

Jean-Marc Fritschy, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich

### Résumé

L'acide g-aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le système nerveux central. Les neurones GABAergiques jouent un rôle essentiel dans le contrôle du niveau d'excitabilité des réseaux neuronaux. De nombreux médicaments antiépileptiques agissent en augmentant l'efficacité de la neurotransmission GABAergique. Dans cet article, nous présentons les résultats d'un travail récent démontrant un changement radical du rôle de la neurotransmission GABAergique au sein du focus épileptique dans du tissu prélevé à des fins thérapeutiques chez des patients souffrant d'une épilepsie mésiale du lobe temporal. Chez ces patients, la résection englobe la formation hippocampale et une partie du cortex temporal adjacent. L'hippocampe proprement dit présente une sclérose prononcée, due à une mort neuronale extensive. Des enregistrements électrophysiologiques dans ce tissu démontrent la présence de neurones spontanément actifs dans le subiculum, qui est la voie de sortie de l'hippocampe en direction du cortex. L'activité de ces cellules correspond aux pointes-onde interictales mesurables par électroencéphalographie et qui sont typiques de cette forme d'épilepsie. De plus, ce travail démontre que ces décharges rythmiques spontanées sont dues spécifiquement à une perte de la fonction inhibitrice de la GABA. La présence d'un focus épileptique en dehors de la partie sclérosée de la formation hippocampale explique la persistance des crises récurrentes en dépit de la mort neuronale. En outre, ces résultats suggèrent que des altérations moléculaires affectant la fonction de la GABA sont à l'origine des activités interictales dans l'épilepsie médiale du lobe temporal. Ce travail présente donc de nouvelles pistes à explorer en vue d'améliorer l'intervention pharmacologique contre cette maladie.

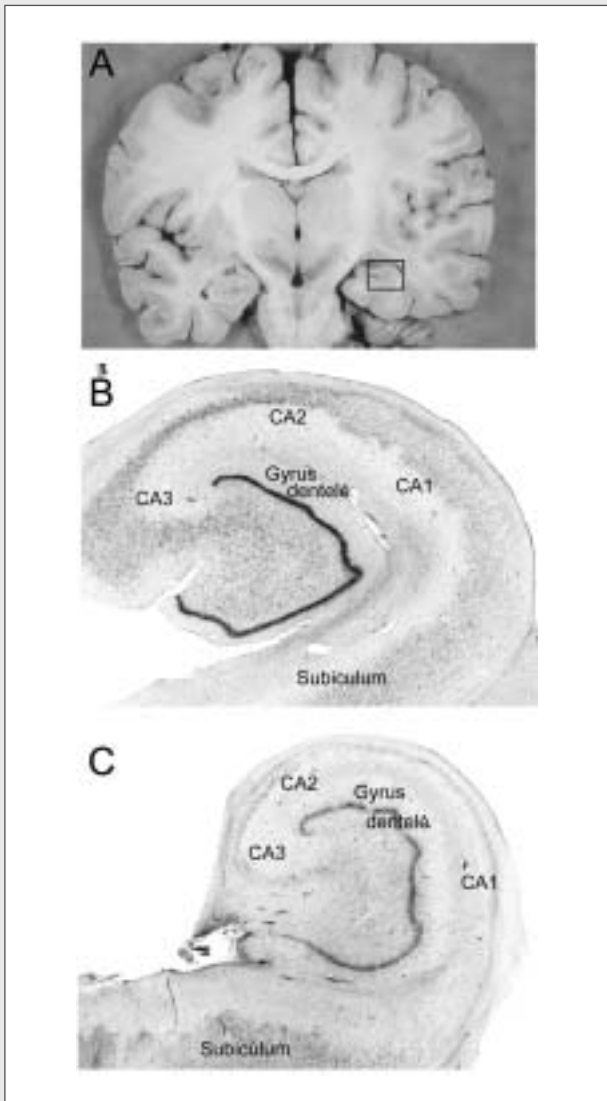
### Summary: On the role of GABAergic neurotransmission in mesial temporal lobe epilepsy

