30  $\mu\text{m}$ , and the space diffusion of NO is usually estimated to be in the range of 100 to 200  $\mu\text{m}$ .<sup>11</sup>

Considering the model of ischemia-reperfusion injury, we used hydroethyl starch infusion for volume support. Indeed, this compound has been shown to decrease organ injury after hepatoenteric ischemia-reperfusion.<sup>12</sup>

#### Effects of Ischemia-Reperfusion on Liver Nitric Oxide Concentration

The effect of tissue ischemia on NO production has been already observed in at least two other studies. Using an electron paramagnetic resonance spectroscopy method, Zweier *et al.*<sup>13</sup> described a 10-fold increase in NO in the ischemic heart. More recently, an increase in NO in gastric tissue was shown after clamping the celiac artery.<sup>13,14</sup> Conversely, Chan *et al.*<sup>15</sup> failed to observe any increase in NO in a model of intestinal ischemia tissues. In the current study, NO concentrations increased after the onset of ischemia to reach a plateau by

10 min. The short delay existing between the onset of ischemia and the increase in NO signal is consistent with the involvement of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). However, nonselective NOS inhibitors administered before ischemia failed to inhibit the increase in NO, whereas NO production remained inhibited in the control group, thereby suggesting the presence of enzyme-independent sources of NO. NO stores are available in tissues and could be mobilized during ischemia. Indeed, the metabolic pathways of NO include the formation of *S*-nitrosothiols, *S*-nitroproteins, as well as nitrosylhemoglobin, which are potential enzyme-independent sources of NO.<sup>16</sup> Another enzyme-independent source for NO might be the endogenous reduction of nitrite and nitrate resulting in the appearance of NO. This mechanism has been demonstrated in ischemic heart and could be the source of NO in the ischemic liver, as the pH is likely to be in the same range as the one observed in the ischemic heart.<sup>17</sup> However, this NO production was dependent on the amount of nitrite-nitrate available in the tissue before ischemia. This could explain the lack of NO increase during ischemia in the intestinal tissue, owing to the low value of the basal NO production observed in this tissue.<sup>15</sup> In addition, NO might be generated from the interaction of hydroxyurea with heme proteins<sup>18</sup> or by heme-bound NO.<sup>19</sup>

The relevance of this finding could be at least twofold. The first is to cast some doubt on the value of nitrite-nitrate concentrations as an index of NO formation during ischemia-reperfusion injury, as the process of ischemia itself could reduce the amount of nitrite-nitrate. In fact, throughout our study the concentrations of nitrite and nitrate remained fairly stable. The second clinical relevance is a potential explanation of the conflicting results observed in studies estimating the role of NOS inhibition in septic shock. Numerous lines of evidence led to the suggestion that NO plays a major role in the circulatory alterations occurring in septic shock. As a consequence, many experimental studies<sup>20-22</sup> as well as some clinical trials<sup>23-25</sup> have aimed at blocking the effects of NO by using selective or nonselective NOS inhibitors. According to our results, the administration of NOS inhibitors does not rule out any NO production in some areas or in some particular experimental model of septic shock with ischemia and acidosis. This could be a contributing factor to the discrepancies observed among these studies.

The exact role of this NOS-independent production of NO remains unanswered and speculative. The first refers to the physiologic effects of NO.<sup>26</sup> It could be thought that this NO contributes to maintain relaxation of vascular smooth muscles and hence vasodilatation in underperfused areas. This could lead at the same time to inhibition of platelet aggregation and leukocyte adhesion and activation. Turning to other roles of NO, this production during ischemia could be viewed as part of a

general mechanism brought into play to adapt to hypoxic conditions. It has been shown that NO reversibly inhibits mitochondrial respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase.<sup>27</sup> It seems likely that this inhibition mediates a general metabolic suppression, including oxygen consumption, glucose and protein synthesis, and ion transport.<sup>28</sup> All of these cellular processes are thought to be regulated in conditions where NO is produced by ischemia.

