



HAL
open science

Ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons pulsés de basse intensité chez un modèle animal d'épilepsie méiotemporale associée à une sclérose hippocampique

Bertrand Mathon

► **To cite this version:**

Bertrand Mathon. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons pulsés de basse intensité chez un modèle animal d'épilepsie méiotemporale associée à une sclérose hippocampique. Neurosciences [q-bio.NC]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS520 . tel-04137278

HAL Id: tel-04137278

<https://theses.hal.science/tel-04137278>

Submitted on 22 Jun 2023

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

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

SORBONNE UNIVERSITE

École Doctorale 158 : Cerveau, Cognition et Comportement (ED3C)

Institut du Cerveau (ICM)

Équipe « Excitabilité cellulaire et dynamiques des réseaux neuronaux »

THESE DE DOCTORAT EN NEUROSCIENCES

Ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons pulsés de basse intensité chez un modèle animal d'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique

Bertrand MATHON

Codirigée par les Prs Stéphane CHARPIER et Alexandre CARPENTIER

Présentée et soutenue le 12 décembre 2022

Devant un jury composé de :

Mr. Stéphane CHARPIER	Directeur de Thèse
Mr. Alexandre CARPENTIER	Codirecteur de Thèse
Mme. Sophie COLNAT-COULBOIS	Rapporteuse
Mr. Jean-Luc GENNISSON	Rapporteur
Mr. Cyril LAFON	Examineur
Mr. Vincent NAVARRO	Président du Jury

Liste des publications et valorisations se rapportant à la Thèse

Bex A, Bex V, Carpentier A, Mathon B. Therapeutic ultrasound: The future of epilepsy surgery? Rev Neurol (Paris). 2022 Jul 16:S0035-3787(22)00641-5. doi: 10.1016/j.neurol.2022.03.015.

Mathon B, Navarro V, Lecas S, Roussel D, Charpier S, Carpentier A. Safety Profile of Low-intensity Pulsed Ultrasound-induced Blood Brain Barrier Opening in Nonepileptic Mice and in a Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. SOUMIS.

Mathon B, Navarro V, Pons T, Lecas S, Roussel D, Charpier S, Carpentier A. Low-intensity Pulsed Ultrasound-induced Blood Brain Barrier Opening Combined with Selenium Nanoparticles Administration reduce seizure frequency in a Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy. EN PREPARATION.

Déclaration d'invention (Sorbonne Université et SATT LUTECH) : Traitement de l'épilepsie mésiotemporale chez la souris kainate par ouverture ultrasonore de la barrière hémato-encéphalique et injection intraveineuse de nanoparticules de Sélénium. Mathon B, Pons T et Carpentier A. SOUMIS, EN COURS D'INSTRUCTION.

Liste des abréviations

BHE, Barrière hémato-encéphalique
EEG, Electroencéphalogramme
GFAP, glial fibrillary acidic protein
HIFU, High-intensity focused ultrasound
HPD, Décharges hippocampiques paroxystiques
Iba1, Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IRMf, Image par résonance magnétique fonctionnelle
KA, Kainate
LIPU, Low-intensity pulsed ultrasound
LITT, Thérapie thermique interstielle par laser
SEEG, Stéréoélectroencéphalographie
NP, Nanoparticules
NpSe, Nanoparticules de Sélénium
PTZ, Pentylènetétrazole
Se, Sélénium
SPECT, Tomographie d'émission monophotonique
SUDEP, Mort soudaine et inattendue du patient épileptique
TEP, Tomographie par émission de positons

Liste des Figures

Figure 1. Vue anatomique axiale d'un cerveau avec dissection du lobe temporal droit.

Figure 2. Vue anatomique coronale d'un cerveau avec dissection du lobe temporal mésial gauche.

Figure 3. Classification histopathologique des scléroses hippocampiques selon l'ILAE 2013.

Figure 4. Aspect IRM d'une sclérose hippocampique.

Figure 5 : Aspect histologique d'un hippocampe de souris Kaïnate.

Figure 6 : Enregistrements EEG d'une décharge hippocampique et d'une bouffée de pointes qui résultent d'un état de mal induit par injection intrahippocampique de Kaïnate chez une souris.

Figure 7. Neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire et zone sous-granulaire chez le rongeur.

Figure 8. Étapes de la différenciation neuronale et astrocytaire.

Figure 9. Différents profils d'expression protéique des cellules de la zone sous-granulaire au cours des 42 jours suivant le début de la division des cellules précurseurs.

Figure 10. Maturation et migration des cellules néoformées partant de la zone sous-granulaire et nombre de cellules BrdU positives exprimant certains marqueurs au cours du premier mois de la neurogenèse adulte hippocampique.

Figure 11. Comparaisons de la neurogenèse adulte hippocampique entre souris et rats.

Figure 12 : La BHE assure l'homéostasie cérébrale en contrôlant les échanges entre le sang et le cerveau (adapté de P. Sansonetti).

Figure 13 : Rôle du sélénium sur la signalisation du calcium et les voies moléculaires induites par le stress oxydatif dans l'épilepsie.

Figure 14 : Procédure expérimentale de sonication sur une souris C57BL6/J.

Figure 15 : Injection stéréotaxique de kaïnate dans l'hippocampe dorsal droit de souris.

Figure 16. Concentrations du Sélénium intracérébral (en ug par g de cerveau) par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif entre les différents groupes de souris à J0 et à J7 du traitement.

Figure 17. Évolution de la moyenne des poids des souris au cours du temps dans les deux groupes de traitement (SHAM, n = 6 et US + NPSe, n = 6).

Figure 18 : Schéma expérimental.

Figure 19 : Évolution du nombre de crises d'épilepsie généralisées par semaine et par groupe de traitement au cours du schéma expérimental.

Figure 20 : Évolution après traitement du tracé EEG d'une souris kainate du groupe US+NpSe.

Figure 21 : Variation (en %) de la fréquence des crises d'épilepsie généralisées entre le vidéo-EEG pré-traitement (baseline) et le vidéo-EEG à distance des traitements.

Figure 22 : Évolution de la durée des crises d'épilepsies généralisées (en secondes) au cours de l'expérimentation selon les groupes de traitement.

Figure 23 : Évolution de la sévérité des crises d'épilepsies généralisées, cotée à l'aide du score de Racine, au cours de l'expérimentation selon les groupes de traitement.

Figure 24. Neurogenèse chez les 6 souris wild-type en comparaison au 6 souris kainate du groupe SHAM.

Figure 25. Neurogenèse chez les souris wild-type traitées par ouverture ultrasonore de la BHE (US), par ouverture ultrasonore de la BHE et Nanoparticules de Sélénium IV (US + NP) et chez les souris contrôles (SHAM).

Figure 26. Neurogenèse chez les souris kainate traitées par ouverture ultrasonore de la BHE (US), par ouverture ultrasonore de la BHE et Nanoparticules de Sélénium IV (US + NP) et chez les souris contrôles (SHAM).

Figure 27 : Intensité des immunomarquages GFAP, Iba1 et NeuN sur les hippocampes droits de souris kainate à 6 mois de la dernière séance de traitement.

Liste des Tableaux

Tableau 1. Effectifs de souris selon groupe de traitement.

Tableau 2. Table des valeurs de P obtenues en comparant deux à deux les concentrations de Sélénium intracérébral entre les différents groupes à J0 du traitement.

Tableau 3. Table des valeurs de P obtenues en comparant deux à deux les concentrations de Sélénium intracérébral entre les différents groupes à J7 du traitement.

Table des Matières

RESUME.....	p.9
INTRODUCTION.....	p.11
1. Anatomie du lobe temporal	p.11
1.1 Anatomie morphologique	p.11
1.1.1 Néocortex	p.11
1.1.2 Hippocampe	p.12
1.1.3 Amygdale	p.14
1.2 Anatomie fonctionnelle.....	p.14
1.2.1 Fonctions cognitives	p.15
1.2.1.1 Mémoire	p.15
1.2.1.2 Langage	p.15
1.2.1.3 Émotions.....	p.16
1.2.2 Fonctions sensorielles	p.16
1.2.2.1 Olfaction	p.16
1.2.2.2 Audition	p.16
1.2.2.3 Vision.....	p.16
1.2.3 Fonctions motrices	p.17
1.2.4 Fonctions endocriniennes.....	p.17
2. L'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique.....	p.17
2.1 Épidémiologie	p.17
2.2 Présentation clinique	p.18
2.3 Données neurocognitives.....	p.19
2.4 Données psychiatriques	p.19
2.5 Données électrophysiologiques	p.19
2.5.1 EEG de surface.....	p.20
2.5.2 SEEG	p.20
2.5.3 Propagation des crises.....	p.21
2.6 Données d'imagerie nucléaire.....	p.21
2.6.1 TEP interictale	p.21
2.6.2 SPECT ictale.....	p.22
2.7 Histologie de la sclérose hippocampique.....	p.23
2.8 Radiologie de la sclérose hippocampique	p.24
2.9 Prise en charge thérapeutique de l'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique.....	p.26
2.9.1 Traitement médicamenteux.....	p.26
2.9.2 Traitement chirurgical	p.26
2.9.2.1 Chirurgie de résection.....	p.26
2.9.2.2 Radiochirurgie stéréotaxique.....	p.27
2.9.2.3 LITT.....	p.27
2.9.2.4 Stimulation amygdalohippocampique.....	p.28
2.9.2.5 Conclusion.....	p.28
3. Modèle animal d'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique : la souris Kaïnate.....	p.29
3.1 Induction de l'épilepsie par injection systémique de Kaïnate.....	p.29
3.2 Induction de l'épilepsie par injection intrahippocampique de Kaïnate.....	p.30
4. La neurogenèse hippocampique.....	p.32
4.1 Étapes de la neurogenèse adulte hippocampique.....	p.33
4.2 Facteurs influençant la neurogenèse hippocampique	p.38
4.3 Influence de l'épilepsie sur la neurogenèse adulte hippocampique	p.39

5.	Ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons	p.40
5.1	La barrière hémato-encéphalique (BHE)	p.40
5.1.1	Définition et histologie.....	p.40
5.1.2	Perméabilité.....	p.41
5.1.3	La BHE dans l'épilepsie	p.42
5.1.3.1	Augmentation de la perméabilité dans l'épilepsie.....	p.42
5.1.3.2	Perméabilité diminuée aux antiépileptiques	p.43
5.2	Ouverture de la BHE par les ultrasons	p.43
5.2.1	Principes de fonctionnement et applications.....	p.43
5.2.2	Neurogenèse induite par l'ouverture ultrasonore de la BHE.....	p.44
5.2.3	Stimulation immunitaire par l'ouverture ultrasonore de la BHE.....	p.45
5.2.4	Effets sur l'épilepsie des ultrasons à visée thérapeutique.....	p.47
	Article « <i>Therapeutic ultrasound: the future of epilepsy surgery?</i>	
6.	Les nanoparticules	p.59
6.1	Généralités sur les nanoparticules	p.59
6.2	Les nanoparticules de sélénium	p.60
6.2.1	Le sélénium.....	p.60
6.2.2	Sélénium et épilepsie.....	p.61
6.2.2.1	Rôle du sélénium sur la signalisation calcique et les voies moléculaires induites par le stress oxydatif de l'épilepsie	
6.2.2.2	Carence en sélénium et épilepsie.....	p.62
6.2.2.3	Rôle du sélénium dans le traitement de l'épilepsie	p.63
6.2.3	Applications thérapeutiques des nanoparticules de sélénium.....	p.65
	OBJECTIFS	p.66
	MATERIEL & METHODES	p.67
1.	Animaux	p.67
2.	Procédures expérimentales	p.67
2.1	Sonication	p.67
2.2	Injection stéréotaxique intrahippocampique de kainate pour induction de l'épilepsie méso-temporale	p.68
2.3	Implantation d'électrodes intracérébrales et enregistrement vidéo-électroencéphalographique	p.70
3.	Structure et synthèse des nanoparticules de sélénium (NpSe)	p.71
4.	Préparation des tissus avant détection immunohistochimique	p.71
4.1	Perfusion intracardiaque	p.71
4.2	Préparation des coupes	p.72
5.	Immunohistochimie	p.72
6.	Comptage cellulaire et analyse de l'intensité de la fluorescence	p.72
6.1	Comptage cellulaire	p.72
6.2	Analyse de l'intensité de la fluorescence	p.73
	RESULTATS	p.74
	Partie 1. Faisabilité et conséquences de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris saines et chez les souris avec épilepsie méso-temporale	p.74
	Article soumis " <i>Safety Profile of Low-intensity Pulsed Ultrasound-induced Blood Brain Barrier Opening in Nonepileptic Mice and in a Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy</i> "	p.75
	Conclusion et synthèse de la Partie 1	p.90

Partie 2. Effets antiépileptiques de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité, seule et couplée aux Nanoparticules de Sélénium.....	p.91
1. Détection et dosage du Sélénium intracérébral après ouverture de la BHE et administration de Nanoparticules de Sélénium.....	p.91
1.1 Objectifs	p.91
1.2 Schéma expérimental	p.92
1.3 Résultats.....	p.92
1.4 Discussion et conclusion	p.93
2. Évaluation de la tolérance et de la sécurité de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium.....	p.95
2.1 Objectifs	p.95
2.2 Schéma expérimental	p.95
2.3 Résultats.....	p.95
2.4 Discussion et conclusion	p.96
3. Évaluation de l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium.....	p.97
3.1 Objectifs	p.97
3.2 Schéma expérimental	p.97
3.3 Résultats.....	p.99
3.3.1 Fréquence des crises d'épilepsie généralisées.....	p.99
3.3.2 Durée des crises d'épilepsie généralisées.....	p.102
3.3.3 Score de Racine.....	p.104
3.4 Discussion et conclusion.....	p.105
4. Évaluation de l'effet sur la neurogenèse de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium.....	p.110
4.1 Objectifs	p.110
4.2 Schéma expérimental	p.110
4.3 Résultats.....	p.111
4.3.1 Comparaisons entre les souris wild-type et les souris KA..	p.111
4.3.2 Souris wild-type.....	p.112
4.3.3 Souris Kaïnate	p.114
4.4 Discussion et conclusion	p.116
5. Évaluation à long terme des conséquences histologiques de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate.....	p.120
5.1 Objectifs	p.120
5.2 Schéma expérimental	p.120
5.3 Résultats.....	p.121
5.4 Discussion et conclusion	p.123
6. Résumé et Conclusion de la Partie 2.....	p.124
 CONCLUSION GENERALE	 p.125
 REMERCIEMENTS.....	 p.128
 BIBLIOGRAPHIE.....	 p.129

RESUME

L'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique est le syndrome épileptique le plus fréquent et est connue pour sa grande pharmacorésistance. Le traitement de référence de ce syndrome est la chirurgie de résection des structures amygdalo-hippocampiques qui permet d'aboutir à l'arrêt des crises dans 80% des cas. Il existe également des alternatives chirurgicales comme la radiochirurgie et la thérapie au laser. Quelle que soit la modalité chirurgicale utilisée, celle-ci peut être associée à une morbidité postopératoire cognitive, psychiatrique et/ou neurologique pour le patient. Notre travail visait donc à évaluer, sur un modèle animal d'épilepsie mésiotemporale, une alternative thérapeutique aux techniques chirurgicales ablatives : l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par ultrasons pulsés de basse intensité, à l'aide de la plateforme préclinique SonoCloud. Nous avons par la suite couplé l'ouverture de la BHE avec l'administration de nanoparticules de Sélénium (NpSe) qui sont des molécules aux propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires qui franchissent spontanément peu la BHE.

Nous avons étudié les conséquences cliniques, électrophysiologiques et histologiques de l'ouverture ultrasonore de la BHE, associée ou non à l'injection intraveineuse de NpSe, à la fois chez des souris wild-type C57BL6/J ainsi que sur le modèle de la souris Kaïnate qui reproduit assez fidèlement les caractéristiques du syndrome d'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique de l'Homme.

Nos résultats ont indiqué que les ultrasons pulsés de basse intensité, délivrés à l'aide de la plateforme préclinique SonoCloud, ouvrent de manière reproductible et transitoire la BHE chez les souris épileptiques du modèle Kaïnate, y compris lorsqu'elles sont implantées avec des électrodes intracérébrales d'enregistrement EEG. Nous avons confirmé que l'ouverture de la BHE par les ultrasons pulsés de basse intensité est transitoire et conduit à une extravasation d'albumine et à une astrogliose légère réversible dans l'hippocampe des souris non épileptiques. Fait nouveau, nous avons démontré que l'ouverture ultrasonore répétée de la BHE n'induit pas, à court terme (1 mois) de crises d'épilepsie ni d'anomalies épileptiques en EEG chez les souris non épileptiques implantées avec des électrodes profondes.

Chez les souris Kaïnate, l'extravasation transitoire d'albumine dans l'hippocampe médiée par l'ouverture ultrasonore de la BHE n'entraîne pas de changements histologiques significatifs en raison des caractéristiques histologiques et neuroinflammatoires préexistantes associées à la sclérose hippocampique. Si l'ouverture répétée de la BHE par ultrasons pulsés seule ne semble pas avoir d'effet antiépileptique significatif sur la souris Kaïnate, nous avons montré que l'ouverture répétée de la BHE couplée à l'administration IV de Nanoparticules de

sélénium est sûre, bien tolérée et permet une réduction des crises épileptiques généralisées d'environ 90%. Notre travail a également permis de formuler des hypothèses expliquant ce dernier résultat. Ainsi, nous avons observé chez les souris Kaïnate traitée par ouverture ultrasonore de la BHE et Nanoparticules de Sélénium des modifications histologiques à court terme (réduction de la neurogenèse aberrante dans le hile de l'hippocampe, baisse de la mortalité neuronale sur l'ensemble de l'hippocampe) et long terme (réduction de l'activation microgliale hippocampique) qui pourraient en partie expliquer l'effet antiépileptique mis en évidence. Ces modifications histologiques peuvent être dues aux différentes propriétés des nanoparticules de sélénium : anti-inflammatoires, antioxydantes et facilitation de la neurotransmission des neurones GABAergiques qui jouent un rôle sur les voies de signalisation qui contrôlent la migration des neurones nouveau-nés depuis la niche neurogénique.

INTRODUCTION

1. Anatomie du lobe temporal

1.1. Anatomie morphologique

1.1.1. Néocortex

Le bord inférieur, le pôle et la face antéro-supérieure sont bien individualisés puisqu'ils correspondent, respectivement, aux faces inférieures et antérieures du cerveau et à la lèvre inférieure de la vallée sylvienne. En revanche, les frontières postérieures avec les lobes pariétaux et occipitaux sont moins bien délimitées et désignées à l'aide de certains repères (**Figure 1**).

Sur la face latérale de l'hémisphère, le prolongement de la ligne occipito-pariétale en direction de l'encoche pré-occipitale marque la limite postérieure du lobe temporal. Tandis que sa frontière avec le lobe pariétal est le prolongement de la scissure latérale de Sylvius jusqu'au milieu de la ligne pariéto-occipitale. Sur la face basale, la ligne pariéto-temporale est continuée après l'encoche préoccipitale en direction de la fin de la scissure pariéto-occipitale (1). Sur la face médiale, la limite se fait avec le lobe occipital, divisant en deux le gyrus lingual.

Il existe cinq gyri temporaux notés de T1 à T5. En partant de la lèvre de la vallée sylvienne et en suivant la surface cérébrale jusqu'à l'isthme du cerveau :

- T1 : gyrus temporal supérieur,
- T2 : gyrus temporal moyen,
- T3 : gyrus temporal inférieur,
- T4 : gyrus fusiforme,
- T5 : à la face mésiale, constitué du gyrus parahippocampique, de l'amygdale et de l'hippocampe.

Le sillon temporal supérieur sépare T1 de T2, le sillon temporal inférieur T2 de T3, le sillon temporo-occipital externe T3 de T4 et le sillon collatéral T4 de T5.



Figure 1. Vue anatomique axiale d'un cerveau avec dissection du lobe temporal droit (d'après Mathon et Clemenceau, *Acta Neurochirurgica*, 2016 (2)). 1, pôle temporal ; 2, uncus de l'hippocampe ; 3, amygdale ; 4, corps de l'hippocampe (Corne d'Ammon) ; 5, gyrus parahippocampique T5 ; 6, néocortex temporal latéral.

1.1.2. Hippocampe

L'hippocampe est constitué du *gyrus dentatus* et de la corne d'Ammon, enroulés l'un autour de l'autre, et incurvés avec une concavité médiane. A cette morphologie s'ajoutent des replis constituant la queue et la tête de l'hippocampe. La corne d'Ammon se prolonge vers le bas par le subiculum, puis l'aire entorhinale qui appartiennent au gyrus parahippocampique (**Figures 1 et 2**). Le *gyrus dentatus* fait saillie dans la lumière de la corne temporale du ventricule latéral, présentant des indentations qui le nomment, et dont la disparition est un excellent signe de sclérose hippocampique (3).

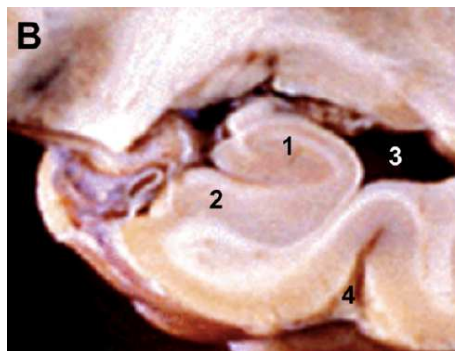


Figure 2. Vue anatomique coronale d'un cerveau avec dissection du lobe temporal méstral gauche (d'après Mathon et Clemenceau, *Acta Neurochirurgica*, 2016 (2) ; remerciements au Dr Dominique Hasboun). 1, corps de l'hippocampe (Corne d'Ammon) ; 2, gyrus parahippocampique T5 ; 3, corne temporale du ventricule latéral ; 4, sillon collatéral.

L'hippocampe est composé d'une tête, d'un corps et d'une queue, de l'avant vers l'arrière, ainsi que d'une partie intraventriculaire et une extraventriculaire pour chacune de ces sections. La tête de l'hippocampe inclut l'*uncus* et s'étend jusqu'aux premières digitations du *gyrus dentatus*, à hauteur du début du plexus choroïde. Elle constitue le plancher de la partie antérieure de la corne temporale du ventricule latéral et répond à l'amygdale.

L'*uncus* est parfois considéré comme le segment antérieur du gyrus parahippocampique, enroulé en dedans. Il entre en rapport avec l'incisure tentorielle et le troisième nerf crânien en dedans. Il est séparé du gyrus parahippocampique par le sillon uncal. Seul son segment postérieur appartient à l'hippocampe.

Sur le segment antérieur de l'hippocampe, on note deux reliefs : le gyrus semilunaire et le gyrus ambient, séparés par le sillon semi-annulaire. Le relief du gyrus semilunaire répond aux noyaux corticaux de l'amygdale. Il entre en rapport, en avant et en dedans, avec l'espace perforé antérieur, par lequel les branches perforantes de l'artère cérébrale moyenne pénètrent le parenchyme, et en est séparé par le sillon endorhinal. Le gyrus ambient est, lui, en rapport avec l'avant du gyrus parahippocampique, dont il est séparé par le sillon rhinal.

Le corps de l'hippocampe, de diamètre légèrement inférieur à celui de la tête, forme le plancher du reste de la corne temporale du ventricule latéral. Ce sont les secteurs CA1 à CA4 de la corne d'Ammon qui constituent ce plancher, recouverts des fibres de substances blanches qui lui sont annexées ainsi que de veines subépendymaires.

Le bord latéral de la face supérieure est constitué par l'éminence collatérale qui la sépare de la substance blanche annexée au néocortex temporal. Le bord médial est, lui, constitué par la *fimbria* qui recouvre presque toute cette face de l'hippocampe. Sur la face mésiale, on ne voit du corps de l'hippocampe que le *gyrus dentatus*, la *fimbria* et le sillon parahippocampique. Cette portion du *gyrus dentatus* est aussi appelée *margo denticulatus*. La portion visible du *gyrus dentatus* porte le nom de bande de Giacomini à hauteur de l'*uncus* et de *fasciola cinerea* à hauteur de la queue. Une quinzaine de dents est visible. Leur présence, spécifique aux primates et à l'homme, est expliquée par l'importance du développement du *gyrus dentatus*, qui se fait dans un espace confiné. Le *margo denticulatus* est séparé de la *fimbria* en haut par un sillon fimbrio-denté, et du *subiculum* en bas par un sillon hippocampique superficiel.

La queue de l'hippocampe présente toujours des indentations, mais elles ne sont plus macroscopiquement visibles. Elle est enfouie sous l'*alveus* et des veines épendymaires. De part et d'autre (respectivement en dedans et en dehors) se répartissent la *fimbria* et le trigone collatéral. Ils constituent ensemble le carrefour ventriculaire.

1.1.3. Amygdale

L'amygdale est constituée de 6 noyaux, soit de la profondeur vers la surface : le noyau latéral, le noyau basal, le noyau basal accessoire, le noyau cortical, le noyau médial et le noyau central. On regroupe ces noyaux en un groupe corticomédial et un basolatéral, respectivement de signification olfactive et visuo-auditive. L'amygdale entretient des rapports étroits avec l'*uncus* de l'hippocampe, et en haut avec le *globus pallidus* interne (1), avec lequel elle n'a pas de délimitation nette.

1.2. Anatomie fonctionnelle

La substance grise corticale temporale est singulière, car elle représente une organisation corticale allant de la forme la plus récente phylogénétiquement, le néocortex à un allocortex qui existe déjà chez des animaux beaucoup plus primitifs. Les gyrus de T1 à T4 inclus appartiennent au néocortex. Le gyrus parahippocampique constitue une forme de transition, en six couches mais moins bien définies, ce qui lui vaut le nom de périallocortex. L'allocortex est celui des structures mésiales, dans lequel la substance blanche est externe, ce qui ne s'observe nulle part ailleurs dans le cerveau humain. Les neurones s'y organisent en trois couches, selon une topographie moins bien délimitée. Ainsi, la singularité de l'anatomie des structures mésiotemporales participe peut-être à la physiopathologie de l'épilepsie.

Le *gyrus dentatus* est composé d'une couche périphérique appelée couche moléculaire, d'une couche centrale de cellules granulaires et d'une couche interne polymorphique appelée hile (4). Les cellules granulaires du *gyrus dentatus* envoient des prolongements cytoplasmiques, appelés fibres mossues vers les neurones pyramidaux de CA3. Ces neurones de CA3 projettent sur les cellules pyramidales de CA1 via les collatérales de Schaffer, celles-ci envoyant à leur tour des projections sur le subiculum. Le subiculum émet ensuite des projections sur la formation para-hippocampique. La plupart des projections entre ces structures sont réciproques.

Il existe une asymétrie mineure concernant l'anatomie des lobes temporaux. Le *planum temporal* (face supérieure et postérieure de T1) est plus développé en taille dans l'hémisphère gauche, rendant plausible l'association entre le rôle phasique de cette structure et cette particularité anatomique.

Les fonctions assignées au lobe temporal sont cognitives (mémoire, langage, émotions), sensorielles (olfaction, audition, vision), motrices et endocriniennes (5).

1.2.1. Fonctions cognitives

1.2.1.1. Mémoire

Le rhinencéphale, représenté dans le lobe temporal par les structures mésiales, est donc essentiellement, le cerveau de la mémoire et des émotions. Les données en provenance du néocortex accèdent à l'hippocampe par l'aire entorhinale, avant d'être retournées pour stockage dans le néocortex. Ainsi, une lésion récente de l'hippocampe entraîne une amnésie antérograde, ne permettant pas le stockage de nouveaux éléments mnésiques, mais laissant les anciens toujours accessibles.

Deux circuits neuronaux temporaux internes sont connus : l'un est direct, l'autre polysynaptique. Le circuit direct prend en charge la mémoire sémantique. Ses neurones rejoignent CA1 depuis l'aire entorhinale sans synapse intermédiaire. Le circuit polysynaptique, qui gère la mémoire épisodique et spatiale, débute dans le cortex entorhinal, traverse le *subiculum*, puis atteint le *gyrus dentatus*. De là, il rejoint CA3 et CA4, puis CA1.

La voie de sortie commune de ces deux circuits rejoint les corps mamillaires via le fornix, puis le thalamus antérieur, et enfin le cortex.

L'hétérogénéité cérébrale se retrouve dans les différents modes de mémorisation et de restitution, mis en jeu par l'existence de fonctions propres à chacune des structures en question. On distingue, notamment, le matériel mnésique verbal, pris en charge par les structures temporo-mésiales de l'hémisphère dominant pour le langage, et le matériel mnésique visuospatial, pris en charge dans l'hémisphère non-dominant pour le langage. Ces données fondamentales, recueillies à l'aide d'un bilan neuropsychologique, permettent une différenciation fonctionnelle entre lobes temporaux droit et gauche, et représentent donc des éléments de latéralisation des crises.

1.2.1.2. Langage

L'aire de Wernicke, correspondant aux aires 22, 37 et 42 de Brodmann, se situe, habituellement dans l'hémisphère gauche, au niveau du pli courbe, opercule reliant la partie postérieure de T1 au gyrus pariétal inférieur.

L'aire de Wernicke jouxte le cortex auditif primaire (gyrus de Heschl) et est connectée à l'aire de Broca (située au pied de F3) par le faisceau arqué. La connaissance de l'anatomie morphologique et fonctionnelle est fondamentale pour éviter, en peropératoire, toute lésion de ces réseaux neuronaux.

1.2.1.3. Émotions

Le contrôle des comportements liés aux émotions semble dévolu à l'amygdale, et plus particulièrement aux fibres en provenance du noyau basolatéral, qui projettent sur le thalamus dorso-médian puis sur le cortex préfrontal. Le noyau central de l'amygdale pourrait contrôler la réponse végétative associée aux émotions. L'hippocampe en lui-même participe peut-être à la régulation de certains comportements liés aux émotions, en particulier dans la douleur, puisqu'il projette, entre autres, dans le cortex entorhinal de façon convergente avec la voie spinoréticulothalamique.

1.2.2. Fonctions sensorielles

1.2.2.1. Olfaction

Les centres de l'olfaction se répartissent dans un ensemble nommé rhinencéphale dont une partie des éléments sont temporaux. Le rhinencéphale n'assure pas que l'olfaction, mais également des fonctions mnésiques et la régulation du comportement. L'amygdale et l'hippocampe font partie du rhinencéphale, mais leur exérèse ne provoque pas de déficit des facultés de perception gustatives ou olfactives. En revanche, l'aura des crises temporales internes peut présenter des sensations anormales dans ce registre sensoriel.

1.2.2.2. Audition

Le gyrus de Heschl, partie du gyrus temporal supérieur (T1), constitue le centre auditif primaire (aire 41 de Brodmann), et audito-gnosique (aire 42). Les sons aigus sont perçus en profondeur du gyrus, tandis que les sons graves y sont perçus en superficie (tonotopie). Les gyri T1 droit et gauche sont reliés par des fibres commissurales et reçoivent des projections de chaque oreille moyenne. L'atteinte isolée d'un gyrus n'a donc pas de retentissement sur l'acuité auditive. Cependant, on peut observer des atteintes plus complexes telles qu'une surdité verbale, selon le côté mis en jeu.

1.2.2.3. Vision

Les radiations optiques entourent la corne temporale du ventricule latéral pour former la boucle de Meyer (6,7). Or, l'ouverture de la corne temporale étant un temps indispensable d'une amygdalohippocampectomie, l'anatomie des radiations optiques expose donc au risque d'amputation campimétrique. Ainsi, un abord chirurgical étendu sur la partie postérieure et

supérieure de la corne temporale, atteignant les voies visuelles rétrociasmatiques, peut entraîner une amputation du champ visuel à type de quadranopsie latérale homonyme supérieure controlatérale (8,9).

1.2.3. Fonctions motrices

La capsule interne est composée par 20% de neurones temporaux. Par ailleurs, l'hippocampe pourrait participer à la boucle striatale ventrale, centrée sur le thalamus et le striatum ventral dont les afférences sont préfrontales et les efférences pallidales, puis préfrontales. Le lobe temporal assure donc des fonctions motrices tant pour les voies pyramidales que pour les voies extrapyramidales (10).

1.2.4. Fonctions endocriniennes

L'hippocampe influence l'axe hypothalamo-hypophysaire car il a des projections sur le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, et semble inhiber la sécrétion de l'hormone adénocorticotrope (ACTH).

2. L'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique

2.1. Épidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 50 millions de personnes vivent actuellement avec l'épilepsie dans le monde. On estime que la proportion de personnes souffrant d'épilepsie chronique nécessitant un traitement se situe entre 4 et 10 pour 1000 personnes. À l'échelle mondiale, l'incidence de la maladie est de 2,4 millions de nouveaux cas chaque année. Dans les pays à revenu élevé, le nombre annuel de nouveaux cas dans la population générale se situe entre 30 et 50 pour 100 000 personnes (11).

En France, on estime que 600 000 personnes sont atteintes d'épilepsie dont 20% seraient pharmacorésistantes (données Haute Autorité de Santé). Concernant les patients atteints d'une épilepsie partielle pharmacorésistante, 70% d'entre eux ont un foyer épileptogène temporal. Il est commun de distinguer l'épilepsie temporale en deux types basés sur la localisation anatomique du foyer épileptogène : l'épilepsie temporale interne ou mésiotemporale et l'épilepsie néocorticale. L'épilepsie méso-temporale est le syndrome d'épilepsie focale le plus commun, et a une pharmacorésistance élevée (89% des patients) (12). La sclérose hippocampique est considérée comme une entité distincte d'épilepsie mésiotemporale et représente 11% des nouveaux cas diagnostiqués d'épilepsie partielle (13).

2.2. Présentation clinique

Certains éléments sont fréquemment retrouvés dans les antécédents médicaux des patients présentant une épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique et seraient associés à la genèse de l'épilepsie. On distingue les lésions initiales précipitantes (*initial precipitating injury*, IPI) et les événements initiaux précipitants (*initial precipitating event*, IPE). Ces agressions cérébrales, survenant habituellement dans la petite enfance, sont présentes dans l'anamnèse de 80% des patients. Parmi celles-ci, les convulsions fébriles représentent l'évènement le plus fréquent (56% des patients) (14). Les traumatismes crâniens, les méningites, les hémorragies cérébrales ainsi que les souffrances fœtales ou néonatales sont identifiés comme les autres événements initiaux précipitants. Plus de 20% des patients ont par ailleurs une histoire familiale d'épilepsie (15).

L'épilepsie se déclare généralement à l'adolescence, après un intervalle libre sans crise, appelé « épileptogénèse » durant en moyenne 10 ans. La sémiologie des crises temporales internes est riche et polymorphe et peut comprendre une phase partielle simple, une phase partielle complexe, parfois secondairement généralisée et une phase postcritique (16,17). Ces éléments sémiologiques sont déterminants dans la démarche localisatrice du foyer épileptogène en indiquant son origine mésiotemporale et en confirmant sa latéralité, et peuvent également orienter vers l'implication concomitante ou précoce d'autres lobes cérébraux (18).

L'existence d'une aura précédant la phase partielle complexe est très fréquente (plus de 90% des patients). Les symptômes survenant lors de cette phase partielle simple peuvent être subdivisés en plusieurs catégories : symptômes végétatifs, symptômes émotionnels, symptômes dysmnésiques, symptômes hallucinatoires (19).

La phase partielle complexe débute souvent par un arrêt des activités avec altération de la conscience et fixation du regard. Il s'en suit, dans la grande majorité des cas (90%) des automatismes, qu'ils soient gestuels (75% des cas) associés à une posture dystonique du membre supérieur controlatéral (20,21) - des clonies du membre supérieur controlatéral et du chef, une déviation des yeux et/ou de la tête sont des signes de propagation sus-sylvienne de la décharge ictale -, oro-alimentaires, verbaux orientant plutôt vers l'hémisphère dominant pour le langage, alors que l'«*ictal speech*» oriente vers l'hémisphère non dominant pour le langage.

La fréquence moyenne des crises partielles complexes est plurimensuelle pour la plupart des patients, mais peut être pluriquotidienne pour certains patients. Les généralisations secondaires sont rares à l'issue d'une crise partielle complexe, cependant trois-quarts des patients présentent au moins une généralisation dans leur histoire épileptique.

La phase postcritique peut comprendre une confusion et une amnésie de l'évènement. Les troubles mnésiques postcritiques ont une valeur localisatrice selon qu'ils portent sur le matériel

verbal (hémisphère dominant pour le langage) ou non verbal (hémisphère non dominant). L'existence de troubles du langage postcritiques oriente vers une décharge ictale débutant dans l'hémisphère dominant pour le langage. Un déficit moteur postcritique rapidement régressif peut également survenir, témoignant d'un foyer épileptogène controlatéral.

On note par ailleurs que moins de 10% des patients présente au moins un état de mal épileptique dans leur vie (14).

2.3. Données neurocognitives

Un bilan neuropsychologique est systématiquement réalisé lors du bilan préchirurgical afin d'évaluer l'opérabilité du patient et d'apporter un élément supplémentaire en faveur de la localisation et de la latéralité de l'épilepsie. En effet, des troubles de la mémoire verbale orientent vers un dysfonctionnement hippocampique de l'hémisphère dominant pour le langage, alors que des troubles de la mémoire visuo-spatiale orientent vers un dysfonctionnement hippocampique de l'hémisphère non dominant pour le langage (22). Un déficit dans les deux modalités de la mémoire peut suggérer une atteinte bitemporale (23). Plus de 90% de patients atteints d'épilepsie méso-temporale sur sclérose hippocampique ont ainsi des troubles mnésiques attestés par le bilan neuropsychologique.

Chez les patients présentant, un bilan neuropsychologique normal ou des troubles de la mémoire dans les modalités verbale et visuo-spatiale, une IRM fonctionnelle (IRMf) est réalisée afin d'anticiper un déficit mnésique postopératoire et ainsi de valider ou non l'indication à u traitement chirurgical. L'IRMf permet de détecter l'activité neuronale par l'intermédiaire des modifications du flux sanguin qu'elle induit. La technique de l'effet BOLD (blood oxygen level dependant) traduit une activation cérébrale par une augmentation du signal IRM. L'IRMf permet donc, grâce à une excellente résolution spatiale et des temps d'acquisition courts, d'offrir une précision anatomique importante pour la localisation des fonctions de mémoire et de langage, en les activant par des tâches spécifiques (24–28). Également, les études réalisées en IRMf ont suggéré que la capacité fonctionnelle résiduelle de l'hippocampe à réséquer est prédominante sur la réserve fonctionnelle de l'hippocampe controlatéral (29,30).

2.4. Données psychiatriques

Près d'un tiers des patients atteints d'épilepsie méso-temporale pharmacorésistante souffre d'un trouble psychiatrique. Pour 80% d'entre eux, il s'agit d'un état dépressif. Dans les

cas restants, il s'agit de troubles bipolaires, de troubles de la personnalité ou de comportements à risques (14,31,32).

2.5. Données électrophysiologiques

2.5.1. EEG de surface

L'EEG intercritique standard peut être normal ou aspécifique chez les patients atteints d'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique, mais le monitoring prolongé révèle des anomalies dans la plupart des cas (33). Les caractéristiques électriques de l'EEG interictal sont des pointes et des ondes temporales antérieures parfois associées à des trains d'ondes, visualisés sur les électrodes de scalp frontotemporales ou plus spécifiquement sur celles explorant le lobe temporal. Une activité bitemporale paroxystique est retrouvée chez un quart des patients, majoritairement prédominante du côté du foyer (14). Cette activité interictale peut fluctuer spontanément et être influencée par l'activité épileptique (17). L'activité ictale de surface n'apparaît généralement qu'avec les signes cliniques partiels complexes. L'EEG de scalp ictal peut ainsi montrer une activité rythmique "thétalike", à 5 à 7 cycles/minutes, avec augmentation des amplitudes et diminution de la fréquence, latéralisée ou non en regard du lobe temporal. Un ralentissement rythmique continu ou intermittent, diffus ou d'une aire temporale, peut également survenir. Les modifications électriques de l'EEG de scalp sont rarement détectées dès le début de la crise, mais la construction d'une activité rythmique latéralisée survient chez 80% des patients (17). Cependant, chez une minorité de patients (13% d'après Wieser, 2004 (34)), la construction de la figure épileptique est controlatérale au foyer.

2.5.2. SEEG

Les enregistrements de longue durée par stéréoelectroencéphalographie (SEEG) ne sont pas la règle dans le bilan préchirurgical des épilepsies mésiotemporales associées à une sclérose hippocampique (35). En effet, le tableau électro-clinico-radiologique suffit généralement à poser l'indication du traitement chirurgical. Cependant, dans certains cas, des atypies électrophysiologiques (suspicion d'épilepsie bitemporale, suspicion d'épilepsie "temporale plus"), l'absence de sclérose hippocampique patente en IRM ou l'existence d'une autre lésion corticale associée à la sclérose mésiale peuvent conduire à une investigation invasive afin de confirmer la localisation du foyer épileptogène. Deux modèles électriques sont généralement observés en début de crise : le premier constitué de pointes à haute fréquence

(plus de 10 Hz) et basse amplitude, et l'autre montrant une activité hypersynchrone avec des pointes de basse fréquence (inférieure à 2 Hz) et de haute amplitude (36). Ces deux modèles évoluent en une activité paroxystique rythmique de haute amplitude qui caractérise la décharge ictale.

2.5.3. Propagation des crises

Les crises mésiotemporales associées à une sclérose hippocampique peuvent avoir une extension large, mais lente aux autres aires corticales. La symptomatologie extratemporale peut ainsi être retardée par rapport au début de la crise. Également, certaines auras peuvent résulter d'une propagation au cortex insulaire ou au néocortex temporal latéral (37). Les régions corticales préférentiellement atteintes par la propagation des crises mésiotemporales sont le néocortex temporal homolatéral et les aires frontales ou orbitofrontales homolatérales. La propagation aux structures mésiotemporales controlatérales est également fréquente, et implique un passage transhémisphérique transcalleux après activation du lobe frontal homolatéral (17). Certaines études d'imagerie fonctionnelle ont également montré l'implication de structures sous-corticales, comme le thalamus et le striatum, dans la propagation des crises mésiotemporales (21).

2.6. Données d'imagerie nucléaire

Les techniques d'imagerie nucléaire permettent de superposer des données fonctionnelles à une imagerie morphologique dans un référentiel commun. Cependant, la relation de cause à effet entre la variation du métabolisme ou du débit sanguin cérébral et l'existence de crises épileptiques n'est pas clairement établie, notamment en période interictale. En effet, et en dépit d'une large utilisation de ces techniques, les tentatives de validation sur la base d'enregistrements intracérébraux sont rares et parfois peu concluantes (38). Deux techniques d'imagerie nucléaire sont utilisées dans les cas de localisation (latéralisation) difficile du foyer épileptogène : la tomographie par émission de positons (TEP) interictale et la tomographie d'émission monophotonique (SPECT) ictale.

2.6.1. TEP interictale

La TEP est un outil mal adapté à l'imagerie fonctionnelle d'une crise épileptique. Ainsi, les dysfonctionnements localisés observés sous la forme d'un hypométabolisme glucidique (¹⁸FDG) ne concernent donc que la période interictale. Néanmoins, sa valeur latéralisatrice serait proche de 90% (39). Le patron d'expression interictal typique de la TEP au ¹⁸FDG

montre un hypométabolisme des structures mésio-temporales et du pôle temporal homolatéral à la sclérose hippocampique et donc au foyer épileptogène (39,40). Cet hypométabolisme peut également être bilatéral, mais plus étendu du côté de la sclérose hippocampique. L'hypométabolisme extratemporal, homolatéral à l'hypométabolisme temporel antérieur prédominant, inclut habituellement le thalamus, et souvent les ganglions de la base, l'insula, le cortex frontal inférieur et le cortex pariétal latéral (41).

Certaines études ont proposé des hypothèses anatomiques ou physiopathologiques pour expliquer la présence d'un hypométabolisme interictal du pôle temporel devant une épilepsie mésiotemporale. Cet hypométabolisme serait ainsi dû soit à une réduction de la substance grise néocorticale temporelle engendrée par l'épilepsie (42), soit par un mécanisme de désafférentation (39). Cette seconde hypothèse est appuyée par le fait qu'une résection amygdalohippocampique sélective augmente l'hypométabolisme des structures anatomiques adjacentes et notamment du néocortex (43). Enfin, certains auteurs rapportent un lien entre le pronostic postopératoire de l'épilepsie mésiotemporale et le modèle d'expression du métabolisme en TEP au 18FDG, réalisée lors du bilan préchirurgical (44). En conclusion, la TEP s'est affirmée comme une technique fiable pour latéraliser le foyer épileptogène, voire comme marqueur pronostique du résultat de la chirurgie, mais pas pour guider le chirurgien dans les limites et l'étendue de son geste.

2.6.2. SPECT ictale

En SPECT, l'obtention d'une image du débit sanguin régional, qui reflète l'activité fonctionnelle, lors d'une crise épileptique est possible grâce à l'injection percritique de traceurs technétiés (^{99m}Tc -HMPAO) qui restent trappés dans les capillaires cérébraux dès leur premier passage. La SPECT ictale atteint une sensibilité de plus de 90% dans les épilepsies temporales (45); l'examen semblant même en mesure d'identifier différents schémas de crises (46). Ainsi, si un hypodébit interictal ne signe pas toujours la présence d'un foyer épileptogène, l'existence d'un hyperdébit ictal permet de le suspecter fortement, surtout s'il s'inscrit topographiquement en regard de la zone préalablement hypoperfusée. Les modifications de débit en SPECT, mieux visualisées en soustrayant les examens ictaux et interictaux, incluent un hyperdébit du pôle temporel homolatéral à la sclérose hippocampique, ou bilatéral mais plus marqué du côté de la sclérose (47). Également, on peut observer un hyperdébit homolatéral du thalamus, des ganglions de la base et du cortex occipital, associé à des zones d'hypoperfusion frontales et pariétales. Il est également important de noter qu'il existe une influence importante du délai d'injection du traceur sur le profil d'hyperperfusion ictale (48). Du fait d'une résolution temporelle limitée, les informations fournies par la SPECT ne se limitent pas à la seule zone épileptogène, mais objectivent un réseau épileptogène plus vaste, lié à la

dynamique spatiotemporelle des processus critiques (48). Ainsi, la SPECT apporte au processus décisionnel des éléments diagnostiques indépendants qui vont compléter les autres paramètres de l'évaluation préchirurgicale, sans pour autant permettre de délimiter une zone de résection.