g-Aminobutyric acid is the main inhibitory neurotransmitter in the central nervous system. GABAergic neurons play an essential role in controlling the level of excitability of neuronal networks. Numerous antiepileptic drugs act by increasing the efficacy of GABAergic neurotransmission. In this article, we present the results of a recent study demonstrating a shift in the function of GABAergic transmission within the epileptic focus in tissue resected for therapeutic reasons in patients with intractable mesial temporal lobe epilepsy. In these patients, the resection comprises the hippocam-

pal formation and parts of the adjacent temporal cortex. The hippocampus proper presents with a severe sclerosis, due to massive loss of neurons. Electrophysiological recordings in such tissue revealed the presence of spontaneously active neurons in the subiculum, a region which relays the output of the hippocampus to the cerebral cortex. The spontaneous discharges of subicular neurons were shown to correspond to interictal spikes and waves measured electroencephalographically, which are typical of this form of epilepsy. Furthermore, this study demonstrated that the rhythmic discharges of subicular neurons were due to a loss of the inhibitory function of GABA. The presence of an epileptic focus outside of the sclerotic part of the hippocampus explains the persistence of recurrent seizures in spite of neuronal death. In addition, these results suggest that molecular alterations affecting the function of GABA give rise to interictal discharges in mesial temporal lobe epilepsy. This study opens therefore new avenues for improved pharmacotherapeutic intervention against this disease.

Epileptologie 2003; 20: 2 - 7

L'épilepsie mésiale du lobe temporal est une forme répandue d'épilepsie partielle complexe. Elle est caractérisée par la récurrence de crises focales ayant leur origine dans la formation hippocampale<sup>[1]</sup>, une partie phylogénétiquement ancienne du cortex cérébral qui forme la région la plus interne du lobe temporal (Fig. 1A), et qui joue un rôle essentiel dans les processus de mémoire, d'apprentissage, et dans la régulation des aspects cognitifs de nos émotions. Chez de nombreux patients souffrant d'une épilepsie mésiale du lobe temporal, cette maladie se traduit par une dégénérescence marquée de l'hippocampe proprement dit, détectable en imagerie magnétique nucléaire; on parle alors de sclérose hippocampale et elle correspond à une profonde perte de neurones dans l'hippocampe (Fig. 1B-C). Cette forme particulière d'épilepsie représente une majorité des épilepsies « pharmacorésistantes ». En l'absence de traitement pharmacologique efficace, la résection chirurgicale représente une alternative thérapeutique d'une efficacité reconnue pour les patients concernés<sup>[2]</sup>. Bien que nombreux groupes de recherche fondamentale se soient intéressés à l'analyse du tissu prélevé chez les patients subissant cette opération, les mécanismes pathophysiologiques de cette maladie restent largement méconnus. De plus, il serait très souhaitable de pouvoir développer des traitements plus efficaces à fin d'éviter l'intervention chirurgicale autant que possible.



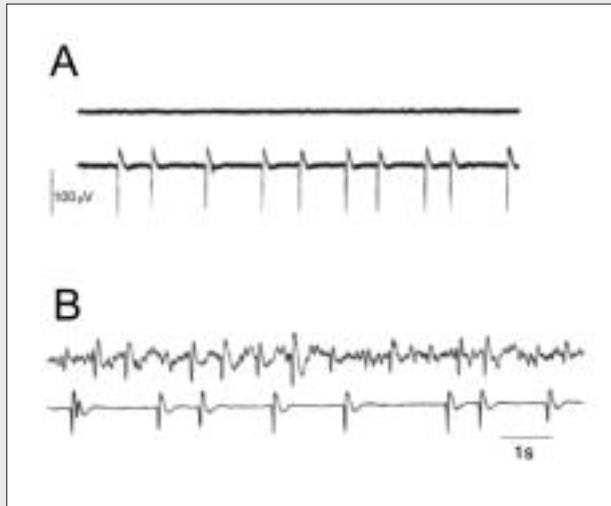
**Figure 1**  
 A) Coupe transversale d'un cerveau humain montrant la position de la formation hippocampale dans la partie interne du lobe temporal (cadre). B) Histologie de l'hippocampe humain normal, telle que vue dans des coupes colorées en violet de crésyl. Ce marquage met en évidence l'ensemble des cellules nerveuses et permet de distinguer les différentes régions de la formation hippocampale [gyrus dentelé, hippocampe proprement dit (régions CA1, CA2, CA3), subiculum, et cortex entorhinal]. C) Histologie de l'hippocampe d'un patient épileptique, prélevé chirurgicalement à des fins thérapeutiques. La sclérose est mise en évidence par une réduction marquée de la taille de l'hippocampe, due à une perte massive de neurones dans différentes régions de l'hippocampe, notamment la région CA1. Noter que le subiculum (qui n'est que partiellement visible dans ces coupes), n'est apparemment pas touché par la sclérose.