The decrease of NO concentration associated with the reperfusion phase, already observed in previous studies,<sup>14</sup> could be explained by several mechanisms. Besides the washout of NO brought about by blood flow following reperfusion, the waning of the acidotic period could account for the decrease in NO. Another contributing factor could be the reaction of NO with superoxide radicals generated during the reperfusion period.<sup>29,30</sup>

Our study demonstrates that the use of an NO-sensitive electrode *in vivo* could be a new specific tool to investigate more accurately changes in NO production, especially when rapid alterations of NO concentration are expected. This work demonstrates that the generation of NO is a local, time-dependent response to liver ischemia and is at least partly independent of NOS.

The authors thank Yoram Vodovotz, Ph.D. (University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA), for his helpful comments; and Florence Arnal (Research Technician, UPRES EA 1896, Faculté de Médecine, Rockefeller, Lyon, France) and Colette Rousset (Research Technician, INSERM U480, Faculté de Médecine, Rockefeller, Lyon, France) for their excellent technical assistance.

## References

1. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferrareso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P: The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol* 1997; 183:477-85
2. Uhlmann D, Scommatou S, Witzigmann H, Spiegel HU: Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia reperfusion injury. *Eur Surg Res* 1998; 30:175-84
3. Li J, Billiar TR: Nitric oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999; 276:G1069-73
4. Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlis G, Tiegls G, Wendel A: Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 1995; 22:1829-37
5. Wang Y, Mathews WR, Guido DM, Farhood A, Jaeschke H: Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock* 1995; 4:282-8
6. Shepherd AP, Riedel GL: Continuous measurement of intestinal mucosal blood flow by laser-Doppler velocimetry. *Am J Physiol* 1982; 242:G668-72
7. Cespuoglio R, Faradji H, Ponchon JL, Buda M, Riou F, Gonon F, Pujol JF, Jouvet M: Differential pulse voltammetry in brain tissue. I. Detection of 5-hydroxyindoles in the rat striatum. *Brain Res* 1981; 223:287-98
8. Suaud-Chagny MF, Cespuoglio R, Rivot JP, Buda M, Gonon F: High sensitivity measurement of brain catechols and indoles *in vivo* using electrochemically treated carbon-fiber electrodes. *J Neurosci Methods* 1993; 48:241-50
9. Bulet S, Cespuoglio R: Voltammetric detection of nitric oxide (NO) in the rat brain: Its variations throughout the sleep-wake cycle. *Neurosci Lett* 1997; 226:131-5
10. Vodovotz Y: Modified microassay for serum nitrite and nitrate. *Biotechniques* 1996; 20:390-2, 394
11. Lancaster JR Jr: Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:8137-41
12. Nielsen VG, Tan S, Brix AE, Baird MS, Parks DA: Hextend (hetastarch solution) decreases multiple organ injury and xanthine oxidase release after hepatoenteric ischemia-reperfusion in rabbits. *Crit Care Med* 1997; 25:1565-74
13. Zweier JL, Wang P, Kuppusamy P: Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* 1995; 270:304-7