2.7. Histologie de la sclérose hippocampique

La caractéristique histologique principale de la sclérose hippocampique est une perte segmentaire des cellules pyramidales qui peut affecter tous les secteurs de la corne d'Ammon. La perte neuronale dans l'hippocampe est toujours associée à une gliose astrocytaire sévère, définie par un maillage dense de cellules positives à l'immunomarquage par la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (49).

En 2013, l'International League Against Epilepsy (ILAE) a proposé une classification histologique individualisant trois types distincts de scléroses hippocampiques (49) (**Figure 3**) :

- ILAE type 1 : perte prononcée des neurones pyramidaux et gliose dans les secteurs CA1 et CA4.
- ILAE type 2 : perte neuronale et gliose prédominants dans CA1.
- ILAE type 3 : perte neuronale et gliose prédominants dans CA4.
- Il existe enfin un type nommé « no hippocampal sclerosis » (no-HS) révélant une gliose isolée sans perte neuronale lors de l'examen microscopique de la pièce opératoire.

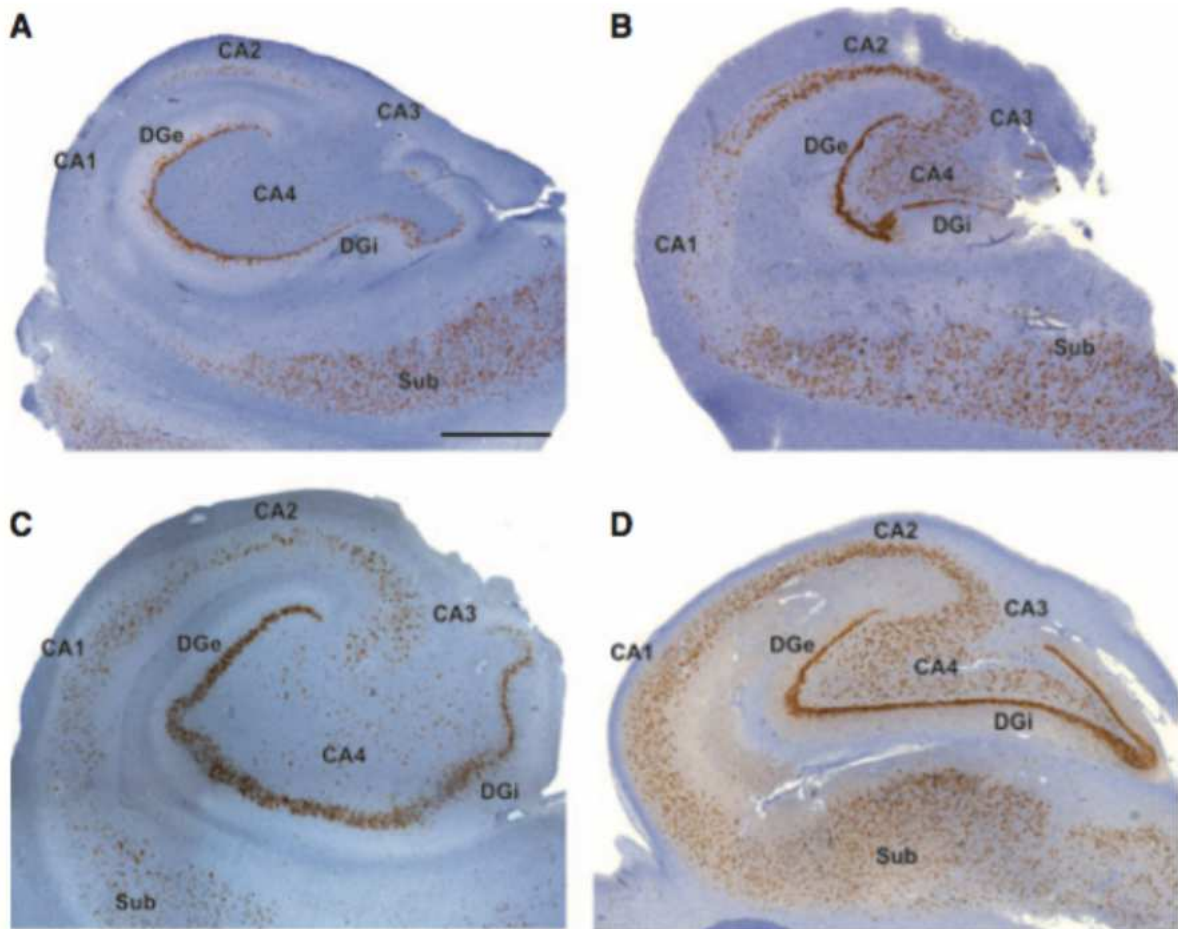


Figure 3. Classification histopathologique des scléroses hippocampiques selon l'ILAE 2013 (d'après Blümcke et al., *Epilepsia*, 2013) (49).

A. Sclérose hippocampique ILAE type 1. B. Sclérose hippocampique ILAE type 2. C. Sclérose hippocampique ILAE type 3. D. « No hippocampal sclerosis ».

La sclérose hippocampique ILAE type 1, présente chez 75% des patients (14,50), est décrite comme souvent associée à une agression cérébrale (IPI/IPE) avant l'âge de 5 ans, un début précoce de l'histoire épileptique et un bon contrôle des crises après la chirurgie ; tandis que les scléroses hippocampiques ILAE types 2 et 3, beaucoup plus rares, sont associées à un début tardif de la maladie et à un pronostic post-chirurgical moins favorable (14,49,50).

2.8. Radiologie de la sclérose hippocampique

L'IRM encéphalique 3.0 Teslas est hautement spécifique et sensible pour objectiver une sclérose hippocampique devant un tableau d'épilepsie méso-temporale. Ainsi, une sclérose hippocampique s'observe généralement en IRM avec les anomalies suivantes : atrophie, perte des digitations de la tête hippocampique, perte de l'architecture interne, hypersignal en séquences T2 et T2 FLAIR, hyposignal en séquence T1 (41,51) (**Figure 4**).

Ces anomalies sont le plus souvent unilatérales, ou apparaissent nettement asymétriques lorsqu'elles sont bilatérales. Les protocoles d'IRM réalisés pour les patients inclus dans un bilan préchirurgical d'une chirurgie de l'épilepsie comportent des séquences (volumétrie) permettant une interprétation quantitative de la sévérité radiologique de la sclérose hippocampique (52,53). L'ensemble de ces interprétations qualitatives et quantitatives peut déboucher sur la gradation radiologique de l'atrophie hippocampique selon l'échelle de Scheltens (54) ou celle de Wyler (55). Certains travaux récents démontrent même une corrélation entre l'imagerie et la sévérité de la perte neuronale par champ ammonien (56), et ambitionnent ainsi d'anticiper, à l'avenir, le grade histologique de la sclérose hippocampique à l'aide de l'IRM préopératoire.

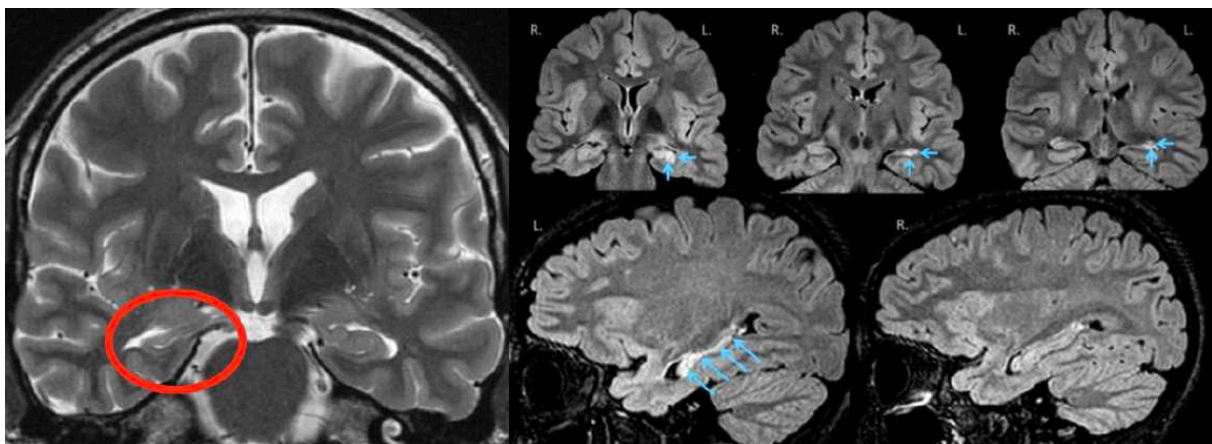


Figure 4. Aspect IRM d'une sclérose hippocampique. À gauche, IRM cérébrale 3.0 Teslas, en coupe coronale, en séquence T2, montrant une atrophie de l'hippocampe droit. À droite, IRM cérébrale, en coupes coronales (en haut) et en coupes sagittales (en bas), en séquence FLAIR, montrant une atrophie et un hypersignal de l'hippocampe droit (d'après Isnard et Bourdillon, *Revue Neurologique*, 2015) (51). Ces anomalies sont typiques d'une sclérose hippocampique droite.

Les modifications structurelles ne sont pas limitées à l'hippocampe et peuvent affecter l'amygdale, le néocortex temporal, la substance blanche du pôle temporal, le fornix, le corps mamillaire, l'insula, le thalamus ou le cortex frontobasal homolatéraux. Dans environ 15% des cas, le pôle temporal peut ainsi apparaître « délavé », signifiant qu'il existe une dédifférenciation entre la substance blanche et la substance grise. Pour certains auteurs, cette anomalie radiologique est le témoin d'une implication formelle du pôle temporal dans l'ictogénèse mésiotemporale (50,57). Certaines de ces modifications radiologiques extrahippocampiques peuvent témoigner d'une perte neuronale, tandis que certaines autres anomalies disparaissent en période postopératoire chez les patients libres de crises (17).

La sclérose hippocampique peut également être associée à des modifications développementales de la formation hippocampique (58), de types malrotation ou malposition (59). Peltier définit les malformations hippocampiques comme complètes devant l'association d'une perte de visualisation de la structure interne de l'hippocampe (stratum radiatum), d'une

anomalie de forme ou de rotation de l'hippocampe (globuleux et médialisé) et d'une verticalisation du sillon collatéral (60).

En IRM multimodale, la spectroscopie a permis d'observer une diminution du N-acétyl-aspartate dans la sclérose hippocampique, témoignant d'une atteinte de l'intégrité neuronale (61).

2.9. Prise en charge thérapeutique de l'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique

2.9.1. Traitement médicamenteux

La première étape du traitement d'un patient atteint d'une épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique est l'administration de médicaments antiépileptiques. Cependant, les diverses molécules antiépileptiques, bien que données en association et avec diverses combinaisons, échouent dans presque 90% des cas à contrôler l'épilepsie (17).

2.9.2. Traitement chirurgical

Devant la pharmacorésistance élevée de ce syndrome, la chirurgie est, à l'heure actuelle, le traitement de référence (62).

2.9.2.1. Chirurgie de résection

Dans un essai thérapeutique contrôlé, randomisé, étudiant la chirurgie de résection par rapport au traitement médical, à 1 an, la proportion cumulée de patients libres de crises était de 42% dans le groupe chirurgical et de 8% dans le groupe médical (63). De plus, dans cette étude, 64% des patients qui ont bénéficié d'une chirurgie étaient libres de crises partielles complexes à 1 an postopératoire. Le traitement chirurgical a également prouvé réduire la survenue des SUDEP. Une méta-analyse de séries rétrospectives a conclu que le taux de patients libres de crises après résection chirurgicale chez les patients atteints d'épilepsie méso-temporale était d'environ 70% (34-93%) (64). Dans les études avec un suivi à long terme, 50 à 88% des patients étaient libres de crises à la 5ème année postopératoire (14,62). Les larges variations de taux de liberté de crises entre les séries peuvent être expliquées par les différentes façons de gérer les médicaments antiépileptiques en période postopératoire : certaines équipes essaient une décroissance rapide des traitements, tandis que d'autres conservent la thérapie initiale (65).

Différentes techniques sont utilisées dans la chirurgie méso-temporale : la lobectomie temporale antérieure qui consiste à réséquer le complexe amygdalo-hippocampique ainsi que le pôle temporal, et les techniques d'amygdalo-hippocampectomie sélectives qui épargnent le pôle temporal.

Bien que rares, les complications postopératoires liées à cette intervention ne sont pas nulles et peuvent concerner 4% des patients, tandis que le taux de séquelle neurologique n'excède pas 0,5% (9). Cependant, la morbidité principale de cette intervention réside dans la survenue ou l'aggravation de troubles cognitifs qui peut atteindre 30% des patients (14). Des alternatives thérapeutiques chirurgicales ont donc été développées, et sont en cours de développement, pour tenter de diminuer ce risque (66).

2.9.2.2. Radiochirurgie stéréotaxique

La radiochirurgie stéréotaxique a trouvé des indications dans le traitement de l'épilepsie, notamment sur les foyers situés en région éloquent, rendant la chirurgie périlleuse, et a montré une efficacité dans le traitement des hamartomes hypothalamiques. L'utilisation de cette technique pour l'épilepsie méso-temporale s'est développée dans les années 2000. Deux essais thérapeutiques laissent entrevoir un pronostic épileptologique favorable avec une réduction de la fréquence des crises a été observée à partir de 1 an postopératoire et 65% des patients qui étaient libres de crises à 2 ans de la chirurgie (67,68). L'essai randomisé, contrôlé, intitulé "radiosurgery or open surgery for epilepsy" (ROSE), a montré une supériorité de la chirurgie de résection par rapport à la radiochirurgie stéréotaxique concernant le pronostic épileptologique (78% contre 52% de patients libres de crise à 3 ans) et l'absence de différence entre les deux groupes concernant les complications postopératoires et le pronostic cognitif (69).

2.9.2.3. Thérapie thermique interstitielle par laser (LITT)

La LITT est la dernière technique mise au point pour le traitement de l'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique. Elle permet une ablation thermique du complexe amygdalohippocampique sous guidage par IRM en temps réel. Les quelques études réalisées à ce jour font d'état d'environ 60% de patients libres de crises à 2 ans de l'intervention (70,71). Il n'existe pas d'essai comparatif avec la chirurgie de résection. Néanmoins le pronostic épileptologique semble légèrement moins bon qu'après une résection chirurgicale. La LITT présente surtout l'avantage d'une moindre invasivité et d'une durée d'hospitalisation postopératoire plus courte.

2.9.2.4. Stimulation amygdalohippocampique

Il existe un nombre non-négligeable de patients, souffrant d'une épilepsie méso-temporale pharmacorésistante, et qui ne sont pas candidats à une chirurgie de résection. Certains d'entre eux peuvent bénéficier des effets d'une stimulation cérébrale profonde ou d'une stimulation corticale. Actuellement, la stimulation cérébrale profonde est considérée comme une option crédible pour le traitement palliatif de l'épilepsie mésiotemporale (72). Les résultats suivant une stimulation amygdalohippocampique (ou hippocampique) sont très variables. Vonck et al. ont évalué l'efficacité de la stimulation chez 11 patients avec un long suivi (73). Chez plus de la moitié des patients, une réduction d'au moins 90% de la fréquence des crises était atteinte et 3 patients étaient libres de crises sur plus de 3 ans de suivi. Également, Vonck et al. ont suggéré que la stimulation méso-temporale bilatérale pouvait avoir une efficacité plus importante dans l'épilepsie méso-temporale unilatérale. Cependant, dans d'autres études, la stimulation amygdalohippocampique produisait une réduction des crises de 15 à 75% (74–76).

2.9.2.5. Conclusion

Quelle que soit la série analysée et la technique chirurgicale utilisée, il est intéressant de constater la diminution progressive du taux de patients libres de crises au cours du temps. En effet, les crises épileptiques peuvent récidiver dès la période postopératoire immédiate jusqu'à plus d'une décennie après l'intervention. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les récurrences à distance de la chirurgie après une période initiale sans crise : la diminution ou l'arrêt trop brusque du traitement antiépileptique, l'abaissement du seuil épileptogène par un ou des facteurs exogènes (prise de toxiques, dette de sommeil, stimulation lumineuse intermittente) ou la complexification du réseau épileptogène.

Également, quelle que soit la technique chirurgicale curatrice utilisée, celle-ci peut être associée à une morbidité neurologique et/ou cognitive, de par une complication de l'intervention ou par la seule conséquence de l'ablation du complexe amygdalohippocampique. La recherche en chirurgie de l'épilepsie s'attelle donc à étudier des alternatives thérapeutiques non destructrices pour traiter les patients atteints d'épilepsie partielle méso-temporale associée à une sclérose hippocampique.

3. Modèle animal d'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique : la souris Kaïnate

Pour mener ce projet de recherche préclinique, nous avons choisi de travailler sur un modèle murin présentant une épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique : la souris Kaïnate.

Le Kaïnate (KA, acide (2-carboxy-4-isopropényl-3-pyrrolidiny)-acétique ou acide kaïnique) est isolé à partir d'une algue (*Digenea simplex*). C'est un agoniste puissant et sélectif des récepteurs glutamatergiques, qui active préférentiellement les récepteurs non-NMDA (AMPA et KA, (77)). Le modèle Kaïnate entraîne un état de mal épileptique partiel, suivi par une période de latence sans crise, puis un état chronique de crises récurrentes. Le Kaïnate peut être administré par voie systémique (intraveineuse ou intrapéritonéale) ou en intrahippocampique, avec des différences notables dans les caractéristiques de la maladie épileptique induite. Dans notre projet, nous avons choisi cette dernière technique d'injection.

3.1. Induction de l'épilepsie par injection systémique de Kaïnate

Lorsque le Kaïnate est administré par voie systémique, l'état de mal épileptique laisse place à des crises limbiques récurrentes et spontanées, nécessitant l'administration d'un traitement antiépileptique pour diminuer la mortalité.

Chez les animaux développant une épilepsie chronique, les caractéristiques histologiques hippocampiques sont similaires aux changements observés dans la sclérose hippocampique humaine, avec une perte neuronale sélective dans CA1 et CA4 ainsi qu'au niveau du hile. CA4 est préférentiellement atteint par rapport à CA1, ce qui suggère la plus forte distribution des récepteurs KA hippocampiques dans cette zone (77). Ceci contraste néanmoins avec la sclérose hippocampique humaine, dans laquelle la perte neuronale est plus importante dans CA1 que dans CA4, excepté dans les rares cas de scléroses hippocampique de type 3 selon l'ILAE ((49,78)). Certaines structures extrahippocampiques, notamment les cortex piriforme et olfactif, l'amygdale, le septum, certains noyaux thalamiques et certaines zones du néocortex sont également touchés par la dépopulation neuronale (79). Les altérations histologiques induites par l'injection systémique de Kaïnate sont donc plus diffuses que celles rapportées dans les tissus de patients atteints d'épilepsie méso-temporale associée à une sclérose hippocampique (80).

3.2. Induction de l'épilepsie par injection intrahippocampique de Kaïnate

Les injections intracérébrales de Kaïnate ont été utilisées pour réduire la variabilité observée, tant pour les crises que pour les lésions cérébrales, après l'injection systémique de Kaïnate, ainsi que l'importante mortalité survenant par cette technique (81). En effet, non seulement la toxicité est réduite, mais les caractéristiques histologiques observées après les injections intracérébrales sont plus proches de celles observées chez l'Homme qu'avec les injections systémiques. Également, ces manipulations sont plus faciles à réaliser que les stimulations électriques, autre technique pour induire l'épileptogénèse, et offrent une bonne reproductibilité.

Dans les minutes suivant l'injection de Kaïnate (1 nmol dans 50 nL) dans l'hippocampe dorsal, un état de mal épileptique partiel survient et peut durer jusqu'à 24 heures (82,83). Durant cette période, il existe déjà une perte neuronale dans CA1, CA4 et dans le hile (84). Dans les 3 premières semaines après l'injection de Kaïnate, on observe une prolifération et une hypertrophie des astrocytes et de la microglie, ainsi qu'un bourgeonnement des fibres moussues, et une dispersion avec hypertrophie des cellules granulaires du *gyrus dentatus* (82,85) (**Figure 5**). Ces changements morphologiques sont observés uniquement dans l'hippocampe homolatéral et sont fixés 3 à 4 semaines après l'injection (86). Aucune perte cellulaire n'est retrouvée dans l'hippocampe controlatéral malgré l'existence en son sein de décharges épileptiques durant la phase d'état de mal partiel (80,81,84).

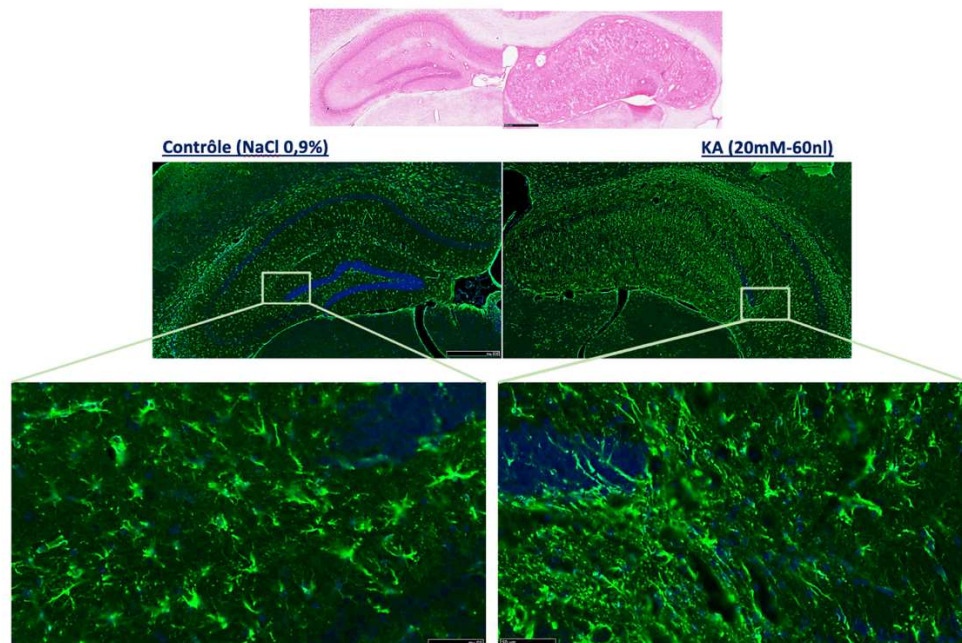


Figure 5 : Aspect histologique d'un hippocampe de souris Kaïnate. Hippocampe de souris à J23 de l'injection de Kaïnate (à droite), par rapport à son contrôle (à gauche). Coupes coronales de 20 µm. On observe une sclérose de l'hippocampe avec dépopulation neuronale et gliose astrocytaire en CA1, CA3 et dans le hile, ainsi qu'un bourgeonnement des fibres moussues et la dispersion hypertrophique des cellules granulaires (d'après V. Navarro et D.Roussel).

Electrophysiologiquement, il existe une aggravation progressive des décharges épileptiformes hippocampiques dans les 3 premières semaines après l'injection de Kainate qui est concomitante avec la dispersion des cellules du gyrus denté, et qui correspond certainement à la période d'épileptogénèse (81,83,86) (**Figure 6**). Par la suite, les crises hippocampiques surviennent régulièrement et restent stables en fréquence et en durée pendant plusieurs mois (87). Ces crises récurrentes, appelées « décharges paroxystiques hippocampiques » sont le plus souvent restreintes à l'hippocampe homolatéral avec des *spikes* contralatéraux chez une minorité d'animaux, et de possibles généralisations vers le cortex (83,86). Ces décharges paroxystiques hippocampiques sont stables dans le temps avec une fréquence qui peut être élevée (jusqu'à 60 par heure) (87,88). Il s'y associe des modifications comportementales (mâchonnements, mouvements stéréotypés de la tête voire des pattes), mais parfois ces décharges peuvent être infracliniques (83). De plus, des enregistrements intracellulaires *in vivo* ont montré que pendant une décharge paroxystique hippocampique, les neurones résiduels de CA1 présentent une dépolarisation membranaire soutenue sur laquelle se superposent des dépolarisations rythmiques supraliminaires (87).

Au total, le modèle de souris Kainate obtenu par injection intrahippocampique présente des caractéristiques de l'épilepsie méso-temporale qui offrent d'importantes similitudes avec les caractéristiques de la maladie humaine : survenue de crises focales parfois secondairement généralisées avec une composante comportementale, décharges paroxystiques hippocampiques visibles en EEG et caractéristiques histologiques de la sclérose hippocampique de type 1 ILAE. Nous avons ainsi utilisé ce modèle dans notre projet.

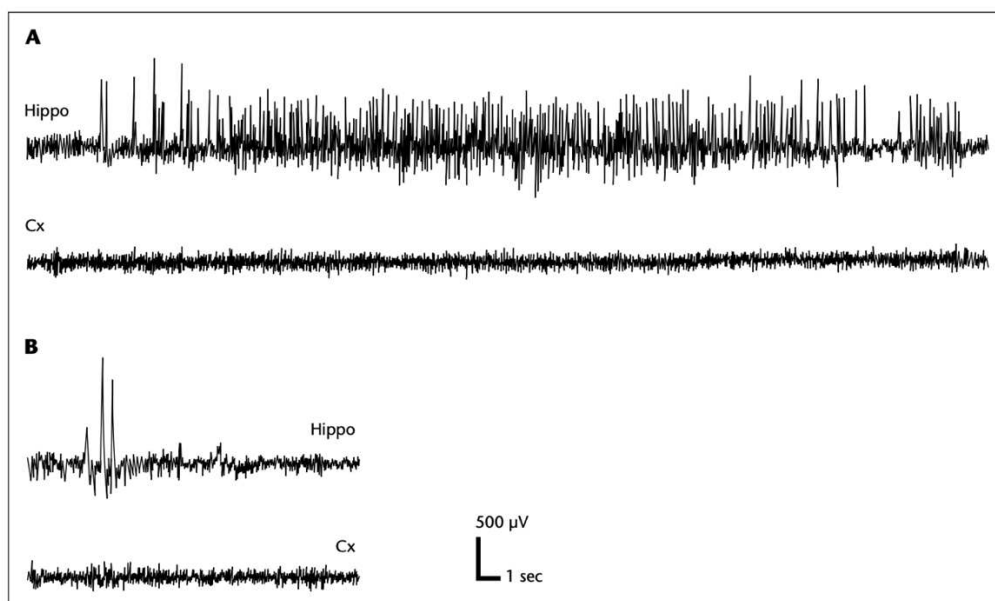


Figure 6 : Enregistrements EEG d'une décharge hippocampique (A) et d'une bouffée de pointes (B) qui résultent d'un état de mal induit par injection intrahippocampique de Kainate chez une souris (d'après Bressand et al, *Epilepsies*, 2009).

4. La neurogenèse hippocampique

Le modèle de souris Kaïnate, décrit au paragraphe précédent, a pour caractéristique, entre autres, une dépopulation neuronale hippocampique à l'instar de la sclérose hippocampique humaine. Comme nous le verrons au paragraphe suivant, l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE), notamment lorsqu'elle est induite par les ultrasons, semble influencer la neurogenèse hippocampique chez la souris (89). Nous nous sommes donc basés sur ce postulat pour définir notre projet de recherche, en faisant l'hypothèse que les modifications de la neurogenèse hippocampique induite par l'ouverture ultrasonore de la BHE pouvait potentiellement avoir un effet antiépileptique.

Dans les années 1960, Altman a été le premier à mettre en évidence la formation de probables nouveaux neurones dans le cerveau de rats adultes préalablement lésés par l'utilisation de thymidine tritiée (90); puis, par la suite dans le cerveau de rats et de chats adultes sains (91,92). A cette époque, il était techniquement impossible d'affirmer que ces cellules néoformées étaient des nouveaux neurones et non des cellules astrocytaires. Dans les années 1990, l'utilisation de la 5-Bromo-2- deoxyUridine (BrdU), un analogue de la thymidine s'intégrant aux cellules en division, a permis le comarquage des nouvelles cellules, avec des marqueurs neuronaux spécifiques, et ainsi de les identifier formellement comme des neurones (93). Plus récemment, la formation de nouveaux neurones (« neurones nouveaux ») dans le cerveau adulte a été mise en évidence chez de nombreuses espèces animales ainsi que chez l'homme (94).

La neurogenèse adulte a été observée dans deux zones principales du cerveau adulte de rongeur (**Figure 7**) :

- la zone sous-ventriculaire des ventricules latéraux,
- la zone sous-granulaire du *gyrus dentatus* de l'hippocampe,

Concernant la zone sous-ventriculaire, les nouvelles cellules issues de cette zone se différencient en neurones au cours de leur migration jusqu'au bulbe olfactif (**Figure 7A**). Au niveau de l'hippocampe, les cellules issues de la zone sous-granulaire migrent au sein même de la couche granulaire pour se différencier en neurones (**Figure 7B**).

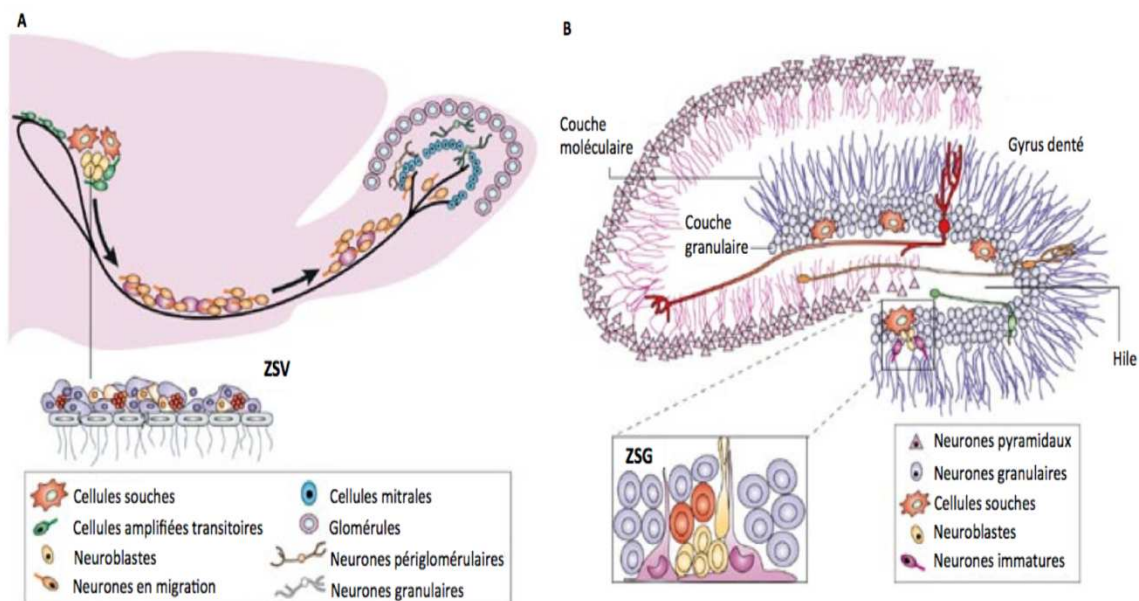


Figure 7. (A) Neurogenèse adulte dans la zone sous-ventriculaire et (B) zone sous-granulaire chez le rongeur, adapté de Vescovi et al, 2006 (95).

En dehors de ces deux structures, certaines études ont montré que la formation de nouveaux neurones chez l'adulte peut avoir lieu dans d'autres régions cérébrales telles que le cortex, le striatum, l'amygdale, le cortex piriforme, le tubercule olfactif, l'hypothalamus, la substance noire ou encore le tronc cérébral. Ces études sont, à l'heure actuelle, encore controversées (96). Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à la neurogenèse hippocampique.

4.1. Étapes de la neurogenèse adulte hippocampique

Le travail de Lunion (2014) s'intéresse en détails à la neurogenèse hippocampique adulte (97). Ici, nous allons en résumer les grandes étapes et y intégrer la littérature récente. Pour observer la formation de nouveaux neurones dans un hippocampe adulte, deux conditions sont nécessaires :

- la présence de cellules souches, dites cellules de type 1,
- un environnement adapté appelé « niche neurogénique ». Cette niche neurogénique correspond à un environnement composé de différents types cellulaires (microglie, astrocytes, oligodendrocytes), sécrétant dans le milieu extracellulaire des facteurs de croissance et des nutriments. Ce sont ces différents éléments qui permettront la différenciation des cellules de type 1 ainsi que leur maturation en neurones ou en cellules gliales (98).

Les cellules de type 1 sont des cellules souches qui vont se diviser en cellules progénitrices, capables de s'autorenouveler et de se différencier en neurones ou en cellules

gliales (**Figure 8**) (98). Plusieurs études mettent en évidence leurs capacités de prolifération et de différenciation. *In vivo*, des expériences de greffe de cellules de type 1 de la zone sous-granulaire adulte dans la zone sous-ventriculaire adulte aboutissent à la formation de neurones du bulbe olfactif, ce qui montre à la fois le caractère multipotent des cellules de type 1 mais également l'importance de la niche neurogénique (98,99).

Seule la formation des nouveaux neurones sera détaillée ci-après. Avant de devenir des neurones post-mitotiques, les cellules de type 1 transitent par différents stades mitotiques affectant leur morphologie ainsi que leur physiologie. Ainsi, il est possible de distinguer les cellules de type 1, type 2 (a et b) et type 3.

Au niveau du *gyrus dentatus*, les cellules de type 1 se situent dans la zone sous-granulaire et ont une longue extension cytoplasmique et un noyau triangulaire. Elles expriment la GFAP, la protéine nestin ainsi que le facteur de transcription Sox2 (nécessaire pour la capacité d'autorenouvellement cellulaire (100)) (**Figure 9**). Ces cellules de type 1 montrent une capacité de prolifération limitée et présentent certaines des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules gliales.

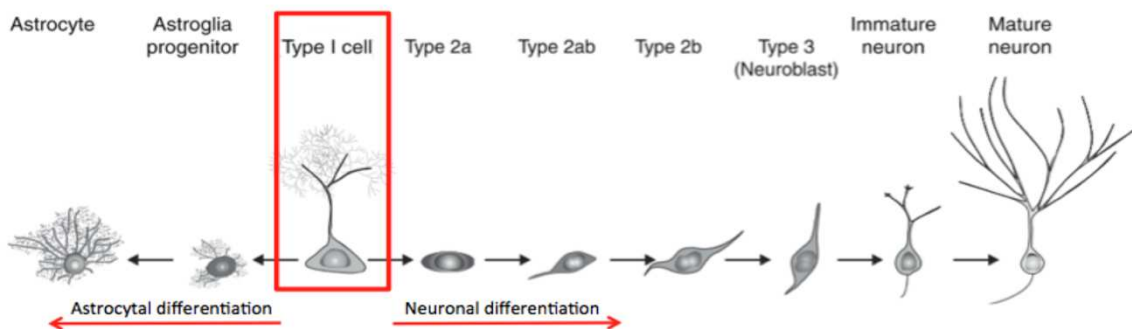


Figure 8. Étapes de la différenciation neuronale et astrocytaire. A partir d'une cellule de type 1, différenciation d'une cellule souche de la zone sous-granulaire en neurone mature ou en cellule gliale, adapté de Bonaguidi et al, 2012 (99).

Les cellules de type 1 vont ensuite donner les cellules de type 2 (**Figure 8**). Celles-ci ne présentent plus d'extension cytoplasmique ; leur noyau est irrégulier et elles sont capables de migration tangentielle (101). La migration de ces nouvelles cellules au sein même de la couche granulaire se produit dans le même temps que la maturation. La plupart des neurones s'intègre dans le 1^{er} tiers de la couche granulaire du *gyrus dentatus*. Une minorité s'intègre dans le 2^{ème} tiers et beaucoup plus rarement dans le 3^{ème} tiers (102). Comme les cellules de type 1, les cellules de type 2 expriment Sox2 ; elles expriment également une protéine d'adhésion, la PSA-NCAM, mais n'expriment plus la GFAP. Elles sont alors divisées en deux sous-populations, celles qui continuent à exprimer la nestin, appelées cellules de type 2a et

celles qui n'expriment plus la nestin mais expriment la doublecortine associée au chromosome X (DCX), appelées cellules de type 2b (101). Les cellules de type 2b proviendraient des cellules 2a. Contrairement à celles de type 1, les cellules de type 2a et 2b possèdent un fort potentiel de prolifération cellulaire.

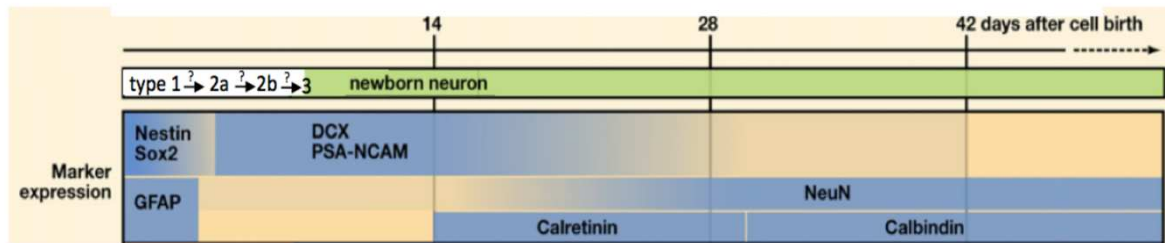


Figure 9. Différents profils d'expression protéique des cellules de la zone sous-granulaire au cours des 42 jours suivant le début de la division des cellules précurseurs, d'après Kempermann et al, 2004 (101).

Les cellules de type 2b vont ensuite se différencier en des cellules de type 3, appelées neuroblastes (**Figure 8**). Leur noyau est arrondi, à l'instar de celui des cellules granulaires (101). Elles expriment également la DCX ainsi que la PSA-NCAM. Le stade cellulaire de type 3 est une étape de transition entre la période mitotique et la période post-mitotique. En effet, après ce stade les cellules commencent à exprimer la calrétinine et sont considérées comme étant des neurones immatures. À l'âge de 2 semaines environ, les neurones immatures continuent à exprimer la DCX, mais commencent également à exprimer en quantité moins importante la protéine NeuN, utilisée pour marquer les noyaux des neurones matures (**Figure 9**). A cet âge, les neurones nouvellement formés présentent initialement une activité GABAergique excitatrice. En effet, ces nouvelles cellules ont une concentration intracellulaire élevée en ions chlorures, ce qui a pour conséquence d'inverser l'action, habituellement inhibitrice, du neuromédiateur GABA. Entre 2 et 4 semaines, l'activité GABAergique des nouveaux neurones devient inhibitrice et c'est également à cette période que s'initie l'arborisation dendritique (**Figure 10**) (98). Les nouveaux neurones granulaires commencent alors à projeter leurs axones sur les neurones pyramidaux de CA4. À environ 2 semaines, des épines dendritiques commencent à se former sur les nouveaux neurones. Enfin, la transition de neurones immatures à neurones matures est marquée par l'expression de la calbindine, à la place de la calrétinine, avec poursuite de l'expression de la protéine NeuN (**Figure 9**).

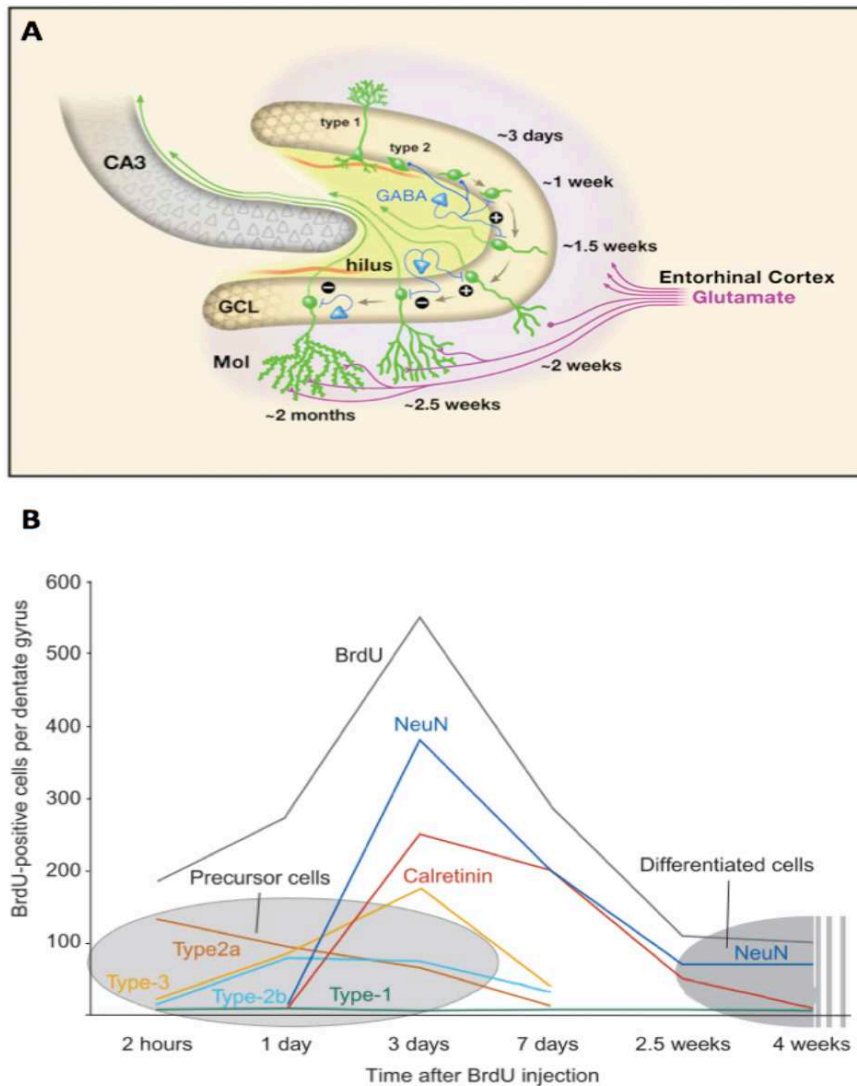


Figure 10. (A) Maturation et migration des cellules néoformées partant de la zone sous-granulaire au sein de la couche granulaire, d'après Zhao et al, 2008 (98). (B) Nombre de cellules BrdU positives exprimant certains marqueurs au cours du premier mois de la neurogenèse adulte hippocampique, d'après Kempermann et al, 2004 (101).

Les premiers neurones dits « matures » sont observés environ 1 mois après les premières divisions des cellules de type 1 (98,103). L'arborisation dendritique de ces nouveaux neurones continue à se développer jusqu'à 2 mois après la phase proliférative, les rendant ainsi non différenciables des autres neurones granulaires matures (98). C'est également à l'issue de ce délai que les projections des neurones vers CA4 deviennent stables (104). Les neurones matures nouvellement formés reçoivent alors des afférences GABAergiques inhibitrices et glutamatergiques excitatrices similaires à celles reçues par les neurones matures initialement présents. Par ailleurs, le système immunitaire inné et adaptatif semble jouer un rôle complexe dans la neurogenèse adulte au cours du vieillissement (105).

Au cours de la neurogenèse adulte hippocampique, une majorité (environ 70%) des cellules nouvellement formées disparaît, dès leurs premiers jours de vie, par un mécanisme

de mort cellulaire programmée (**Figure 11**) (101). Ainsi, sur l'ensemble des neurones néoformés, seuls 25 à 30 % d'entre eux survivent 1 mois après la fin de la phase mitotique et s'intègrent aux réseaux neuronaux (98). L'électrophysiologie et l'immunohistochimie permettent de comprendre l'intégration fonctionnelle de ces nouveaux neurones et suggère que la neurogenèse participe à la plasticité hippocampique (106).

La neurogenèse hippocampique chez la souris et le rat partage des points communs, mais présente également des différences. Snyder et al (2009a) ont montré que la quantité de nouveaux neurones générés et la chronologie de leur maturation variaient entre ces deux espèces (107). Ainsi, le nombre de nouveaux neurones générés quotidiennement est 3 fois plus important chez le rat que chez la souris (**Figure 11A**). Cette étude montre cependant que le taux de cellules néoformées est similaire entre les deux espèces proportionnellement au volume de leur couche granulaire, mais que le taux de mortalité de ces cellules est plus important chez la souris que chez le rat (**Figure 11B**). Également, la chronologie d'expression des marqueurs utilisés pour suivre la maturation neuronale varie en fonction de l'espèce : le pourcentage de neurones DCX+ diminue plus rapidement chez le rat que chez la souris (**Figure 11C**), et l'expression de NeuN augmente plus rapidement chez le rat que chez la souris (**Figure 11D**). Ainsi, la maturation neuronale est plus rapide chez le rat que chez la souris. Des différences dans la distribution des cellules granulaires nouvellement formées le long de l'axe dorso-ventral ont également été observées entre différentes espèces (108).