Un travail récent, publié dans la revue « Science » du 15 novembre 2002 par l'équipe du Dr. Richard Miles de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière de Paris [3] apporte un nouvel éclairage sur deux questions fondamentales touchant à la pathophysiologie de l'épilepsie mésiale du lobe temporal. D'une part, ce travail s'est intéressé à déterminer dans quelle région des neurones spontanément actifs, responsables des activités intercritiques, sont localisés. En d'autres termes, ces chercheurs ont déterminé où se trouve précisément le « pace-maker » du focus épileptogénique. Lors d'enregistrements électroencéphalographiques effectués à des fins diagnostiques chez les personnes épileptiques, ces activités « pace-maker » apparaissent comme des pointes-ondes rythmiques régulières durant les intervalles entre les crises. Ces activités intercritiques sont considérées comme le reflet d'un niveau d'excitabilité trop élevé dans la région focale, pouvant en tout temps dégénérer en une crise épileptique. D'autre part, les chercheurs ont analysé quels neurotransmetteurs sont impliqués dans ces activités intercritiques. Ils se sont penchés sur les deux neurotransmetteurs principaux, le glutamate et la GABA, qui exercent normalement une fonction opposée dans le système nerveux central (voir encart 1). Le glutamate est le messager impliqué dans la transmission de signaux entre les neurones, alors que la GABA a un rôle inhibiteur et sert à contrôler le niveau d'excitabilité des réseaux neuronaux. Une perte d'efficacité de la GABA peut se traduire dans la naissance de crises épileptiques et de nombreux médicaments anti-épileptiques agissent en augmentant l'action de la GABA [4].

Pour la première partie du travail, les chercheurs ont effectué des enregistrements électrophysiologiques extracellulaires durant plusieurs heures dans des tranches de tissu réséqué chirurgicalement et maintenues en vie dans du liquide céphalo-rachidien artificiel. Ces enregistrements mettent en évidence la présence de neurones spontanément actifs in vitro, suggérant que ces cellules représentent le focus épileptique in vivo. La seconde partie, quant à elle, visait à déterminer l'origine de ces décharges spontanées. Elle est basée sur des enregistrements intracellulaires utilisant des agents pharmacologiques spécifiques pour bloquer l'action du glutamate ou de la GABA dans les neurones étudiés.

Les résultats sont fascinants, car ils démontrent que le siège de décharges neuronales spontanées de type 'pace-maker', ne se trouve pas, comme prévu, dans l'hippocampe. Au contraire, de telles cellules nerveuses ne furent trouvées que dans le subiculum (Fig. 2A), une région de transition entre l'hippocampe à proprement parler et le néocortex et qui sert de voie de sortie vers le cortex temporal. Le rythme de ces décharges spontanées était très proche de la fréquence des activités intercritiques enregistrées par électroencéphalogramme avant l'opération (Fig. 2B). Cette observation suggère que les activités de type pointe-onde intercritiques sont générées dans le subiculum chez les patients épileptiques. Comme le subiculum communique avec de

nombreuses régions du lobe temporal, il devient facile d'imaginer qu'une crise épileptique prenant naissance dans le subiculum puisse rapidement entraîner de larges régions du cortex et donner lieu aux symptômes bien connus de cette maladie. Ce résultat répond en outre aux nombreuses interrogations des chercheurs qui étaient bien à mal d'expliquer jusqu'ici comment l'hippocampe sclérosé, qui contient un nombre très réduit de cellules nerveuses, pouvait générer des crises épileptiques.