14. Wada K, Kamisaki Y, Ohkura T, Kanda G, Nakamoto K, Kishimoto Y, Ashida K, Itoh T: Direct measurement of nitric oxide release in gastric mucosa during ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol* 1998; 274:G465-71
15. Chan KL, Zhang XH, Fung PC, Guo WH, Tam PK: Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. *Br J Surg* 1999; 86:1427-32
16. Kelm M: Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:273-89
17. Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P: Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411:250-62
18. Pacelli R, Taira J, Cook JA, Wink DA, Krishna MC: Hydroxyurea reacts with heme proteins to generate nitric oxide (letter). *Lancet* 1996; 347:900
19. Kuppusamy P, Shankar RA, Roubaud VM, Zweier JL: Whole body detection and imaging of nitric oxide generation in mice following cardiopulmonary arrest: Detection of intrinsic nitrosoheme complexes. *Magn Reson Med* 2001; 45:700-7
20. Szabo C, Ferrer-Sueta G, Zingarelli B, Southan GJ, Salzman AL, Radi R: Mercaptoethylguanidine and guanidine inhibitors of nitric-oxide synthase react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage. *J Biol Chem* 1997; 272:9030-6
21. Liaudet L, Fishman D, Markert M, Perret C, Feihl F: L-canavanine improves organ function and tissue adenosine triphosphate levels in rodent endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1643-8
22. Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerberg J: Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am J Physiol* 1993; 264:H660-3
23. Lorente JA, Landin L, Canas P, Delgado MA, Albaya A, Renes E, Jorge P, Liste D: Effects of nitric oxide synthase inhibition on the cardiovascular response to low output shock. *Crit Care Med* 1996; 24:482-7
24. Petros A, Lamb G, Leone A, Moncada S, Bennett D, Vallance P: Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res* 1994; 28:34-9
25. Grover R, Zaccardelli D, Colice G, Guntupalli K, Watson D, Vincent JL: An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. *Crit Care Med* 1999; 27:913-22
26. Moncada S, Higgs EA: Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:361-74
27. Brown GC: Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase. *FEBS Lett* 1995; 369:136-9
28. Brown GC, Foxwell N, Moncada S: Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages. *FEBS Lett* 1998; 439:321-4
29. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:1620-4
30. Miller MJ, Sandoval M: Nitric oxide. III. A molecular prelude to intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999; 276:G795-9

**PARMANTIER Pierre**

Implications de l'acétylcholine et du monoxyde d'azote dans les interactions entre l'épilepsie-absence et le sommeil.

Th. D. Pharm. Lyon 1, 2003, 122 p.

**RESUME**

La survenue des décharges de pointes-ondes (DPO) caractéristiques de l'épilepsie-absence (ou "petit-mal") est étroitement corrélée avec les rythmes d'éveil et de sommeil. En effet, elles apparaissent principalement (tant chez l'homme que dans le modèle *Genetic Absence Epileptic Rat from Strasbourg* ou GAERS) en fin d'éveil ou au début du sommeil lent. Lors de cette transition physiologique, une structure thalamique (le noyau réticulé thalamique ou nRT) assure la genèse de l'activité électroencéphalographique dite en "fuseaux" dont les DPO pourraient être une déviance.

Les données préexistantes sur les effets anti-absence de l'acétylcholine (ACh) et du monoxyde d'azote (NO) (qui sont très impliqués dans la régulation des états de veille et de sommeil) nous ont poussés à étudier l'influence de ces deux messagers neuronaux sur le nRT dans la régulation des DPO.

Les influences cholinergiques et NO-ergique d'origine pontique ont donc été simulées par des micro-injections locales dans le nRT et les effets induits sur les DPO et les états de veille et de sommeil ont été analysés.

Nos travaux ont suggéré que l'ACh libérée dans le nRT pendant l'éveil empêche la genèse des fuseaux et des DPO probablement en diminuant l'activité phasique des neurones du nRT. L'ACh peut donc être le déterminant commun entre DPO et fuseaux du sommeil lent.

Nos travaux ont montré aussi que le NO exogène peut, dans le nRT des rats GAERS, favoriser les fuseaux du sommeil et empêcher les DPO sans modifier la succession physiologique des états de veille et de sommeil. Nous avons vu aussi que l'enzyme neuronale de synthèse du NO était peut-être absente ou inactive chez le rat GAERS. Le NO peut donc être le déterminant différentiel entre DPO et fuseaux du sommeil lent.

Après la synthèse de nos données avec la littérature concernant la mise en place des fuseaux du sommeil et la physiopathologie des DPO, nous proposons l'étude de l'utilisation des molécules activant la voie du NO en tant qu'anti-absence.

**MOTS CLES**

Epilepsie  
Sommeil  
Monoxyde d'azote  
Acétylcholine

**JURY**

M RENAUD Bernard, Professeur  
M RYVLIN Philippe, Professeur  
M VALATX Jean-Louis, Directeur de Recherche  
M CESPUGLIO Raymond, Directeur de Recherche

**DATE DE SOUTENANCE**

Lundi 30 juin 2003