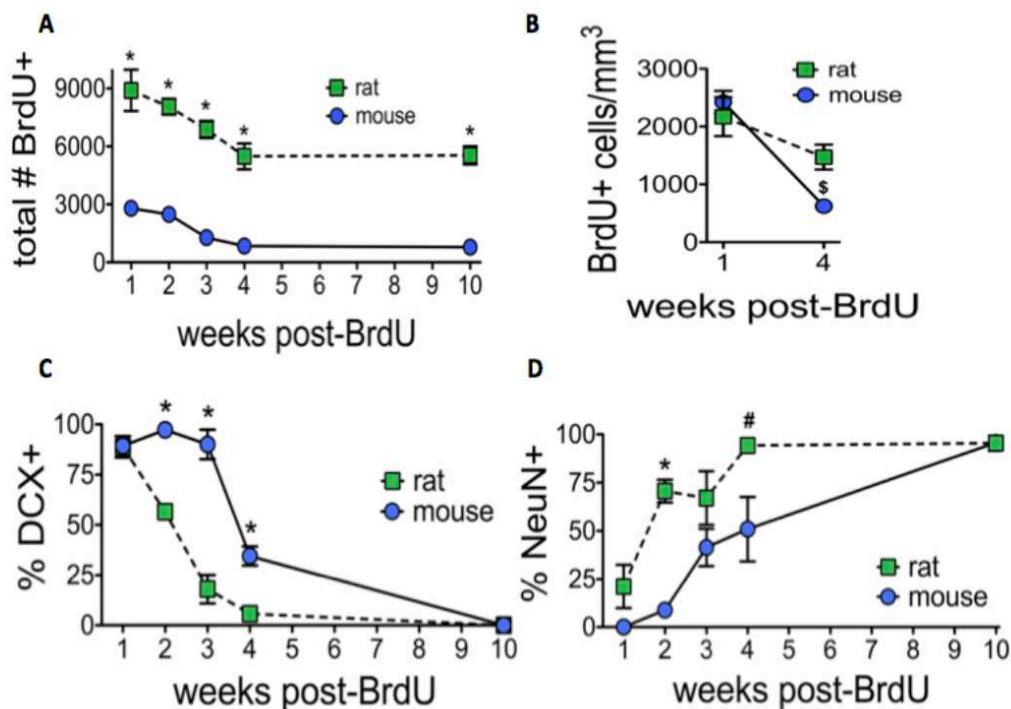


Figure 11. Comparaisons de la neurogenèse adulte hippocampique entre souris et rats. (A) Comparaison du nombre total de cellules marquées positivement à la BrdU en fonction des semaines post-injections de BrdU. (B) Comparaison de densités de cellules BrdU+/mm³ à 1 et 4 semaines post-injections de BrdU. (C) et (D) Comparaison du pourcentage de cellules BrdU+/DCX+ et BrdU+/NeuN+ en fonction des jours post injection de BrdU, d'après Snyder et al, 2009a (107).

4.2. Facteurs influençant la neurogenèse adulte hippocampique

La neurogenèse adulte hippocampique est influencée par de nombreux facteurs exogènes et par certaines maladies qui peuvent agir positivement ou négativement au cours des différents stades de la formation des neurones. Parmi les facteurs positifs, il y a l'exercice physique, l'enrichissement de l'environnement et la potentialisation à long terme. Parmi les facteurs négatifs, il y a notamment le vieillissement, le stress, la privation de sommeil. Certains facteurs peuvent être positifs ou négatifs en fonction des conditions expérimentales choisies : le stress, l'apprentissage et les facteurs de croissance (109).

L'enrichissement environnemental correspond à des conditions d'hébergement permettant l'augmentation des stimulations sensorielles, motrices, cognitives, sociales, olfactives et auditives des animaux. Plusieurs études ont montré que l'enrichissement était capable de stimuler différentes structures cérébrales et, entre autres, de provoquer un épaissement du cortex cérébral, d'augmenter l'arborisation et la longueur des dendrites, ainsi que le nombre d'épines dendritiques, la taille des synapses sur certains neurones ou encore de modifier l'expression de certains gènes (110–112). Concernant la neurogenèse adulte hippocampique, l'enrichissement environnemental augmente la durée de survie des neurones mais pas la prolifération cellulaire chez la souris (113). Une étude a montré qu'un enrichissement d'une seule semaine sur des cellules âgées de 1 à 2 semaines permettait d'augmenter leur survie (114) et que l'effet bénéfique de l'enrichissement sur la survie était dépendant de leur âge. Ainsi, l'influence serait plus importante si les neurones sont immatures (âgés de 1 à 3 semaines) au moment de l'enrichissement, tandis que, sur les neurones âgés de plus de 3 semaines, l'enrichissement n'a aucun effet (114).

Chez les souris, l'**exercice physique** volontaire a des effets positifs sur la neurogenèse adulte hippocampique. En effet, cela engendre une augmentation de la prolifération cellulaire, de la survie neuronale et une accélération de la maturation et de la différenciation neuronale, via une augmentation du nombre d'épines dendritiques (102,110,115), et de l'expression de plus de neurones matures et moins de cellules astrocytaires (116).

Le **vieillessement** influence négativement les différentes étapes de la neurogenèse adulte hippocampique. Les animaux âgés présentent une quantité de cellules souches, une prolifération cellulaire ainsi qu'une survie neuronale moindre par rapport animaux plus jeunes (117). Des études montrent une diminution importante de la prolifération cellulaire (de 30 à 40% chaque mois) entre l'âge de 1 mois et l'âge de 4 mois (118). Puis, cette diminution se poursuit de façon moins importante jusqu'à 9 mois. La survie neuronale subit également une diminution avec le vieillissement ; et plus de cellules se différencient en astrocytes qu'en neurones chez les souris âgées par rapport aux plus jeunes (119).

L'effet du **stress** sur la neurogenèse adulte hippocampique est controversé. Différents résultats sont obtenus selon les espèces ainsi que selon les types de stress appliqués (120). En effet, chez le rat, un stress ponctuel n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire alors qu'il diminue la survie neuronale (121). En revanche, chez le rat comme chez la souris, une série de stress répétés entraîne une diminution de la prolifération cellulaire (122,123). A l'inverse, il a également été montré que le stress pouvait augmenter la survie cellulaire de façon transitoire chez la souris (115).

De nombreuses études montrent qu'il y a une association entre l'**apprentissage** et la neurogenèse adulte hippocampique. Les tâches comportementales telles que la piscine de Morris (115,124), et l'exploration spatiale (125) stimuleraient la formation de nouveaux neurones. De plus, il a été montré qu'une acquisition lente est liée à une augmentation de la survie des jeunes neurones alors qu'une acquisition plus rapide ne modifie pas la survie neuronale (126). L'apprentissage sur des tâches dépendantes des fonctions hippocampiques peut entraîner une augmentation de la survie des nouveaux neurones âgés de 1 et 2 semaines, alors qu'aucune modification de la survie cellulaire n'est observée suite à un apprentissage concernant des tâches indépendantes des fonctions hippocampiques (127–131). A l'inverse, d'autres études montrent que l'apprentissage dépendant des fonctions hippocampiques peut entraîner, soit une absence d'effet significatif, soit une diminution de la neurogenèse adulte hippocampique, (132,133). Certains auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle l'apprentissage agirait de manière distincte et indépendante sur les différentes étapes de la neurogenèse adulte et que cette action dépendrait de l'âge des neurones observés (134).

Enfin, certaines interventions expérimentales peuvent également influencer la neurogenèse. Ainsi, dans une étude réalisant une hippocampectomie chez le rat adulte, une augmentation compensatoire de la neurogenèse est observée dans l'hippocampe controlatéral ce qui pourrait expliquer l'absence de détérioration cognitive de l'animal (135).

4.3. Influence de l'épilepsie sur la neurogenèse adulte hippocampique

Comme les facteurs exogènes détaillés précédemment, l'épilepsie influence la neurogenèse hippocampique. Ainsi, la neurogenèse des cellules granulaires dans le *gyrus dentatus* augmente après les crises (136), tandis qu'un nombre substantiel de cellules granulaires nouvellement générées (137) migrent anormalement dans le hile après un état de mal épileptique (138,139). Des études anatomiques et physiologiques indiquent que ces cellules granulaires ectopiques sont capables de s'insérer dans des circuits hilaires (140,141). Elles présentent des décharges régulières de potentiels d'action qui sont synchronisées avec les décharges des cellules pyramidales de CA4 et les décharges des neurones hilaires, y

compris des fibres moussues (142). Les fibres moussues participeraient aux circuits excitateurs qui activent les cellules granulaires ectopiques, fournissant un aperçu supplémentaire des réarrangements de réseau qui accompagnent la neurogenèse induite par les crises dans ce modèle animal d'épilepsie (143). Enfin, une autre étude suggère que des programmes de développement relativement rigides définissent les propriétés membranaires des cellules nouvellement générées, mais également qu'une plasticité substantielle est présente pour influencer leur place dans les circuits préexistants (139).

La neurogenèse hippocampique aberrante induite par l'état de mal épileptique contribuerait elle-même à l'épilepsie et au déclin cognitif chez la souris après injection intrahippocampique de pilocarpine. De plus, l'ablation de cette neurogenèse aberrante peut réduire les crises récurrentes et restaurer la fonction cognitive suite à une agression cérébrale pro-épileptique (144). Dans une étude analysant la morphologie de ces nouveaux neurones chez le rat, il a été montré que les dendrites des cellules granulaires ectopiques hilaires étaient morphologiquement plus complexes, avec plus de ramification et de dendrites tortueuses (145). La reconstruction axonale a démontré que les cellules granulaires ectopiques hilaires contribuaient au bourgeonnement des fibres moussues. Cette combinaison de caractéristiques morphologiques préservées et aberrantes pourrait expliquer pourquoi la population de cellules granulaires ectopiques hilaires pourrait altérer la fonction du *gyrus dentatus* (145).

5. Ouverture de la barrière hémato-encéphalique par ultrasons

5.1. La barrière hémato-encéphalique (BHE)

5.1.1. Définition et histologie

La BHE est localisée à l'interface entre le sang et le parenchyme cérébral, et contrôle les échanges entre eux (146). Elle est formée par les cellules endothéliales cérébrales qui se caractérisent par la présence de jonctions intercellulaires serrées ayant une résistance électrique très élevée qui empêche la diffusion des molécules, même de petite taille (ex : ions). Les cellules endothéliales cérébrales sont, de plus, en interaction fonctionnelle avec les cellules périvasculaires (péricytes, astrocytes, neurones), l'ensemble constituant ce qu'on appelle « le complexe neurovasculaire » (147). Une autre interface sang-cerveau est localisée au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes et contrôle les échanges entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR) : la barrière sang-LCR (146,148). Certaines aires cérébrales sont dépourvues de BHE et de barrière sang-LCR et constituent ainsi une zone privilégiée

d'échanges entre le cerveau et la périphérie (contrôle de la prise alimentaire ou de la température corporelle) (149) : ce sont les organes circumventriculaires (organe subfornical, organe vasculaire de la lame terminale, neurohypophyse, glande pinéale, organe subcommissural et area postrema). Cette absence de barrière répond à plusieurs nécessités : neurosécrétion par l'hypophyse postérieure et chémoréception par l'organe subfornical (150). Ces régions sont séparées du reste du cerveau par des cellules épendymaires spécialisées unies par des jonctions serrées. Les surfaces d'échanges offertes dans ces zones sont cependant négligeables par rapport aux surfaces offertes par la BHE (151).

5.1.2. Perméabilité

La BHE est imperméable à un grand nombre de molécules, et agit comme un filtre sélectif ne laissant passer que les molécules de poids moléculaire inférieur à 0,5 kDa, protégeant ainsi le cerveau contre les variations de concentration des ions et des neurotransmetteurs ou des hormones circulant dans le sang (148). Seules les molécules très lipophiles peuvent la franchir. Certaines molécules le font grâce à des systèmes de transport, c'est le cas du glucose ou des acides aminés, pour lesquels il existe 3 systèmes de transports différents (152,153) (Figure 12) :

- Le passage du glucose, substrat énergétique fondamental de la cellule nerveuse, est très sélectif puisque seul le D-glucose intervient dans les besoins métaboliques.
- Les neurones : le D-glucose entrant est supérieur à la demande métabolique, mais la situation s'inverse si la glycémie est basse.
- Le passage des acides aminés indispensables pour la synthèse protéique dans le SNC est assuré par des transporteurs différents selon que l'acide aminé est neutre ou basique.

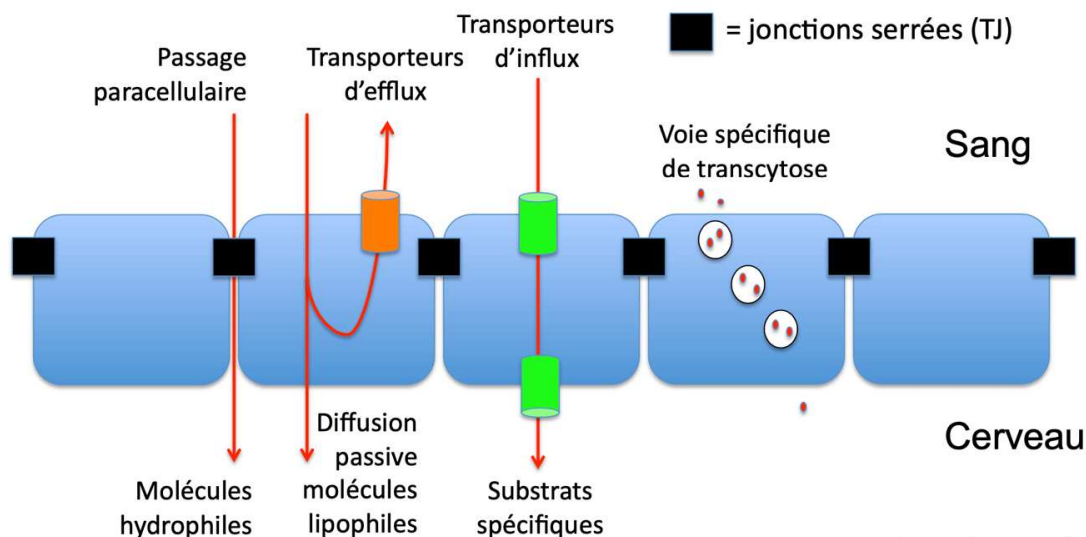


Figure 12 : La BHE assure l'homéostasie cérébrale en contrôlant les échanges entre le sang et le cerveau (adapté de P. Sansonetti). La BHE empêche la diffusion libre par voie paracellulaire des molécules hydrosolubles. Ceci est assuré par le rôle (154) essentiel des jonctions serrées, organisées dans un réseau complexe, de l'absence de fenestration et d'une faible activité de micro pinocytose qui limitent le passage transcellulaire des molécules. Cette disposition anatomique est combinée à un grand nombre de mécanismes de transport assurant le « filtrage » des nutriments et médiateurs nécessaires au métabolisme et fonctions du cerveau, et le rejet des molécules sériques potentiellement toxiques.

5.1.3. La barrière hémato-encéphalique dans l'épilepsie

L'implication physiopathologique de la BHE dans l'épilepsie se résume en partie aux rôles des transporteurs (155). Peu de données sont, à ce jour, disponibles quant à une altération de la perméabilité capillaire, des jonctions serrées ou de la migration transendothéliale de leucocytes.

5.1.3.1. Augmentation de la perméabilité paracellulaire dans l'épilepsie

Une augmentation de la perméabilité et une perte de la structure des jonctions serrées n'ont pu être démontrées qu'au décours de crises répétées dans des modèles d'épilepsie du lobe temporal ou d'état de mal épileptique (156,157). L'augmentation de la perméabilité de la BHE semble survenir rapidement après la survenue d'un état de mal épileptique, tant dans un modèle d'épilepsie du lobe temporal chez le rat (156) que chez des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal (157). Chez le rat, la perméabilité restait élevée au décours de l'état de mal et son augmentation était corrélée à la fréquence des crises (157). Une surexpression de molécules d'adhérence, telles que P-sélectine et ICAM1, en réponse à des stimulations inflammatoires a également été décrite dans un modèle animal d'épilepsie et dans des vaisseaux cérébraux humains obtenus après chirurgie de l'épilepsie (158).

Récemment, une étude réalisée sur un modèle de rat Alzheimer retrouvait que l'augmentation de la dysfonction de la BHE était corrélée à l'augmentation du ralentissement transitoire des réseaux corticaux en EEG (*paroxysmal slow wave events*) (159). Dans la même étude, ces manifestations EEG de crises non convulsivantes ont été mise en évidence dans une cohorte de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et corrélées à la dysfonction de la BHE (159).

5.1.3.2. Perméabilité diminuée aux antiépileptiques due aux transporteurs

Une expression augmentée des transporteurs ABC dans le cerveau, notamment au niveau de la BHE, pourrait rendre compte de cette résistance. En effet, différents transporteurs ABC (P-gp, MRP1 et MRP2) sont surexprimés dans des cellules endothéliales de capillaires cérébraux humains (160,161) et de nombreux antiépileptiques sont des substrats de ces transporteurs (162). En supprimant l'action de la P-gp chez des souris, par invalidation du gène ou par des inhibiteurs, les concentrations cérébrales de ces médicaments sont augmentées (163). Cependant, il n'a pu être établi de manière formelle si les anomalies d'expression de ces transporteurs étaient constitutives ou secondaires soit à la survenue de crises convulsives répétées, soit à l'administration des traitements antiépileptiques (160,164). Le rôle des transporteurs ABC dans l'épilepsie réfractaire est à l'heure actuelle toujours incertain dans la mesure où il est éthiquement impossible de comparer ces données à du tissu cérébral provenant de patients épileptiques répondant bien aux traitements. Cependant, il a pu être démontré dans un modèle d'épilepsie réfractaire chez le rat, que l'inhibition de la P-gp améliorait l'activité antiépileptique de l'oxcarbamazépine (165). Également, l'adjonction de vérapamil, un substrat compétitif de la P-gp, a montré son efficacité pour diminuer le nombre de crises dans une petite série de patients présentant une épilepsie pharmacorésistante (166).

5.2. Ouverture de la BHE par les ultrasons

5.2.1. Principes de fonctionnement et applications

Des études précliniques ont démontré que l'utilisation d'ultrasons pulsés de basse intensité (LIPU) dirigés sur le cerveau est une technique mini-invasive qui ouvre temporairement la BHE. L'injection intraveineuse, concomitante à l'administration des ultrasons, de microbulles (liposomes de perfluorocarbone) permet de faciliter et d'améliorer l'administration intracérébrale de médicaments ou de thérapeutiques chez de nombreux modèles animaux (167,168). Cette ouverture de la BHE induite par les ultrasons permet le

passage de molécules d'un poids moléculaires allant jusqu'à 2000 kDa, soit 4000 fois plus grosses que l'ouverture physiologique de la BHE, pendant une durée d'environ 6 heures.

Contrairement aux ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU), qui ont été développés chez l'animal avec une translation à difficile à l'homme, notamment du fait de l'épaisseur crânienne qui absorbe jusqu'à 90% de l'énergie ultrasonore et qui nécessitent un rasage complet ainsi qu'un référentiel stéréotaxique et un monitoring en temps-réel par IRM durant plusieurs heures (169), les LIPU sont d'utilisation facile et fiable. En effet, chez l'homme, l'implantation d'un émetteur ultrasonore en lieu et place de l'os du crâne permet de réaliser les séances d'ouverture de la BHE qui dure quelques minutes et ne nécessitent ni rasage, ni repères stéréotaxiques, ni guidage par IRM. Cette technique a déjà prouvé sa sécurité, sa fiabilité et des prémisses d'efficacité, après traitements répétés, dans le traitement des récurrences de gliomes malins (170–172), et est actuellement évaluée dans la prise en charge des métastases cérébrales, de la maladie d'Alzheimer et des gliomes malins *de novo*. Chez les rongeurs, la finesse de l'os permet de réaliser les sonications (administrations d'ultrasons) à travers l'os crânien, avec un simple rasage des poils de l'animal. Le crâne est mis au contact du transducteur ultrasonore à l'aide d'eau dégazéifiée ou de gel d'échographie (173).

5.2.2. Neurogenèse induite par l'ouverture ultrasonore de la BHE

Depuis une décennie, les applications des techniques ultrasonores sur la neuromodulation et la neurostimulation ne cessent de se développer. Ainsi, en 2010, Tufail et al ont rapporté une augmentation de l'activité neuronale hippocampique et dans le cortex moteur de souris saines après ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité (174). Par la suite, il a été montré chez la souris saine que les ultrasons focalisés favorisent la prolifération et la différenciation des neurones hippocampiques, au moins jusqu'au 18^{ème} jour post-thérapeutique, sans altérer la proportion de populations cellulaires intrinsèques au *gyrus dentatus* (175). Cette neurogenèse hippocampique, associée à une amélioration des performances en mémoire visuo-spatiale, a également été retrouvée chez un modèle de souris atteinte de la maladie d'Alzheimer après 3 séances d'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés (89). L'augmentation du nombre de neurones générés après traitement ultrasonore était de 250%. Les nouveaux neurones avaient également des dendrites plus longues et une augmentation de leur arborisation dendritique de l'ordre de 330% (89). Ces résultats ont été confirmés sur un modèle de rats atteints de démence chez lesquels on retrouvait, outre une augmentation de la neurogenèse hippocampique et des performances cognitives, une augmentation de l'expression du BDNF (brain-derived neurotrophic factor), qui agit comme promoteur de la neurogenèse (176). Dans une autre étude, la neurogenèse induite par

ouverture de la BHE aux ultrasons focalisés était associée à un effet antidépresseur de courte durée (177).

L'ouverture ultrasonore de la BHE apparaît ainsi être une technique génératrice de neurogenèse hippocampique. Cependant, l'induction de cette neurogenèse semble être dépendante des paramètres de sonication (178) et du type d'anesthésie utilisés (179). Parmi les différents paramètres de sonication testés par Mooney et al, seuls les ultrasons focalisés à l'amplitude de pression acoustique $\sim 0,78$ MPa ont favorisé la neurogenèse hippocampique et ont été associés à une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (178).

Ces résultats suggèrent que la neurogenèse induite par les ultrasons dépend de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique qui en résulte.

5.2.3. Stimulation immunitaire induite par l'ouverture ultrasonore de la BHE

En plus de délivrer des agents thérapeutiques au cerveau, l'ouverture ultrasonore de la BHE peut elle-même exercer certains effets immunitaires. Dans les études initiales explorant cette technique, l'ouverture de la BHE a non seulement des effets physiques qui incluent la modification des jonctions serrées dans les cellules endothéliales pour permettre aux molécules médicamenteuses de passer, mais peut également augmenter la transcytose. En effet, il a été observé que les IgG endogènes traversaient la BHE consécutivement aux processus transcellulaires et, dans une moindre mesure, à la navette intercellulaire (180). Dans ce cas, la plupart des IgG ont été transportées dans des vésicules après internalisation sur la surface luminale des cellules endothéliales (transcytose).

L'ouverture ultrasonore de la BHE peut réguler à la baisse les pompes d'expulsion, induire des réponses immunitaires (181) et l'activation des microglies et des récepteurs tyrosine kinases TAM (tyro3, Axl, Mer). Elle améliore également l'administration intracérébrale d'une grande variété de molécules, notamment des enzymes (182), des cellules (183) et des anticorps monoclonaux (184). Une autre étude a montré une amélioration du passage pour différents anticorps (Fab, scFv, IgG) allant de 29 kDa à 156 kDa (185).

Les réponses variées induites par l'ouverture de la BHE offrent la possibilité de changer le microenvironnement et l'immunogénicité, ce qui pourrait être bénéfique pour le contrôle de l'épilepsie, de la même manière que les effets montrés dans les modèles de la maladie d'Alzheimer (186).

Concernant la stimulation de la réponse immunitaire innée, les concentrations de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (cellules TH1 pro-inflammatoires puissantes) et de protéines du stress (heat shock proteins) se sont révélées être transitoirement augmentées dans les 24h suivant l'exposition aux ultrasons (187).

L'ouverture de la BHE s'est également avérée activer la microglie. Jordão et al., (188) ont montré la surexpression de molécules adaptatrices ionisées de liaison au calcium 1 (Iba1), indiquant l'activation de la microglie ; les niveaux d'Iba1 étaient 2,8 fois et 2,9 fois plus élevés dans le cortex des souris soniquées par rapport au cortex non traité des souris transgéniques et non transgéniques (188). L'activation microgliale (Iba1 positive) était visible à la fois chez des souris transgéniques (modèles de la maladie d'Alzheimer) et des souris non transgéniques de 4 heures à 4 jours après l'ouverture ultrasonore de la BHE. Dans la même étude, des astrocytes positifs à la GFAP (glial fibrillary acidic protein) ont été activés à la fois chez les souris transgéniques et non transgéniques 4 jours après la sonication. Au bout de 15 jours, l'activation des astrocytes positifs à la GFAP ne restait que chez les souris transgéniques, et l'activation de la microglie avait diminué à la fois chez les souris transgéniques et les souris non transgéniques (189). Dans d'autres études sur des modèles animaux de tumeurs cérébrales, l'ouverture ultrasonore de la BHE a augmenté la migration des astrocytes (augmentation de l'expression de GFAP) (190), des macrophages (191) et a amélioré les capacités d'infiltration des cellules dendritiques ainsi que d'autres cellules présentatrices d'antigène dans la tumeur traitée (187). La migration des macrophages CD68 + systémiques dans le parenchyme soniqué a été observée 6 jours après sonication sans lésion parenchymateuse ni microhémorragie (192).

Ces résultats suggèrent que 1) le recrutement de macrophages provenant de la circulation sanguine peut se produire après l'ouverture de la BHE et 2) que l'infiltration des macrophages peut être associée à l'étendue de l'extravasation érythrocytaire.

Concernant l'immunité adaptative, l'ouverture ultrasonore de la BHE peut également permettre la libération de particules antigéniques dans la circulation sanguine périphérique (193). Dans une autre étude sur un modèle murin de tumeur cérébrale, la stimulation par ouverture de la BHE a montré un enrichissement de l'infiltration par des lymphocytes T cytotoxiques et une augmentation du rapport lymphocytes T cytotoxiques / lymphocytes T régulateurs (194).

Dans les modèles murins précliniques de métastases cérébrales, l'ouverture ultrasonore de la BHE augmente de 5 fois le nombre de cellules NK attirées vers le site tumoral (195). Cette accumulation de cellules NK dans le cerveau a été considérablement augmentée dans l'ensemble du faisceau d'ultrasons, y compris dans le cerveau sain. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'association des ultrasons et des microbulles avait un effet sur la BHE et les cellules NK circulant dans le flux sanguin, induisant ainsi une diapédèse et une migration dans la tumeur. L'activité cytolytique des cellules NK n'a pas été modifiée par la sonication. Ils ont également observé une réduction du volume de la tumeur et une augmentation du temps de survie après l'application de plusieurs sonications pendant trois semaines (195).

Au total, des preuves précliniques importantes et des essais cliniques sur l'ouverture ultrasonore de la BHE via différents dispositifs ont été menés, démontrant le potentiel de cette technique à induire une modulation immunitaire sur le système nerveux central. Une telle modulation pourrait modifier le microenvironnement du foyer épileptogène. L'ouverture ultrasonore de la BHE offre un potentiel prometteur pour la modulation immunitaire du système nerveux central à travers trois mécanismes majeurs : (1) en augmentant la perméabilité locale de la BHE pour permettre la pénétration des anticorps circulants ou des cytokines qui peuvent réguler le système immunitaire, (2) en recrutant ou en ajustant les cellules immunitaires pouvant infiltrer et cibler la zone pathologique, et (3) en activant les cellules neurogliales et d'autres cellules innées pour transformer le microenvironnement du foyer épileptogène.

5.2.4. Effets sur l'épilepsie des ultrasons à visée thérapeutique

Depuis le développement des techniques ultrasonores, certains travaux se sont intéressés à l'effet que cette neurostimulation induit sur l'épilepsie. Min et al. ont montré, en 2011, qu'une série de 2 sonications par ultrasons focusés, réalisée au début de la période d'état de mal épileptique, permettait de diminuer l'activité épileptique et d'améliorer le comportement épileptique chez des modèles de rats rendus épileptiques par injection préalable de pentylènetétrazole (PTZ) (196). Ces mêmes résultats ont été obtenus par la suite sur un modèle de souris kaïnate (197). Une autre étude a montré que les ultrasons de basse intensité peuvent inhiber les crises épileptiques temporales lors de leur survenue chez la souris kaïnate, et que cet effet est indépendant du type d'ultrasons utilisé (pulsés ou continus) (198,199). Cette suppression des décharges épileptiformes est retrouvée *in vitro* sur des tranches d'hippocampe de souris âgées de 8 jours traitées par ultrasons de basse intensité, et était principalement attribuée à l'activation mécanosensible des canaux Kv1.1 (200).

Il faut noter, qu'au moment de l'écriture de ces lignes, aucune étude clinique ou préclinique explorant les conséquences et les effets de l'ouverture de la BHE par LIPU n'a été publiée.

Nous détaillons dans l'article ci-dessous comment les ultrasons, selon leurs différentes techniques d'administration, se présentent comme des modalités thérapeutiques prometteuses pour le traitement de l'épilepsie (201) :

Bex A, Bex V, Carpentier A, Mathon B.

Therapeutic ultrasound: The future of epilepsy surgery?

Rev Neurol (Paris). 2022 Jul 16:S0035-3787(22)00641-5. doi:10.1016/j.neurol.2022.03.015.



ELSEVIER

Available online at

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com


General review

Therapeutic ultrasound: The future of epilepsy surgery?

 A. Bex^{a,b}, V. Bex^a, A. Carpentier^{b,c,d}, B. Mathon^{b,c,d,e,*}
^a Department of Neurosurgery, CHR Citadelle, Liege, Belgium^b Department of Neurosurgery, Sorbonne University, AP-HP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013, Paris, France^c Sorbonne University, GRC 23, Brain Machine Interface, AP-HP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France^d Sorbonne University, Advanced Surgical Research Technology Lab, Paris, France^e Paris Brain Institute, ICM, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne University, UMRS, 1127 Paris, France

INFO ARTICLE

Article history:

Received 5 December 2021

Received in revised form

8 March 2022

Accepted 8 March 2022

Available online xxx

Keywords:

HIFU

Innovative technologies

Noninvasive approach

Neuromodulation

Thermoablation

Blood-brain barrier opening

Drug-resistant epilepsy

ABSTRACT

Epilepsy is one of the leading neurological diseases in both adults and children and in spite of advancement in medical treatment, 20 to 30% of patients remain refractory to current medical treatment. Medically intractable epilepsy has a real impact on a patient's quality of life, neurologic morbidity and even mortality. Actual therapy options are an increase in drug dosage, radiosurgery, resective surgery and non-resective neuromodulatory treatments (deep brain stimulation, vagus nerve stimulation). Resective, thermoablative or neuromodulatory surgery in the treatment of epilepsy are invasive procedures, sometimes requiring long stay-in for the patients, risks of permanent neurological deficit, general anesthesia and other potential surgery-related complications such as a hemorrhage or an infection. Radio-surgical approaches can trigger radiation necrosis, brain oedema and transient worsening of epilepsy. With technology-driven developments and pursuit of minimally invasive neurosurgery, transcranial MR-guided focused ultrasound has become a valuable treatment for neurological diseases. In this critical review, we aim to give the reader a better understanding of current advancement for ultrasound in the treatment of epilepsy. By outlining the current understanding gained from both preclinical and clinical studies, this article explores the different mechanisms and potential applications (thermoablation, blood brain barrier disruption for drug delivery, neuromodulation and cortical stimulation) of high and low intensity ultrasound and compares the various possibilities available to patients with intractable epilepsy. Technical limitations of therapeutic ultrasound for epilepsy surgery are also detailed and discussed.

© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

* Corresponding author at: Department of Neurosurgery, La Pitié-Salpêtrière University Hospital, 47-83, boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France.

E-mail address: bertrand.mathon@aphp.fr (B. Mathon).

<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2022.03.015>

0035-3787/© 2022 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Bex A, et al. Therapeutic ultrasound: The future of epilepsy surgery?. *Revue neurologique* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2022.03.015>

1. Introduction

Epilepsy is one of the leading neurological diseases in both adults and children and in spite of advancement in treatment, 20 to 30% of patients remain refractory to current medical treatment [1]. Intractable epilepsy results in a compromised quality of life, an increased psychosocial and neurologic morbidity and risk of mortality, ultimately leading to higher health-care cost. In drug-resistant cases, resective surgery or neurostimulation with deep brain stimulation, vagus nerve stimulation and responsive neurostimulation surgery can yield a potential cure or a good seizure control [2]. However, an important proportion of patients are not eligible for surgery due to seizure originating from an eloquent or deep-seated brain area or diffuse, multifocal in onset. With non-resective neuromodulatory treatments, patients are rarely seizure-free and frequently require adjuncts of medication to maintain control of their seizure [3,4].

With technology-driven developments and pursuit of minimally invasive neurosurgery, transcranial MR-guided focused ultrasound (MRgFUS) has become a valuable treatment for neurological diseases [5]. The first attempt to study the effects of ultrasound on the brain tissue began more than 90 years ago with Harvey et al. [6] In the 1950s, Fry's laboratory was the first to document the ultrasound's capacity to trigger both excitation and/or inhibition of the neuronal tissue without histologic modifications in the sonicated area [7]. Since the 1990s, the interest for minimally invasive techniques like FUS has increased, there have been several practical applications: high intensity focused ultrasound (HIFU) for ablation [8,9], peripheral nerve blocking [10,11], stroke thrombolysis [12,13]. The focal disruption of the blood-brain barrier to improve drug delivery also represents a very interesting asset for the growth of neurotherapeutics [14]. HIFU is defined as ultrasounds with more than 200 W/cm², and low intensity focused ultrasound LIFU as those with less than 100 W/cm².

On this date, this novel technology has already been approved by the Food and Drugs Administration (FDA) as a surgical treatment for various pathologies such as bone metastases, adenomyosis or uterine fibroids. In the neurological field, MRgFUS is approved for essential tremor (ET) by the FDA and for ET, Parkinson's disease and neuropathic pain by the European Commission [15,16]. With the improvement in magnetic resonance imaging thermometry and the ability to use FUS across an intact skull, MRgFUS is an attractive therapeutic method explored in several other neuropsychiatric conditions, neuro-oncological pathologies and neurological disorders, including epilepsy. In the treatment of epilepsy, MRgFUS represents a non-invasive transcranial procedure that has several potential roles: ablative procedures to damage the epileptogenic zone and/or disconnect the epileptogenic networks using HIFU and neuromodulation of brain networks or disruption of the blood brain barrier (BBB) using low-frequency sonication [17].

Although epilepsy is at the forefront of the neurological disorders being explored for MRgFUS and has been under study for several years, very few specialists are familiar with it. The purpose of this review is to give clinicians, general

practitioners or specialists, a good overview of the various potential therapeutic applications of ultrasound, a comparison to actual therapy options and to give them an update on the recent advancement in order to ease the choice of the suitable treatment course for their patients suffering from intractable epilepsy.

2. The ultrasound therapeutic armamentarium

2.1. MR-guided focused ultrasound systems

The MRgFUS system is a tool for noninvasive targeted thermal ablation that is already being used for extracranial soft tissue ablation and for BBB opening. Its potential for neurological conditions is currently evolving [18]. The MRgFUS system used clinically to treat neurological diseases is a designed MRgFUS transducer helmet mounted with a manually operated positioning system and integrated with the MRI table. Patient positioning and stable fixation of the head using a stereotactic frame are essential in order to ensure the precision of the treatment. Once the patient is in the definitive position and secured to the MRI table, a water-cooling system is placed on top of the assembly. The space between the patient's head and the transducers is filled with cold and degassed water in a tightly fitted silicon membrane. The water works as a medium through which ultrasound will travel to limit the skull and scalp temperature. The system is connected to a workstation where the planning of the targeted brain area and the parameters are adjusted to deliver the right dose of FUS energy. Using MR thermometry, the sonication procedure is monitored and precise measures of the temperature of deep structures are calculated to predict the potential damage within and around the targeted area. The delivered quantity of HIFU is increased incrementally up to 650 kHz leading to a local temperature rise and to target tissue ablation [19]. The intervention is guided by real-time imaging and clinical feedback to avoid compromising the surrounding healthy brain [9].

The ExAblate Neuro® systems (InSightec, Haifa, Israel) are employed for both thermoablation and BBB opening (with a low frequency around 220 kHz in this latter condition) whereas NaviFUS® (NaviFUS, Taipei, Taiwan) is currently being investigated for BBB opening and neuromodulation. Contrary to the ExAblate® system that uses an intraoperative MRI to position the geometric focus of the transducer array to the target, the NaviFUS® system combines optical neuronavigation and preoperative MRI (Fig. 1) [9].

2.2. An implantable device delivering low-intensity pulsed ultrasound for blood-brain barrier opening

SonoCloud-9® (Carthera, Paris, France) is an ultrasound device with 9 emitters that is surgically implanted in the skull bone (Fig. 2) [20]. To activate the device at each treatment session, a transdermal needle connection device was connected to the implant and to an external generator. This system generates larger BBB opening volumes than FUS systems.

Focused ultrasound

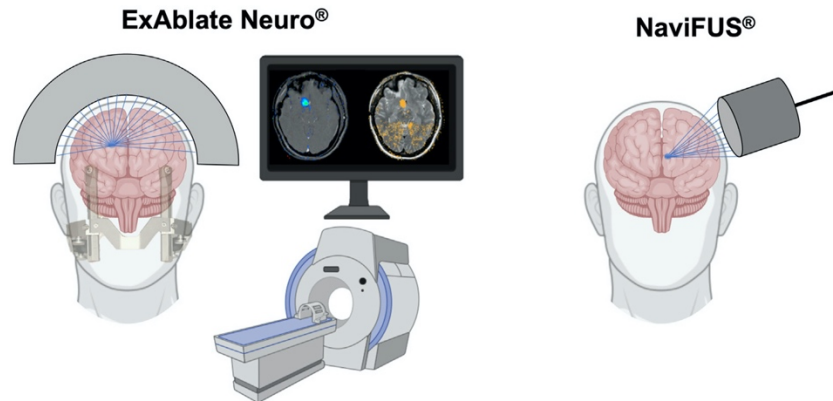


Fig. 1 – Focused ultrasound systems. The ExAblate Neuro® system (InSightec, Haifa, Israel) is a high-intensity focused ultrasound transducer helmet integrated with the MRI table allowing both thermoablation and blood-brain barrier opening. Patient's head is fixed into a stereotactic frame to ensure the millimeter precision of treatment. The sonication procedure is guided by real-time MR thermometry to predict the potential damage within and around the targeted area. NaviFUS® (NaviFUS, Taipei, Taiwan) delivers low-intensity focused ultrasound and is employed for blood-brain barrier opening and neuromodulation. The NaviFUS® system combines optical neuronavigation and preoperative MRI to position the geometric focus of the transducer array to the target.

Low-intensity pulsed ultrasound

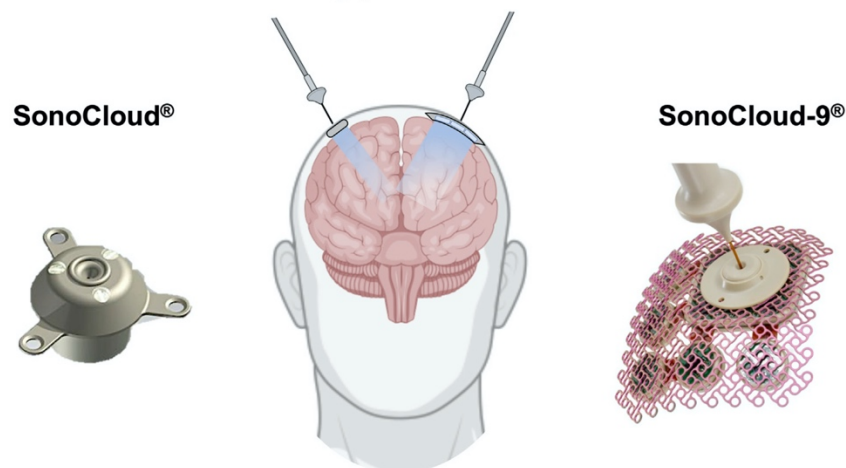


Fig. 2 – The SonoCloud® devices (CarThera, Paris, France). SonoCloud® and SonoCloud-9® are implanted in the skull bone and activated at each treatment session using a transdermal needle connected to an external ultrasound generator. SonoCloud-9® is the latest generation of implantable ultrasound device with 9 emitters fixed to a deformable titanium grid. The SonoCloud® devices deliver low-intensity pulsed ultrasound for large and transient blood-brain barrier opening.

3. Therapeutic applications of ultrasound technologies

3.1. Thermoablative procedures

HIFU works on two main mechanisms of therapy. The first one is thermal ablation, the FUS are aimed as a lesioning tool by deploying acoustic energy at a precise target volume [21]. The conversion of acoustic energy to thermal energy leads to coagulative necrosis of the lesion. The necrosis is thought to occur with a temperature above 55 °C [22]. The temperature rise is usually done incrementally and guided with imaging and real-time clinical feedback. The second mechanism is mechanical cavitation through the interactions of HIFU and gas-filled microbubbles. The microbubbles are the result of interstitial liquid transforming into vapor due to temperature rise after deposition of acoustic energy. The focused ultrasound beams cause the microbubbles to expand and collapse violently in the brain tissue potentiating a mechanical disturbance. This process of cavitation causes necrosis of the zone [23].

Currently, the FDA approved thalamotomy using MRI-guided HIFU in two neurological diseases: ET and tremor dominant Parkinson's disease. Unlike the small surgical area that is targeted in the movement disorders, the abnormal epileptogenic zone excised in conventional epilepsy surgery is larger and usually requires a cortical resection or a lobectomy. This surgery is extensive and every minimally invasive or noninvasive procedure that ablates the region of epileptogenic focus dysfunction without involving a craniotomy or a brain penetration is highly attractive. The alternative treatments expect that the epileptogenic zone becomes nonfunctional or disconnected after the ablation. Radiofrequency ablation [24], but also and especially MRI-guided Laser interstitial Thermal Therapy (MRgLITT) [25] are a few rational alternative approaches to conventional resective surgery that have been explored with good results [26–28]. Another option is gamma knife radiosurgery (GKRS) to treat MTLE. A few years ago, in a randomized, single-blinded, the controlled ROSE (radiosurgery versus open surgery for epilepsy) trial compared stereotactic radiosurgery (SRS) versus anterior temporal lobectomy (ATL) for patients suffering from drug-resistant unilateral MTLE [29]. The study data suggested an advantage of ATL over SRS when it comes to timing of effectiveness and seizure outcome. The 3 years follow-up indicates that 78% of patients who underwent ATL are seizure-free versus 52% of patients after SRS. Nonetheless, SRS could be an alternative treatment for patients with contraindication for open surgery. Furthermore, unlike stereotactic radiosurgery, FUS does not involve radiations and avoids possible side effects as delayed swelling of the temporal lobe leading to intracranial hypertension, headache, cyst formation, aseptic meningitis, alopecia or precipitation of status epilepticus [30,31].

Current non-resective ablative techniques offer favorable outcomes in terms of seizure control and neuropsychological performances making MRgFUS a very attractive option to explore in epilepsy. Given the possible complications of other techniques, the ultrasound energy presents the advantages of being a non-invasive and non-ionizing treatment. There is a

potential to treat MTLE with MRgFUS, however anatomical complexity of the medial temporal structures should be taken into considerations. The effective ablation of the target is a challenge while preserving delicate structures of the skull base, major blood vessels of the sylvian fissure, cranial nerves and the brain stem [32].

A research team at the Focused Ultrasound Foundation conducted a study on 3 cadaveric skulls to determine whether lesional temperatures can be achieved in the mesial temporal lobe target tissue and to assess potential safety concerns regarding the procedure [26–28,32]. The target area was the amygdala, uncus, anterior 20 mm of hippocampus, and adjacent parahippocampal gyrus representing an ablative volume of 5 cm³. They used thermocouples on the critical skull base structures to monitor skull base heating. They found out they required longer sonications (30 seconds) in order to achieve temperatures (up to 60.5 °C) that would create a complete ablation of the targeted brain tissue. Unfortunately, heating of the skull base structure (up to 24.7 °C) occurred during the longer sonications. They concluded that blocking algorithms creating “no passes region” are necessary to avoid ultrasound beams that cause skull base heating. There are several practical limitations to this study, because it is conducted on cadaveric skull phantoms, the temperature of the MRI room is 16 °C, significantly lower than human body temperature, there is no sign of heat exchange, cerebrospinal fluid flow is absent and blood flow in the brain, skull or scalp is nonexistent [26–28].

Recently, Abe et al. reported the first case of MRgFUS for mesial temporal lobe epilepsy [33]. The target was located on the left hippocampus. The procedure was performed with a 3.0 Tesla MRI system and the ExAblate Neuro system. Twelve sonication sessions were applied, they lasted between 10 to 20 seconds long. The team did not attain the desired temperature of at least 54 °C but managed to induce a temperature between 42 °C and 44 °C to ablate the target. During the procedure, the patient reported severe headaches and vertigo, general anesthesia was induced intraoperatively. On the post-treatment MRI, no lesion of the brain tissue was detected. One month after treatment, the patient experienced worsening of seizure frequency, but at 12 months follow-up the patient is almost seizure free.

Another indication for MRgFUS would be treatment of epilepsy associated with small or subcortical targets such as cortical malformations or hypothalamic hamartoma. In 2019, the team of the Nicklaus Children's hospital in Miami, FL, USA, successfully ablated a hypothalamic hamartoma using focused ultrasound. No adverse effects were reported, and the 15-year-old patient was discharged from the hospital 48 hours later [34]. Similarly, in 2020, Yamaguchi et al. successfully performed a MRgFUS ablation as a disconnection surgery on a 26-year-old man suffering from epilepsy caused by a sessile para hypothalamic hamartoma. Patient is seizure-free on decreased antiepileptic drugs with no adverse events at the 1-year follow-up period [35]. However, the prediction of the lesion size and especially for the perilesional edema created by focused ultrasound is much more difficult compared to the treatment with stereotactic radiosurgery. So, the treatment of hypothalamic hamartoma with MRgFUS could be an option for very carefully selected patients.

There are a few limitations to HIFU for thermoablation of epileptogenic zones. First, bone has a much higher attenuation coefficient than soft tissue. Because of its acoustic impedance it absorbs and reflects substantial amounts of ultrasound energy. It triggers a lower efficacy of energy transfer and an undesired heating of the skull. To overcome this problem, multiple transducers with a large number of energy sources are employed and an external cooling system is placed in the helmet around the scalp. A second limiting factor is the severe aberration of FUS waves due to the irregularity in the skull thickness leading to the defocusing of the ultrasound beams. A computerized multi-channel hemispheric phased-array transducer combined with a CT-scanner is used to adjust the direction of the beams after computer calculations. This technology allows adjustments to focus on a small sharply marginated area. The last main limiting factor of this approach is to find a balance between a temperature increase high enough to trigger coagulative necrosis while preserving the surrounding brain structures [19]. In the light of the above mentioned technical limitations, the treatment with MRgFUS appears not absolutely as a non-invasive, low-risk procedure. There is a need of mounting a stereotactic frame. The patients need to undergo a completely shaving of the head. During the procedure, mentionable amount of the patients suffers from headache and painful heating of the head skin. If we go for treatment of larger ablation volumes such as the hippocampus, we need to apply a lot of long lasting sonications about 30 second or longer, which can be uncomfortable for the patients. The total amount of energy in one treatment session is limited by the system for safety considerations. In the light of this aspect, the risk to fail to achieve an ablative temperature in an adequate amount of the brain tissue is relatively high.