**Figure 2**  
Enregistrements électrophysiologiques extracellulaires dans des tranches de tissu prélevé chirurgicalement chez un patient épileptique (adapté de [3]). A) Présence sélective de décharges spontanées et rythmiques dans le subiculum (trace inférieure) mais pas dans la région CA1 (trace supérieure). Ces décharges, qui correspondent à l'activité simultanée de plusieurs neurones, sont visibles par l'inflexion à intervalles réguliers de la trace d'enregistrement. B) Parallélisme entre les pointes-ondes intercritiques enregistrées *in vivo* par électroencéphalographie avant l'opération chirurgicale (trace supérieure) et les décharges spontanées enregistrées *in vitro* par électrophysiologie sur tranche (trace inférieure). Noter la similitude du rythme d'activité dans les deux enregistrements, qui indique que les décharges spontanées dans le subiculum *in vitro* représentent les pointes-ondes *in vivo*.

Armés de ce résultat, les chercheurs ont ensuite étudié quels neurotransmetteurs participent à l'activation spontanée des neurones du subiculum. Pour ce faire, ils ont empalé des cellules individuelles avec une électrode très fine pour enregistrer leur activité électrique dans des conditions contrôles et durant le blocage pharmacologique de la neurotransmission glutamatergique et GABAergique (voir encart 1). Ils se sont intéressés aussi bien aux cellules pyramidales, qui transmettent l'information dans d'autres régions du cortex, qu'aux interneurons, dont le rôle est de contrôler localement l'activité neuronale (voir encart 2). A leur grande surprise, ils ont observé dans certaines cellules pyramidales que les deux types de transmetteurs étaient impliqués dans

la genèse des décharges spontanées. Même la GABA, qui est en principe un transmetteur inhibiteur, était capable d'activer les cellules pyramidales dans le subiculum « épileptique ». Ce résultat surprenant signifie que les neurones du subiculum ont largement perdu leur frein naturel, ce qui explique peut-être la genèse des décharges spontanées. Il y a plusieurs explications possibles à ce phénomène (voir encart 3), mais la plus plausible est que des altérations moléculaires affectent la fonction naturelle de la GABA dans le tissu épileptique.

Une autre observation importante récoltée dans la deuxième partie de cette étude est que les neurones excités par la GABA sont actifs exactement durant les phases de décharges spontanées caractérisées par les enregistrements extracellulaires. Ceci signifie que la cause primaire des décharges spontanées est l'inversion de la fonction de la GABA de transmetteur inhibiteur à transmetteur excitateur.

L'équipe du Dr. Miles [3] est la première à démontrer que des altérations fonctionnelles importantes peuvent avoir lieu dans du tissu considéré jusqu'ici comme « sain ». En effet, d'un point de vue morphologique, rien ne distingue le subiculum d'un patient épileptique par rapport à celui d'un contrôle. De plus, ce résultat indique que les changements fonctionnels liés à l'épilepsie peuvent impliquer des processus moléculaires affectant la neurotransmission synaptique sélectivement dans certaines régions du cerveau.

Ce travail s'inscrit dans une lignée de tentatives d'effectuer des enregistrements électrophysiologiques dans du tissu prélevé sur des patients épileptiques. Il jette un regard nouveau sur des mécanismes complexes, et surtout, il fournit des pistes intéressantes à analyser dans l'avenir. La première question sera de déterminer pour quelle(s) raison(s) la GABA perd son rôle de transmetteur inhibiteur dans le focus épileptique. S'agit-il d'une réduction du nombre de pompes d'extrusion du chlore (voir encart 3) ou d'une diminution de leur fonction? La seconde question sera d'établir comment apparaissent ces activités de type 'pace-maker' dans le subiculum? Est-ce une conséquence de la perte neuronale dans l'hippocampe, ou, au contraire, la perte neuronale est-elle causée par la répétition des crises dues à une autre cause? Finalement, dans l'optique d'une amélioration de la pharmacothérapie, il sera intéressant d'étudier s'il est possible de rétablir le fonctionnement normal de ces pompes d'extrusion du chlore, et par-là de réduire l'excitabilité des neurones dans le focus.

## Encart 1

### La neurotransmission synaptique glutamatergique et GABAergique

L'immense majorité des synapses dans le système nerveux central utilise comme neurotransmetteur soit l'acide glutamique (ou glutamate), soit l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA). Ces substances sont libérées lors de la transmission synaptique et activent des récepteurs dont le rôle est de changer le niveau d'activité de la cellule postsynaptique. Typiquement, le glutamate va activer des récepteurs 'excitateurs', c'est-à-dire qui augmentent l'activité électrique de la cellule postsynaptique, alors que la GABA va activer des récepteurs inhibiteurs et donc réduire l'activité de la cellule postsynaptique. L'action du glutamate est due à un influx de cations (sodium et calcium) qui augmente le potentiel de la membrane cellulaire (dépolarisation) et génère des potentiels d'action, alors que la GABA conduit à un influx d'anions chlore ( $\text{Cl}^-$ ), provoquant une baisse du potentiel de membrane (hyperpolarisation) de la cellule postsynaptique (Figure 3). En outre, cet influx d'anions conduit à une baisse notable de la résistance membranaire qui empêche sa dépolarisation par d'éventuels influx cationiques simultanés dans des synapses voisines.

L'action conjuguée du glutamate et de la GABA devient évidente si l'on considère les réseaux neuronaux qui forment l'essentiel du cerveau. Le glutamate permet la transmission de signaux d'une cellule à l'autre au sein du réseau, alors que la GABA veille à contrôler le niveau d'activité dans une marge raisonnable. Par analogie, dans une voiture, le glutamate correspondrait à l'accélérateur et la GABA au frein. Il faut ajouter toutefois qu'une autre fonction de la GABA est de permettre une synchronisation de l'activité des cellules formant un circuit donné dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Ceci est dû à l'organisation des connections synaptiques au sein du réseau. Il existe des cellules GABAergiques spécialisées (interneurones, voir encart 2) qui contrôlent plusieurs centaines de neurones glutamatergiques simultanément. Dans les conditions expérimentales, une augmentation pathologique de l'activité de ces cellules GABAergiques peut conduire à une hypersynchronisation des cellules glutamatergiques et déclencher une crise épileptique.

D'une manière générale, les substances pharmacologiques qui potentialisent l'effet de la GABA, telles que les barbituriques ou les benzodiazépines, ont un effet anti-épileptique en augmentant « la force de freinage », alors que les substances qui réduisent l'effet de la GABA induisent des convulsions. Ces dernières n'ont pas d'application clinique mais sont utilisées expérimentalement. Il existe également des substances qui permettent de bloquer l'action des récepteurs au glutamate et à la GABA à fin de déterminer lequel de ces transmetteurs est impliqué dans la genèse d'un signal électrophysiologique.

En résumé, le rôle de la neurotransmission GABAergique est de synchroniser l'activité neuronale dans le CNS et de veiller à éviter tout « débordement ». Une altération du système GABAergique a été mise en évidence dans l'étude présentée ici, qui produit une activation spontanée rythmique des cellules pyramidales du subiculum correspondant aux pointes-ondes intercritiques.