For future perspective, an open label trial is currently conducted to determine the role of ablative MRgFUS therapy for subcortical epilepsy (NCT02804230). Another clinical trial investigates the use of MRgFUS in refractory focal onset seizures (NCT03417297) with secondary generalization, proceeding in the ablation of a target focus within the Anterior Nucleus (AN) of the thalamus.

3.2. Disruption of the blood-brain barrier

Effective drug delivery across the BBB and into the brain remains a challenge. The BBB protects the brain both from exogenous and endogenous toxins. The BBB is primarily composed of microvascular endothelial cells and tight junctions with specific properties: very low permeability, high transendothelial electrical resistance and rare occurrence of pinocytotic vesicles [36]. These characteristics make the impermeability of the BBB the main limiting factor for the future growth of neurotherapeutics such as antiepileptic drugs [37]. Low-intensity ultrasound may offer a non-invasive option to disrupt the BBB and deliver therapeutic agents into the brain. The ultrasound could be a good adjuvant treatment and reduce toxicity by allowing a more conservative dosing regimen. To preserve the vital aspect of the barrier, the disruption should be temporary, reversible and locally induced. Besides being a non-invasive and non-ionizing

intervention, another significant advantage of the FUS is the spatiotemporal control of energy deposition.

Disruption of the BBB by ultrasound exposure has been extensively studied on animal models. In early studies, the disruption was observed near the tissue targeted to HIFU treatment but was associated with thermal tissue necrosis and neuronal damage [38]. Twenty years ago, a study conducted by Hynynen et al. on rabbits showed that the opening of the BBB was achievable with lower intensity FUS and without the damaging effect of local hyperthermia [39]. In this research, the method used to permeate the BBB is acoustic cavitation. Intravenous microbubbles are injected at the onset of the sonication, when entering the ultrasound field, they expand and contract at the frequency of the ultrasound [39]. The oscillating microbubbles interact with the endothelial cells in the cerebral capillaries and stretch the blood vessel walls leading to BBB dysfunction. The BBB opening is transient and lasts for 6 to 24 hours post sonication [40].

Experimental research employing FUS to permeate the BBB have been directed in the oncological field to improve the delivery of substances such as Herceptin [41], Temozolomide [42] and doxorubicin [43]. Similarly, Carpentier et al. have developed a small pulsed-ultrasound device system implanted in the patient's skull [20]. Associated with injected microbubbles, the BBB was disrupted monthly to optimize carboplatin delivery in a targeted zone and to slow tumor growth in recurrent glioblastomas [44].

In Alzheimer's disease, adult hippocampal neurogenesis is drastically reduced causing loss of memory functions. Alzheimer's disease is characterized by the presence of amyloid- β deposition in plaques, tau proteins hyperphosphorylation in neurofibrillary tangles and cholinergic system degeneration. As transcranial ultrasound technology can transiently and locally increase the BBB permeability, it can be used to stimulate hippocampal neurogenesis and modulate tau hyperphosphorylation as well as the accumulation of amyloid- β proteins [45,46]. Shin et al. investigated the effect of focused ultrasound induced BBB opening on adult hippocampal neurogenesis in a cholinergic degeneration on the rat model [45]. They describe a significant increase in adult hippocampal neurogenesis and improved spatial memory after FUS treatment. This improvement might be related to the upregulation of the brain-derived neurotrophic factor, the early growth response protein 1 and the acetylcholinesterase. In 2016, a research team from Toronto studied whether the opening of the blood-brain barrier, the specific pressure amplitudes of focused ultrasound or the intravenous administration of microbubbles were required for the augmentation of neurogenesis [47]. They exposed the mice to burst focused ultrasound of various frequencies and with or without microbubbles. The data revealed that focused ultrasound at ~ 0.78 MPa pressure amplitude associated with microbubbles promoted hippocampal neurogenesis because of an increase in blood-barrier permeability. These results confirm that neither microbubbles, nor increased pressure amplitudes alone are capable of producing neurogenesis, it is dependent upon the transient opening of the BBB. A limitation to the efficacy of immunotherapy in Alzheimer's disease is caused by poor access to the brain for antibodies. FUS-induced BBB permeability enhances intracerebral bioavailability of administered intravenous the-

rapeutics. Intravenous immunoglobulin (IVIg), a fractionated healthy human blood product containing polyclonal antibodies, acts as an immunomodulator and induces benefits peripherally and centrally. In the brain, FUS-induced BBB permeability is required to deliver a significant dose of IVIg to the targeted hippocampus of a mouse model. Recently, Dubey and al. reported that IVIg-FUS treatments have the ability to reduce amyloid-plaque pathology, excessive inflammation and increase neurogenesis [48]. On the other hand, Burgess et al. conducted a study that suggests that changes in vessel diameter and its permeability could be directly related to the presence of amyloid plaque. This factor should be taken in consideration to adjust FUS parameters used for the delivery of therapeutic agents to the brain [49].

In the field of epilepsy, although it is well-known that seizures are associated with BBB dysfunction, [50–52] pre-clinical investigations are currently being conducted on animal models of mesial temporal lobe epilepsy in order to assess the potential antiepileptic effects of repeated ultrasound-induced BBB disruption. In the light of the above-mentioned findings obtained from studies on Alzheimer's disease, promoting hippocampal neurogenesis using ultrasound-induced BBB opening could be an efficient way to reverse the neuronal loss of the hippocampal sclerosis associated with mesial temporal lobe epilepsy [53]. The second promising skill of ultrasound-induced BBB disruption is facilitating and enhancing the delivery of a variety of antiepileptic therapeutics. Ultrasound-induced BBB disruption enables molecules of up to 2,000 kDa to be delivered safely to the brain [54]. By comparison, therapeutic Ig have a molecular weight of around 150 kDa with a brain penetration of less than one percent of the administered dose and thereby should be amenable to delivery using ultrasound-induced BBB opening [37]. Ig delivery through ultrasound could help to treat patients with refractory autoimmune encephalitis, autoimmune epilepsy or new onset refractory status epilepticus [55,56]. In addition to Ig, other successful deliverables include conventional antiepileptic drugs [57], nanoparticles [9,58,59] and viral constructs [60,61].

3.3. Neuromodulation - Cortical stimulation

Another potential treatment mechanism for low intensity focused ultrasound (LIFU) is the modulation of neurological function without tissue damage. By using low intensity sonication, the ultrasound energy could work similarly to a treatment by deep brain stimulation or neurostimulation without the need for a surgical procedure of device implantation [62–64]. Re-treatment can be done safely. It has already been shown by a few studies that a single treatment of FUS could block nerve conduction [10,11,65]. Considering that epilepsy is a disease with reorganizations of neural networks, this technique could potentially block those pathological pathways and inhibit epileptic bursts.

An interesting potential target for MRgFUS is the anterior nucleus (AN) of the thalamus, indeed in a study conducted by Krishna et al., the stimulation of the lateroventral AN close to the mammillothalamic tract seems to be the most effective way to interrupt the seizures [66]. Likewise, in a study conducted on rats with chemically induced acute epilepsy,

Min et al. revealed that transcranial LIFU sonication on the thalamus suppresses epileptic burst [67].

In another article, authors showed that pulsed ultrasound stimulation could efficiently inhibit acute seizure activity and either delay the onset or suppress status epilepticus on kainate-induced mouse models of mesial temporal lobe epilepsy [68]. They also pointed out that the mice that received ultrasound stimulation presented fewer spontaneous recurrent seizures suggesting that ultrasound stimulation has antiepileptic effects. Recently, in a study designed to investigate the parametric selection of ultrasound exposure, the authors showed that exposure levels reaching 0.75 of mechanical index with an exposure time of 600 seconds could achieve an effective spike-suppressing effect in rats with pentylenetetrazole-induced acute epilepsy [69].

In 2021, Brinker et al. developed a FUS platform dedicated to neuromodulation across the human hippocampus. One patient was safely and successfully treated using this device platform [70]. In a recent pilot clinical study in 6 patients with drug-resistant epilepsy implanted with intracranial EEG depth electrodes, Lee et al. showed that FUS could be safely delivered to the seizure onset zone and led to significant changes in spectral power of intracranial EEG [71]. However, benefits from neuromodulation on seizure outcome were low in this study. Two clinical trials (NCT03868293, NCT02151175) are currently recruiting in the USA aiming to assess neuromodulation with LIFU in temporal lobe epilepsy patients. In the future, FUS could be a very promising non-invasive approach once more techniques like resting-state functional MRI or real-time functional MRI have been validated enabling the real-time guidance of neuromodulation [72,73].

Little is known about the mechanism underlying ultrasound-mediated neuromodulation; few hypotheses could be put forth. One hypothesis is that FUS sonication regulates the thalamic GABAergic inhibitory neurons implicated in epilepsy causing a reduction in epileptic EEG activity [74]. Intracerebral microdialysis could be used to measure the extracellular neurotransmitter levels such as GABA [75]. Another one is that sonication could significantly affect the neurophysiology of in vitro local neural circuitry with alteration of membrane potential or change in membrane fluidity, turbidity and permeability [76,77]. Supposedly, ultrasound sonication affects ion-channels and receptors on the cell membrane disturbing the transmembrane concentrations by modifying the passage of ions or neurotransmitters. It has been reported that sonication activates voltage-gated Na⁺ and Ca²⁺ channels as well as ultrasound mechanical force could also activate mechano-sensitive ion channels allowing cation entry leading to modification of membrane potential [78–80].

4. Advantages and limitations of ultrasound therapies

Whether it is HIFU or LIFU, FUS has the ability to penetrate deep into the brain tissue through an intact skull. Non-invasive approaches are a very attractive therapy option when aware of all the potential impacts, neurological and/or functional, surgery could have on the patient. When compared to other treatments (Table 1), deep brain stimulation requires a

Table 1 – Main features of therapeutic ultrasound techniques compared to those of the medical and surgical armamentarium currently available to treat drug-resistant epilepsy.

	Drugs	Surgery for patients with drug-resistant epilepsy patients	HIFU	LIPU or LIFU
		Resectory surgery/ LITT	Continuous ultrasound	Discontinuous ultrasound Neuromodulation
		DBS/VNS		BBB disruption
Effect Invasiveness	Temporary, reversible Noninvasive	Irreversible, permanent Invasive	Irreversible Noninvasive Stereotactic frame, shaving	Reversible, temporary Noninvasive (external devices) Minimal Invasive (local anesthesia implanted devices)
Mechanism of action	Valproate: Increase brain concentration of GABA Lamotrigine: Inactivation of the voltage sensitive sodium channels reducing the neuronal activity of neurons synthesizing glutamate & aspartate. Topiramate: Increase the activity of the GABA neurotransmitter, blocks voltage-dependant sodium channels.	Resection or thermoablation of the epileptogenic zone. Neuromodulation of specific area of the brain (DBS) or through indirect pathways (VNS).	Thermal ablation through coagulative necrosis	Non-thermogenic, non-destructive. Neuronal excitation or inhibition. Stretch endothelial cells in the cerebral capillaries through microbubbles cavitation concomitant to 2–4 min acoustic low intensity emission. Increased drug delivery for 8 hours →Could work in conjunction with AED.
Target	Whole body dispersion	MTLE, cortical lesion, hypothalamic hamartoma.	MTLE, hypothalamic hamartoma, deep-seated epileptogenic lesion.	AN of the thalamus – Focal (external devices) – Regional (implanted device)
Increase of treatment toxicity	Increase of the dose and the toxicity	Re-treatment and extension of the surgical area can be achieved but higher neurological risks are encountered.	Unknown	Re-treatment (easier for implanted devices)
Efficacy on Epilepsy	AEDs allow seizure freedom in 70-80% of patients.	MRI-positive epilepsy: 80% of seizure-free patients. Cryptogenic epilepsy: 50% of seizure-free patients.	Unknown yet	Unknown yet
Complications	Toxicity, side effects, drug interaction.	Infection, neurological deficit, long-stay in (for resective surgery), general anesthesia	Overheating/lesion outside of the target area.	No sign of overheating, no concomitant histologic changes.

AED: antiepileptic drug; AN: anterior nucleus; BBB: blood brain barrier; DBS: deep brain stimulation; HIFU: high intensity focused ultrasound; LIFU: low intensity focused ultrasound; LIPU: low intensity pulsed ultrasound; LITT: laser interstitial thermal therapy; MTLE: mesial temporal lobe epilepsy.

Please cite this article in press as: Bex A, et al. Therapeutic ultrasound: The future of epilepsy surgery?. Revue neurologique (2022), <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2022.03.015>

long surgical procedure with risks of infection, neurological lesions and of course, general anesthesia [81]. Also, unlike surgical procedures for movement disorders that target a small and precise brain area, in epilepsy surgery, oftentimes the pathological epileptogenic zone is extensive and requires a large cortical resection or even a lobectomy [82]. Since it is an external non-invasive technology, ultrasound to treat epilepsy could reduce intra- and postoperative risks and the length of in-patient stay compared to open surgery or mini-invasive techniques such as LITT. HIFU has an irreversible effect, either through thermal ablation or with mechanical cavitation of soft tissues. The bioeffects are mainly thermal, the heating of the focus zone triggers DNA fragmentation, [83] denature protein and homogenize tissue leading to the necrosis of the pathological area [84]. HIFU ablation studies report destruction of the neuronal tissue within the application focus, but none of them encountered histologic changes outside of that zone.

LIFU is non-destructive, non-thermogenic and a reversible neurophysiological alteration. This technique modulates neural activity without injuring collateral tissue. Low frequency sonication is bimodal making possible both neuronal excitation and inhibition in order to modulate region-specific brain function. Re-treatment can be done safely [10]. LIFU is also used to disrupt, transiently and locally the BBB allowing substances to penetrate into the brain more easily. It could be used as an adjuvant therapy to antiepileptic drugs allowing a lighter dosing regimen and a reduction of its toxicity. Indeed, this treatment may find a niche between antiepileptic drugs and invasive surgical treatment. Neuromodulation technology might bring the advantage over pharmacology treatment to have a more direct and focal influence on neuronal circuits. Regarding the safety issue, in the use of low energy focused ultrasound, studies have shown, there are no signs of overheating during the procedure and no concomitant histologic changes in the sonicated area [67,78,85]. Similarly, with BBB disruption, there was rare evidence of ischemia or apoptosis and only a mild inflammatory response within the trigger zone [38].

5. Conclusion

Epilepsy is one of the main neurological disorders and is frequently difficult to control with antiepileptic drugs. Medically intractable epilepsy has a real impact on a patient's quality of life, neurologic morbidity and even mortality. Actual therapy options are an increase in drug dosage, radiosurgery, resective surgery and non-resective neuromodulatory treatments (deep brain stimulation, vagus nerve stimulation).

Resective or neuromodulatory surgery in the treatment of epilepsy are invasive procedures, sometimes requiring long stay-in for the patients, risks of permanent neurological deficit, general anesthesia and other potential surgery-related complications such as a hemorrhage or an infection. Radio-surgical approaches can trigger radiation necrosis, brain oedema and transient worsening of epilepsy.

In an era of intense quest for less invasive techniques, ultrasound therapy is a promising option when compared to other existing treatments for epilepsy. Epilepsy is at the forefront for neurological disorders in exploration for MRgFUS, indeed this procedure can provide non-invasive neuroablative

and neuromodulation functions as well as BBB opening for antiepileptic drugs delivery. Epileptogenic zones and pathological neuronal networks are large but well delineated which makes them interesting targets for focal ablation, disconnections or modulation. Many technologies such as real-time functional MRI or MR thermometry could be used simultaneously to guide precisely the actions of FUS.

One limitation to the technique is the lack of effective sonication parameters used to achieve a therapeutic effect avoiding any complication on the healthy brain. Numerous clinical trials and current research studies will validate and improve the use of FUS and pulsed ultrasound in epilepsy. Until now, there are no long-term follow-up studies on the effect of the therapeutic ultrasound on the human brain, this needs further investigation.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Authors' contribution

All authors had a role in writing the manuscript.

Disclosure of interest

Prof. Carpentier is shareholder and consultant for CarThera. The other authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgments

We thank the Laboratoire de Recherche en Technologies Chirurgicales Avancées (LRTCA) and the Fonds d'Etudes et de Recherche du Corps Médical (FERCM) from the AP-HP for supporting this project. Figures 1 and 2 were created using biorender.com.

REFERENCES

- [1] Mathon B, Bédos-Ulvin L, Baulac M, et al. [Evolution of ideas and techniques, and future prospects in epilepsy surgery]. *Rev Neurol (Paris)* 2015;171(2):141–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2014.09.010>.
- [2] Mathon B, Bédos Ulvin L, Adam C, et al. Surgical treatment for mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2015;171(3):315–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurol.2015.01.561>.
- [3] Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ. Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med* 2011;365(10):919–26. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr1004418>.
- [4] Mathon B, Bielle F, Samson S, et al. Predictive factors of long-term outcomes of surgery for mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Epilepsia* 2017;58(8):1473–85. <http://dx.doi.org/10.1111/epi.13831>.

- [5] Dorfer C, Rydenhag B, Baltuch G, et al. How technology is driving the landscape of epilepsy surgery. *Epilepsia* 2020;61(5):841–55. <http://dx.doi.org/10.1111/epi.16489>.
- [6] Harvey E. The effect of high frequency sound waves on heart muscle and other irritable tissues. 1929;1929 Dec 1;91(1):284–90.
- [7] Fry FJ, Ades HW, Fry WJ. Production of reversible changes in the central nervous system by ultrasound. *Science* 1958;127(3289):83–4. <http://dx.doi.org/10.1126/science.127.3289.83>.
- [8] Jolesz FA, Hynynen K, McDannold N, Freundlich D, Kopelman D. Noninvasive thermal ablation of hepatocellular carcinoma by using magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1). <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.056> [S242–247].
- [9] Meng Y, Hynynen K, Lipsman N. Applications of focused ultrasound in the brain: from thermoablation to drug delivery. *Nat Rev Neurol* 2021;17(1):7–22. <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-020-00418-z>.
- [10] Foley JL, Little JW, Vaezy S. Image-guided high-intensity focused ultrasound for conduction block of peripheral nerves. *Ann Biomed Eng*. 2007;35(1):109–19. <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-006-9162-0>.
- [11] Foley JL, Little JW, Vaezy S. Effects of high-intensity focused ultrasound on nerve conduction. *Muscle Nerve* 2008;37(2):241–50. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.20932>.
- [12] Balucani C, Alexandrov AV. Ultrasound- and microspheres-enhanced thrombolysis for stroke treatment: state of the art. *Curr Cardiol Rep* 2010;12(1):34–41. <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-009-0082-0>.
- [13] Trübestein G, Engel C, Etzel F, Sobbe A, Cremer H, Stumpf U. Thrombolysis by ultrasound. *Clin Sci Mol Med Suppl* 1976;3:697–8. <http://dx.doi.org/10.1042/cs051697s>.
- [14] Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2004;30(7):979–89. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010>.
- [15] Piper RJ, Hughes MA, Moran CM, Kandasamy J. Focused ultrasound as a non-invasive intervention for neurological disease: a review. *Br J Neurosurg* 2016;30(3):286–93. <http://dx.doi.org/10.3109/02688697.2016.1173189>.
- [16] Giammalva GR, Gagliardo C, Marrone S, et al. Focused Ultrasound in Neuroscience. State of the Art and Future Perspectives. *Brain Sci* 2021;11(1):84. <http://dx.doi.org/10.3390/brainsci11010084>.
- [17] Ranjan M, Boutet A, Bhatia S, et al. Neuromodulation beyond neurostimulation for epilepsy: scope for focused ultrasound. *Expert Rev Neurother* 2019;19(10):937–43. <http://dx.doi.org/10.1080/14737175.2019.1635013>.
- [18] Stavarche MA, Chazen JL, Kaplitt MG. Innovative Applications of MR-Guided Focused Ultrasound for Neurological Disorders. *World Neurosurg* 2021;145:581–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2020.08.052>.
- [19] Quadri SA, Waqas M, Khan I, et al. High-intensity focused ultrasound: past, present, and future in neurosurgery. *Neurosurg Focus* 2018;44(2). <http://dx.doi.org/10.3171/2017.11.FOCUS17610> [E16].
- [20] Carpentier A, Canney M, Vignot A, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med* 2016;8(343):343re2. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6086>.
- [21] Hoffman CE, Parker WE, Rapoport BI, Zhao M, Ma H, Schwartz TH. Innovations in the Neurosurgical Management of Epilepsy. *World Neurosurg*. 2020;139:775–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2020.03.031>.
- [22] McDannold N, Clement GT, Black P, Jolesz F, Hynynen K. Transcranial magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound surgery of brain tumors: initial findings in 3 patients. *Neurosurgery* 2010;66(2):323–32. <http://dx.doi.org/10.1227/01.NEU.0000360379.95800.2F> [discussion 332].
- [23] Kimmel E. Cavitation bioeffects. *Crit Rev Biomed Eng* 2006;34(2):105–61. <http://dx.doi.org/10.1615/critrevbiomedeng.v34.i2.10>.
- [24] Vojtěch Z, Malíková H, Krámská L, et al. Long-term seizure outcome after stereotactic amygdalohippocampectomy. *Acta Neurochir (Wien)* 2014;156(8):1529–37. <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-014-2126-5>.
- [25] Willie JT, Laxpati NG, Drane DL, et al. Real-time magnetic resonance-guided stereotactic laser amygdalohippocampectomy for mesial temporal lobe epilepsy. *Neurosurgery* 2014;74(6):569–84. <http://dx.doi.org/10.1227/NEU.0000000000000343> [discussion 584–585].
- [26] Drane DL. MRI-Guided stereotactic laser ablation for epilepsy surgery: Promising preliminary results for cognitive outcome. *Epilepsy Res* 2018;142:170–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.09.016>.
- [27] Wu C, Jermakowicz WJ, Chakravorti S, et al. Effects of surgical targeting in laser interstitial thermal therapy for mesial temporal lobe epilepsy: A multicenter study of 234 patients. *Epilepsia* 2019;60(6):1171–83. <http://dx.doi.org/10.1111/epi.15565>.
- [28] Wu C, Schwalb JM, Rosenow JM, McKhann GM, Neimat JS, American Society for Stereotactic Functional Neurosurgeons. The American Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery Position Statement on Laser Interstitial Thermal Therapy for the Treatment of Drug-Resistant Epilepsy. *Neurosurgery* 2022;90(2):155–60. <http://dx.doi.org/10.1227/NEU.0000000000001799>.
- [29] Barbaro NM, Quigg M, Ward MM, et al. Radiosurgery versus open surgery for mesial temporal lobe epilepsy: The randomized, controlled ROSE trial. *Epilepsia* 2018;59(6):1198–207. <http://dx.doi.org/10.1111/epi.14045>.
- [30] Vojtech Z, Vladyka V, Kalina M, et al. The use of radiosurgery for the treatment of mesial temporal lobe epilepsy and long-term results. *Epilepsia* 2009;50(9):2061–71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02071.x>.
- [31] Monteith S, Sheehan J, Medel R, et al. Potential intracranial applications of magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery. *J Neurosurg* 2013;118(2):215–21. <http://dx.doi.org/10.3171/2012.10.JNS12449>.
- [32] Monteith S, Snell J, Eames M, Kassell NF, Kelly E, Gwinn R. Transcranial magnetic resonance-guided focused ultrasound for temporal lobe epilepsy: a laboratory feasibility study. *J Neurosurg* 2016;125(6):1557–64. <http://dx.doi.org/10.3171/2015.10.JNS1542>.
- [33] Abe K, Yamaguchi T, Hori H, et al. Magnetic resonance-guided focused ultrasound for mesial temporal lobe epilepsy: a case report. *BMC Neurol* 2020;20(1):160. <http://dx.doi.org/10.1186/s12883-020-01744-x>.
- [34] Focused Ultrasound Foundation. Focused Ultrasound for Benign Pediatric Brain Tumors: A Case Report. Published online May 28, 2020. <https://www.fusfoundation.org/news/focused-ultrasound-for-benign-pediatric-brain-tumors-a-case-report>.
- [35] Yamaguchi T, Hori T, Hori H, et al. Magnetic resonance-guided focused ultrasound ablation of hypothalamic hamartoma as a disconnection surgery: a case report. *Acta Neurochir (Wien)* 2020;162(10):2513–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-020-04468-6>.
- [36] Partridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today* 2007;12(1–2):54–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2006.10.013>.
- [37] Partridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005;2(1):3–14. <http://dx.doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>.

- [38] Deng CX. Targeted drug delivery across the blood-brain barrier using ultrasound technique. *Ther Deliv* 2010;1(6):819–48. <http://dx.doi.org/10.4155/tde.10.66>.
- [39] Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology* 2001;220(3):640–6. <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.2202001804>.
- [40] Lipsman N, Mainprize TG, Schwartz ML, Hynynen K, Lozano AM. Intracranial applications of magnetic resonance-guided focused ultrasound. *Neurotherapeutics* 2014;11(3):593–605. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-014-0281-2>.
- [41] Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(31):11719–23. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0604318103>.
- [42] Wei KC, Chu PC, Wang HYJ, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening to enhance temozolomide delivery for glioblastoma treatment: a preclinical study. *PLoS One* 2013;8(3). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0058995> [e58995].
- [43] Park J, Zhang Y, Vykhodtseva N, Jolesz FA, McDannold NJ. The kinetics of blood brain barrier permeability and targeted doxorubicin delivery into brain induced by focused ultrasound. *J Control Release* 2012;162(1):134–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.012>.
- [44] Idbaih A, Canney M, Belin L, et al. Safety and Feasibility of Repeated and Transient Blood-Brain Barrier Disruption by Pulsed Ultrasound in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2019;25(13):3793–801. <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3643>.
- [45] Shin J, Kong C, Lee J, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model. *Alzheimers Res Ther* 2019;11(1):110. <http://dx.doi.org/10.1186/s13195-019-0569-x>.
- [46] Burgess A, Dubey S, Yeung S, et al. Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. *Radiology* 2014;273(3):736–45. <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.14140245>.
- [47] Mooney SJ, Shah K, Yeung S, Burgess A, Aubert I, Hynynen K. Focused Ultrasound-Induced Neurogenesis Requires an Increase in Blood-Brain Barrier Permeability. *PLoS One* 2016;11(7). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159892> [e0159892].
- [48] Dubey S, Heinen S, Krantic S, et al. Clinically approved IVIG delivered to the hippocampus with focused ultrasound promotes neurogenesis in a model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(51):32691–700. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1908658117>.
- [49] Burgess A, Nhan T, Moffatt C, Klivanov AL, Hynynen K. Analysis of focused ultrasound-induced blood-brain barrier permeability in a mouse model of Alzheimer's disease using two-photon microscopy. *J Control Release* 2014;192:243–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.051>.
- [50] Mendes NF, Pansani AP, Carmanhães ERF, et al. The Blood-Brain Barrier Breakdown During Acute Phase of the Pilocarpine Model of Epilepsy Is Dynamic and Time-Dependent. *Front Neurol* 2019;10:382. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2019.00382>.
- [51] Milikovsky DZ, Ofer J, Senatorov VV, et al. Paroxysmal slow cortical activity in Alzheimer's disease and epilepsy is associated with blood-brain barrier dysfunction. *Sci Transl Med* 2019;11(521). <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw8954>.
- [52] van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2007;130(Pt 2):521–34. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awl318>.
- [53] Calderon-Garcidueñas AL, Mathon B, Lévy P, et al. New clinicopathological associations and histoprognostic markers in ILAE types of hippocampal sclerosis. *Brain Pathol* 2018;28(5):644–55. <http://dx.doi.org/10.1111/bpa.12596>.
- [54] Chen H, Konofagou EE. The size of blood-brain barrier opening induced by focused ultrasound is dictated by the acoustic pressure. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34(7):1197–204. <http://dx.doi.org/10.1038/jcbfm.2014.71>.
- [55] Nosadini M, Mohammad SS, Ramanathan S, Brilot F, Dale RC. Immune therapy in autoimmune encephalitis: a systematic review. *Expert Rev Neurother* 2015;15(12):1391–419. <http://dx.doi.org/10.1586/14737175.2015.1115720>.
- [56] Kodama S, Arai N, Hagiwara A, Kimura A, Takeuchi S. A favorable outcome of intensive immunotherapies for new-onset refractory status epilepticus (NORSE). *J Intensive Care* 2018;6:43. <http://dx.doi.org/10.1186/s40560-018-0315-7>.
- [57] Bennewitz MF, Saltzman WM. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics* 2009;6(2):323–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nurt.2009.01.018>.
- [58] Zhang TT, Li W, Meng G, Wang P, Liao W. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. *Biomater Sci* 2016;4(2):219–29. <http://dx.doi.org/10.1039/c5bm00383k>.
- [59] Naqvi S, Panghal A, Flora SJS. Nanotechnology: A Promising Approach for Delivery of Neuroprotective Drugs. *Front Neurosci* 2020;14:494. <http://dx.doi.org/10.3389/fnins.2020.00494>.
- [60] Thévenot E, Jordão JF, O'Reilly MA, et al. Targeted delivery of self-complementary adeno-associated virus serotype 9 to the brain, using magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound. *Hum Gene Ther* 2012;23(11):1144–55. <http://dx.doi.org/10.1089/hum.2012.013>.
- [61] Stavarache MA, Petersen N, Jurgens EM, et al. Safe and stable noninvasive focal gene delivery to the mammalian brain following focused ultrasound. *J Neurosurg* 2018;130(3):989–98. <http://dx.doi.org/10.3171/2017.8.JNS17790>.
- [62] Bystritsky A, Korb AS, Douglas PK, et al. A review of low-intensity focused ultrasound pulsation. *Brain Stimul* 2011;4(3):125–36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2011.03.007>.
- [63] Darrow DP. Focused Ultrasound for Neuromodulation. *Neurotherapeutics* 2019;16(1):88–99. <http://dx.doi.org/10.1007/s13311-018-00691-3>.
- [64] Baek H, Pahk KJ, Kim H. A review of low-intensity focused ultrasound for neuromodulation. *Biomed Eng Lett* 2017;7(2):135–42. <http://dx.doi.org/10.1007/s13534-016-0007-y>.
- [65] Colucci V, Strichartz G, Jolesz F, Vykhodtseva N, Hynynen K. Focused ultrasound effects on nerve action potential in vitro. *Ultrasound Med Biol* 2009;35(10):1737–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2009.05.002>.
- [66] Krishna V, King NKK, Sammartino F, et al. Anterior Nucleus Deep Brain Stimulation for Refractory Epilepsy: Insights Into Patterns of Seizure Control and Efficacious Target. *Neurosurgery* 2016;78(6):802–11. <http://dx.doi.org/10.1227/NEU.0000000000001197>.
- [67] Min BK, Bystritsky A, Jung KI, et al. Focused ultrasound-mediated suppression of chemically-induced acute epileptic EEG activity. *BMC Neurosci* 2011;12:23. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2202-12-23>.
- [68] Hakimova H, Kim S, Chu K, Lee SK, Jeong B, Jeon D. Ultrasound stimulation inhibits recurrent seizures and

- improves behavioral outcome in an experimental model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav* 2015;49:26–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.04.008>.
- [69] Chen SG, Tsai CH, Lin CJ, et al. Transcranial focused ultrasound pulsation suppresses pentylenetetrazol induced epilepsy in vivo. *Brain Stimul* 2020;13(1):35–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2019.09.011>.
- [70] Brinker ST, Preiswerk F, White PJ, Mariano TY, McDannold NJ, Bubrick EJ. Focused Ultrasound Platform for Investigating Therapeutic Neuromodulation Across the Human Hippocampus. *Ultrasound Med Biol* 2020;46(5):1270–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.01.007>.
- [71] Lee CC, Chou CC, Hsiao FJ, et al. Pilot study of focused ultrasound for drug-resistant epilepsy. *Epilepsia* 2022;63(1):162–75. <http://dx.doi.org/10.1111/epi.17105>.
- [72] Gill BC, Pizarro-Berdichevsky J, Bhattacharyya PK, et al. Real-Time Changes in Brain Activity during Sacral Neuromodulation for Overactive Bladder. *J Urol* 2017;198(6):1379–85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2017.06.074>.
- [73] Ning L, Makris N, Camprodon JA, Rathi Y. Limits and reproducibility of resting-state functional MRI definition of DLPFC targets for neuromodulation. *Brain Stimul* 2019;12(1):129–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brs.2018.10.004>.
- [74] Schofield CM, Kleiman-Weiner M, Rudolph U, Huguenard JR. A gain in GABAA receptor synaptic strength in thalamus reduces oscillatory activity and absence seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(18):7630–5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0811326106>.
- [75] Zuiderwijk M, Ghijsen WE. Monitoring amino acid neurotransmitter release in the brain by in vivo microdialysis. *Methods Mol Biol* 1997;72:239–50. <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-394-5:239>.
- [76] Gavrilov LR, Tsurulnikov EM, Davies IA. Application of focused ultrasound for the stimulation of neural structures. *Ultrasound Med Biol* 1996;22(2):179–92. [http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629\(96\)83782-3](http://dx.doi.org/10.1016/0301-5629(96)83782-3).
- [77] Rinaldi PC, Jones JP, Reines F, Price LR. Modification by focused ultrasound pulses of electrically evoked responses from an in vitro hippocampal preparation. *Brain Res* 1991;558(1):36–42. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)90711-4](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(91)90711-4).
- [78] Tyler WJ, Tufail Y, Finsterwald M, Tauchmann ML, Olson EJ, Majestic C. Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PLoS One* 2008;3(10). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003511> [e3511].
- [79] Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J* 2003;84(5):3087–101. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)70034-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(03)70034-4).
- [80] Dinno MA, Dyson M, Young SR, Mortimer AJ, Hart J, Crum LA. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Phys Med Biol* 1989;34(11):1543–52. <http://dx.doi.org/10.1088/0031-9155/34/11/003>.
- [81] Boviatsis EJ, Stavrinou LC, Themistocleous M, Kouyialis AT, Sakas DE. Surgical and hardware complications of deep brain stimulation. A seven-year experience and review of the literature. *Acta Neurochir (Wien)* 2010;152(12):2053–62. <http://dx.doi.org/10.1007/s00701-010-0749-8>.
- [82] Mathon B, Navarro V, Bielle F, et al. Complications After Surgery for Mesial Temporal Lobe Epilepsy Associated with Hippocampal Sclerosis. *World Neurosurg* 2017;102:639–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wneu.2017.03.128>.
- [83] Coakley WT, Dunn F. Degradation of DNA in high-intensity focused ultrasonic fields at 1MHz. *J Acoust Soc Am* 1971;50(6):1539–45. <http://dx.doi.org/10.1121/1.1912808>.
- [84] Ishibashi K, Shimada K, Kawato T, et al. Inhibitory effects of low-energy pulsed ultrasonic stimulation on cell surface protein antigen C through heat shock proteins GroEL and DnaK in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(3):751–6. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02230-09>.
- [85] Tyler WJ. Noninvasive neuromodulation with ultrasound? A continuum mechanics hypothesis. *Neuroscientist* 2011;17(1):25–36. <http://dx.doi.org/10.1177/1073858409348066>.

6. Les nanoparticules

Comme nous l'avons rapporté dans notre article sur les applications thérapeutiques des ultrasons (voir ci-dessus) (201), les nanoparticules font partie des molécules qui peuvent être administrées concomitamment à l'ouverture de la BHE. Leurs différentes propriétés les rendent particulièrement maniables et intéressantes comme agents thérapeutiques. De par leur taille, les nanoparticules ne franchissent pas ou peu spontanément la BHE. Ce sont donc d'excellentes candidates pour bénéficier d'un franchissement facilité de la BHE à l'aide des ultrasons. Dans notre projet, nous avons décidé de coupler l'ouverture ultrasonore de la BHE aux nanoparticules de Sélénium, du fait des propriétés antiépileptiques potentielles de ce dernier.

6.1. Généralités sur les nanoparticules

Les nanoparticules (NP) sont une famille de matériaux qui comprennent des substances particulières, ayant un diamètre de 1 à 100 nm (202). Les NP ne sont pas, en tant que telles, de simples molécules et sont composées de trois couches : 1) la couche de surface, qui peut être fonctionnalisée avec une variété de petites molécules, d'ions métalliques, de tensioactifs et de polymères, 2) la couche d'enveloppe, qui est un matériau chimiquement différent du noyau sous tous ses aspects, et 3) le noyau, qui est la partie centrale de la NP et fait généralement référence à la NP elle-même. Elles peuvent être classées en différents groupes en fonction de leurs propriétés, formes ou tailles : les NP basées sur le carbone, les NP métalliques, les NP céramiques et les NP polymères. Les NP possèdent des propriétés physiques et chimiques uniques en raison de leur grande surface et de leur taille nanométrique. Leurs propriétés optiques dépendent de la taille, qui donne des couleurs différentes en raison de l'absorption dans la région visible. Leur réactivité, ténacité et autres propriétés dépendent également de leur taille, forme et structure uniques.

En raison de ces caractéristiques, ces matériaux ont suscité un immense intérêt des chercheurs dans divers domaines. Les NP peuvent être utilisées pour l'administration de médicaments (203), la détection chimique et biologique, la détection de gaz, la capture du CO₂ et d'autres applications connexes (204).

On rapporte néanmoins que les NP de métaux lourds de plomb, de mercure et d'étain sont si rigides et stables que leur dégradation n'est pas facilement réalisable, ce qui peut conduire à de nombreuses toxicités environnementales (205).

6.2. Les nanoparticules de Sélénium

6.2.1. Le Sélénium

Le Sélénium (Se) est l'élément chimique de numéro atomique 34 (diamètre atomique : 0,23nm). C'est un non-métal qui a des propriétés d'isolations électrique et thermique. Son énergie d'ionisation et son électronégativité sont élevées. Le Sélénium est un oligoélément constituant des sélénoprotéines dont fait partie le principal antioxydant intracellulaire, la glutathion peroxydase (206). Il est, apporté par l'alimentation. On le retrouve notamment dans le thon, les moules, le foie (40 - 100 µg de Se/100 g de produit), les rognons, les œufs, la dinde, le cabillaud, le saumon (20 - 40 µg/100 g), le pain, le fromage, (3 - 10 µg/100 g) ... Les apports recommandés dans l'alimentation humaine sont de 20 à 70 µg/jour. Il est recommandé de ne pas dépasser 400 µg/j, le sélénium étant toxique à haute dose en donnant la sélénose, se traduisant par la perte des cheveux, puis des lésions neurologiques, une cirrhose hépatique et un œdème pulmonaire.

Le Sélénium a par ailleurs de multiples applications domestiques et commerciales (207):

- **Métallurgie** : il entre comme ajout dans le cuivre et les aciers pour faciliter leur usinage.
- **Soudage** : utilisé, avec le bismuth, comme alliage de brasage, en remplacement des soudures au plomb.
- **Industries verrières** : utilisé comme décolorant dans le verre d'emballage en faisant disparaître la couleur verte apportée par les traces d'oxyde de fer présentes dans la silice. Dans les vitrages pour la construction et l'automobile, il réduit la transmission de la chaleur solaire.
- **Pigment** : utilisé dans des matières plastiques, des céramiques et des verres, pour donner une couleur variant du jaune au rouge. En particulier il colore en rouge vif les feux de signalisation.
- **Chimie** : utilisé comme catalyseur.
- **Électronique** : utilisé dans des redresseurs de courant, des cellules photoélectriques, en détection infrarouge pour des longueurs d'onde comprises entre 1,5 et 5,2 µm.
- **Photovoltaïque** : utilisé pour élaborer des panneaux solaires.
- **Hygiène** : utilisé dans les shampoings antipelliculaires.

- **Agriculture et élevage** : il peut être ajouté dans les engrais dans des pays dont les sols sont déficients en sélénium. Il peut être ajouté à l'alimentation animale à des teneurs de 400 à 800 µg/kg d'aliment.

En pathologie humaine, des essais thérapeutiques ont montré que la supplémentation en Sélénium préviendrait la survenue de certains cancers cutanés (208). Il a été également rapporté qu'une supplémentation quotidienne en Sélénium peut supprimer la progression de la charge virale du VIH-1 et augmenter indirectement le nombre de CD4 (209). Enfin, une méta-analyse d'essais randomisés a montré que l'utilisation de sélénium était associée à une baisse de la mortalité chez les patients de réanimation (210). Le Sélénium aurait donc un rôle protecteur dans les pathologies susceptibles d'entraîner une production accrue de radicaux libres provoquant des lésions cellulaires et libérant des médiateurs de l'inflammation tels que les cytokines. Cet effet protecteur serait dû à l'action antioxydante de la glutathion peroxydase (206,211).

6.2.2. Sélénium et épilepsie

6.2.2.1. Rôle du sélénium sur la signalisation du calcium et les voies moléculaires induites par le stress oxydatif dans l'épilepsie

La génération de radicaux libres peut induire une activité épileptique par activation directe de la glutamine synthétase, entraînant ainsi une accumulation anormale d'acide glutamique, un neurotransmetteur exciteur (212). L'apparition de crises induites par l'oxygène chez les patients et les animaux épileptiques est corrélée à une diminution de la concentration en neurotransmetteur GABA, en raison de l'inhibition de l'enzyme glutamate décarboxylase par les espèces réactives de l'oxygène (*reactive-oxygen species*, ROS). Les crises peuvent entraîner une augmentation de la libération de glutamate, conduisant à l'absorption de calcium par le récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et les canaux calcium voltage-dépendants. Les mitochondries accumulent du calcium fourni par le cytosol. Lorsque la concentration dépasse 400nM ou à condition que l'absorption mitochondriale de calcium dépasse l'extrusion (213), cela entraîne la dépolarisation des membranes mitochondriales. D'autre part, l'exposition des mitochondries à un taux élevé de calcium libre s'est avéré augmenter la formation de ROS. La dépolarisation soutenue des membranes mitochondriales et la production augmentée de ROS activent les canaux potentiels transitoires de mélastatine 2 (TRPM2). L'afflux de calcium augmente ainsi par activation de TRPM2 via ROS (214) (**Figure 13**). Le sélénium jouerait un rôle encore incomplètement élucidé dans l'inhibition de cette voie.

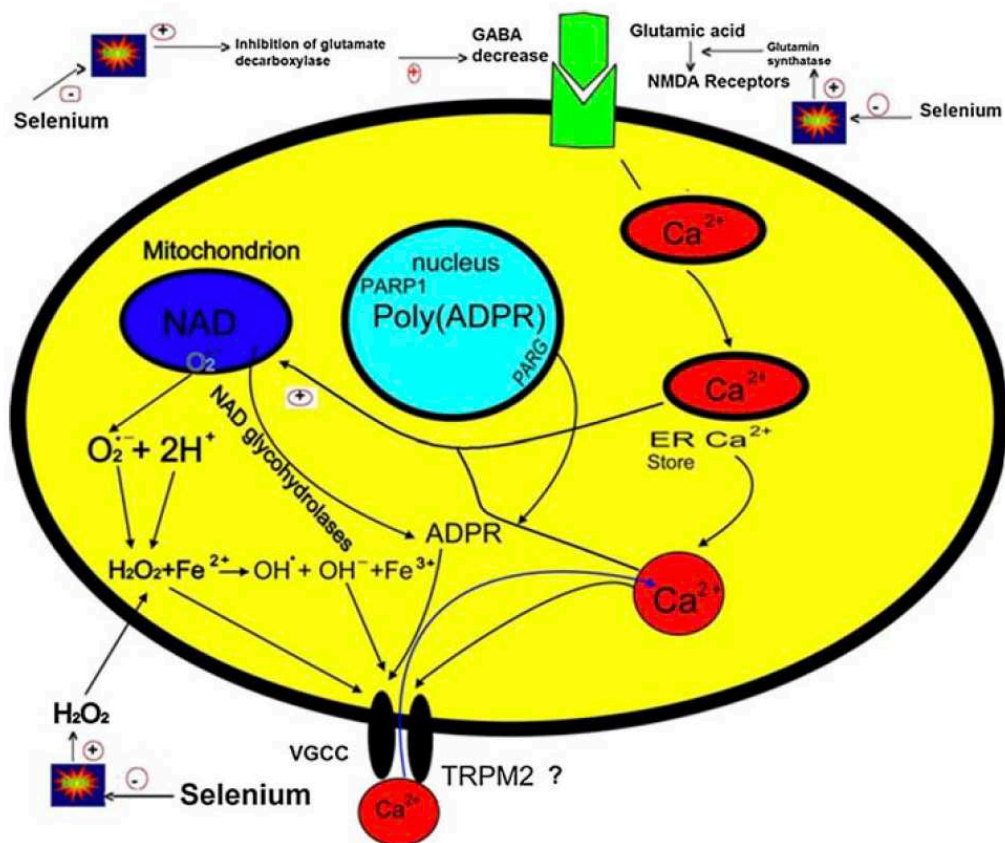


Figure 13 : Rôle du sélénium sur la signalisation du calcium et les voies moléculaires induites par le stress oxydatif dans l'épilepsie (d'après Naziroglu, *Neurochem Res*, 2009 (215)).

6.2.2.2. Carence en Sélénium et épilepsie

Bien que plusieurs auteurs aient démontré une association entre la carence en sélénium et l'épilepsie (216–218), le rôle causal du sélénium dans l'épilepsie n'a pas été clairement établi. Ashrafi et al. (216) ont rapporté que les niveaux de sélénium et l'activité de la glutathion peroxydase étaient plus faibles chez les enfants épileptiques (69 ng/mL et 440 nmol /min/ml) que chez les enfants en bonne santé (86 ng/mL et 801 nmol /min/ml) et ils ont conclu que l'activité érythrocytaire de la glutathion peroxydase dans le cas d'une carence en sélénium ne pourrait pas être un indicateur sensible et spécifique des taux de sélénium dans le sérum des enfants. Au contraire, Hamed et al. (219) ont rapporté que les niveaux de sélénium ne changeaient pas entre les patients épileptiques et les témoins sains du même âge. Finalement, une méta-analyse récente a confirmé que les taux de sélénium sont plus faibles chez les patients épileptiques que chez les contrôles sains (220).

Le retard de croissance est fréquent chez les enfants épileptiques et un apport alimentaire insuffisant en sélénium peut en être l'une des causes. Ainsi, Volpe et al. (221) ont comparé l'apport en sélénium d'enfants de 1 à 8 ans atteints d'épilepsie réfractaire à des

enfants en bonne santé du même âge. Ils ont trouvé un apport moindre en sélénium chez les enfants atteints d'épilepsie réfractaire.

En conclusion, il existe des preuves convaincantes du rôle de la carence en sélénium et de la déficience de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase dans la pathogenèse de l'épilepsie.

6.2.2.3. Rôle du sélénium dans le traitement de l'épilepsie

Le sélénium offre donc une protection contre les dommages cellulaires induits par les ROS. Les mécanismes proposés passent principalement par la fonction des enzymes dépendantes des sélénoprotéines et des sélénoprotéines elles-mêmes (222). Des études cliniques établissant un lien direct entre le statut en sélénium et les troubles neurologiques ont montré qu'une forme de convulsions réfractaires chez les nourrissons était associée à un faible taux de sélénium dans le sang et pouvait être traitée par une supplémentation en sélénium (223,224). Par exemple, un lien entre les convulsions et le sélénium a été suggéré à partir du cas de deux enfants présentant une régression neuro-développementale sévère et des crises réfractaires, et qui se sont avérés avoir une carence systémique en sélénium. A l'époque, on ne savait pas si la carence en sélénium était un facteur direct du retard neurodéveloppemental ou si elle affectait le cerveau via une fonction hépatique anormale. Les deux enfants, qui avaient un retard neurodéveloppemental sévère et une fonction hépatique altérée, ont développé des crises réfractaires au cours de la première année de vie. Ils se sont avérés être carencés en sélénium. La supplémentation orale en sélénium chez les deux enfants a entraîné une réduction des crises, une amélioration de l'EEG et le retour à une fonction hépatique physiologique après 2 semaines (224). Plus important encore, lors du retrait du sélénium, les crises sont revenues et n'ont pu être contrôlées qu'en rétablissant la supplémentation en sélénium. Auparavant, seules des preuves circonstancielles étaient disponibles indiquant que le manque de sélénium était un facteur de risque pour les patients recevant une nutrition parentérale totale de développer un syndrome de carence en sélénium puis des crises d'épilepsie. À ce jour, il n'y a pas de preuve formelle quant à l'implication du sélénium dans les maladies dégénératives telles que l'épilepsie et la maladie de Parkinson. Un problème majeur est que nous ne savons pas comment les taux de sélénium dans le sang sont en corrélation avec ceux du cerveau. Cependant, des études ont montré que l'administration de sélénium avait des effets bénéfiques sur l'épilepsie induite par le fer chez le rat notamment en normalisant les enregistrements EEG et en réduisant les dommages tissulaires (225,226). La mort des cellules hippocampiques et le nombre de crises ont également augmenté chez des rats kaïnate nourris avec un régime pauvre en sélénium (227). Dans cette étude, les taux physiologiques de sélénite de sodium dans les cultures de cellules neuronales protégeaient

contre les agressions excitotoxiques et atténuaient même les dommages primaires. L'effet neuroprotecteur du sélénium est donc lié à l'inhibition de l'activation de NF-kappaB et d'AP-1 induite par le glutamate et non pas directement médié par l'effet antioxydant du sélénium. Dans une autre étude réalisée sur des rats rendus épileptiques par injection intrapéritonéale de PTZ, une administration intrapéritonéale de sélénium seul ou en combinaison avec de la carbamazépine a été réalisée (228). Des analyses quantitatives électrocorticographiques et des paramètres biochimiques ont révélé que le sélénium et la carbamazépine ont atténué les effets indésirables induits par le PTZ, par la diminution du nombre de pointes épileptiques, la normalisation des fréquences lentes et rapides et l'atténuation de la plupart des marqueurs du stress oxydatif. Ces résultats suggèrent que la supplémentation en sélénium avec les médicaments antiépileptiques peut être bénéfique pour améliorer certaines altérations cérébrales induites à la suite des crises épileptiques.

Un autre lien entre l'épilepsie et le sélénium a également été suggéré à partir d'observations de patients sous nutrition parentérale totale qui développaient des crises jusqu'à ce que le sélénium soit incorporé dans les compositions nutritives (229).

Nous pouvons ainsi résumer brièvement le rôle préventif et thérapeutique du sélénium dans l'épilepsie. L'épilepsie entraîne une destruction neuronale quelques heures après la crise. La cascade d'événements implique des actions néfastes des radicaux libres et l'activation de facteurs de transcription pro-apoptotiques, qui aboutissent finalement à la destruction neuronale. Il a été montré que la carence en sélénium entraîne une augmentation massive de la sensibilité aux crises et la mort neuronale. Ainsi, l'oligo-élément sélénium, essentiel sur le plan nutritionnel, joue un rôle central dans la susceptibilité neuronale aux lésions excitotoxiques. Premièrement, il a été observé dans des cultures de cellules neuronales que l'ajout de sélénium à un taux physiologique protège contre les agressions oxydatives et atténue même les dommages primaires. L'effet neuroprotecteur du sélénium est dû à l'inhibition de la production de radicaux libres (NF-kappaB et d'AP-1) induite par le glutamate et au soutien du système antioxydant via une augmentation du niveau de glutathion et de l'activité de la glutathion peroxydase dans les érythrocytes humains (230). L'activation d'un mécanisme lié lui-même à l'activation du récepteur de la prostaglandine E_1 par le sélénium a également été évoqué pour expliquer le rôle antiépileptique du sélénium (231). Enfin, le sélénium jouerait un rôle dans la neurotransmission, dans laquelle les neurones γ -aminobutyricacidergiques parvalbumine positifs seraient les plus dépendants du taux de sélénium (232).

6.2.3. Applications thérapeutiques des nanoparticules de Sélénium

Le sélénium (Se) à une fenêtre thérapeutique étroite et ses marges de toxicité sont très ténues alors que les nanoparticules de Se (NpSe) possèdent une toxicité remarquablement réduite (233). De plus, il a été prouvé que les NpSe sont pareillement absorbées, distribuées, métabolisées et excrétées que le sélénium seul (234). Cependant, on ignore en grande partie comment les NpSe peuvent affecter la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des sélénoprotéines.

Les NpSe ont été explorés dans divers troubles liés au stress oxydatif et à l'inflammation comme l'arthrite, le cancer, le diabète et la néphropathie avec des avantages thérapeutiques potentiels (235). Les NpSe constituent également une solution de transport prometteuse pour transporter divers médicaments vers le site d'action. Concernant les pathologies neurologiques, les NpSe ont montré posséder la capacité de diminuer la formation du peptide A β en diminuant la production de ROS dans la maladie d'Alzheimer (236), de diminuer l'inflammation induite par un traumatisme médullaire chez le rat (237) et de promouvoir l'apoptose de cellules gliomateuses in vitro (238). Dans le domaine de l'épilepsie, un traitement oral préventif par NpSe chez des souris rendues épileptiques par injection de PTZ s'est avéré retarder l'apparition et diminuer la durée des crises toniques, myocloniques et généralisées. De plus, les NpSe se sont avérés fournir une neuroprotection en empêchant le développement d'un stress oxydatif (239).

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail étaient de :

Partie 1 : Faisabilité et conséquences de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris saines et chez les souris avec épilepsie méso-temporale (souris Kaïnate).

- Évaluer la faisabilité et la reproductibilité de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris wild-type sans et avec électrodes intracérébrales d'enregistrement EEG.
- Évaluer les conséquences histologiques de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris wild-type et des souris présentant une épilepsie méso-temporale (modèle kainate).
- Évaluer l'épileptogénicité potentielle d'ouvertures répétées (x3) de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris wild-type implantées par des électrodes intracérébrales profondes d'EEG.

Partie 2 : Effets antiépileptiques de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité, seule et couplée aux Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate.

- Évaluer la sécurité et la tolérance de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris wild-type.
- Évaluer l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate, en comparaison avec l'ouverture de la BHE seule et l'administration de Nanoparticules seules.
- Évaluer les éventuelles modifications de la neurogenèse hippocampique induites par l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée ou non à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate.
- Évaluer les éventuelles modifications histologiques à long terme induites par l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée ou non à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate.

MATERIEL & METHODES

Toutes les expérimentations sur l'animal décrites ci-dessous ont été réalisées en accord avec le comité d'éthique de l'Institut du Cerveau (numéro d'agrément A751319). Le projet, référencé sous le numéro APAFIS (#20102 2019021817577773 v4), a été autorisé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation le 29/07/2019 pour une durée de 4 ans, en application des dispositions du code rural et de la pêche maritime, notamment ses articles R.214-87 à R.214-126. Un avenant a été obtenu le 04/01/2021, référencé sous le numéro APAFIS (#20102-2019021817577773 v7). Tous les efforts ont été mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de ce projet et diminuer leur souffrance au cours des expériences.

1. Animaux

Les différentes expériences ont été menées sur des souris sauvages mâles (Wild Type, WT) C57BL/6 fournies par Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) et âgées de 8 à 10 semaines. Les souris ont été reçues à l'âge de 6 à 7 semaines et acclimatées aux conditions d'hébergement de l'animalerie de l'Institut du Cerveau. Toutes les souris étaient placées dans des cages normales (32 cm x 20,4 cm x 14 cm de hauteur) avec de la nourriture et de l'eau *ad libitum*. Habituellement, les souris étaient hébergées par fratrie de 2 à 6, exceptées les souris, qui avaient été implantées avec des électrodes intracérébrales, qui étaient alors isolées en période postopératoire pour éviter une fracture ou un dysfonctionnement du matériel en cas de lutte avec leurs congénères. Un total de 289 souris a été utilisé pour l'ensemble des expériences de ce projet.

2. Procédures expérimentales

2.1. Sonication

L'anesthésie générale de l'animal était obtenue par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et xylazine dilué dans du sérum physiologique (10% de kétamine, 5% de kétamine, 85% de Sérum physiologique). La procédure, classée comme légère, intervenait après contrôle de la profondeur de l'anesthésie. L'animal était rasé localement sur le côté droit du scalp, puis dépilé, à l'aide de crème dépilatoire. Le dessèchement oculaire était prévenu

par application d'Ocrygel (Virbac, France). Une injection intraveineuse de microbulles (0,1ml, liposomes de perfluorocarbone, Sonovue 25mg) était réalisée dans le sinus rétro-orbitaire droit. Immédiatement après, la souris était installée en décubitus dorsal et placée au-dessus du transducteur ultrasonore, avec le vertex baignant dans de l'eau déminéralisée préalablement dégazéifiée pour favoriser la transmission des ultrasons (**Figure 14**). La précision de la zone à soniquer était améliorée par un pointeur laser. La sonication était alors lancée avec les paramètres suivants (0,3 MPa, 1Hz) pour une durée de 120 secondes. Durant la sonication, le contrôle de la réfraction des ultrasons était assuré par le moniteur. L'animal était ainsi réinstallé si besoin afin d'obtenir une réfraction inférieure à 10%. Après la procédure, l'animal était séché, puis installé dans une salle de réveil chauffante jusqu'à son réveil complet. Il était enfin replacé dans sa cage en hébergement collectif.

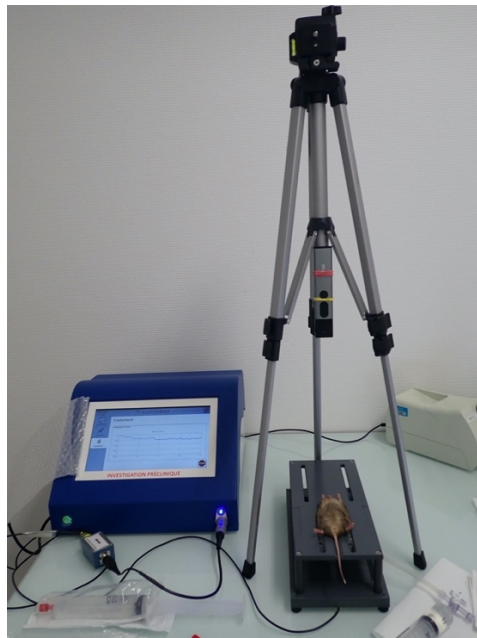


Figure 14 : Procédure expérimentale de sonication sur une souris C57BL6/J.

2.2. Injection stéréotaxique intrahippocampique de kainate pour induction de l'épilepsie méiotemporale

Cette procédure a été réalisée selon la technique précédemment publiée (240). L'animal, anesthésié par de l'isoflurane au masque (500 mL/L à 4% pour l'induction et 250 mL/L à 2,5% en entretien) était placé dans le cadre de stéréotaxie sur un tapis chauffant. La température corporelle était monitorée par une sonde thermique rectale. La procédure, classée comme modérée, intervenait après contrôle de la profondeur de l'anesthésie. L'animal était rasé localement puis dépilé, à l'aide de crème dépilatoire. Le dessèchement oculaire était prévenu par application d'Ocrygel (Virbac, France). Une incision cutanée médiane du scalp

était réalisée en regard de la suture sagittale. L'antisepsie crânienne était réalisée par application de bétadine et d'eau oxygénée ; cette dernière permettait également de faire apparaître les sutures. Sous microscope, une craniotomie était réalisée par fraisage au-dessus de l'hippocampe droit selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes : antéropostérieures (AP) : -1,80 mm ; médiolatérales (ML) : +1,80 mm, en utilisant le bregma comme référence. La canule d'injection était par la suite descendue dans l'hippocampe dorsal droit (coordonnées dorsoventrales (DV) : -1,80 mm) (**Figure 15**). Le kaïnate (KA) était injecté, à l'aide d'une micropompe reliée à une seringue (Hamilton 10uL), durant 5 minutes pour une dose totale de 50 nL (10 nL/min). Un délai de 10 minutes s'écoulait avant le retrait de la canule pour permettre une bonne diffusion du KA. L'incision cutanée était fermée par de la colle biologique. Après la procédure, l'animal était installé dans une salle de réveil chauffante jusqu'à son réveil complet. Il était enfin remplacé dans sa cage en hébergement collectif.

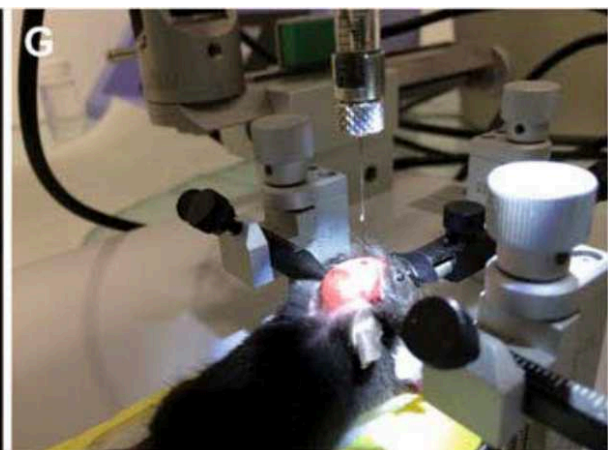
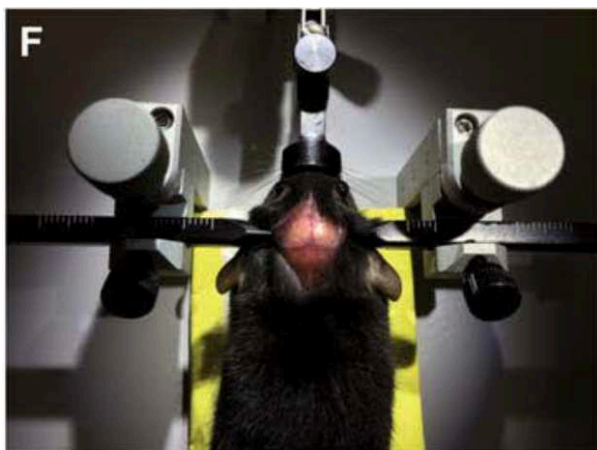
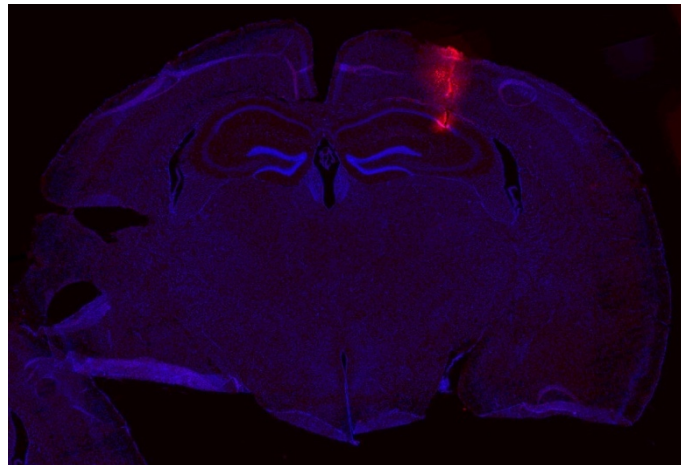
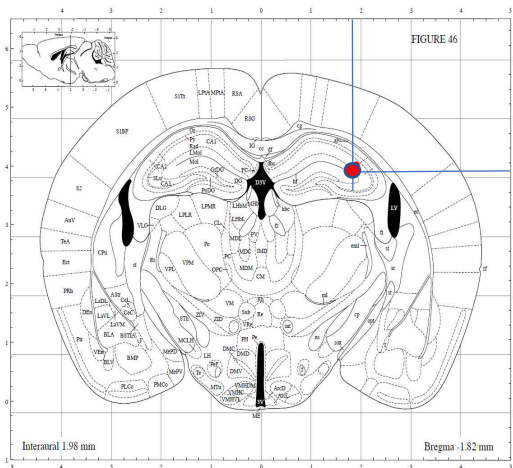


Figure 15 : Injection stéréotaxique de kaïnate dans l'hippocampe dorsal droit de souris. Coordonnées stéréotaxiques selon l'atlas de Paxinos et Franklin (2001, en haut à gauche). Visualisation de la cible stéréotaxique en immunohistochimie après injection (en haut à droite). Installation de la souris dans le cadre de stéréotaxie (en bas à gauche) et injection de kaïnate à l'aide d'une microcanule portée par une microsiringue (en bas à droite) d'après Mathon et al., 2015 (240).

2.3. Implantation d'électrodes intracérébrales et enregistrement vidéo-électroencéphalographique

Pour les expérimentations impliquant un enregistrement du tracé EEG, deux électrodes profondes ciblant l'hippocampe dorsal droit ainsi que des électrodes corticales de surface ont été implantées à la suite de l'injection intrahippocampique. Les électrodes ont été fabriquées à l'aide de deux fils d'acier inoxydable et dont les extrémités distales se trouvaient éloignées par 500 µm. Un contrôle de la qualité de la fabrication a été effectué par une vérification de la conduction électrique dans chaque électrode. Les électrodes hippocampiques (HP1 et HP2) ont été implantées médialement (ML : 1,5mm) par rapport au site d'injection intrahippocampique. Des électrodes ont été placées bilatéralement au niveau du cortex moteur droit (M1R), du cortex moteur gauche (M1L), et au niveau du cortex pariétal de l'hémisphère gauche (LPtA). Une électrode de référence a été placée au-dessus du vermis du cervelet. Les électrodes ont ensuite été branchées à un connecteur multifiches et solidement fixé au crâne de l'animal à l'aide de ciment dentaire, en prenant soin de réaliser le montage le moins encombrant possible pour ne pas gêner la transmission des ultrasons lors des sonications. Après la procédure, l'animal était installé dans une salle de réveil chauffante jusqu'à son réveil complet. Il était enfin replacé dans sa cage en hébergement isolé.

Chaque animal destiné à l'étude EEG a ensuite été placé dans une enceinte en Plexiglas permettant son observation et relié à un EEG (filtre passe-bande entre 0,5 et 50 Hz ; Reega Minidix TR, Alvar Electronic, Paris, France). Les événements EEG associés à la micro-injection intrahippocampique de KA ont été enregistrés pendant les heures suivantes la procédure. Les signaux EEG enregistrés chez l'animal libre de ses mouvements ont été numérisés, traités et analysés à l'aide du logiciel DELTAMED LTM, couplé au logiciel COHERENCE qui permettait l'enregistrement de la vidéo jour et nuit.

L'analyse de l'EEG débutait par la création d'une cartographie temps-fréquence pour chaque animal et pour chacune des 5 voies, permettant d'obtenir une vue d'ensemble de l'enregistrement. Pour chaque crise suspectée sur cette cartographie, le tracé EEG était analysé pour l'ensemble des voies afin de confirmer ou non la crise. La vidéo était concomitamment analysée afin d'évaluer la sévérité de sémiologie ictale et de la classer selon le score de Racine (241) :

- Stade 1 : immobilité et posture rigide ;
- Stade 2 : mouvements de la bouche, hochements de tête et mouvements répétitifs ;
- Stade 3 : clonus des membres antérieurs ;
- Stade 4 : crises sévères avec cabrage et chute ;
- Stade 5 : crises sévères avec perte de posture ou saut ;
- Stade 6 : crises tonico-cloniques.

Le nombre de crises enregistrées était alors rapporté à la durée de l'enregistrement pour obtenir une fréquence.

3. Structure et synthèse des nanoparticules de sélénium (NpSe)

Les NpSe ont été synthétisées par le Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux de l'École Supérieure de Physique-Chimie Industrielles (ESPCI) de la ville de Paris. Il s'agissait de NP solides de 40 à 50 nm de diamètre hydrodynamique (mesuré par diffusion dynamique de la lumière - *dynamic light scattering* - et microscopie électronique) recouvertes d'un surfactant PEGylé.

Le seuil de toxicité du Sélénium décrit dans la littérature étant de 0,5 mg par kg (239), nous avons fixé à 15 µg la dose maximale de Sélénium pouvant être administrée à une souris de 30g. Nous avons donc injecté, en intravasculaire dans le sinus rétro-orbitaire, 100 µL d'une solution non filtrée de NP Se à 150 µg/ mL dans un tampon phosphate pH 7.4 avec 0.9 g/L de NaCl.

La stabilité de ces NpSe dans la circulation sanguine et leur capacité à échapper à la reconnaissance par les macrophages présents dans le foie n'étant pas connues, nous avons fait l'hypothèse qu'elle sont typiquement de quelques minutes à 1-2 heures après l'injection. Nous avons néanmoins admis que les NpSe étaient plus stables que les microbulles, et ainsi choisi d'injecter d'abord les NpSe, puis les microbulles avant de réaliser la sonication.

4. Préparation des tissus avant détection immunohistochimique

4.1. Perfusion intracardiaque

Les souris ont été euthanasiées à l'aide d'une dose intrapéritonéale de pentobarbital sodique (80 mg/kg), puis perfusées par voie intracardiaque à raison de 15 mL/min à l'aide d'une pompe péristaltique. La perfusion est précédée par l'ouverture de l'oreillette droite pour éviter une surpression dans le système circulatoire suivie par l'insertion dans le ventricule gauche d'une canule de perfusion. On perfuse d'abord à l'aide de 10mL de PBS qui permet l'exsanguination de l'animal. La fixation est ensuite effectuée par du paraformaldéhyde acétique (PFA) à 4% (20mL). Après décapitation, les cerveaux ont été extraits du crâne et ont été placés dans une solution de post-fixation constituée de PFA 4 % pendant 24 h.

4.2. Préparation des coupes

Après la post-fixation, les cerveaux ont été déshydratés durant 48 h dans une solution de sucrose à 30% pour optimiser leur cryoconservation. Les cerveaux ont été ensuite congelés dans l'isopentane à -50°C pendant 1 min avant d'être conservés au congélateur à -20°C.

Les cerveaux ont été coupés au cryostat à -20°C en tranches coronales de 20 µm au niveau de la région hippocampique : ~0,7 à -2,5 mm à partir du bregma selon l'axe rostro-caudal, avec une coupe tous les 200 µm, et montés sur des lames. Les lames ont alors été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

5. Immunohistochimie

La récupération de l'antigène était réalisée avec un tampon citrate à 0,01 M et à un pH=6. Ensuite, les tranches étaient perméabilisées avec du Triton 0,1% pendant 30 minutes. Les anticorps primaires étaient appliqués pendant une nuit à 4° C (par exemple : GFAP, 1: 250, poulet AB5541 Merck-Millipore; Iba1 1: 250, souris MABN92 Merck-Millipore; et albumine, 1: 250, lapin ab 207327 Abcam). Après lavages, des anticorps secondaires étaient appliqués pendant 1 heure à température ambiante (par exemple : Alexa fluor anti-poulet 488, anti-souris 555 ou anti-lapin 647, Thermo Fischer).

6. Comptage cellulaire et analyse de l'intensité de la fluorescence

Après numérisation des lames au scanner, l'analyse s'est effectuée, en aveugle du groupe d'appartenance des souris, à l'aide des logiciels Zen et ImageJ.

6.1. Comptage cellulaire

Lorsqu'un comptage cellulaire était nécessaire, par exemple pour évaluer le nombre de cellules BRDU positives ou DCX positives, nous avons réalisé un Z-stack de l'ensemble de la tranche de cerveau en coupe coronale. Nous avons par la suite choisi 4 zones d'intérêts par hippocampe et par côté, couvrant l'ensemble du gyrus denté. Nous avons par la suite procédé au comptage manuel des cellules positives. Pour qu'une cellule soit considérée DCX positive, il fallait, à la fois, que le corps cellulaire et l'axone soient marqués.

6.2. Analyse de l'intensité de la fluorescence

Pour évaluer l'intensité de la fluorescence induite par certains marquages (Albumine, GFAP, NeuN, Iba1), nous avons, à l'aide du logiciel ImageJ, pondéré la fluorescence du marquage par rapport à l'auto-fluorescence de la tranche (médiane de 5 mesures), rapporté à la surface analysée. Les mesures ont été effectuées sur trois tranches différentes à travers l'hippocampe pour chaque souris.

RESULTATS

Partie 1. Faisabilité et conséquences de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris saines et chez les souris avec épilepsie méiotemporale

Rappel des Objectif de la Partie 1 :

- *Évaluer la faisabilité et la reproductibilité de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris wild-type sans et avec électrodes intracérébrales d'enregistrement EEG.*
- *Évaluer les conséquences histologiques de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris wild-type et des souris présentant une épilepsie méiotemporale (modèle kainate).*
- *Évaluer l'épileptogénicité potentielle d'ouvertures répétées (x3) de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris wild-type implantées par des électrodes intracérébrales profondes d'EEG.*

Le premier temps de ce travail était de montrer la faisabilité, la reproductibilité et la tolérance de l'ouverture de la BHE par LIPUs chez la souris wild-type C57BL6/J, sans et avec électrodes profondes d'enregistrement EEG.

Comme nous l'avons vu précédemment (Introduction 5.1.3 « La barrière hémato-encéphalique dans l'épilepsie »), il existe une association entre perméabilité de la BHE et épilepsie. Néanmoins, à ce jour, il n'a pas été clairement identifié si une de ces deux conditions entraîne la seconde ou si elles surviennent réciproquement et concomitamment. Puisque ce travail repose sur l'ouverture répétée de la BHE, induite par les ultrasons, nous avons voulu investiguer si celle-ci pouvait être épileptogène chez un modèle de souris non épileptiques et analyser les conséquences histologiques de l'ouverture de BHE chez les souris wild-type et Kainate.

Nous présentons les résultats et l'analyse de ces problématiques sous la forme d'un article scientifique rédigé en langue anglaise.

Safety Profile of Low-intensity Pulsed Ultrasound-induced Blood Brain Barrier Opening in Nonepileptic Mice and in a Mouse Model of Mesial Temporal Lobe Epilepsy

Bertrand MATHON^{1,2,3,4}; Vincent NAVARRO^{2,5}; Sarah LECAS²; Delphine ROUSSEL²; Stéphane CHARPIER²; Alexandre CARPENTIER^{1,3,4}.

1 Sorbonne University, Department of Neurosurgery, APHP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France.

2 Paris Brain Institute, ICM, INSERM U 1127, CNRS UMR 7225, Sorbonne University, UMRS 1127, F-75013, Paris, France

3 Sorbonne University, GRC 23, Brain Machine Interface, APHP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France.

4 Sorbonne University, Advanced Surgical Research Technology Lab, Paris, France

5 Sorbonne University, Department of Neurology, Epileptology Unit, APHP, La Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013, Paris, France.

Reprints and Correspondence: Bertrand Mathon, MD, MSc, Department of Neurosurgery, La Pitié–Salpêtrière University Hospital, 47–83, boulevard de l’Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. Tel: +33 (0)1 84 82 73 63; e-mail: bertrand.mathon@aphp.fr

ORCID: 0000-0002-9182-5846

SUMMARY

It is unknown whether ultrasound-induced BBB disruption can promote epileptogenesis and how the BBB integrity changes over time after sonication. To get more insight into the safety profile of US-induced BBB opening, we determined BBB permeability as well as histological modifications in C57BL/6 adult control mice and in the kainate (KA) model for mesial temporal lobe epilepsy in mice after sonication with low-intensity pulsed ultrasound (LIPU). Microglial and astroglial changes in ipsilateral hippocampus were examined at different time points following BBB disruption by respectively analyzing Iba1 and GFAP immunoreactivity. We further studied using intracerebral EEG recordings the possible electrophysiological repercussions of a repeated disrupted BBB for the seizure generation in control mice. LIPU-induced BBB opening led to transient albumin extravasation and reversible mild astrogliosis, but not to microglial activation in the hippocampus of nonepileptic mice. In KA mice, the transient albumin extravasation into the hippocampus mediated by LIPU-induced BBB opening did not aggravate inflammatory processes and histologic changes that characterize the hippocampal sclerosis. Three LIPU-induced BBB opening did not induce epileptogenicity in nonepileptic mice implanted with depth EEG electrodes. Our experiments in mice provide convincing evidence of safety of LIPU-induced BBB opening as a therapeutic modality of neurological diseases.

INTRODUCTION

The blood-brain barrier (BBB) consists of endothelial cells and tight junctions with highly specific properties: low permeability, elevated transendothelial electrical resistance and rare presence of pinocytotic vesicles.(242) The BBB acts a selective filter that passes very small molecules (molecular weight <0.5 kDa and diameter <0.1 nm) and thereby protects the brain both from exogenous and endogenous toxins.(243) These features make the impermeability of the BBB the major limiting factor in the effective drug delivery in the brain.(244)

The BBB is subject to permanent regulation, which can be impaired in pathology.(243) It is well-known that chronic leakage of the BBB is involved in various central nervous system diseases, including epilepsy. The role of BBB leakage in seizures has been widely investigated indicating that chronic BBB disruption may induce seizures, and conversely, seizure-induced BBB breakdown may lead to further epileptic events.(159,245) BBB breakdown occurring during epileptogenesis and the chronic epileptic period may thereby contribute to the progression of epilepsy and long-term cognitive impairment.(246–248)

Both preclinical and clinical studies have demonstrated that ultrasound (US) directed to brain areas, combined with systemic injection of micrometer-sized bubbles, allows transient and focal disruption of the BBB and facilitates the delivery of some neurotherapeutics into the brain.(170,249) The underlying mechanism of BBB opening is the stretching of endothelial cells in the cerebral capillaries through microbubbles cavitation concomitant to brief acoustic low-intensity emission.(250) For some years, the interest for breaching the BBB using ultrasound is rising dramatically in several neurological conditions such as Alzheimer disease,(251) malignant primary brain tumors(171) and amyotrophic lateral sclerosis.(252) Due to the therapeutic potential of this promising approach, the number of procedures performed in humans will grow exponentially in the near future.(250) The first safety clinical trials on US-induced BBB opening reported no severe adverse event, and in particular no post-procedure clinically additional seizure.(171,253,254)

However, it is unknown whether US-induced transient BBB disruption can promote epileptogenesis and how the BBB integrity changes over time after sonication. To get more insight into the safety profile of US-induced BBB opening, we determined BBB permeability as well as histological modifications in control mice and in the kainate (KA) model for mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) in mice after sonication. We further studied using intracerebral depth EEG recordings the possible electrophysiological repercussions of a repeated disrupted BBB for the seizure generation in control mice.

MATERIAL AND METHODS

All experiments performed in this study are summarized in **Table 1**.

Mice (total N = 77)		Number of LIPU sonications per mice	Type of analysis	Time from sonication to euthanasia	Aims of the experiment	Associated figures in the manuscript			
Control SHAM	N=4	0	Evans Blue (macroscopical analysis)	30 min	Feasibility and reproducibility of BBB opening with LIPU in control mice.	Fig.1			
Control LIPU	N=8	1							
Control LIPU (with depth EEG electrodes)	N=4	1							
Control SHAM	N=4	0	Albumin, GFAP, Iba1 immunostaining	2 hours	Assessment of i) albumin extravasation, ii) astrogliosis (GFAP) and iii) microglial activation (Iba1) following LIPU-induced BBB opening in epileptic and control mice.	Fig.2 (Albumin) Fig.3 (GFAP) Fig.4 (Iba1)			
KA SHAM	N=4			24 hours					
	N=3			7 days					
	N=5	2 hours							
Control LIPU	N=6	1		24 hours					
	N=5			7 days					
	N=3			2 hours					
KA LIPU	N=6	1		24 hours					
	N=5			7 days					
	N=4			2 hours					
Control LIPU (with depth EEG electrodes)	N=9	3		Depth electrode EEG recordings			N/A	Assessment of potential epileptogenicity induced by 3 BBB opening with LIPU in control mice implanted with depth EEG electrodes.	Fig.5
				<i>Electrodes were inserted respectively into the right hippocampus (bipolar electrode) and the right and left motor cortex (monopolar electrodes). Continuous EEG and video acquisition were performed for 4 days before the sonication protocol, then after each sonication and 7 days after the last sonication.</i>					

Table 1. Summary of experiments performed in this study.

Ultrasound-induced BBB opening procedures

The low-intensity pulsed ultrasound (LIPU) preclinical platform (SonoCloud Technology, CarThera) consisted of a 12 mm diameter ultrasound transducer surrounded by a cylinder of degassed and demineralized water to ensure acoustic transmission. The transducer used a center frequency of 1-MHz, pulse-repetition frequency of 1 Hz, pulse length of 25,000 cycles, and in situ acoustic pressure level of 0.3 MPa (**Fig. 1A**). These safe parameters were as determined in previous experiments in mice.(172,255) A laser pointer were vertically positioned facing the center of the transducer.

For all BBB opening procedures, mice's heads hairs were shaved, and depilatory cream was applied on the skin of the sonicated area. Sonications were performed under general anesthesia through intraperitoneal injection of 200 µL of a mixture of 10 mg/kg xylazine and 100 mg/kg ketamine. A 100-µL bolus of microbubbles (Sonovue, Bracco) was injected through the retro-orbital sinus just before starting sonications. Mice were then placed on the

ultrasound platform and the head was positioned in contact with water and the targeted area (right hippocampus) was aligned with the laser dot. Sonication was then launched for a duration of 120 seconds.

To assess the feasibility and reproducibility of LIPU-induced BBB opening in the hippocampal area, a 100 mg/kg solution of Evans blue dye, which binds to albumin and does not physiologically cross the intact BBB,(256) was injected intravenously just prior to the injection of the microbubbles (n = 12, 8 with LIPU and 4 without LIPU).

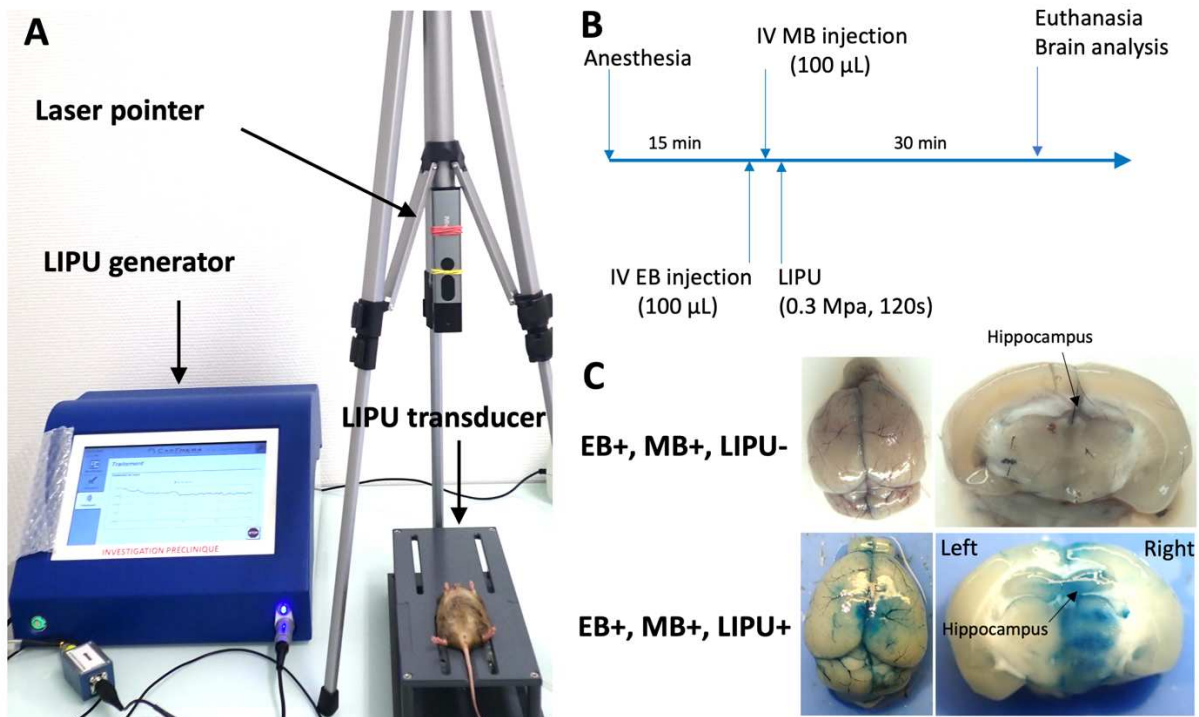


Fig. 1. LIPU sonications allows targeted and reproducible BBB opening in the hippocampus and surrounding structures.

Preclinical platform for LIPU sonications in rodents. Mice were positioned supine with their head in contact with demineralized and degassed water. Laser guidance allowed targeting the region of interest. The generator displayed in real-time the ultrasound doses that were forwarded to the targeted area (A). Protocol for blood-brain barrier opening in mice with tracking using Evans blue dye (B). Views of whole brain (left panels) and whole brains coronally sectioned (right panels) after euthanasia in sonicated mouse (n = 12, bottom panels) and nonsonicated mouse (n = 4, top panels). Evans blue dye is visible only into the sonicated brain (C).

BBB, blood-brain barrier; EB, Evans blue; IV, intravenous; LIPU, low-intensity pulsed ultrasound; MB, microbubbles.

Animals

All experimental studies were performed in accordance with the European Committee Council Directive (2010/63/UE) and approved by the local ethics committee (A75-13-19; 20102-2019). Experiments were performed on C57BL/6 J male mice, aged of 2 months of age and weighing 20-25 g.

Intrahippocampal injection

Mice were anesthetized with 2-4% isoflurane under analgesia (0.1mg/kg buprecare for 48 hours) and placed in a stereotaxic frame. A solution of 50 nl of kainate (20 nM in PBS) or PBS for control mice was injected (10nl/min) into the right dorsal hippocampus (anterior-posterior, -1.8 mm; medio-lateral, -1.8 mm; dorso-ventral, -1.8 mm, from the bregma) according to the previously described methodology.(240) Six weeks after the intrahippocampal injection, mice were sonicated. Coordinates were derived and adjusted from the Franklin and Paxinos atlas.(257)

Mice brain tissues preparation

KA-injected mice and mice from the control group were euthanized, at 2 h, 24 h or 7 days after sonication, by an intraperitoneal overdose of pentobarbital ($\geq 50\text{mg/kg}$). For immunohistochemistry analyses, brains from four groups of mice were compared: (1) nonepileptic control group without LIPU ("Control SHAM", H2 n=4, H24 n=4 and D7 n=4, total n=12); (2) nonepileptic control group treated with LIPU ("Control LIPU", H2 n=6, H24 n=5 and D7 n=3, total n=14); (3) KA group without LIPU ("KA SHAM", H2 n=3, H24 n=3 and D7 n=5, total n=11); and (4) KA group treated with LIPU ("KA LIPU", H2 n=6, H24 n=5 and D7 n=4, total n=15). Mice were perfused intracardially and their brains were postfixed overnight into 4% paraformaldehyde. After cryoprotection with sucrose 30%, brains were frozen in isopentane ($50^{\circ}\pm 5^{\circ}\text{C}$). 20 μm thick coronal sections were cut on a cryostat. Slices were collected in 0.1 M PBS and processed for immunocytochemistry.

Histology and immunohistochemistry

Antigen retrieval was performed with citrate buffer 0,01 M pH6. Then, slices were permeabilized with Triton 0,1% 30 min. Primary antibodies were applied overnight at 4°C (GFAP, 1:250, chicken AB5541 Merck-Millipore; Iba1 1:250, mouse MABN92 Merck-Millipore; and albumin, 1:250, rabbit ab 207327 Abcam). After washes, secondary antibodies were applied for 1h at room temperature (Alexa fluor anti chicken 488, anti-mouse 555 or anti rabbit 647, Thermo Fischer). Images were acquired with Axioscan and Zen software (Zeiss) and analyzed using ImageJ software (NIH). Measurements of hippocampal immunostaining were performed on three different slices through the hippocampus for each mouse and were then averaged.

Depth electrode implantation and video-EEG recordings

To assess the potential epileptogenicity induced by 3 LIPU sonications, 9 nonepileptic wild-type mice were implanted with stainless-steel electrodes (#791400; A-M Systems, Sequim, WA) inserted respectively into the right hippocampus (bipolar electrode) and the right

and left motor cortex (monopolar electrodes). A reference electrode was placed on the cerebellum of each mouse. After a minimum of 1-week recovery period, Implanted mice were freely moving and connected to a digital converter amplifier (Brainbox EEG-1166), as part of a video-EEG acquisition system (Deltamed, Natus). EEG signals were acquired at 4096 Hz and band pass filtered (0.5-70 Hz). Continuous EEG and video acquisition was then performed for 96 hours, under infrared light conditions during the night (12/12 hours, light on at 8:00 a.m.), then after each sonication and 7 days after the last sonication. Signal analyses were achieved using Deltamed software.

Statistical analyses

Analyses were performed with SPSS Statistics v22 (IBM Corp). Shapiro-Wilk test was first performed to assess normality of value distribution. Then, pairwise comparisons were performed using Student or Mann-Whitney tests when appropriate. Results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

LIPU reproducibly opens the BBB in mice

Evans blue does not cross the BBB in physiological conditions. We thus evaluated the reproducibility of BBB disruption using LIPU by injecting intravenous Evans blue dye just prior to right hemisphere sonication to assess the dye penetration in the cerebral structures (8 wild type mice and in 4 mice implanted with depth electrodes for EEG recordings and **Fig. 1B**). In all sonicated mice ($n=12$), images of whole brains and brain coronal sections showed that dye was distributed throughout the right brain areas aligned with the ultrasound beam including the hippocampus, 30 minutes after sonication (**Fig. 1C**). None of the brain of the mice that received IV injection of Evans blue without sonication ($n=4$) was colored. These findings confirmed the reproducibility of targeted BBB opening using LIPU in the hippocampus and surrounding structures.

LIPU-induced BBB opening leads to albumin extravasation in the mouse hippocampus and mild histological changes only in the control mouse group

Albumin immunoreactivity in the mouse hippocampus

BBB disruption, resulting in albumin extravasation, was detected using immunohistochemistry. In nonsonicated chronic epileptic KA mice (KA SHAM), intensity of albumin staining in the hippocampus was higher compared to that of control mice ($P = 0.001$, **Fig. 2A**).

Control and KA mice treated with LIPU were euthanized at different time points after sonication to assess the BBB permeability over the time. Immunofluorescence with antibodies to mouse albumin showed immunoreactivity in the sonicated area. Albumin extravasation was significantly increased in control LIPU and KA LIPU mice compared to nonsonicated mice 2 hours ($P = 0.01$ and $P = 0.02$, respectively) and 24 hours ($P = 0.02$ and $P = 0.04$, respectively) after sonication, but not 7 days after sonication ($P = 1.0$ and $P = 0.27$, respectively, **Fig. 2 A-C**). In both control LIPU and KA LIPU mice, albumin extravasation was highest 2 hours after LIPU treatment and decreased at H24 ($P = 0.03$ and $P = 0.02$, respectively) and at D7 ($P < 0.001$ and $P < 0.001$, respectively, **Fig. 2 B and C**). The nonsonicated hemisphere did not display any albumin immunoreaction products.

Astrocyte activation using GFAP immunostaining in the mouse hippocampus

We measured in the hippocampus the amounts of Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) as a marker of astrogliosis. In nonsonicated animals, our obtained data showed significant increase of GFAP immunostaining in KA SHAM mice as compared with control SHAM mice ($P < 0.001$, **Fig. 3A**).

In the control mice group, there was an increase in GFAP levels in mice treated with LIPU compared to the nonsonicated mice 2 hours ($P = 0.04$) and 24 hours ($P = 0.03$) after sonication, but not 7 days after sonication ($P = 0.63$ **Fig. 3 A and B**). The amounts of GFAP were not significantly different between the mice euthanized at H2 and those euthanized at H24 ($P = 0.60$). However, we observed a reduction in GFAP levels 7 days after sonication compared to 24 hours ($P = 0.03$) and 2 hours ($P = 0.02$) after sonication (**Fig. 3B**).