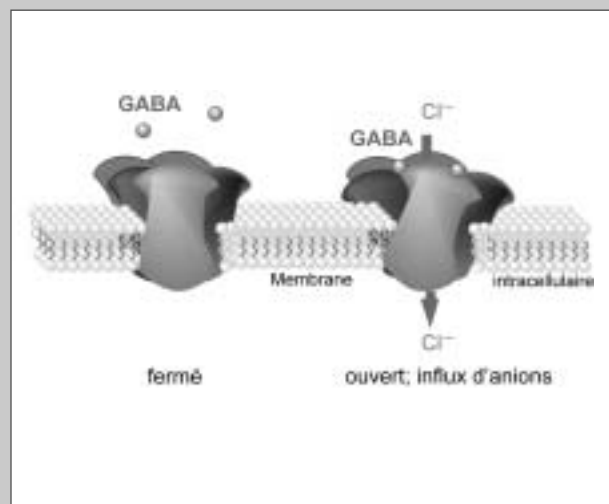


Figure 3

Représentation schématique d'un récepteur à la GABA. Ce récepteur est un complexe de cinq protéines localisé dans la membrane cellulaire qui forme un canal transmembranaire. Normalement, ce canal est fermé. La liaison des molécules de GABA sur le récepteur produit un changement de conformation qui ouvre le canal et permet l'influx immédiat d'anions chlore. L'ouverture du récepteur est rapide ( $< 1$  milliseconde) et brève (10-20 millisecondes). Ce temps est toutefois suffisant pour produire un influx d'anions chlore, dont l'effet est de réduire l'excitabilité de la cellule concernée. La membrane cellulaire, qui est formée par une double couche de lipides, est imperméable aux anions et aux cations. Chaque neurotransmetteur active un type différent de récepteur, ce qui explique la sélectivité de l'action de chacune de ces substances.

## Encart 2

### Interneurones et cellules pyramidales

Dans le cortex cérébral et l'hippocampe, on trouve deux types principaux de cellules nerveuses, les cellules pyramidales et les interneurones (Fig. 4). Les cellules pyramidales doivent leur nom à la forme pointue de leur corps cellulaire. Elles représentent environ 90% du nombre total de neurones dans le cortex cérébral et l'hippocampe. Elles possèdent une longue dendrite apicale, orientée verticalement en direction de la surface du cerveau, plusieurs dendrites basales et un axone qui se projette à de grandes distances dans d'autres régions du cerveau (Fig. 4A). Les cellules pyramidales reçoivent des milliers de contacts synaptiques et utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Elles forment l'unité de base pour le traitement et l'envoi d'information au sein du cortex cérébral.

Les interneurones portent ce nom, car leur axone reste à proximité du corps cellulaire. Ce sont des neurones responsables du contrôle « local » de l'activité des cellules pyramidales. Les interneurones sont très variés dans leur forme et leur fonction (Fig. 4C). Ils utilisent toutefois la GABA comme neurotransmetteur et représentent donc les cellules inhibitrices du cortex cérébral. Les interneurones sont relativement peu nombreux (environ 10% du nombre total de neurones) mais chacun d'entre eux est « responsable » du contrôle de plusieurs centaines de cellules pyramidales par le biais de connexions synaptiques très diversifiées et particulièrement efficaces.

La distinction entre ces deux types fondamentaux de cellules nerveuses a été faite il y a près de 100 ans par le fameux neurobiologiste espagnol Santiago Ramón y Cajal, sur la base de critères morphologiques (Fig. 4B), mais ce n'est que depuis peu que l'on découvre le rôle fondamental des interneurones dans le contrôle et la synchronisation de l'activité des cellules pyramidales.