In the KA mice group, there was no significant difference in GFAP levels between sonicated (KA LIPU) and nonsonicated mice (KA control), regardless of when the mice were euthanized (H2, $P = 0.71$; H24, $P = 0.14$; D7, $P = 0.76$; **Fig. 3C**). In addition, we did not observe any significant variation of GFAP immunostaining over the time in KA LIPU mice.

Microglial activation using Iba1 immunostaining in the mouse hippocampus

We then measured in the hippocampus the amounts of Ionized calcium binding adaptor molecule (Iba1), a marker of microglial activation. Our findings showed significant increase of Iba1 immunostaining in KA mice as compared with control mice both in sonicated and nonsonicated animals ($P < 0.001$ and $P = 0.001$, respectively, **Fig. 4A**).

We did not observe any significant differences of Iba1 levels between sonicated and nonsonicated mice, regardless of when the mice were euthanized neither in control mice (H2, $P = 0.2$; H24, $P = 0.7$; D7, $P = 1.0$; **Fig. 4B**), nor in KA mice (H2, $P = 1.0$; H24, $P = 0.67$; D7, $P = 0.56$; **Fig. 4C**).

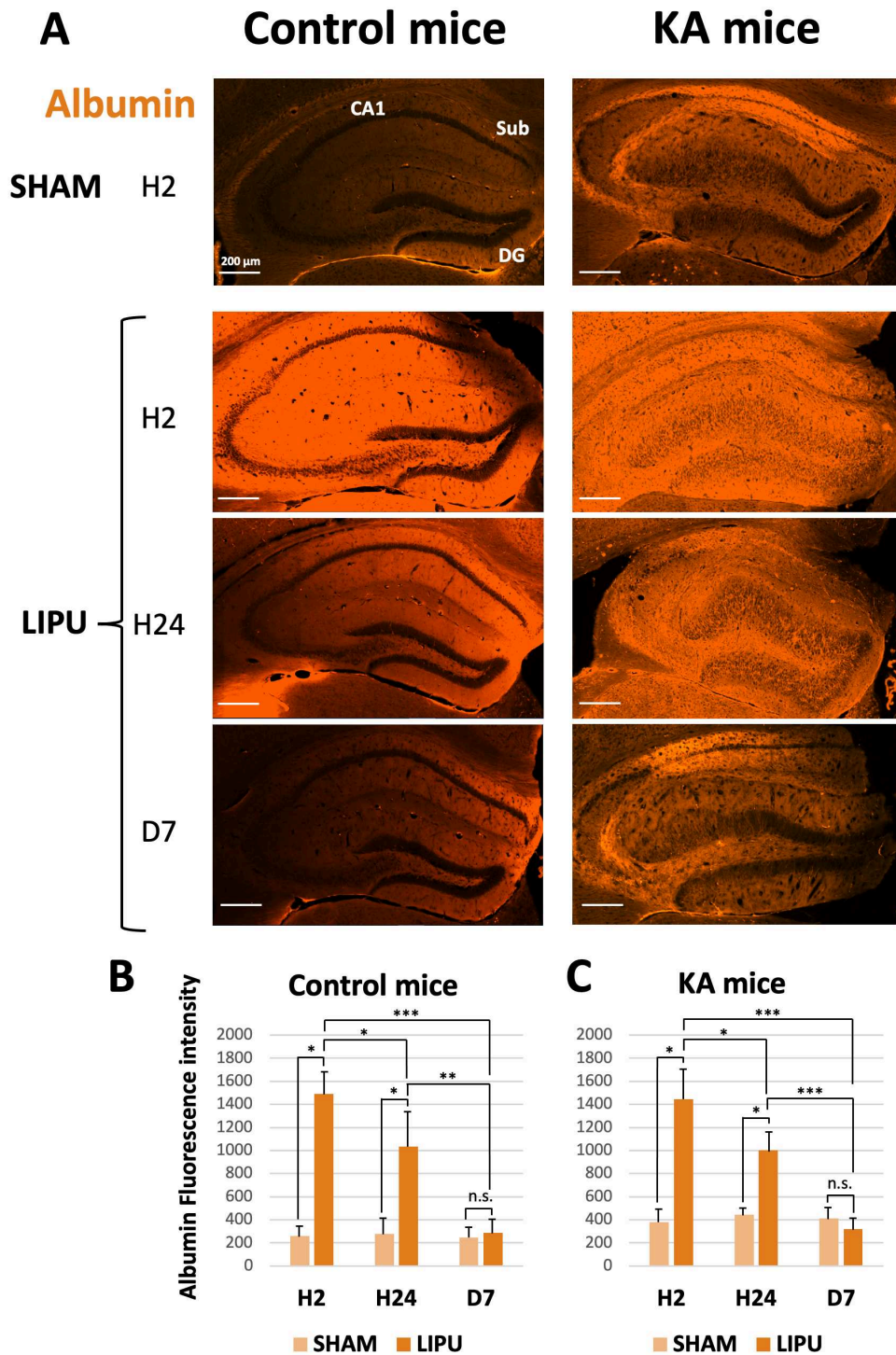


Fig. 2. LIPU-induced BBB permeability results in transient albumin extravasation both in control and KA-mice.

Albumin immunocytochemistry in the hippocampus of control and KA-mice (**A**). Albumin could not be detected in the hippocampus in control mice that received a sham sonication (**B**), while it was present in the hippocampus in KA-mice that received a sham sonication (**C**). In both control (**B**) and KA-mice (**C**), albumin extravasation was strong throughout the hippocampus until 24 hours after LIPU-induced BBB opening.

All data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

BBB, blood-brain barrier; CA1, cornu ammonis 1; DG, dentate gyrus; KA, kainate; LIPU, low-intensity pulsed ultrasound; Sub, subiculum.

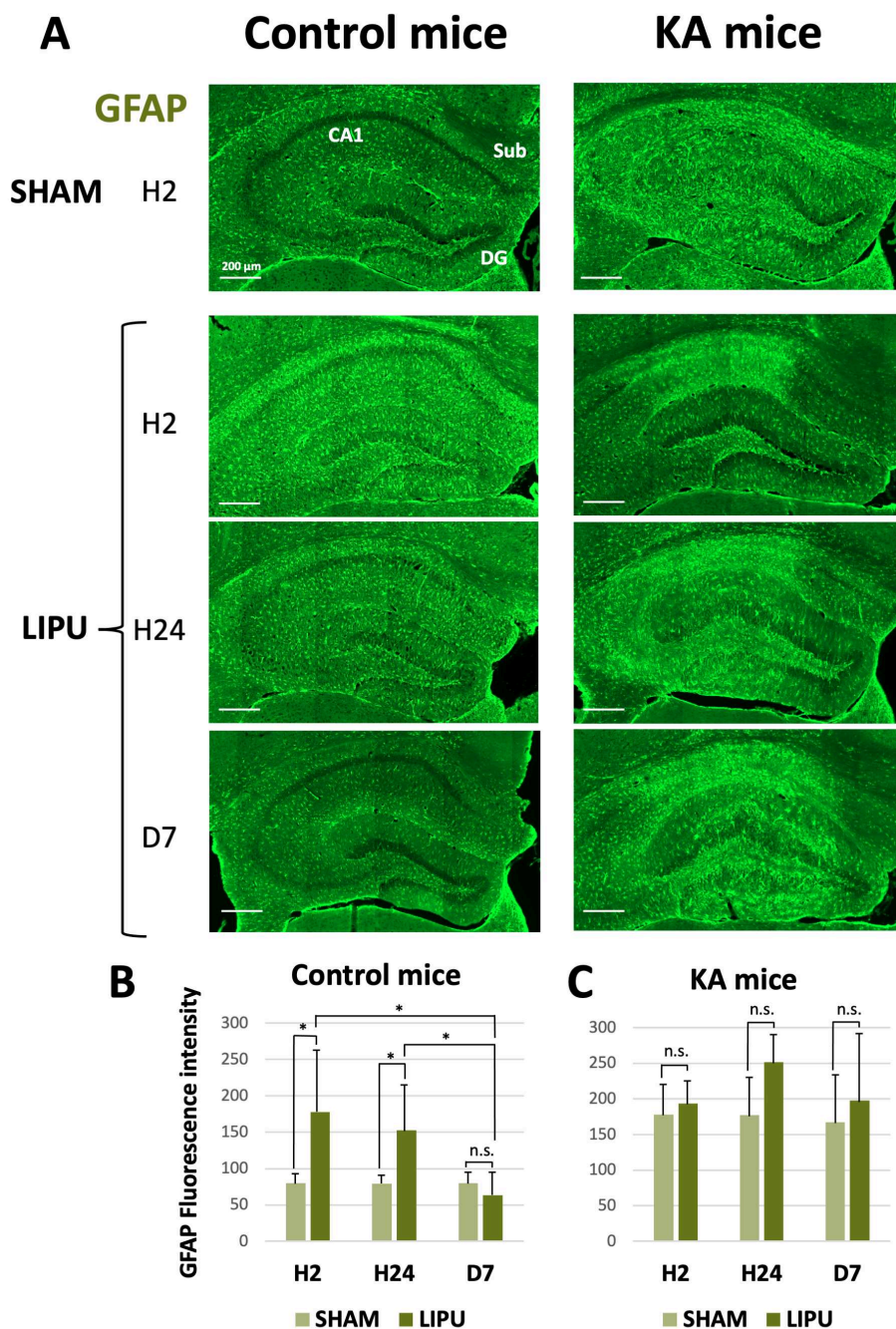


Fig. 3. LIPU-induced BBB opening led to reversible mild astrocyte activation in the hippocampus of control mice.

GFAP immunostaining in the hippocampus of control and KA-mice (A). In control mice, GFAP staining revealed significantly increased GFAP expression in astrocytes at 2 and 24 h postsonication in sonicated hippocampus compared with the sham hippocampus (B). In the KA group, GFAP staining revealed no significant difference between sonicated and sham mice (C).

All data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test. * $P < 0.05$. BBB, blood-brain barrier; CA1, cornu ammonis 1; DG, dentate gyrus; GFAP, glial fibrillary acidic protein; KA, kainate; LIPU, low-intensity pulsed ultrasound; Sub, subiculum.

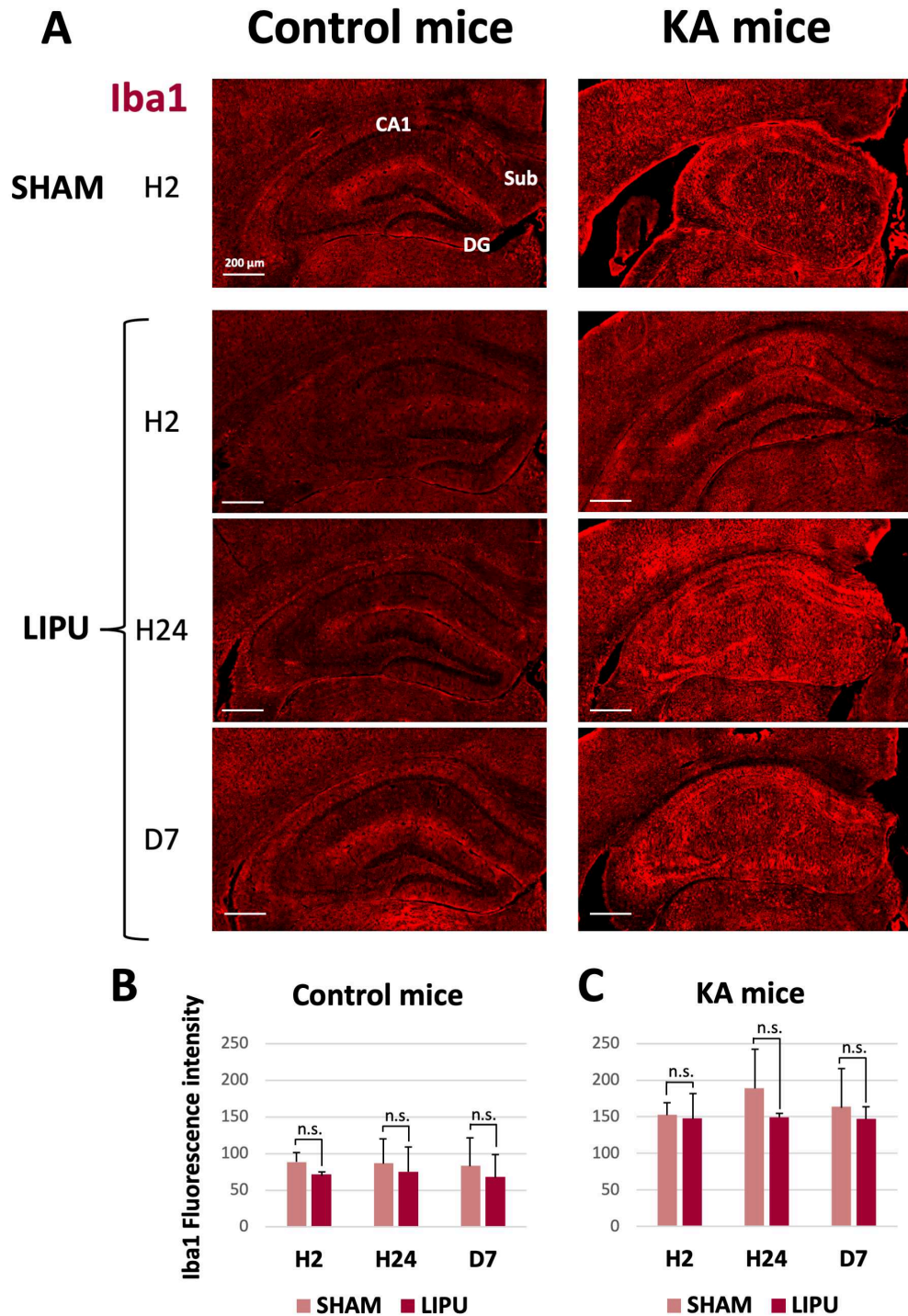


Fig. 4. LIPU-induced BBB opening did not imply significant microglial activation in the hippocampus.

Iba1 immunostaining in the hippocampus of control and KA-mice (**A**). There was no significant statistical difference in Iba1 levels between sonicated and sham mice, either in the control group (**B**) or in the KA group (**C**).

All data are represented as mean \pm SEM; statistical analyses: Mann-Whitney test.

BBB, blood-brain barrier; *CA1*, cornu ammonis 1; *DG*, dentate gyrus; *Iba1*, ionized calcium-binding adapter molecule 1; *KA*, kainate; *LIPU*, low-intensity pulsed ultrasound; *Sub*, subiculum.

Repeated LIPU-mediated transient BBB opening does not induce epileptogenicity

Given the well-known association between BBB leakage and epilepsy, we investigated whether repeated LIPU-mediated transient BBB opening could promote epileptogenicity in nonepileptic mice. Nine wild-type mice implanted with depth EEG electrodes underwent a LIPU treatment to open the BBB once per week for 3 consecutive weeks. For 96 hours after each sonication and 7 days after the third sonication, mice were recorded and monitored on the video-EEG platform (Fig. 5 A-D). Baseline EEG recordings confirmed that none of the mice had epileptic abnormalities before the sonication protocol (Fig. 5 E and G). During post-sonication recordings and delayed recordings, none of the mice experienced symptomatic focal or generalized seizure (Fig. 5I). Moreover, these long-time recordings did not show neither epileptiform discharges nor other epileptic abnormalities (Fig. 5 F and H). Mice were then monitored twice a week for 4 months after the last sonication and did not experience any systemic or behavioral adverse event.

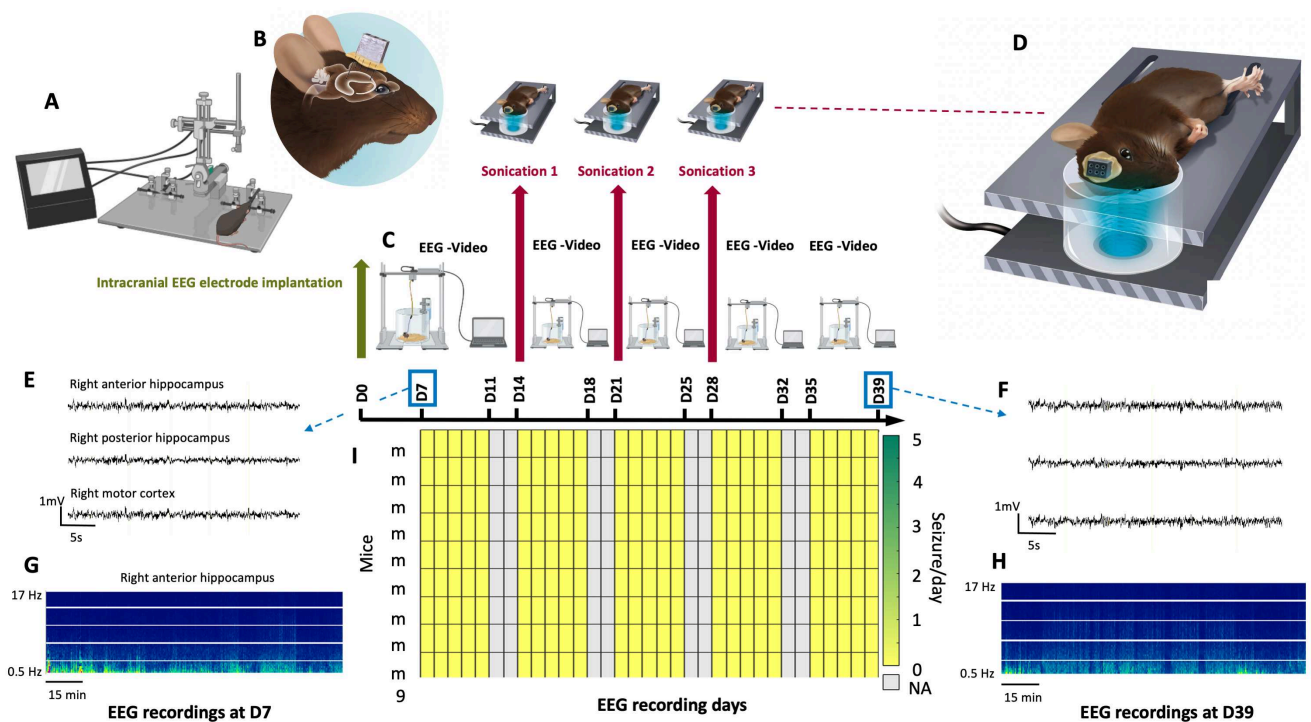


Fig. 5. Repeated sonications for BBB opening did not induce epileptic figures on intracranial EEG in nonepileptic mice.

We performed 3 sonications in 9 wild-type mice implanted with depth electrodes for video-EEG recordings to assess the potential epileptogenicity of LIPU-induced BBB opening. First, mice were placed in a stereotaxic frame under general anesthesia and implanted with depth stainless-steel electrodes (A). The wires of the electrodes were soldered to a connector. Electrodes and connector were fixed on the mouse skull with cyanoacrylate and dental acrylic cement (B). EEG activity from the cortex and hippocampus and mouse behavior were recorded from mice moving freely in individual plexiglass cages. Mice were habituated to the test cage for 30 minutes and then recorded on a computer-based digital acquisition system for 96 hours. EEG-video recordings were obtained before sonications (baseline recordings starting 7 days after electrode implantation), then after each sonication and 7 days after the last sonication

(C). A weekly 120-second sonication for BBB-opening were performed three consecutive weeks in implanted mice under general anesthesia immediately after retro-orbital injection of 100- μ L of microbubbles (D). Extracts of EEG of ipsilateral hippocampus (anterior and posterior hippocampal electrodes) and ipsilateral motor cortex from mouse showing no epileptic figures neither during the baseline recordings at D7 (E) nor after the successive sonications at D39 (F). Time frequency analyses representing 2 hours of EEG recordings display no epileptic abnormality (G and H). The heatmap displaying the number of seizure/day/mouse shows no recorded seizure before, during and after the sonication protocol (I).
BBB, blood-brain barrier; LIPU, low-intensity pulsed ultrasound.
Figure created with BioRender.com.

DISCUSSION

Transient US-induced BBB disruption is a promising strategy to treat several diseases in the brain. Here we report for the first time that: (i) repeated opening of the BBB with LIPU do not induce evidence of epileptogenicity in nonepileptic mice; (ii) LIPU reproducibly open the BBB in the KA model for MTLE in mice; and (iii) transient opening of the BBB with LIPU do not aggravate inflammatory processes and histologic changes that characterize the hippocampal sclerosis in KA mice.

Albumin amount was elevated in the hippocampus of KA model, as compared to control mice, confirming that BBB is physiologically and chronically disrupted in this mice model of MTLE. Changes in BBB permeability can be caused by an increase in focal blood pressure that occurs during seizures,(258) free radical production,(259) loss of tight junction molecules(153) and inflammatory mechanisms.(260,261) In addition, our data also highlight that inflammatory processes and histological changes, described during epileptogenesis,(82,262,263) are still active at the chronic epileptic phase. We observed an intense reactive astrogliosis, a process whereby astroglial cells undergo hypertrophy (increase of size and protein expression) and proliferation,(264) in the sclerotic hippocampus confirming previous studies in the same MTLE model.(82,265,266) Such an astroglial cell activation could contribute to neural network hyperexcitability leading to seizure recurrence and epilepsy development in the hippocampus.(82,267) Our experiments also revealed a high microglial activation in the injected hippocampus of KA mice, as previously documented in the same MTLE model,(82) as well as in MTLE patients.(268) Highly activated microglial cells are detected during the early epileptogenesis and persist at the chronic epileptic phase, suggesting a significant role in the progression of epilepsy.(82,262)

Our results show dynamic changes of BBB permeability following sonication. Half an hour after LIPU-mediated BBB opening, Evans Blue dye was macroscopically detected in

control mouse brain and limited to the sonicated parenchyma, while the nonsonicated hemisphere was not colored. To further study longer effect on BBB permeability, we studied albumin extravasation, which has a much higher molecular weight than Evans blue (66 kDa vs. 1 kDa). BBB opening appears more intense within the very first hours after sonication and decreases gradually over time so that it recovers its full integrity at one week. In addition, our study shows mild reactive astroglial activation following ultrasound-induced BBB opening 2 hours after sonication that is reversible in 7 days. Previous reports have similarly reported a reactive astrogliosis as soon as 1 hour after BBB opening.(269,270) Kovacs et al reported increased astroglial cell activation 6 hours after sonication, but not at 1 hour.(192) The main discrepancy between our results and theirs is the absence of activated microglia in sonicated mice compared to control mice.(192,269,270) This may be explained by two major differences in experimental protocols. First, these studies investigated histological changes following BBB opening into the neocortex, not into the hippocampus. We hypothesize that inflammatory response induced by BBB disruption could be variable according to the specific brain areas targeted by the ultrasound beam (e.g., archicortex). Second, contrary to previous studies, we used LIPU instead of focused ultrasound for BBB opening. Previous reports have shown that the sonication and protocol parameters with application of a high peak negative pressure, as well as the microbubble dose, can deeply modify the inflammatory response and the degree of histological changes.(270,271) Unlike LIPU, the effects of focused ultrasound on microbubbles causes cavitation forces leading to acoustic pressure waves into the cortex that activate astrocytes, microglial cells and neurons beyond the vessels.(272) In addition, some authors argue that the “shockwaves” provoked by the acoustic cavitation result in mRNA and proteomic alterations in the sonicated parenchyma.(192) On the other hand, due to the intense astrogliosis and microglial activation existing in the ipsilateral hippocampus in the KA mice, no significant histological changes were observed following BBB opening with LIPU at an acoustic pressure of 0.3 MPa. Further studies are needed to investigate if BBB opening with focused ultrasound at higher peak negative pressures would lead to a histological inflammatory response in the sclerotic hippocampus of MTLE models.

Previous studies suggested that a chronic compromised BBB contributes to seizure development and progression of epilepsy, through the accumulation into the brain of serum proteins which may lead to increased excitability, and identify BBB pathology as an underlying mechanism of epileptogenesis.(157,159) Given the role of BBB dysfunction in epileptogenesis, therapeutics that can modify BBB permeability are candidates for strategies in order to stem the development of epilepsy.(157,246) Our results show that coupling LIPU with intravenous injection of microbubbles induces reversible and transient BBB opening in mice with MTLE. This innovative strategy is used for years in preclinical and clinical studies to enhance the delivery of various drugs to specific brain areas and facilitate immune modulation in diverse

neurological diseases such as central nervous system tumors,(273) Alzheimer disease(251) and amyotrophic lateral sclerosis.(274) Although results from published clinical trials did not highlight epileptic events related to LIPU-induced BBB opening, the exact consequences of this approach in terms of potential epileptogenicity have been not reported yet. In a preclinical study on 3 primates undergoing 7 sonications for BBB disruption, no epileptic sign was observed on surface EEG.(173) To our knowledge, our study is the first to use intracranial EEG recordings with depth electrodes to address this critical question. Our experiments from wild type mice demonstrate that BBB opening with LIPU lead to mild and reversible hippocampal astrogliosis without clinical or electrophysiological epileptic manifestations and can be thus safely perform in preclinical rodent models.

In addition to open the BBB, another potential consequence for LIPU is the modulation of neural network activity.(275) Little is known about the mechanism underlying ultrasound-mediated neuromodulation. One hypothesis is that sonication could significantly affect the electrophysiology of neural networks with alteration of membrane potential or change in membrane fluidity, turbidity and permeability.(276,277) Supposedly, sonication affects ion-channels and receptors on the cell membrane which disturbs the transmembrane concentrations by modifying the passage of ions or neurotransmitters. It has been reported that sonication activates voltage-gated Na^+ and Ca^{2+} channels as well as ultrasound mechanical force could also activate mechano-sensitive ion channels allowing cation entry leading to modification of membrane potential.(278,279) Considering that epilepsy is a disease with disturbed neural networks, this technique could potentially block those pathological pathways and inhibit epileptic bursts. Indeed, Hakimova et al showed that ultrasound stimulation could efficiently inhibit acute seizure activity and either delay the onset or suppress status epilepticus in KA mice.(197) They also pointed out that the mice that received repeated ultrasound pulses containing 200 acoustic sine waves at 0.2 MHz underwent fewer spontaneous recurrent seizures during the chronic epileptic phase suggesting that LIPU sonication has antiepileptic effects through membrane saturation mechanism leading to refractory period. These findings were confirmed in a recent study showing that ultrasound pulsation suppresses pentylenetetrazol induced epilepsy in rats.(280) Although BBB opening and neuromodulation require distinct sonication parameters, our results and literature demonstrate that the combined effects of LIPU on BBB disruption and cortical stimulation appear clinically, histologically and electrophysiologically nontoxic in wild type mice. Further studies will explore if repetitive BBB opening can suppress epilepsy.

CONCLUSION

Taken together, our findings indicate that LIPU reproducibly open the BBB in the KA model for MTLE in mice. We confirm that LIPU-induced BBB disruption is transient and leads to albumin extravasation and reversible mild astrogliosis in the hippocampus of nonepileptic mice. In addition, our results demonstrate that repeated BBB opening using LIPU do not induce epileptogenicity in nonepileptic mice implanted with depth electrodes. In KA mice, the transient albumin extravasation into the hippocampus mediated by BBB opening do not lead to significant histological changes because of the preexisting histological and neuroinflammatory features of the hippocampal sclerosis.

In conclusion, our experiments in mice provide convincing evidence of safety of LIPU-induced BBB opening as a therapeutic modality of neurological diseases including epilepsy. Further preclinical studies should assess the potential antiepileptic effect of BBB opening using LIPU in epileptic animal models.

Conclusion et Synthèse de la Partie 1

Nous avons confirmé dans cette étude que l'ouverture de la BHE induite par les ultrasons pulsés de basse intensité était transitoire et conduisait à une extravasation d'albumine et à une astrogliose légère réversible dans l'hippocampe de souris non épileptiques. Nous avons également montré que l'ouverture ultrasonore répétée de la BHE n'induit pas d'épileptogénicité à court terme (1 mois) chez des souris non épileptiques implantées avec des électrodes EEG de profondeur.

Nos résultats indiquent que les ultrasons pulsés de basse intensité ouvrent de manière reproductible la BHE chez la souris Kaïnate. Chez les souris Kaïnate, l'extravasation transitoire d'albumine dans l'hippocampe médiée par l'ouverture de la BHE n'entraîne pas de changements histologiques significatifs en raison des caractéristiques histologiques et neuroinflammatoires préexistantes de la sclérose hippocampique.

En conclusion, nos expérimentations chez les souris wild-type et chez les souris Kaïnate fournissent des preuves convaincantes de l'innocuité de l'ouverture de la BHE induite par les ultrasons pulsés de basse intensité.

Partie 2. Effets antiépileptiques de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité, seule et couplée aux Nanoparticules de Sélénium

Rappel des Objectifs de la Partie 2 :

- *Évaluer la sécurité et la tolérance de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris wild-type.*
- *Évaluer l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate, en comparaison avec l'ouverture de la BHE seule et l'administration de Nanoparticules seules.*
- *Évaluer les éventuelles modifications de la neurogenèse hippocampique induites par l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée ou non à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate.*
- *Évaluer les éventuelles modifications histologiques à long terme induites par l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée ou non à l'administration IV de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate.*

Après avoir démontré, dans la partie précédente, la faisabilité et la reproductibilité de l'ouverture de la BHE chez des souris saines et épileptiques, ainsi que la sécurité de la procédure tant d'un point de vue histologique qu'électrophysiologique et clinique, nous avons évalué le potentiel effet thérapeutique comme traitement de l'épilepsie des ouvertures de BHE isolées et couplées aux Nanoparticules de Sélénium.

1. Détection et dosage du Sélénium intracérébral après ouverture de la BHE et administration de Nanoparticules de Sélénium

1.1. Objectif

L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer si l'association de l'ouverture de la BHE associée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium permettait i) l'augmentation du dosage de Sélénium intracérébral et ii) l'augmentation de la rémanence du Sélénium intracérébral.

1.2. Schéma expérimental

Les ouvertures de la BHE ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment. Trente-six souris C57BL6/J mâles âgées de 8 semaines ont été réparties en plusieurs groupes de traitement (**Tableau 1**):

- Contrôle (SHAM),
- Sélénium IV (Se, Sélénium, Sélénite de sodium, AGUETTANT, 100ul à 150ug/ml),
- Nanoparticules de Sélénium IV (NpSe, 100ul à 150ug/ml),
- Ouverture de la BHE + Sélénium IV (US + Se 100ul à 150ug/ml),
- Ouverture de la BHE + Nanoparticules de Sélénium IV (US + NPSe, 100ul à 150ug/ml).

Le sacrifice des animaux a été réalisé soit à J0 (30 minutes après le traitement), soit à J7 du traitement. Les cerveaux ont été extraits et dissouts à l'état frais, puis dilués 100 fois. Les dosages de Sélénium intracérébral ont été réalisés, sur la solution obtenue, par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) à l'Institut de physique du Globe de Paris (Mickaël Tharaud, IPGP, CNRS, Université Paris Cité).

Groupes	SHAM	Se	NpSe	Se + US	NpSe + US
J0	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
J7		n=4	n=4	n=4	n=4

Tableau 1. Effectifs de souris selon groupe de traitement.

1.3. Résultats

Les concentrations de Sélénium intracérébral différaient significativement entre les groupes à J0 et à J7 (**Figure 16**, tests de Kruskal-Wallis, $P = 0,013$ et $P = 0,038$, respectivement). A J0, ces concentrations étaient significativement plus faibles dans le groupe SHAM que dans tous les autres groupes (**Tableau 2**). La concentration de Sélénium dans le cerveau des souris NP Se + US était plus élevée que celle des groupes Se et Se + US, mais sans atteindre le seuil de significativité (tests de Mann-Whitney-Wilcoxon, $P = 0,11$). A J7, ces concentrations étaient significativement plus élevées dans le groupe NP Se + US que dans tous les autres groupes (**Tableau 3**). Pour chaque groupe, la concentration de Sélénium diminuait significativement entre J0 et J7 (**Figure 16**, tests de Mann-Whitney-Wilcoxon, $P = 0,029$).

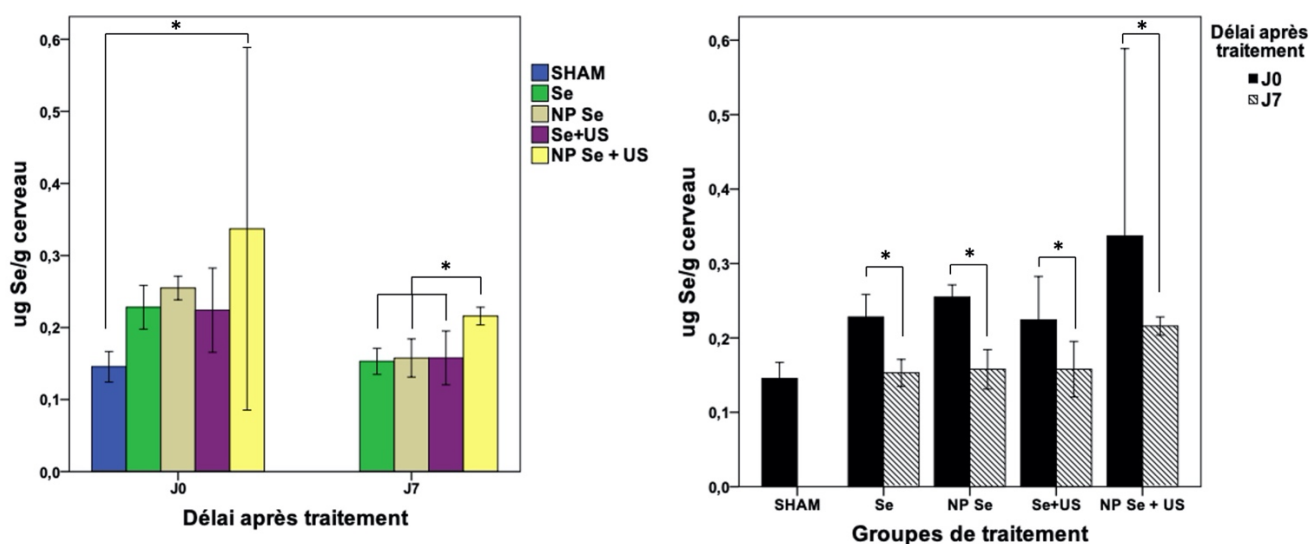


Figure 16. Concentrations du Sélénium intracérébral (en ug par g de cerveau) par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif entre les différents groupes de souris à J0 et à J7 du traitement. Le détail des valeurs de *P* est fourni dans les tableaux ci-après.

J0	SHAM	Se	NP Se	Se + US	NpSe + US
SHAM		0,029	0,029	0,029	0,029
Se	0,029		0,114	0,686	0,114
NP Se	0,029	0,114		0,343	1
Se + US	0,029	0,686	0,343		0,114
NP Se + US	0,029	0,114	1	0,114	

Tableau 2. Table des valeurs de *P* obtenues en comparant deux à deux les concentrations de Sélénium intracérébral entre les différents groupes à J0 du traitement (tests de Mann-Withney-Wilcoxon).

J7	SHAM	Se	NP Se	Se + US	NpSe + US
SHAM J0		0,486	0,343	0,486	0,029
Se	0,486		1	1	0,029
NP Se	0,343	1		0,886	0,029
Se + US	0,486	1	0,886		0,029
NP Se + US	0,029	0,029	0,029	0,029	

Tableau 3. Table des valeurs de *P* obtenues en comparant deux à deux les concentrations de Sélénium intracérébral entre les différents groupes à J7 du traitement (tests de Mann-Withney-Wilcoxon).

1.4. Discussion et Conclusion

Cette expérimentation montre que l'injection intraveineuse de Sélénium ou de nanoparticules de Sélénium avec ou sans ouverture ultrasonore de la BHE permet

d'augmenter la concentration de Sélénium dosée dans le cerveau 30 minutes après l'injection. A 7 jours du traitement, la concentration de Sélénium dans le cerveau était plus élevée chez les souris qui ont reçu l'injection intraveineuse de nanoparticules de sélénium associée à l'ouverture ultrasonore de la BHE. Cela suggère que les nanoparticules de Sélénium sont moins dégradées que le Sélénium seul, probablement grâce à leur surfactant pegylé, et permettent d'obtenir une concentration de Sélénium persistante dans le cerveau. Également, l'ouverture de la BHE permet un passage intracérébral prolongé des nanoparticules de Sélénium jusqu'à 24h après la sonication, ce qui explique probablement la concentration plus élevée dans le groupe NpSe + US que dans le groupe NP Se à J7 post-sonication. Un dosage de la concentration de Sélénium à H24 après la sonication aurait pu théoriquement montrer une concentration encore plus élevée dans le groupe NpSe + US.

Au total, l'administration intraveineuse de nanoparticules de Sélénium couplée à l'ouverture ultrasonore de la BHE, s'est révélée être la technique la plus efficace pour obtenir une concentration élevée et persistante de sélénium dans le cerveau. Cette technique a donc été utilisée comme technique de référence dans les expérimentations suivantes.

2. Évaluation de la tolérance et de la sécurité de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium

2.1. Objectif

L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer la sécurité et la tolérance de l'administration intraveineuse de NpSe couplée à l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés chez des souris présentant une épilepsie mésiotemporale.

2.2. Schéma expérimental

Douze souris C57BL6/J mâles âgées de 8 semaines ont été rendues épileptiques par injection intrahippocampique de Kaïnate. Quatre semaines plus tard, elles étaient pesées puis séparées en deux groupes : US + NpSe (n = 6) et SHAM (n = 6). Les souris du groupe US + NpSe recevaient 3 séances de traitement avec administration intraveineuse de NpSe (100ul à 150ug/ml) associée à l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés. Les séances de traitement étaient séparées de 7 jours (J0, J7, J14). Les souris du groupe SHAM étaient soumises à l'anesthésie générale mais ne recevaient aucun traitement.

Pour évaluer la sécurité et la tolérance de ce protocole, les critères de jugement suivants étaient relevés trois fois par semaine à partir de la première séance de traitement et pendant un mois après la dernière séance de traitement :

- Survie de l'animal,
- Poids de l'animal,
- Aspect général, comportement de l'animal.

Ces critères qualitatifs et quantitatifs étaient comparés entre les deux groupes.

2.3. Résultats

La mortalité a été nulle (test de Fischer, $P = 1,0$) et l'état général était conservé chez toutes les souris des deux groupes pendant la période de suivi. Sur cette période, les courbes de poids ne différaient pas significativement (tests de Kolmogorov-Smirnov, $P = 0,89$) entre les groupes US + Np Se et SHAM (**Figure 17**).

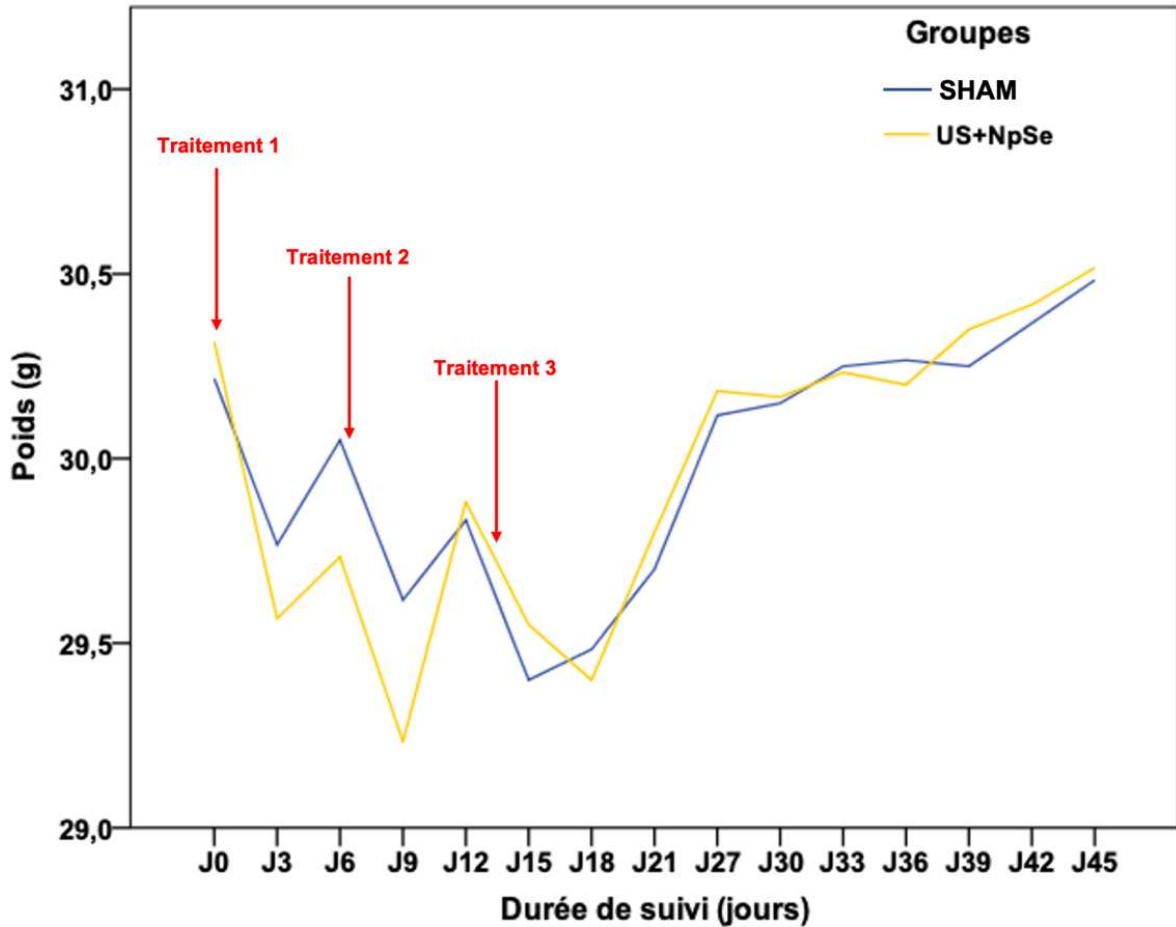


Figure 17. Évolution de la moyenne des poids des souris au cours du temps dans les deux groupes de traitement (SHAM, n = 6 et US + NPSe, n = 6).

2.4. Discussion et Conclusion

La tolérance et la sécurité de l'administration intraveineuse de NpSe couplée à l'ouverture ultrasonore de la BHE n'avait jamais été évaluée chez le rongeur. Les seuls travaux ayant précédés notre expérimentation, permettant de définir la dose maximale de NpSe pouvant être administrée, étaient ceux de Yuan et al.(239) et ceux de Dkhil et al.(281) dans lesquels des rats recevaient oralement des NpSe à la dose de 0,1 à 0,5mg/kg quotidiennement pendant des périodes allant de 10 à 28 jours, avec une bonne tolérance.

Nos résultats ont démontré que les traitements répétés par NPSe et ouverture de la BHE n'impactaient pas défavorablement la survie des animaux épileptiques ni leur état général et comportement.

3. Évaluation de l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium

3.1. Objectif

L'objectif de ces expérimentations était d'évaluer l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de nanoparticules de sélénium.

Le critère de jugement principal était la variation du nombre de crises d'épilepsie généralisées entre l'enregistrement EEG-vidéo prétraitement (baseline) et l'enregistrement EEG-vidéo à distance du traitement.

Les critères de jugement secondaires étaient i) la variation de la durée des crises d'épilepsie entre l'enregistrement EEG-vidéo prétraitement (baseline) et l'enregistrement EEG-vidéo à distance du traitement, ii) la variation du score clinique de Racine entre l'enregistrement EEG-vidéo prétraitement (baseline) et l'enregistrement EEG-vidéo à distance du traitement, et iii) la variation du nombre de crises d'épilepsie généralisées entre l'enregistrement EEG-vidéo prétraitement (baseline) et les enregistrements EEG-vidéo suivants les 3 séances de traitement.

3.2. Schéma expérimental

Nous avons injecté en Kaïnate des souris mâles C57BL6/J âgées de 8 semaines, et implanté dans le même temps des électrodes intracérébrales avec le schéma d'implantation précédemment décrit (paragraphe Méthodes 2.3 Implantation d'électrodes intracérébrales et enregistrement vidéo-électroencéphalographique). Quatre semaines plus tard (période d'épileptogénèse), un enregistrement vidéo-EEG a été réalisé sur 8 jours comme référence (EEG-vidéo prétraitement ou « baseline »).

Seules les souris qui ont présenté au moins 1 crise généralisée sur l'enregistrement EEG-vidéo prétraitement (baseline) ont été randomisées dans un des 4 groupes de traitement suivants :

- **Contrôle (SHAM)** : anesthésie générale + microbulles IV sans ultrasons,
- **Ouverture de la BHE (US)** : anesthésie générale + microbulles IV + ultrasons,
- **Nanoparticules de Sélénium IV (NpSe)** : anesthésie générale + NPSe (100ul à 150ug/ml),
- **Ouverture de la BHE + Nanoparticules de Sélénium IV (US + NPSe)** : anesthésie générale + microbulles IV + ultrasons + NPSe (100ul à 150ug/ml).

Par la suite, 3 séances de traitement ont été réalisées à une semaine d'intervalle et un enregistrement vidéo EEG de 4 jours a été réalisé immédiatement après chacune des séances. Un dernier enregistrement vidéo-EEG de 4 jours a été débuté 7 jours après la 3^{ème} et dernière séance de traitement (**Figure 18**).

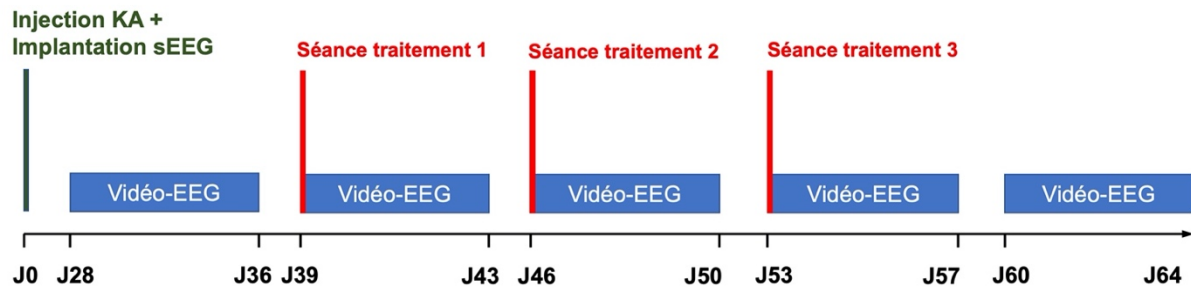


Figure 18 : Schéma expérimental.