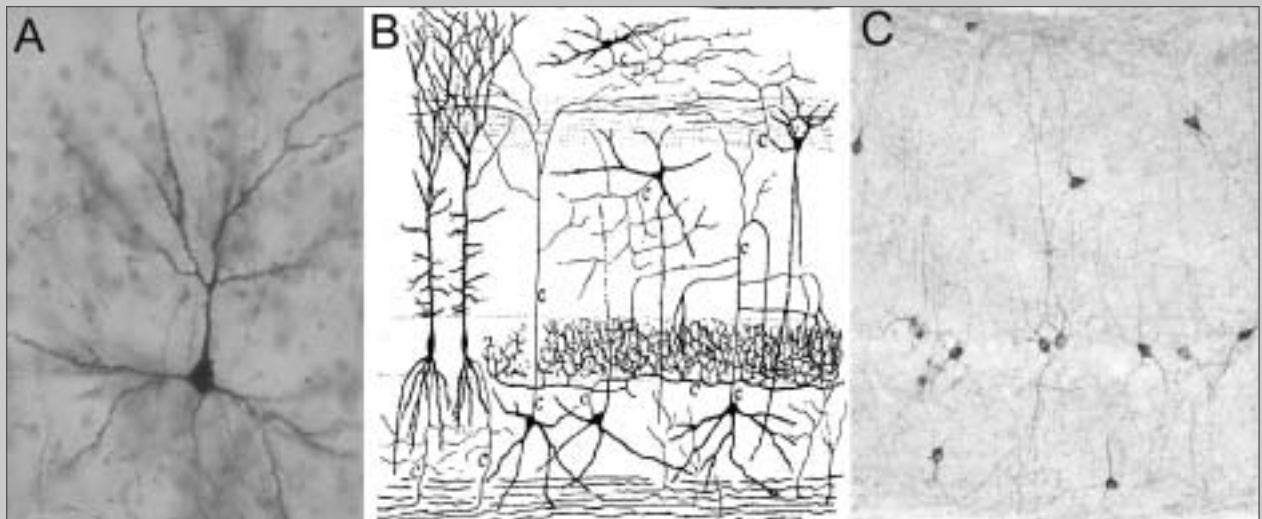


Figure 4

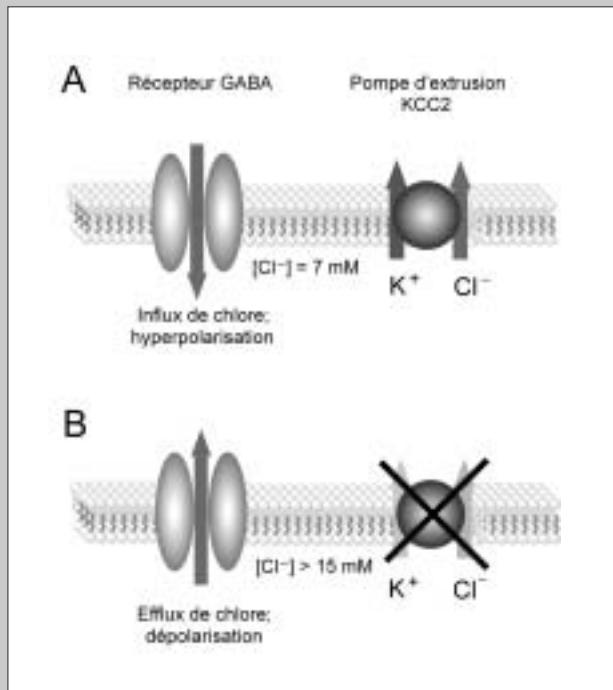
Distinction morphologique des cellules pyramidales et des interneurones. Ces types cellulaires peuvent être mis en évidence dans des préparations histologiques particulières et visualisés par microscopie optique. A) Photographie d'une cellule pyramidale dans le cortex cérébral de rat, marquée par la méthode de Golgi. Seule une cellule parmi les centaines dans cette coupe est visible, mais son corps cellulaire et ses dendrites sont entièrement marqués. B) Reproduction d'un dessin de Santiago Ramón y Cajal (adapté de<sup>[6]</sup>), montrant la morphologie et l'arrangement des cellules pyramidales et de différents types d'interneurones dans la région CA1 de l'hippocampe. Cajal a produit ces dessins sur la base de l'examen de coupes telles que montrées en A). Ce dessin comprend deux cellules pyramidales sur la gauche et différents types d'interneurones à droite. Outre leur corps cellulaire et dendrites, il a également dessiné l'axone des interneurones (c), qui se distribue dans différentes parties de l'hippocampe. C) Interneurones dans une coupe d'hippocampe de rat, marqués par une méthode histochimique mettant en évidence leur arbre dendritique et leur corps cellulaire. La région montrée correspond au dessin de Cajal.

## Références

<sup>1</sup> Margerison JH, Corsellis JA. *Epilepsy and the temporal lobes: A clinical, electroencephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes.* Brain 1966; 89: 499-530

<sup>2</sup> Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M. *A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy.* N Engl J Med 2001; 345: 311-318

<sup>3</sup> Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, et al. *On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro.* Science 2002; 298: 1418-1421



**Figure 5**  
Rôle des pompes d'extrusion de chlore (KCC2) dans le maintien d'une faible concentration intracellulaire de chlore et donc de la fonction inhibitrice du récepteur GABA. A) Dans les conditions normales, les anions chlore pénétrant dans la cellule par le récepteur GABA sont immédiatement expulsés par la pompe KCC2 (qui transporte également des cations de potassium). Le maintien d'une faible concentration de chlore intracellulaire (7 mM) permet un influx lors de chaque ouverture du récepteur GABA. B) Dans les conditions pathologiques, la pompe KCC2 est affectée et devient moins efficace. La concentration de chlore intracellulaire augmente (>15 mM), ce qui conduit à un efflux de ces anions lorsque le récepteur GABA est activé. Dans ces conditions, la cellule perd des charges négatives et devient dépolarisée, ce qui augmente son excitabilité. Il n'est pas connu pourquoi la fonction de KCC2 est altérée dans l'épilepsie méssiale du lobe temporal.

### La GABA: un neurotransmetteur «inhibiteur»?

Tel qu'expliqué dans l'encart 1, la stimulation des récepteurs à la GABA conduit à un influx de charges négatives (portées par les anions chlore) dans les cellules postsynaptiques, ce qui réduit leur niveau d'excitabilité électrique. Les anions chlore ne sont pas accumulés dans la cellule, mais sont activement expulsés par des pompes membranaires. La principale de ces pompes est nommée « KCC2 » car elle transporte simultanément des cations potassium ( $K^+$ ) et des anions chlore ( $Cl^-$ ) (Fig. 5A). Ainsi, la concentration de chlore est maintenue plus basse dans le cytoplasme des neurones que dans le milieu extracellulaire (typiquement 7 mM à l'intérieur et 120 mM à l'extérieur). Si ces pompes viennent à manquer ou ne fonctionnent pas correctement, le niveau de chlore intracellulaire reste élevé. Dans ces conditions, dès que la concentration de chlore intracellulaire dépasse 12-15 mM, l'activation des récepteurs à la GABA conduit à un efflux d'anions chlore de l'intérieur vers l'extérieur, et donc à une perte de charges négative (Fig. 5B). On observe alors une dépolarisation de la cellule, et donc une augmentation de son niveau d'excitabilité.

Ce phénomène a longtemps été considéré comme étant une possibilité théorique ne se produisant pas in vivo. Un nombre croissant de travaux démontrent que cette vue était erronée et mettent en évidence une action « excitatrice » de la GABA. C'est notamment le cas durant le développement du cerveau, car les pompes d'extrusion des anions chlore apparaissent tardivement dans la plupart des neurones<sup>[5]</sup>. C'est également le cas dans certaines situations pathologiques, suite à une ischémie cérébrale, par exemple. Finalement, dans le cas qui nous concerne, la GABA devient excitatrice pour certaines cellules pyramidales dans la région du focus épileptique. Il sera particulièrement intéressant de déterminer pour quelle raison la concentration intracellulaire d'ion chlores est anormalement élevée dans ces cellules. Il est par exemple possible d'envisager que la fonction de KCC2 (ou le nombre de ces pompes) soiet altérée suite à la répétition chronique des crises épileptiques.

<sup>4</sup> Löscher W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 113-118

<sup>5</sup> Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Rev Neurosci* 2002; 3: 728-739

<sup>6</sup> Swanson N, Swanson LW. New ideas on the structure of the nervous system in man and vertebrates. Translation of the original book of Santiago Ramón y Cajal. Cam-

bridge, Massachusetts: The MIT Press, 1990

Correspondance à:

Prof. Dr. Jean-Marc Fritschy

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Universität Zürich

Winterthurerstrasse 190

CH 8057 Zürich

Tel. 0041 1 635 59 26

Fax 0041 1 635 68 74

fritschy@pharma.unizh.ch