Nous avons décidé de comptabiliser uniquement les crises généralisées car nous avons remarqué que les variabilités interobservateur et intraobservateur étaient élevées pour la détection des crises partielles et des décharges hippocampiques isolées. En effet, les variabilités interobservateur et intraobservateur pour détecter les crises généralisées étaient nulles, ce qui nous a amené à choisir ce critère de jugement très robuste. La fréquence des crises généralisées a été rapportée aux nombres d'heures d'enregistrement en vidéo-EEG et exprimée en nombre de crises généralisées par semaine. Nous avons également recueilli la durée des crises ainsi que la sévérité clinique de la crise à l'aide du score de Racine (paragraphe Méthodes 2.3 Implantation d'électrodes intracérébrales et enregistrement vidéo-électroencéphalographique).

L'analyse a été effectuée en intention de traiter et en aveugle du groupe de traitement de l'animal. Les souris qui sont décédées avant la fin de l'enregistrement vidéo-EEG suivant la première séance de traitement ont été exclues de l'analyse. Si, par exemple, une souris décédait pendant l'enregistrement vidéo-EEG suivant la 3^{ème} séance de traitement, la souris était incluse dans l'analyse et les données des enregistrements suivants les deux premières séances de traitement étaient analysées.

Nous avons utilisé Prism (Version 8.0.1, GraphPad Software Inc) et IBM SPSS Statistics (Version 23.0, IBM) pour effectuer les analyses statistiques suivantes : test de rang signé des paires appariées de Wilcoxon ou de Friedman (tests appariés, non paramétriques, bilatéraux, intervalle de confiance de 95 %), test de Mann Whitney (Test non apparié, non paramétrique, comparant les rangs, bilatéral, intervalle de confiance de 95 %), et ANOVA

unidirectionnelle à mesures répétées (ne présumant pas la sphéricité, en utilisant la correction de Geisser-Greenhouse). La signification statistique de l'analyse de tendance pour les alternatives ordonnées a été évaluée à l'aide du test de Jonckheere-Terpstra effectué à l'aide de la fonction Matlab de Cardillo G. (2008).

3.3. Résultats

Quatre-cent trente-trois (433) crises généralisées ont été enregistrées au cours des différents vidéo-EEG chez 27 souris. Le nombre de souris incluses dans chaque groupe de traitement était :

- SHAM : n=5
- US : n=10
- NpSe : n=6
- US + NPSe : n=6.

3.3.1. Fréquence des crises d'épilepsie généralisées

Concernant les souris du **groupe SHAM**, il n'y avait pas variation significative de la fréquence des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 19**, test de Friedman, $P = 0,83$).

Concernant les souris du **groupe US**, il n'y avait pas variation significative de la fréquence des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 19**, test de Friedman, $P = 0,60$).

Concernant les souris du **groupe NpSe**, il y avait une variation significative de la fréquence des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 19**, test de Friedman, $P = 0,02$). Il y avait une diminution significative de la fréquence des crises de 56% entre l'enregistrement pré-traitement (baseline) et l'enregistrement à distance (test de Wilcoxon, $P = 0,04$). Nous avons observé une réduction significative de la fréquence des crises à partir de la 2^{ème} séance de traitement (test de Wilcoxon, $P = 0,03$).

Concernant les souris du **groupe US + NpSe**, il y avait une variation significative de la fréquence des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 19**, test de Friedman, $P = 0,001$). Il y avait une diminution significative de la fréquence des crises de 90% entre l'enregistrement pré-traitement (baseline) et l'enregistrement à distance (test de Wilcoxon, $P = 0,03$). Nous avons observé une réduction significative de la fréquence des crises à partir de la 1^{ère} séance de traitement (test de Wilcoxon, $P = 0,03$). Un exemple d'enregistrement vidéo-EEG montrant l'évolution post-traitement des crises chez une souris du groupe US + NpSe est présenté en **Figure 20**.

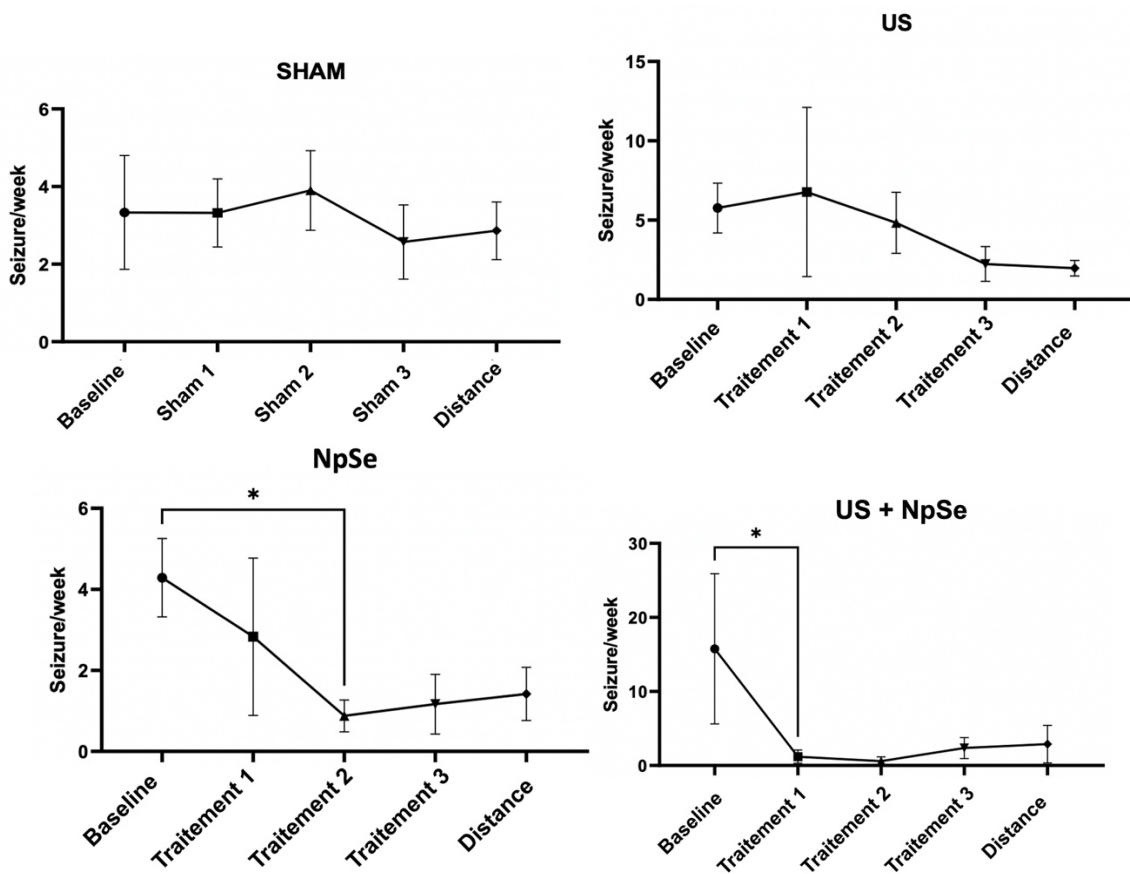
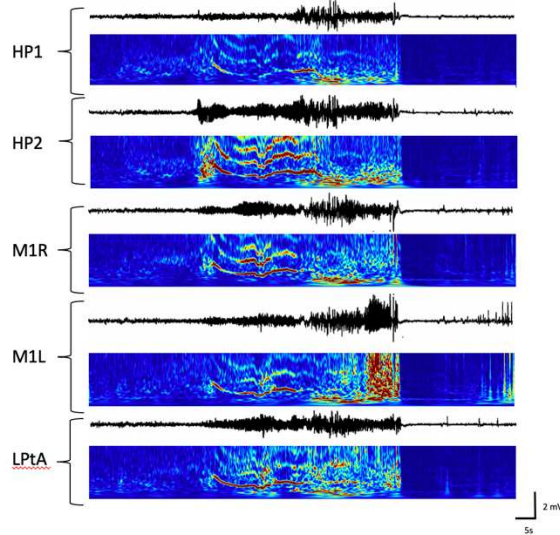


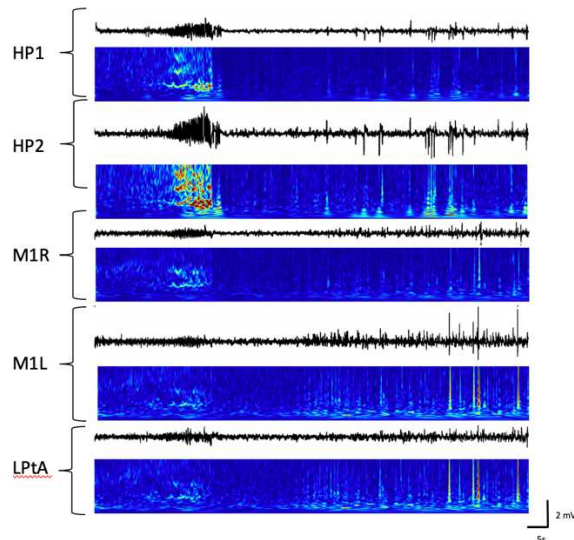
Figure 19 : Évolution du nombre de crises d'épilepsie généralisées par semaine et par groupe de traitement au cours du schéma expérimental. * $P < 0,05$.

Baseline



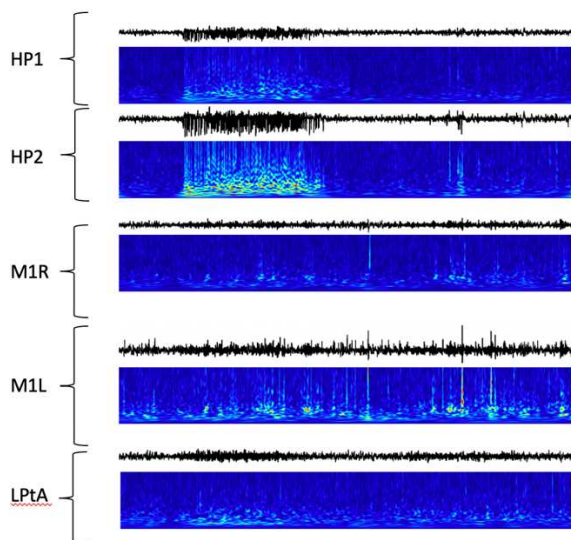
Crise généralisée visualisée sur les 5 électrodes.
Score de Racine 6.

Post-traitement 1



Crise focale limitée aux deux électrodes hippocampiques droites.
Score de Racine à 2.

Post-traitement 2



Décharge hippocampique droite sans crise.
Score de Racine à 0.

Figure 20 : Évolution après traitement du tracé EEG d'une souris kainate du groupe US+NpSe.

Les variations de la fréquence des crises d'épilepsie généralisées entre le vidéo-EEG pré-traitement (baseline) et le vidéo-EEG à distance des traitements étaient significativement différents entre les groupes de traitements (**Figure 21**, test de Kruskal-Wallis, $P = 0,02$). Il y avait une réduction de la fréquence des crises significativement plus importante dans le groupe US + NpSe par rapport au groupe SHAM (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $P = 0,004$), et des tendances non significatives par rapport aux groupes NpSe (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $P = 0,25$) et US (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, $P = 0,06$).

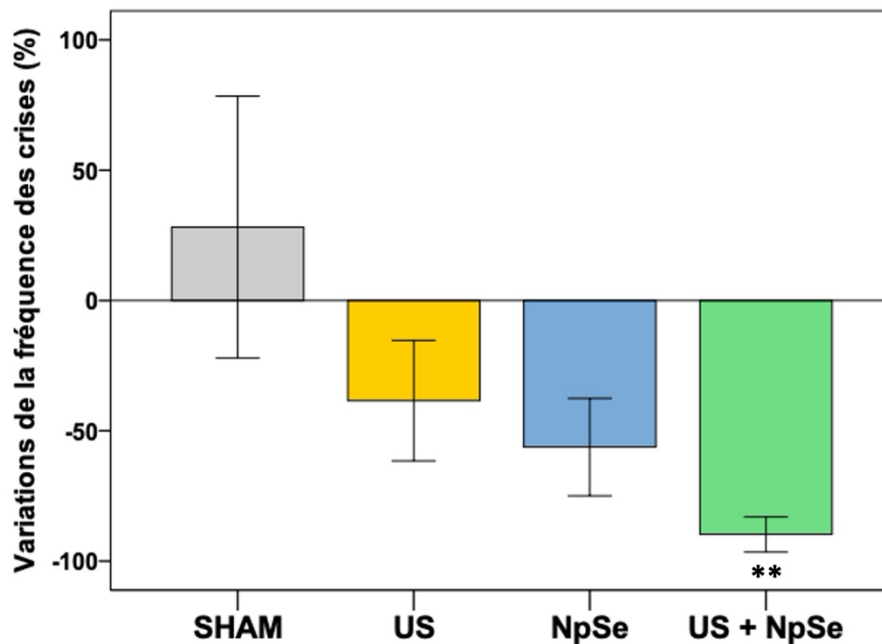


Figure 21 : Variation (en %) de la fréquence des crises d'épilepsie généralisées entre le vidéo-EEG pré-traitement (baseline) et le vidéo-EEG à distance des traitements. Différences par rapport aux souris SHAM. ** $0,001 < P < 0,01$

3.3.2. Durée des crises d'épilepsie généralisées

Concernant les souris du **groupe SHAM**, il n'y avait pas de variation significative de la durée des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 22**, test ANOVA, $P = 0,20$). Notamment, il n'y avait pas de différence significative entre la durée des crises lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (38 vs 33,1 secondes, t-test apparié, $P = 0,14$).

Concernant les souris du **groupe US**, il y avait une variation significative de la durée des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 22**, test ANOVA, $P < 0,001$). Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative entre la durée des crises lors de l'enregistrement vidéo-

EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (37,5 vs 42 secondes, t-test apparié, $P = 0,29$).

Concernant les souris du **groupe NpSe**, il n'y avait pas de variation significative de la durée des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 22**, test ANOVA, $P = 0,13$). Notamment, il n'y avait pas de différence significative entre la durée des crises lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (40,6 vs 42,8 secondes, t-test apparié, $P = 0,64$).

Concernant les souris du **groupe US + NpSe**, il n'y avait pas de variation significative de la durée des crises au cours de l'expérimentation (**Figure 22**, test ANOVA, $P = 0,17$). Notamment, il n'y avait pas de différence significative entre la durée des crises lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (35,1 vs 34,3 secondes, t-test apparié, $P = 0,60$).

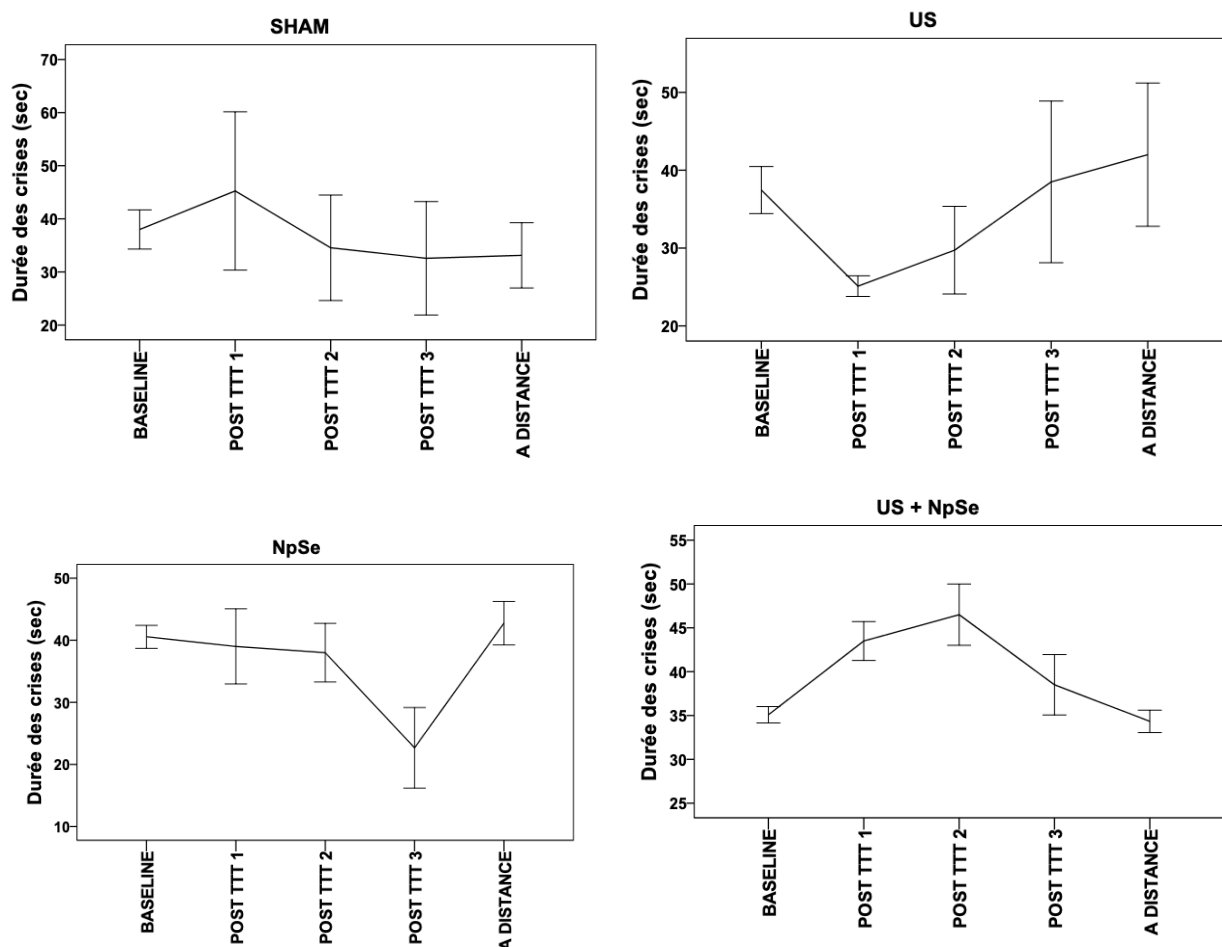


Figure 22 : Évolution de la durée des crises d'épilepsies généralisées (en secondes) au cours de l'expérimentation selon les groupes de traitement.

Au total, il n'y avait pas de différence significative entre les groupes de traitement concernant la variation de la durée des crises entre l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (test de Kruskal-Wallis, $P = 0,93$).

3.3.3. Score clinique de Racine

Concernant les souris du **groupe SHAM**, il y avait une variation significative du score de Racine moyen au cours de l'expérimentation (**Figure 23**, test ANOVA, $P = 0,03$). Notamment, il y avait une différence significative entre le score de Racine moyen lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (3,8 vs 4,9, t-test apparié, $P = 0,03$).

Concernant les souris du **groupe US**, il y avait une variation significative du score de Racine moyen au cours de l'expérimentation (**Figure 23**, test ANOVA, $P < 0,001$). Le score de Racine était significativement moins élevé après les 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} séances de traitement (t-test apparié, $P < 0,001$, $P = 0,005$ et $P = 0,049$, respectivement). Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre le score de Racine moyen lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (4,6 vs 4,1, t-test apparié, $P = 0,13$).

Concernant les souris du **groupe NpSe**, il y avait une variation significative du score de Racine moyen au cours de l'expérimentation (**Figure 23**, test ANOVA, $P = 0,04$). Le score de Racine était significativement moins élevé après les 2^{ème} et 3^{ème} séances de traitement (t-test apparié, $P < 0,001$ et $P = 0,02$ respectivement). Cependant, il n'y avait pas de différence significative entre le score de Racine moyen lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (3,9 vs 3,5, t-test apparié, $P = 0,26$).

Concernant les souris du **groupe US + NpSe**, il n'y avait pas de variation significative du score de Racine moyen au cours de l'expérimentation (**Figure 23**, test ANOVA, $P = 0,15$). Notamment, il n'y avait pas de différence significative entre le score de Racine moyen lors de l'enregistrement vidéo-EEG prétraitement (baseline) et l'enregistrement vidéo-EEG à distance (4,0 vs 4,2, t-test apparié, $P = 0,27$).

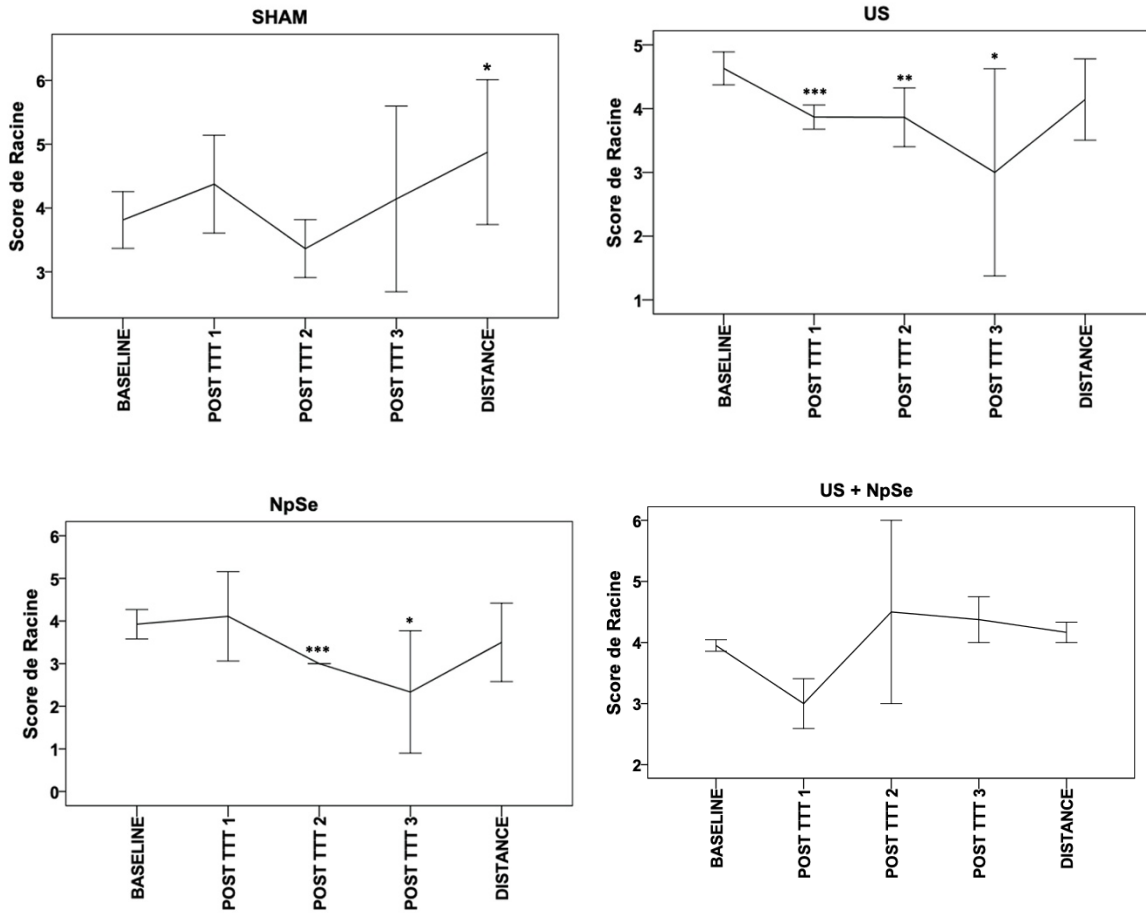


Figure 23 : Évolution de la sévérité des crises d'épilepsies généralisées, cotée à l'aide du score de Racine, au cours de l'expérimentation selon les groupes de traitement. Différences par rapport au score de Racine de l'enregistrement vidéo-EEG de baseline. * $0,01 < P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$; *** $P < 0,001$

3.4. Discussion et Conclusion

Cette expérimentation a d'abord montré que l'ouverture transitoire de la BHE sur la région hippocampique a tendance à diminuer les crises épileptiques généralisées chez la souris kainate, bien que cette tendance soit statistiquement non significative. Nos résultats indiquent également que les ouvertures successives de la BHE réduisent la sévérité clinique des crises, mais que cet effet ne persiste pas à distance des sonications.

Plusieurs conséquences de l'ouverture ultrasonore transitoire de la BHE peuvent être avancées pour expliquer ces résultats :

- **Modifications de la neurogenèse et des circuits neuronaux hippocampiques**

Comme certaines études l'ont montré sur des souris wild-type ou sur des souris transgéniques Alzheimer présentant une atrophie hippocampique, l'ouverture ultrasonore de

la BHE semble augmenter la neurogenèse hippocampique et modifier la structure de l'arborisation dendritique (89,175,178), contribuant à modifier les circuits neuronaux hippocampiques. Il s'agit donc d'une hypothèse pouvant expliquer l'effet antiépileptique observé. Cette hypothèse a fait l'objet d'expérimentations dédiées qui sont présentées et discutées au paragraphe suivant (4. Évaluation de l'effet sur la neurogenèse de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium).

- **Stimulation corticale / neuromodulation**

Un autre mécanisme thérapeutique potentiel des ultrasons de faible intensité est la modulation de la fonction neurologique sans endommager les tissus. En utilisant une sonication de faible intensité, l'énergie ultrasonore fonctionne de la même manière qu'un traitement par stimulation cérébrale profonde ou neurostimulation sans nécessiter une intervention chirurgicale d'implantation de dispositif (282–284). Il a déjà été démontré qu'un seul traitement ultrasonore pouvait bloquer la conduction nerveuse (285–287). Puisque l'épilepsie est une maladie avec un réseau neuronal anarchique, les ultrasons pourraient potentiellement bloquer ces voies pathologiques et inhiber les poussées épileptiques. Une étude a montré que la stimulation par ultrasons pulsés pouvait inhiber efficacement l'activité épileptique aiguë et retarder l'apparition ou supprimer l'état de mal épileptique sur un modèle de souris kainate (197). Les auteurs ont également souligné que les souris qui avaient reçu une stimulation par ultrasons présentaient moins de crises récurrentes spontanées suggérant que la stimulation par ultrasons a des effets antiépileptiques. Une autre étude a montré que les ultrasons de basse intensité peuvent inhiber les crises épileptiques temporales lors de leur survenue chez la souris kainate, et que cet effet est indépendant du type d'ultrasons utilisé (pulsés ou continus) (198,199). Cette suppression des décharges épileptiformes est retrouvée *in vitro* sur des tranches d'hippocampe de souris âgées de 8 jours traitées par ultrasons de basse intensité, et était principalement attribuée à l'activation mécanosensible des canaux Kv1.1 (200). Récemment, dans une étude conçue pour étudier la sélection des paramètres d'exposition aux ultrasons, les auteurs ont montré que des sonications à 75% de l'indice mécanique avec un temps d'exposition de 600 secondes pouvaient obtenir un effet efficace de suppression des *spikes* chez les rats PTZ (280).

On sait peu de choses sur le mécanisme sous-jacent à la neuromodulation médiée par les ultrasons. Une hypothèse est que la sonication régule les neurones GABAergiques inhibiteurs impliqués dans l'épilepsie, provoquant une réduction de l'activité épileptique (288). Une autre hypothèse est que la sonication pourrait affecter de manière significative la physiologie des circuits neuronaux locaux *in vitro* en altérant le potentiel membranaire et/ou en modifiant la fluidité et la perméabilité membranaire (276,277). Il a été rapporté que la sonication active les canaux Na⁺ et Ca²⁺ voltage-dépendants, et également que la force

mécanique des ultrasons pourrait activer les canaux ioniques mécano-sensibles permettant l'entrée de cations entraînant une modification du potentiel de membrane (278,279,289).

Enfin, le résultat principal de cette expérimentation est la réduction significative, importante (-90%) et prolongée de la fréquence des crises généralisées dès la première séance d'ouverture de la BHE couplée à l'administration intraveineuse de NpSe. Aucune expérimentation similaire, qui nous permettrait de comparer nos résultats, n'est décrite dans la littérature.

Néanmoins, deux études récentes ont déjà rapporté l'effet antiépileptique de l'administration de NpSe. En 2020, Yuan et al (239) ont administré oralement des NpSe (5mg/kg) à des souris qui venaient d'être rendues épileptiques par injection intrapéritonéale de PTZ. Il a été constaté que la supplémentation en NpSe retardait l'apparition et diminuait la durée des crises toniques, myocloniques et généralisées après l'injection de PTZ. De plus, les NpSe se sont avérées fournir une neuroprotection en empêchant le développement d'un stress oxydatif via la régulation à la hausse de Nrf2 et de HO-1, par l'inhibition de la réponse inflammatoire et de la cascade apoptotique. Également, les NpSe ont inversé les changements dans l'activité et dans les niveaux des neuromodulateurs induits par les crises d'épilepsie.

En 2022, Al Omairi et al (290) ont investigué chez des rats PTZ, selon une méthodologie similaire, l'activité antiépileptique des NpSe couplées à la prodigiosine, un pigment rouge synthétisé par des espèces bactériennes. Ils ont également observé que le traitement préventif par NpSe retardait l'apparition et la durée des crises après l'injection de PTZ. De plus, ils ont montré que le traitement par NpSe a amélioré la capacité antioxydante du tissu hippocampique en activant le facteur nucléaire érythroïde 2 et les antioxydants innés (glutathion et dérivés du glutathion) et en diminuant les concentrations des pro-oxydants (produits de lipoperoxydation et monoxyde d'azote). L'administration de NpSe a également inhibé les réactions inflammatoires et de gliose astrocytaire associées au développement de crises d'épilepsie en supprimant la production et l'activité de la GFAP et des médiateurs pro-inflammatoires (l'interleukine-1 bêta, le facteur de nécrose tumorale alpha, la cyclooxygénase-2, l'oxyde nitrique synthase inductible, et le facteur nucléaire kappa B). Les auteurs ont également confirmé que les NpSe protégeaient contre la mort neuronale hippocampique après l'injection de PTZ en diminuant les niveaux de cytochrome c cytosolique, de Bax et de caspase-3 et en améliorant l'expression de Bcl-2 anti-apoptotique. Enfin, les NpSe ont restauré le déséquilibre induit par le PTZ entre les acides aminés excitateurs et inhibiteurs et amélioré la transmission monoaminergique et cholinergique.

Nous pouvons ainsi formuler plusieurs hypothèses concernant les mécanismes expliquant l'effet antiépileptique de l'ouverture ultrasonore de la BHE couplée à l'administration intraveineuse de NpSe démontré par notre expérimentation :

- L'effet antiépileptique observé peut être l'association des effets antiépileptiques conjugués de l'ouverture de la BHE et des NpSe (voir ci-dessus). L'ouverture de la BHE permet une biodisponibilité cérébrale plus élevée des NpSe et ainsi comme nous l'avons montré précédemment s'est révélée être efficace pour obtenir une concentration élevée et persistante de sélénium dans le cerveau (voir paragraphe 1. « Détection et dosage du Sélénium intracérébral après ouverture de la BHE et administration de Nanoparticules de Sélénium »). Les propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et d'homéostasie cellulaires du sélénium sont alors potentialisées et peuvent influencer sur les mécanismes et les voies de signalisation qui favorisent la genèse des crises (voir paragraphe 6.2.2.1 « Rôle du sélénium sur la signalisation du calcium et les voies moléculaires induites par le stress oxydatif dans l'épilepsie ») (214,215,232).
- On peut également supposer que les NpSe restaurent le déséquilibre induit par le Kainate entre les acides aminés excitateurs et inhibiteurs et améliorent la transmission monoaminergique et cholinergique, comme cela a précédemment été démontré chez un modèle de rat épileptique PTZ (290).
- On peut enfin mettre en avant les propriétés neuroprotectrices et anti-apoptotiques des NpSe, notamment sur la mort neuronale hippocampique, comme décrit précédemment par Al Omairi et al (290) et Albrakati et al (291) (voir paragraphe suivant 4. Évaluation de l'effet sur la neurogenèse de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence statistiquement une diminution significative de la durée et de la sévérité clinique des crises généralisées, mais cela peut s'expliquer par deux raisons :

- Les séances de traitement ont entraîné une diminution importante du nombre d'évènements inclus dans l'analyse statistique (nombre de crises généralisées). Il était donc plus difficile d'obtenir des seuils de significativité avec un intervalle de confiance à 95% sur ces échantillons réduits. On peut également faire l'hypothèse que les crises généralisées qui persistaient malgré les 3 séances de traitement étaient les plus sévères et les plus longues.
- Comme nous le montrons en exemple sur la **Figure 20**, les séances successives de traitement par ouverture de la BHE associée à l'administration de NpSe ont vraisemblablement d'abord permis de circonscrire les crises à l'hippocampe

homolatéral (crises focales), puis ont modifié la sévérité électro-clinique des crises en décharges hippocampiques. Ainsi, ne s'agissant plus de crises généralisées, ces évènements épileptiques n'ont pas été pris en compte dans l'analyse.

Les limites que l'on peut opposer à cette expérimentation sont d'abord celles du modèle de souris Kaïnate. En effet, la fréquence des crises épileptiques généralisées est hétérogène selon les individus. Ainsi, certaines font plusieurs dizaines de crises par semaine, tandis que d'autres vont présenter une crise hebdomadaire. La randomisation après l'analyse de l'enregistrement vidéo-EEG visait à corriger ce biais.

Également, on aurait pu évaluer l'effet antiépileptique des différents traitements à plus long terme. Néanmoins, cela se serait heurté à des difficultés liées au modèle Kaïnate et à la technique. En effet, prolonger la durée d'enregistrement dans le temps aurait exposé à une mortalité plus élevée des souris, à un sur-risque d'arrachement des électrodes ainsi qu'à une altération majeure du signal EEG rendant difficile son interprétation.

Enfin, notre analyse aurait pu se porter sur les crises épileptiques focales voire les décharges hippocampiques, en complément de l'analyse des crises épileptiques généralisées. Néanmoins, une minorité de souris présentaient des crises focales associées aux crises généralisées. De plus, les crises focales, et *a fortiori* les décharges hippocampiques, sont difficiles à identifier sur des enregistrements vidéo-EEG de très longue durée (648 heures d'enregistrements pour cette expérimentation) et leur analyse et interprétation est souvent sujette à subjectivité et donc à débat. Ajouter l'analyse des crises focales et des décharges hippocampiques comme critère de jugement aurait ainsi diminué la robustesse de nos conclusions.

4. Évaluation de l'effet sur la neurogenèse de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium

Nous avons montré dans la partie précédente l'effet antiépileptique significatif de l'ouverture répétée de la BHE par ultrasons pulsés associée à l'administration intraveineuse de NpSe. Il convenait ainsi d'investiguer les différents mécanismes qui peuvent être impliqués dans cet effet thérapeutique. Suite aux travaux de l'équipe de Toronto (ON, Canada) qui rapportaient une augmentation de la neurogenèse hippocampique après l'ouverture de la BHE par ultrasons focusés (89,175,178) chez des souris wild-type et des souris transgéniques reproduisant un modèle de Maladie d'Alzheimer avec atrophie hippocampique, nous avons fait l'hypothèse que stimuler la neurogenèse hippocampique pourrait lutter contre les mécanismes pro-épileptogènes liés au développement de l'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique.

4.1. Objectif

L'objectif de ces expérimentations était d'évaluer si l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés associée ou non à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium modifiait la neurogenèse et/ou la mortalité neuronale dans l'hippocampe chez des souris wild-type et épileptiques (modèle Kaïnate).

4.2. Schéma expérimental

Trente-six souris C57BL6/J mâles âgées de 8 semaines ont été utilisées pour ces expérimentations. La moitié des souris a été rendue épileptique par injection intrahippocampique de Kaïnate. Les souris ont ensuite été réparties en 6 groupes de 6 souris chacun selon le traitement qu'elles recevaient :

- Souris wild-type, contrôle (WT-SHAM),
- Souris Kaïnate, contrôle (KA-SHAM),
- Souris wild-type, ouverture de la BHE (WT-US),
- Souris Kaïnate, ouverture de la BHE (KA-US)
- Souris wild-type, ouverture de la BHE + Nanoparticules de Sélénium IV (100ul à 150ug/ml) (WT-US + NpSe),
- Souris Kaïnate, ouverture de la BHE + Nanoparticules de Sélénium IV (100ul à 150ug/ml) (KA-US + NpSe).

Le traitement était réalisé (J0), puis une injection intrapéritonéale de BrDU (100mg/kg) était faite quotidiennement de J2 à J7. Les souris étaient ensuite sacrifiées à J19 et perfusées en intracardiaque et fixés dans du PFA à 4% (voir Méthodes paragraphes 4, 5 et 6). Les cerveaux étaient par la suite déshydratés et congelés avant d'être coupés en tranches coronales de 20 um. Une immunohistochimie était alors réalisée avec un quadruple marquage DCX, BrDU, NeuN et DAPI.

Pour évaluer le nombre de cellules BrDU et DCX positives, nous avons réalisé un Z-stack de l'ensemble de la tranche de cerveau en coupe coronale. Nous avons par la suite choisi 4 zones d'intérêts sur l'hippocampe traité, couvrant l'ensemble du gyrus denté. Nous avons par la suite procédé au comptage manuel des cellules positives, en étant en aveugle du groupe de traitement de l'animal. Pour qu'une cellule soit considérée DCX positive, il fallait, à la fois, que le corps cellulaire et l'axone soient marqués. Le nombre de cellules NeuN positives a été évalué par analyse semi-automatisée de l'intensité de la fluorescence de l'hippocampe traité, à l'aide du logiciel ImageJ.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics v23.0. Des tests non paramétriques ont été utilisés pour comparer les groupes 2 à 2 (test de Mann-Whitney-Wilcoxon) ou tous ensemble (test de Kruskal-Wallis). Le seuil de significativité était fixé à $P < 0,05$.

4.3. Résultats

4.3.1. Comparaisons entre les souris wild-type et les souris Kaïnate

L'analyse comparant, la neurogenèse chez les 6 souris wild-type et chez les 6 souris Kaïnate contrôles (SHAM) retrouvait significativement plus de cellules BrDU positives dans le gyrus denté des souris kainate (**Figure 24**, Test de Mann-Withney-Wilcoxon, $P = 0,002$). Il y avait également en moyenne plus de cellules DCX positives dans le gyrus denté des souris Kaïnate, mais la différence n'était pas significative (16,3 contre 9,7 ; $P = 0,39$). A l'inverse, l'intensité de la fluorescence de l'immunomarquage NeuN dans l'hippocampe était plus élevée chez les souris wild-type que chez les souris Kaïnate, mais il s'agissait d'une tendance non significative (Test de Mann-Withney-Wilcoxon, $P = 0,18$).

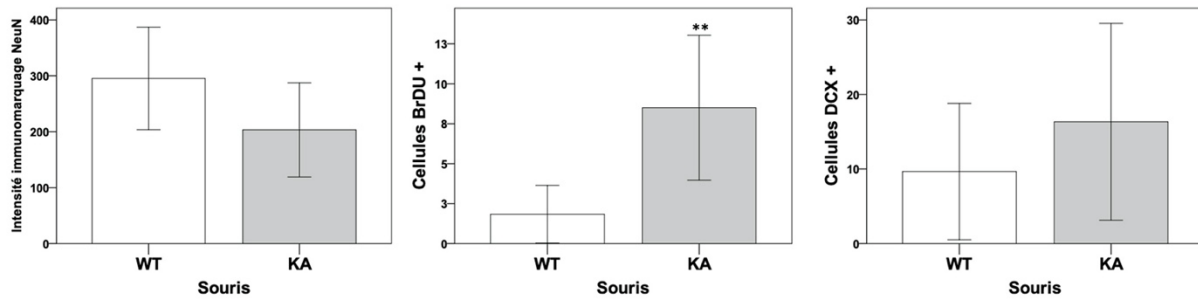


Figure 24. Neurogenèse chez les 6 souris wild-type en comparaison au 6 souris Kaïnate du groupe SHAM. Colonne de gauche : analyse semi-automatisée de la fluorescence de l'immunomarquage NeuN dans l'hippocampe. Colonne du milieu : analyse du comptage des cellules BrDU positives dans le gyrus denté. Colonne de droite : analyse du comptage des cellules DCX positives dans le gyrus denté. Statistiques : tests de Mann-Whitney-Wilcoxon. ** 0,001 < P < 0,01

4.3.2. Souris wild-type

Le nombre de cellules BrDU positives dans le gyrus denté était significativement plus élevé chez les souris ayant eu une ouverture ultrasonore de la BHE associée ou non à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium (groupes US et US + NPSe) que chez les souris du groupe contrôle (SHAM) (**Figure 25**, +1239% (P = 0,002) et +840% (P = 0,002), respectivement). Il n'y avait pas de différence significative entre les souris des groupes US et US + NPSe (P = 0,49).

Le nombre de cellules DCX positives dans le gyrus denté était significativement plus élevé chez les souris ayant eu une ouverture ultrasonore de la BHE associée ou non à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium (groupes US et US + NP) que chez les souris du groupe contrôle (SHAM) (**Figure 25**, +241% (P = 0,009) et +274% (P = 0,002), respectivement). Il n'y avait pas de différence significative entre les souris des groupes US et US + NP (P = 0,59).

L'intensité de la fluorescence de l'immunomarquage NeuN dans l'hippocampe était significativement plus élevée chez les souris ayant eu une ouverture ultrasonore de la BHE associée ou non à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium (groupes US et US + NPSe) que chez les souris du groupe contrôle (SHAM) (**Figure 25**, +37,3% (P = 0,04) et +46,7% (P = 0,004), respectivement). Il n'y avait pas de différence significative entre les souris des groupes US et US + NP (P = 0,82).

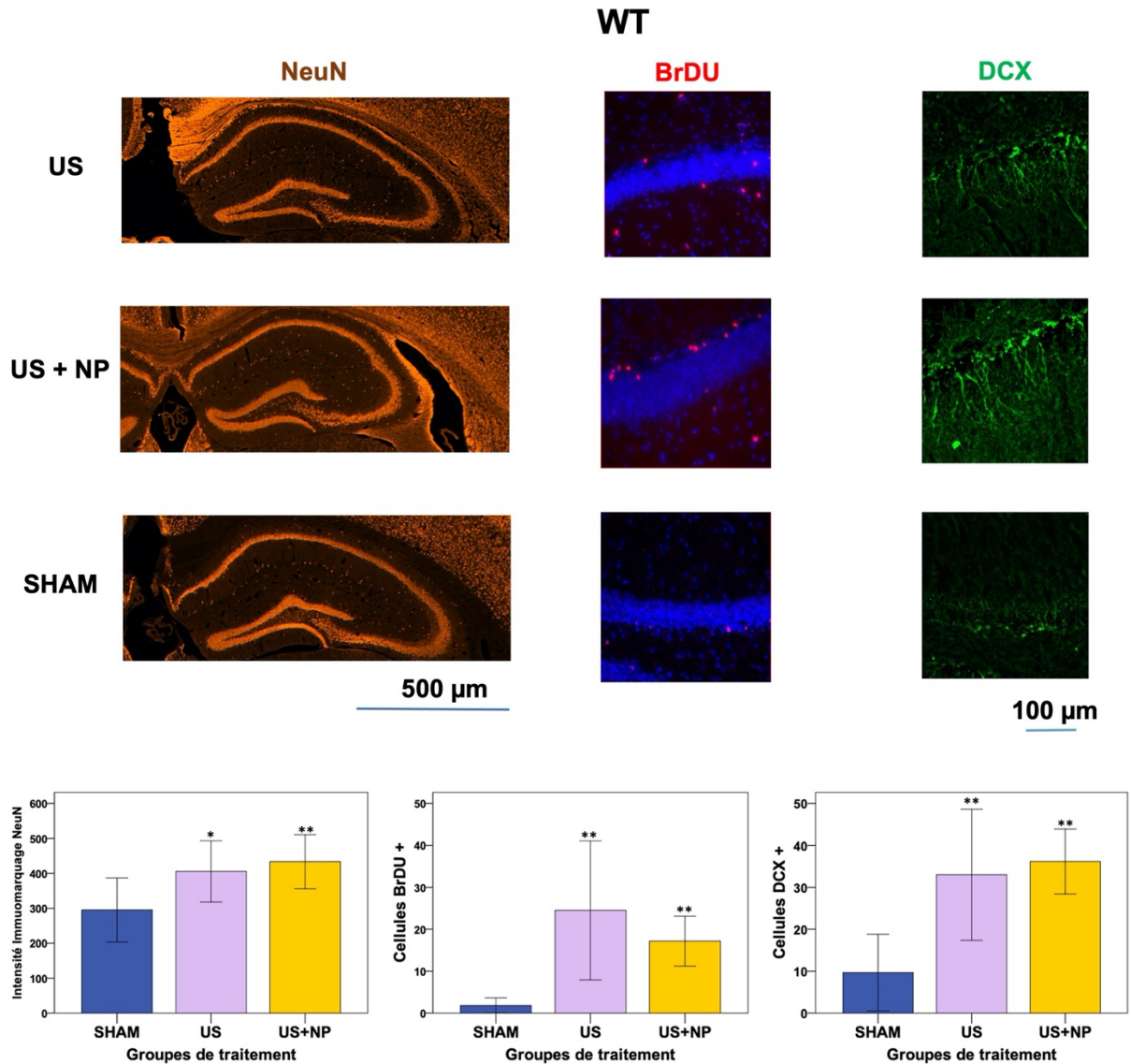


Figure 25. Neurogenèse chez les souris wild-type traitées par ouverture ultrasonore de la BHE (US), par ouverture ultrasonore de la BHE et Nanoparticules de Sélénium IV (US + NP) et chez les souris contrôles (SHAM). Colonne de gauche : immunomarquage NeuN et analyse semi-automatisée de la fluorescence dans l'hippocampe. Colonne du milieu : immunomarquages BrDU (rouge) et DAPI (bleu) et analyse du comptage des cellules BrDU positives dans le gyrus denté (une seule zone d'intérêt est représentée). Colonne de droite : immunomarquages DCX et analyse du comptage des cellules DCX positives dans le gyrus denté (une seule zone d'intérêt est représentée). Statistiques : tests de Mann-Whitney-Wilcoxon. Différences par rapport aux souris SHAM. * $P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$.

4.3.3. Souris Kaïnate

Le nombre de cellules BrDU positives dans le gyrus denté ne différait pas significativement entre les différents groupes de souris (**Figure 26**, (P = 0,86), test de Kruskall-Wallis). Il n'y avait pas de différence significative entre les souris des groupes SHAM et US (test de Mann-Whitney-Wilcoxon, P = 0,70), entre celles des groupes SHAM et US + NP (P = 0,70) et entre celles des groupes US et US + NP (P = 0,82).

Le nombre de cellules DCX positives dans le gyrus denté différait significativement entre les différents groupes de souris (**Figure 26**, (P = 0,05), test de Kruskall-Wallis). Il n'y avait pas de différence significative entre les souris des groupes SHAM et US (tests de Mann-Whitney-Wilcoxon, P = 0,82). Le nombre de cellules DCX positives dans le gyrus denté était significativement moins élevé chez les souris ayant eu une ouverture ultrasonore de la BHE associée à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium (groupe US + NPSe) que chez les souris du groupe contrôle (SHAM) et que chez celles ayant eu une ouverture ultrasonore de la BHE (groupe US) (**Figure 26**, -89% (P = 0,04) et -90% (P = 0,04), respectivement).

L'intensité de la fluorescence de l'immunomarquage NeuN dans l'hippocampe était significativement plus élevée chez les souris ayant eu une ouverture ultrasonore de la BHE associée ou non à l'administration intraveineuse de Nanoparticules de Sélénium (groupes US et US + NP) que chez les souris du groupe contrôle (SHAM) (**Figure 26**, +84,4% (P = 0,004) et 58,1% (P = 0,009), respectivement). Il n'y avait pas de différence significative entre les souris des groupes US et US + NP (P = 0,18).

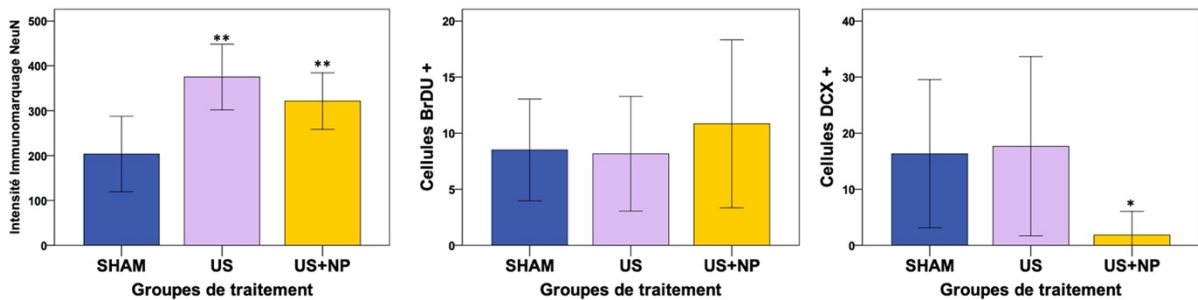
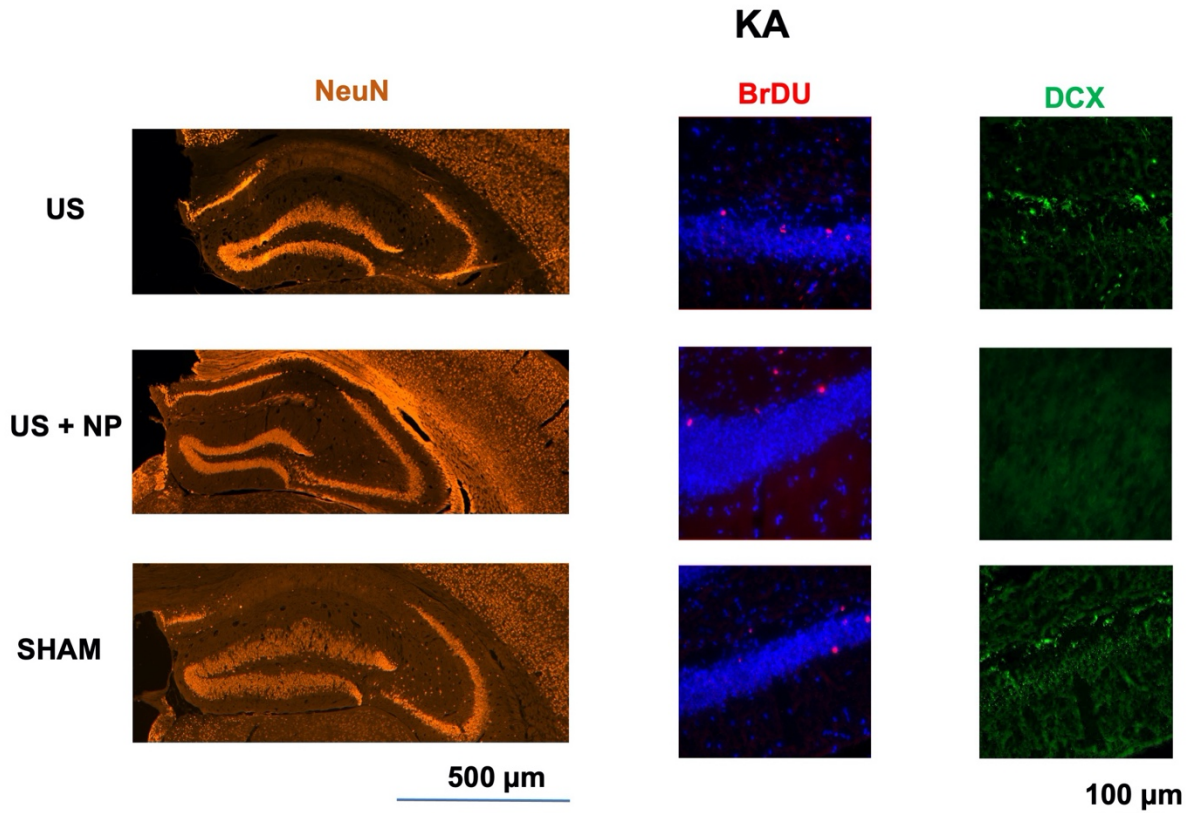


Figure 26. Neurogenèse chez les souris kainate traitées par ouverture ultrasonore de la BHE (US), par ouverture ultrasonore de la BHE et Nanoparticules de Sélénium IV (US + NP) et chez les souris contrôles (SHAM). Colonne de gauche : immunomarquage NeuN et analyse semi-automatisée de la fluorescence dans l'hippocampe. Colonne du milieu : immunomarquages BrDU (rouge) et DAPI (bleu) et analyse du comptage des cellules BrDU positives dans le gyrus denté (une seule zone d'intérêt est représentée). Colonne de droite : immunomarquages DCX et analyse du comptage des cellules DCX positives dans le gyrus denté (une seule zone d'intérêt est représentée). Statistiques : tests de Mann-Whitney-Wilcoxon. Différences par rapport aux souris SHAM. * $P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$.

4.4. Discussion et Conclusion

Nous avons étudié la neurogenèse à l'aide des marquages DCX, BrDU et NeuN en suivant le protocole décrit par l'équipe de Toronto afin de pouvoir comparer nos résultats avec les leurs sur la base d'expérimentations homogènes (89). Également, le fait de réaliser ces trois marquages sur des cerveaux d'animaux sacrifiés 19 jours après l'ouverture de la BHE permet d'identifier à la fois des neurones matures et immatures (voir Introduction paragraphe 4. La neurogenèse hippocampique) (178).

Ces expérimentations ont d'abord montré que la neurogenèse, représentée par le nombre de neurones immunomarqués par DCX et BrDU dans le hile du gyrus denté de l'hippocampe était plus important chez les souris Kaïnate que chez les souris wild-type. Ces résultats confirment les données d'études précédentes qui ont démontré l'apparition d'une neurogenèse ectopique, faite de neurones excitateurs, dans le hile du gyrus denté chez des modèles de souris ou de rats épileptiques (modèle pilocarpine) (136,139,142,143,145,292). En effet, les anomalies de la migration des neuroblastes induites par les crises conduisent à une intégration anormale de nouvelles cellules granulaires dans l'hippocampe et impliquent une neurogenèse aberrante (138). Il a par la suite été montré que cette neurogenèse hippocampique aberrante contribue à la chronicisation de l'épilepsie et au déclin cognitif qui lui est associé (138,144). Nous avons ainsi confirmé avec le modèle Kaïnate les résultats précédemment obtenus avec le modèle pilocarpine. A l'inverse, l'analyse de l'immunomarquage NeuN a mis en évidence une tendance à la diminution des neurones matures dans l'hippocampe chez les souris Kaïnate, cela étant dû à l'apoptose neuronale existant dans CA1 suite à l'injection de Kaïnate dans l'hippocampe dorsal (293).

Nous avons, par la suite, montré que l'ouverture transitoire de la BHE par ultrasons pulsés stimulait la neurogenèse dans le gyrus denté chez les souris wild type (contrôles), et que l'administration intraveineuse de nanoparticules de sélénium en association ne modifiait pas ce résultat. Ce premier résultat confirme ceux d'études précédentes ayant réalisé des ouvertures de BHE à l'aide d'ultrasons focalisés (89,175,178). En effet, Burgess et al avaient trouvé une augmentation de 200% du nombre de cellules DCX positives dans le gyrus denté de souris contrôles et une augmentation de la longueur de l'arborisation dendritique de 227% chez les souris traitées par ultrasons par rapport aux souris non traitées (89). Scarcelli et al retrouvaient, quant à eux, en moyenne 4 fois plus de cellules BrDU positives dans le gyrus denté des souris traitées par ultrasons focalisés (175).

Un grand nombre de preuves suggèrent que les vaisseaux sanguins sont des niches neurogèniques au sein du système nerveux central (294). Des facteurs trophiques importants

présents dans la circulation peuvent contribuer à la relation entre la vascularisation et la neurogenèse. Par exemple, le facteur de croissance endothélial vasculaire circulant (VEGF) est nécessaire à la neurogenèse hippocampique induite par l'exercice (295). Il a été démontré que le traitement par ultrasons régule significativement à la hausse le VEGF in vitro (296). Cela représente donc une explication possible quant à la nécessité d'ouvrir la BHE pour donner un accès accru aux facteurs disponibles dans le système vasculaire.

Un autre mécanisme potentiel pourrait être l'induction de la signalisation Akt dans les neurones, qui s'est avérée se produire dans les régions d'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés (297). Akt est une molécule de signalisation en aval des récepteurs de la tyrosine kinase et est activée lors de la liaison du ligand aux récepteurs comme les récepteurs de la neurotrophine ou les récepteurs du glutamate. Il a été établi que l'activation de la signalisation Akt conduit à une survie augmentée des cellules DCX-positives (298).

Enfin, de nombreuses études ont objectivé le rôle de la microglie et des médiateurs immunitaires périphériques dans la neurogenèse adulte (105,106). Des preuves précliniques et des essais cliniques évaluant l'ouverture ultrasonore de la BHE via divers dispositifs ont été menés démontrant le potentiel de modulation immunitaire du système nerveux central (voir Introduction paragraphe 5.2.3 Stimulation immunitaire induite par l'ouverture ultrasonore de la BHE).

Les expérimentations réalisées sur les souris Kaĩnate n'ont, quant à elles, pas retrouvé une neurogenèse accrue dans le gyrus denté chez les souris traitées par ouverture de la BHE. Au contraire, nous avons mis en évidence une diminution significative des cellules DCX positives chez les souris traitées par ultrasons et nanoparticules de sélénium, tandis qu'il n'y avait pas de différence significative concernant les cellules BrDU positives. Sur l'ensemble de l'hippocampe, le nombre de neurones matures (cellules NeuN positives) était significativement accru chez les souris traitées par ultrasons avec ou sans administration de nanoparticules de sélénium.

Contrairement aux souris wild-type, nous n'avons ainsi pas retrouvé d'augmentation de la neurogenèse dans le hile du gyrus denté suite aux sonications. Cela peut s'expliquer par les propriétés histopathologiques architecturales de l'hippocampe de la souris Kaĩnate. En effet, la neurogenèse aberrante spontanée, décrite ci-dessus, dans le gyrus denté des souris Kaĩnate peut constituer une limite au développement de nouveaux neurones. Les études ayant montré une neurogenèse induite par l'ouverture ultrasonore de la BHE différaient de la nôtre car elles avaient pour modèles des souris transgéniques reproduisant la maladie d'Alzheimer (89,176) ou proposaient l'administration concomitante aux ultrasons d'immunoglobulines intraveineuses (299).

Le fait le plus intéressant est la diminution importante des neurones immatures dans le hile chez les souris qui ont reçu les nanoparticules de Sélénium couplées aux ultrasons. Cette ablation induite de la neurogenèse aberrante hippocampique peut expliquer la réduction du nombre de crises d'épilepsie dans ce même groupe de souris (voir Résultats Partie 2 paragraphe 3. Évaluation de l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium). En effet, Cho et al ont montré que l'ablation génétique de la neurogenèse ectopique, chez un modèle de souris pilocarpine, réduisait la fréquence des crises récurrentes de 40% et limitait le déclin cognitif associé à l'épilepsie (144). Notre travail n'a pas permis d'élucider le mécanisme d'ablation de la neurogenèse aberrante qui semble associé à l'administration des nanoparticules de sélénium puisqu'on ne retrouve pas ce résultat chez les souris qui ont eu une ouverture de BHE seule. Nous pouvons néanmoins faire l'hypothèse que les propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et de facilitation de la neurotransmission des neurones GABAergiques des nanoparticules de sélénium (voir Introduction paragraphe 6.2.2.1. Rôle du sélénium sur la signalisation du calcium et les voies moléculaires induites par le stress oxydatif dans l'épilepsie), jouent un rôle sur les voies de signalisation qui contrôlent la migration des neurones nouveau-nés depuis la niche neurogénique. Il a d'ailleurs été montré que les sélénoprotéines ont une importance particulière dans le développement et le fonctionnement des interneurons positifs à la parvalbumine GABAergique (GABA, acide γ -aminobutyrique) du cortex cérébral et de l'hippocampe (232). Ainsi, les nanoparticules de sélénium pourraient réguler à la hausse les niveaux de reeline qui régule la migration des progéniteurs neuronaux dans l'hippocampe (300–302). La reeline est un signal « stop » normal sécrété par les cellules hilaires dont les concentrations diminuent chez la souris épileptique car les cellules exprimant la reeline meurent en réponse aux crises (303). Les nanoparticules de sélénium pourraient donc favoriser la survie des cellules hilaires exprimant la reeline, et donc de surcroît limiter la migration neuronale aberrante des neurones nouveaux-nés. Ces propriétés anti-apoptotiques et de neuromodulation des nanoparticules de sélénium ont récemment été décrites, en association avec la prodigiosine, chez des rats pentylènetétrazole (290) et chez des rats modélisant une dépression (291). Ces équipes ont ainsi démontré que l'administration de ce complexe inhibait les réactions inflammatoires associées aux crises d'épilepsie en supprimant la production et l'activité de la GFAP et des médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'interleukine-1 bêta, le facteur de nécrose tumorale alpha, la cyclooxygénase-2, l'oxyde nitrique synthase inductible, et le facteur nucléaire kappa B. De plus, il protégeait contre la perte de cellules hippocampiques après l'injection de pentylènetétrazole en diminuant les niveaux de cytochrome c cytosolique, de Bax et de caspase-3 et en augmentant l'expression de Bcl-2 anti-apoptotique. Enfin, les nanoparticules de sélénium associées à la prodigiosine ont restauré le déséquilibre induit par le pentylènetétrazole entre les acides aminés excitateurs

et inhibiteurs et amélioré la transmission monoaminergique et cholinergique (290,291). Ces mêmes propriétés anti-apoptotiques peuvent expliquer le nombre significativement plus important de neurones matures (cellules NeuN positives) objectivées sur l'ensemble de l'hippocampe chez les souris traitées par ultrasons et nanoparticules de sélénium par rapport aux souris contrôles.

Le protocole d'immunohistochimie, décrit ci-dessus et utilisé dans nos expériences, a néanmoins l'inconvénient de n'avoir pu être réalisé qu'après une seule sonication. Nous n'avons donc pas pu évaluer si l'effet des 3 sonications, réalisées à visée thérapeutique dans la partie précédente, était différent de l'effet induit par une sonication unique. Également, il n'a pas été possible de réaliser des contrôles intra-individuels en comparant la neurogenèse de l'hippocampe traité (droit) et de l'hippocampe controlatéral (gauche) chez le même animal. En effet, la plateforme préclinique SonoCloud possède un transducteur ultrasonore de 12mm de diamètre qui permet des ouvertures larges de la BHE couvrant l'intégralité de la surface d'un hémisphère cérébral de souris adulte et l'ensemble du parenchyme en profondeur. Les sonications transversales ou sagittales ont donc pu provoquer une ouverture de la BHE des deux hippocampes, ne permettant pas de choisir l'hippocampe controlatéral comme hippocampe contrôle. D'où notre choix d'avoir étudié exclusivement dans ce travail l'hippocampe homolatéral à la sonication et d'avoir réalisé des comparaisons avec des animaux contrôles non-soniqués.

5. Évaluation à long terme des conséquences histologiques de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de Nanoparticules de Sélénium chez la souris Kaïnate

Nous avons montré par les expérimentations précédentes que l'ouverture de la BHE couplée à l'administration de nanoparticules de sélénium permettait une réduction significative des crises d'épilepsie et modifiait la neurogenèse chez la souris Kaïnate. Nous avons par la suite cherché à savoir si l'ouverture de BHE associée ou non à l'administration de nanoparticules induisait des modifications histologiques hippocampiques à long terme.

5.1. Objectif

L'objectif de cette expérimentation était d'évaluer si l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés associée ou non à l'administration intraveineuse de nanoparticules de sélénium entraînait des modifications histologiques (activation microgliale évaluée par Iba1, astrogliose évaluée par GFAP) et de la mortalité neuronale (évaluée par NeuN) à long terme chez les souris Kaïnate.

5.2. Schéma expérimental

Les souris Kaïnate, qui ont été implantées par des électrodes intracérébrales d'enregistrement EEG lors de l'expérimentation détaillée au paragraphe 3 ci-dessus (« Évaluation de l'effet antiépileptique de l'ouverture de la BHE couplée à l'administration intraveineuse de nanoparticules de sélénium »), ont été sacrifiées 6 mois après la dernière séance de traitement qui avait lieu 53 jours après l'injection de Kaïnate. Les souris étaient ensuite perfusées en intracardiaque et fixés dans du PFA à 4% (voir Méthodes paragraphes 4, 5 et 6). Les cerveaux étaient alors déshydratés et congelés avant d'être coupés en tranches coronales de 20 μm . Une immunohistochimie était réalisée avec un quadruple marquage Iba1, GFAP, NeuN et DAPI. La coupe choisie pour l'analyse était située entre les 2 électrodes hippocampiques droites (corps de l'hippocampe). Pour évaluer l'intensité de la fluorescence induite par les immunomarquages, nous avons, à l'aide du logiciel ImageJ, pondéré la fluorescence du marquage par rapport à l'auto-fluorescence de la tranche (médiane de 5 mesures), rapporté à la surface analysée, comme cela a précédemment été décrit (293).

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistics v23.0. Des tests non paramétriques ont été utilisés pour comparer les groupes 2 à 2 (test de Mann-Whitney-Wilcoxon) ou tous ensemble (test de Kruskal-Wallis). Le seuil de significativité était fixé à $P < 0,05$.

Le nombre de souris incluses dans chaque groupe de traitement était :

- SHAM : n=5
- US : n=5
- NpSe : n=5
- US + NPSe : n=5.

5.3. Résultats

L'intensité de la fluorescence de l'immunomarquage GFAP dans l'hippocampe ne différait pas significativement selon les groupes de traitement (test de Kruskal-Wallis, $P = 0,73$).

L'intensité de la fluorescence de l'immunomarquage NeuN dans l'hippocampe ne différait pas significativement selon les groupes de traitement (test de Kruskal-Wallis, $P = 0,19$). Néanmoins, on observe une intensité de l'immunomarquage significativement supérieure dans le groupe NpSe par rapport au groupe SHAM ($P = 0,03$).

L'intensité de la fluorescence de l'immunomarquage Iba1 dans l'hippocampe était significativement différent entre les groupes plus élevé (test de Kruskal-Wallis, $P = 0,006$). Notamment, l'intensité de l'immunomarquage était significativement plus faible dans le groupe US + NpSe que dans le groupe SHAM (4,2 fois moins, $P = 0,008$), que dans le groupe US (3,7 fois moins, $P = 0,008$) et que dans le groupe NpSe (2,2 fois moins, $P = 0,03$).

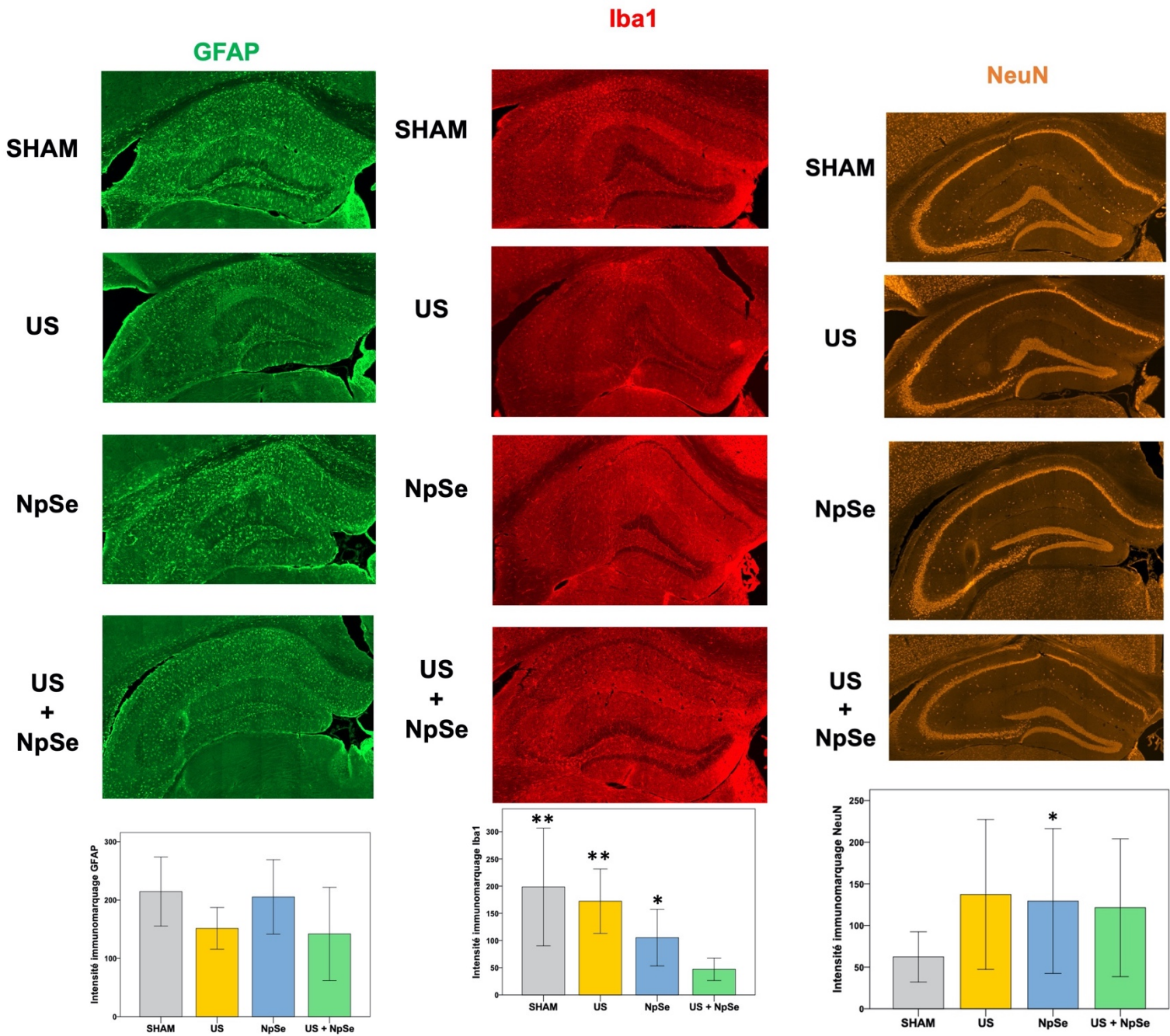


Figure 27 : Intensité des immunomarquages GFAP, Iba1 et NeuN sur les hippocampes droits de souris kainate à 6 mois de la dernière séance de traitement.

Statistiques : tests de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Groupes Iba1 : différences par rapport aux souris US + NpSe.

Groupes NeuN : différences par rapport aux souris SHAM

* $P < 0,05$; ** $0,001 < P < 0,01$.

Dans cette expérimentation, nous avons étudié les éventuelles conséquences à long terme de l'ouverture transitoire répétée de la BHE par ultrasons pulsés associée ou non à l'administration de nanoparticules de sélénium chez les souris Kainate.

Le principal résultat qui en ressort est la moindre activation microgliale existante chez les souris traitées par ultrasons et nanoparticules de sélénium par rapport aux autres groupes de souris. Cela confirme l'effet anti-inflammatoire déjà décrit des nanoparticules de sélénium (233,235,237) et suggère que cet effet est durable dans le temps (supérieur à 6 mois) lorsque l'administration des nanoparticules est couplée à l'ouverture de la BHE. De plus, nous avons montré dans la Partie 1 de ce travail (« Faisabilité et conséquences de l'ouverture de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité chez des souris saines et chez les souris avec épilepsie méso-temporale ») que la seule ouverture de la BHE par ultrasons pulsés ne modifiait pas l'activation microgliale dans les 7 premiers jours chez les souris kainate. L'effet anti-inflammatoire de réduction de l'activation microgliale peut donc être attribué en premier lieu aux nanoparticules de sélénium, d'autant qu'il existait une tendance non significative ($P = 0,09$) à la réduction de l'activation microgliale chez les souris traitées par nanoparticules de sélénium (groupe NpSe) par rapport aux souris ayant eu les ouvertures ultrasonores de la BHE (groupe US). Cette propriété de réduction de l'activation microgliale pourrait expliquer en partie le meilleur contrôle de l'épilepsie chez les souris traitées nanoparticules de sélénium et ouverture de la BHE.

L'astroglie n'a pas été modifiée, sur le long terme, par les différents traitements administrés. On rappellera que l'astroglie est fortement augmentée chez la souris kainate (82,265,266). Nous avons déjà montré que l'ouverture ultrasonore de la BHE ne modifiait pas l'activation astrogliale chez la souris kainate, dans les heures et les premiers jours qui suivaient la sonication (voir Partie 1). Ce résultat est donc confirmé sur le long terme et n'est pas modifié par l'adjonction de nanoparticules de sélénium lors de la sonication.

Concernant, l'évaluation de la population neuronale par l'immunomarquage NeuN, l'analyse montre que le traitement par ouverture de la BHE, nanoparticules de sélénium ou la combinaison de ces deux traitements permettent une moindre mortalité neuronale que chez les souris Kainate SHAM. Les nanoparticules de sélénium sont connues pour procurer des effets antioxydant et anti-apoptotique luttant contre l'oxydation cellulaire hippocampique existant chez la souris kainate, ainsi que la mortalité neuronale qui y est associée (235,239,290). Nous avons cependant observé une hétérogénéité des résultats et donc des

écarts-types, notamment dans le groupe US + NpSe, expliquant la non-significativité des différences observées avec le groupe SHAM.

Les limites associées à cette expérimentation étaient qu'il n'a pas été possible d'analyser l'histologie des 27 souris kainate enregistrées par EEG intracérébral. En effet, 5 souris sont décédées entre les deux expérimentations et les hippocampes droits n'étaient pas analysables pour deux d'entre elles. Également, le faible effectif par groupe (n = 5) n'a pas permis d'analyse statistique concernant une éventuelle association entre diminution de l'activation microgliale et réduction de la fréquence des crises épileptiques.

6. Résumé et conclusion de la Partie 2

Après avoir montré que l'administration intraveineuse de nanoparticules de sélénium couplée à l'ouverture ultrasonore de la BHE, était la technique la plus efficace pour obtenir une concentration élevée et persistante de sélénium dans le cerveau, nous avons démontré son innocuité chez la souris, après 3 séances de traitement espacées d'une semaine. Ce traitement a permis de réduire significativement les crises d'épilepsie généralisées chez les souris Kainate. Nous avons par la suite montré l'existence de modifications histologiques à court terme (réduction de la neurogenèse aberrante dans le hile de l'hippocampe, baisse de la mortalité neuronale sur l'ensemble de l'hippocampe) et long terme (réduction de l'activation microgliale hippocampique) qui pourraient en partie expliquer l'effet antiépileptique mis en évidence.

Les futurs travaux pourront s'intéresser à i) explorer d'autres mécanismes physiologiques potentiellement en jeu dans la réduction des crises d'épilepsie ii) identifier les paramètres optimaux de sonication et de dosage des nanoparticules pour optimiser l'effet antiépileptique.

CONCLUSION GENERALE

Nos résultats ont indiqué que les ultrasons pulsés de basse intensité, délivrés à l'aide de la plateforme préclinique SonoCloud, ouvrent de manière reproductible et transitoire la BHE chez les souris épileptiques du modèle Kainate, y compris lorsqu'elles sont implantées avec des électrodes intracérébrales d'enregistrement EEG. Nous avons confirmé que l'ouverture de la BHE par les ultrasons pulsés de basse intensité est transitoire et conduit à une extravasation d'albumine et à une astrogliose légère réversible dans l'hippocampe des souris C57BL6/J non épileptiques. Fait nouveau, nous avons démontré que l'ouverture ultrasonore répétée de la BHE n'induit pas, à court terme (1 mois) de crises d'épilepsie ni d'anomalies épileptiques en EEG chez les souris non épileptiques implantées avec des électrodes profondes intracérébrales.

Chez les souris Kainate, l'extravasation transitoire d'albumine dans l'hippocampe médiée par l'ouverture ultrasonore de la BHE n'entraîne pas de changements histologiques significatifs en raison des caractéristiques histologiques et neuroinflammatoires préexistantes associées à la sclérose hippocampique. Si l'ouverture répétée de la BHE par ultrasons pulsés seule ne semble pas avoir d'effet antiépileptique significatif sur la souris Kainate, nous avons montré que l'ouverture répétée de la BHE couplée à l'administration IV de nanoparticules de sélénium est sûre, bien tolérée et permet une réduction des crises épileptiques généralisées d'environ 90%. Notre travail a également permis de formuler des hypothèses expliquant ce dernier résultat. Ainsi, nous avons observé chez les souris Kainate traitée par ouverture ultrasonore de la BHE et nanoparticules de sélénium des modifications histologiques à court terme (réduction de la neurogenèse aberrante dans le hile de l'hippocampe, baisse de la mortalité neuronale sur l'ensemble de l'hippocampe) et long terme (réduction de l'activation microgliale hippocampique) qui pourraient en partie expliquer l'effet antiépileptique mis en évidence. Ces modifications histologiques peuvent être dues aux différentes propriétés des nanoparticules de sélénium : anti-inflammatoires, antioxydantes et facilitation de la neurotransmission des neurones GABAergiques qui jouent un rôle sur les voies de signalisation qui contrôlent la migration des neurones nouveau-nés depuis la niche neurogénique.

Une limite aux expérimentations réalisées pour investiguer les conséquences des sonications répétées chez les souris, épileptiques ou non, implantées avec des électrodes profondes d'EEG est l'altération du signal EEG qui survient progressivement. Ainsi, les signaux EEG deviennent difficilement interprétables après quelques semaines d'enregistrement. Ceci n'a donc pas permis d'évaluer à long terme l'absence d'épileptogénicité

induite par les sonications chez les souris non épileptiques et l'effet antiépileptiques des sonications couplées ou non à l'administration de nanoparticules de sélénium chez les souris Kaïnate. D'autres difficultés techniques liées au connecteur des électrodes, fixé sur le crâne des souris, existent. En effet, avec le temps la solidité de la fixation du connecteur par le ciment diminue et certaines souris ont pu se défaire de leur connecteur. Également, les manipulations de branchement et débranchement des souris aux pistes d'enregistrement vidéo-EEG ont parfois donné lieu à l'ablation accidentelle du connecteur. Ces différents écueils ont dû être pris en compte lorsque nous avons décidé *a priori* du plan expérimental. Notre équipe n'en reste pas moins l'une des seules à réaliser des enregistrements vidéo-EEG pendant plusieurs semaines chez des rongeurs épileptiques implantés avec des électrodes profondes.

Également, le choix de ne comptabiliser que les crises d'épilepsie généralisées lors des enregistrements EEG-vidéos peut être considéré comme une limite, puisque le modèle de la souris Kaïnate présente surtout des décharges hippocampiques. Néanmoins, comme expliqué précédemment, les variabilités interobservateur et intraobservateur étaient telles pour la détection des crises focales et des décharges hippocampiques isolées que nous avons préféré choisir un critère de jugement très robuste, facilement détectable sur les tracés EEG, sur la carte temps-fréquence et sur la vidéo.

Une autre limite identifiable dans notre travail est l'absence de contrôle de la réussite de l'ouverture de la BHE après sonication chez les souris qui sont maintenues en vie. En effet, chez les souris sacrifiées après ouverture de la BHE pour étude histologique, il nous a toujours été possible de vérifier, à l'aide d'immunomarquage, que la sonication avait été un succès. Ceci est une différence entre la technique d'ultrasons pulsés de basse intensité que nous avons utilisée et les ultrasons focalisés de haute intensité qui sont réalisés sous contrôle par IRM permettant ainsi d'objectiver en temps réel l'ouverture de la BHE sans sacrifier l'animal. Néanmoins, notre travail sur la faisabilité de l'ouverture de la BHE chez la souris à l'aide de la plateforme SonoCloud et l'expérience de notre équipe en la matière depuis plus d'une décennie, permettent d'avancer que les échecs d'ouverture de BHE restent exceptionnels. Les avantages majeurs de notre technique sont son faible coût et la rapidité d'exécution de la procédure qui nous ont permis de traiter un nombre suffisant d'animaux pour pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Enfin, il convient de rappeler les limites qui s'appliquent aux modèles animaux épileptiques : relative hétérogénéité interindividuelle des caractéristiques cliniques et histologiques, durée de vie des animaux, évolution spontanée de l'épilepsie au cours du temps...(81,83,266).

Notre travail a ainsi mis en évidence le potentiel prometteur de l'ouverture répétée de la BHE par ultrasons pulsés de basse intensité couplée à l'administration systémique de

nanoparticules de sélénium comme traitement de l'épilepsie. Les futurs travaux pourront s'intéresser aux conséquences comportementales des sonications, ce que nous n'avons pas pu évaluer dans ce travail. Il semble également nécessaire de pouvoir réaliser une caractérisation électrophysiologique / immunohistochimique des nouveaux neurones qui migrent dans le hile suite à l'ouverture de la BHE formant la neurogenèse dite « aberrante » et d'explorer les mécanismes physiologiques mis en jeu dans la réduction des crises d'épilepsie. On peut aussi envisager d'autres travaux consistant à administrer d'autres molécules antiépileptiques lors des ouvertures de la BHE ou bien encore à transposer notre méthodologie à une étude clinique.

REMERCIEMENTS

Au Professeur Stéphane Charpier pour m'avoir accueilli dans son Équipe à l'Institut du Cerveau et pour avoir accepté de diriger ce travail de Thèse.

Au Professeur Alexandre Carpentier pour sa confiance et son soutien quotidiens, ainsi que pour m'avoir confié ce projet.

Au Professeur Vincent Navarro pour son implication et son aide tout au long de ce projet.

Au Professeur Sophie Colnat-Coulbois pour avoir accepté de rapporter ce travail et pour son soutien.

A Monsieur Jean-Luc Gennisson pour avoir accepté de rapporter ce travail.

A Monsieur Cyril Lafon pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour m'avoir accueilli dans son Équipe au LabTau.

A Monsieur Thomas Pons pour la synthèse des nanoparticules et pour son enthousiasme à collaborer à notre projet.

A Mesdames Delphine Roussel et Sarah Lecas pour leur aide durant ce projet.

Au Laboratoire de Recherche en Techniques Chirurgicales Avancées (LRTCA) du Pr Alexandre Carpentier pour avoir financé ce projet.

Au Fonds d'Etudes et de Recherche du Corps Médical (FERCM) de l'AP-HP pour avoir financé ma mise en disponibilité pour réaliser ce projet.

BIBLIOGRAPHIE

1. Wen HT, Rhoton AL, de Oliveira E, Cardoso AC, Tedeschi H, Baccanelli M, et al. Microsurgical anatomy of the temporal lobe: part 1: mesial temporal lobe anatomy and its vascular relationships as applied to amygdalohippocampectomy. *Neurosurgery*. sept 1999;45(3):549-91; discussion 591-592.
2. Mathon B, Clemenceau S. Selective amygdalohippocampectomy via trans-superior temporal gyrus keyhole approach. *Acta Neurochir (Wien)*. avr 2016;158(4):785-9.
3. Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol*. août 2014;40(5):520-43.
4. van Strien NM, Cappaert NLM, Witter MP. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci*. avr 2009;10(4):272-82.
5. Vonck K, Boon P, Goossens L, Dedeurwaerdere S, Claeys P, Gossiaux F, et al. Neurostimulation for refractory epilepsy. *Acta Neurol Belg*. déc 2003;103(4):213-7.
6. Mandelstam SA. Challenges of the anatomy and diffusion tensor tractography of the Meyer loop. *AJNR Am J Neuroradiol*. août 2012;33(7):1204-10.
7. Taoka T, Sakamoto M, Nakagawa H, Nakase H, Iwasaki S, Takayama K, et al. Diffusion tensor tractography of the Meyer loop in cases of temporal lobe resection for temporal lobe epilepsy: correlation between postsurgical visual field defect and anterior limit of Meyer loop on tractography. *AJNR Am J Neuroradiol*. août 2008;29(7):1329-34.
8. Yogarajah M, Focke NK, Bonelli S, Cercignani M, Acheson J, Parker GJM, et al. Defining Meyer's loop-temporal lobe resections, visual field deficits and diffusion tensor tractography. *Brain*. juin 2009;132(Pt 6):1656-68.
9. Mathon B, Navarro V, Bielle F, Nguyen-Michel VH, Carpentier A, Baulac M, et al. Complications After Surgery for Mesial Temporal Lobe Epilepsy Associated with Hippocampal Sclerosis. *World Neurosurg*. juin 2017;102:639-650.e2.
10. Destrieux C, Bourry D, Velut S. Surgical anatomy of the hippocampus. *Neurochirurgie*. oct 2013;59(4-5):149-58.
11. Mathon B, Bédos-Ulvin L, Baulac M, Dupont S, Navarro V, Carpentier A, et al. [Evolution of ideas and techniques, and future prospects in epilepsy surgery]. *Rev Neurol (Paris)*. févr 2015;171(2):141-56.
12. Navarro V, Clemenceau S, Habert MO, Hasboun D, Nguyen-Michel VH, Masson V, et al. [Epilepsy surgery: when thinking about? Who are the good candidates?]. *Presse Med*. mars 2011;40(3):293-300.
13. Van Paesschen W, Sisodiya S, Connelly A, Duncan JS, Free SL, Raymond AA, et al. Quantitative hippocampal MRI and intractable temporal lobe epilepsy. *Neurology*. déc 1995;45(12):2233-40.
14. Mathon B, Bielle F, Samson S, Plaisant O, Dupont S, Bertrand A, et al. Predictive factors of long-term outcomes of surgery for mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Epilepsia*. 2017;58(8):1473-85.
15. Adam C, Clémenceau S, Semah F, Hasboun D, Samson S, Dormont D, et al. [Strategy of evaluation and surgical results in medial temporal lobe epilepsy]. *Rev Neurol (Paris)*. nov 1997;153(11):641-51.

16. Adam C, Clemenceau S, Semah F, Hasboun D, Samson S, Aboujaoude N, et al. Variability of presentation in medial temporal lobe epilepsy: a study of 30 operated cases. *Acta Neurol Scand.* juill 1996;94(1):1-11.
17. Baulac M. MTLE with hippocampal sclerosis in adult as a syndrome. *Rev Neurol (Paris).* mars 2015;171(3):259-66.
18. Dupont S, Samson Y, Nguyen-Michel VH, Zavanone C, Navarro V, Baulac M, et al. Lateralizing value of semiology in medial temporal lobe epilepsy. *Acta Neurol Scand.* déc 2015;132(6):401-9.
19. Dupont S, Samson Y, Nguyen-Michel VH, Zavanone C, Clémenceau S, Miles R, et al. Are auras a reliable clinical indicator in medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis? *Eur J Neurol.* sept 2015;22(9):1310-6.
20. Rusu V, Chassoux F, Landré E, Bouilleret V, Nataf F, Devaux BC, et al. Dystonic posturing in seizures of mesial temporal origin: electroclinical and metabolic patterns. *Neurology.* 22 nov 2005;65(10):1612-9.
21. Dupont S, Semah F, Baulac M, Samson Y. The underlying pathophysiology of ictal dystonia in temporal lobe epilepsy: an FDG-PET study. *Neurology.* nov 1998;51(5):1289-92.
22. Samson S. [Epilepsy: role of neuropsychological evaluation]. *Neurochirurgie.* mai 2008;54(3):236-9.
23. Dupont S, Samson Y, Van de Moortele PF, Samson S, Poline JB, Hasboun D, et al. Bilateral hemispheric alteration of memory processes in right medial temporal lobe epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* nov 2002;73(5):478-85.
24. Dupont S. Imaging memory and predicting postoperative memory decline in temporal lobe epilepsy: Insights from functional imaging. *Rev Neurol (Paris).* mars 2015;171(3):307-14.
25. Dupont S. Investigating temporal pole function by functional imaging. *Epileptic Disord.* sept 2002;4 Suppl 1:S17-22.
26. Dupont S, Samson Y, Le Bihan D, Baulac M. Anatomy of verbal memory: a functional MRI study. *Surg Radiol Anat.* févr 2002;24(1):57-63.
27. Dupont S, Samson Y, Van de Moortele PF, Samson S, Poline JB, Adam C, et al. Delayed verbal memory retrieval: a functional MRI study in epileptic patients with structural lesions of the left medial temporal lobe. *Neuroimage.* nov 2001;14(5):995-1003.
28. Dupont S, Van de Moortele PF, Samson S, Hasboun D, Poline JB, Adam C, et al. Episodic memory in left temporal lobe epilepsy: a functional MRI study. *Brain.* août 2000;123 (Pt 8):1722-32.
29. Richardson MP, Strange BA, Thompson PJ, Baxendale SA, Duncan JS, Dolan RJ. Pre-operative verbal memory fMRI predicts post-operative memory decline after left temporal lobe resection. *Brain.* nov 2004;127(Pt 11):2419-26.
30. Richardson MP, Strange BA, Duncan JS, Dolan RJ. Memory fMRI in left hippocampal sclerosis: optimizing the approach to predicting postsurgical memory. *Neurology.* 14 mars 2006;66(5):699-705.
31. Kohler C, Norstrand JA, Baltuch G, O'Connor MJ, Gur RE, French JA, et al. Depression in temporal lobe epilepsy before epilepsy surgery. *Epilepsia.* mars 1999;40(3):336-40.
32. Tellez-Zenteno JF, Patten SB, Jetté N, Williams J, Wiebe S. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia.* déc 2007;48(12):2336-44.
33. Williamson PD, French JA, Thadani VM, Kim JH, Novelly RA, Spencer SS, et al. Characteristics of medial temporal lobe epilepsy: II. Interictal and ictal scalp electroencephalography, neuropsychological testing, neuroimaging, surgical results, and

pathology. *Ann Neurol.* déc 1993;34(6):781-7.

34. Wieser HG, Blume WT, Fish D, Goldensohn E, Hufnagel A, King D, et al. ILAE Commission Report. Proposal for a new classification of outcome with respect to epileptic seizures following epilepsy surgery. *Epilepsia.* févr 2001;42(2):282-6.
35. Mathon B, Clemenceau S, Hasboun D, Habert MO, Belaid H, Nguyen-Michel VH, et al. Safety profile of intracranial electrode implantation for video-EEG recordings in drug-resistant focal epilepsy. *J Neurol.* déc 2015;262(12):2699-712.
36. Velasco AL, Wilson CL, Babb TL, Engel J. Functional and anatomic correlates of two frequently observed temporal lobe seizure-onset patterns. *Neural Plast.* 2000;7(1-2):49-63.
37. Lüders HO, Najm I, Nair D, Widdess-Walsh P, Bingman W. The epileptogenic zone: general principles. *Epileptic Disord.* août 2006;8 Suppl 2:S1-9.
38. Lucignani G, Tassi L, Fazio F, Galli L, Grana C, Del Sole A, et al. Double-blind stereo-EEG and FDG PET study in severe partial epilepsies: are the electric and metabolic findings related? *Eur J Nucl Med.* nov 1996;23(11):1498-507.
39. Semah F, Baulac M, Hasboun D, Frouin V, Mangin JF, Papageorgiou S, et al. Is interictal temporal hypometabolism related to mesial temporal sclerosis? A positron emission tomography/magnetic resonance imaging confrontation. *Epilepsia.* mai 1995;36(5):447-56.
40. Chassoux F, Chiron C. [Positron emission tomography: which indications, which benefits?]. *Neurochirurgie.* mai 2008;54(3):219-25.
41. Duncan JS. Imaging and epilepsy. *Brain.* févr 1997;120 (Pt 2):339-77.
42. Dupont S, Ottaviani M, Thivard L, Semah F, Samson Y, Baulac M. Temporal pole hypometabolism may be linked to a reduction of grey matter in temporal lobe epilepsy. *Neuroreport.* 20 déc 2002;13(18):2537-41.
43. Dupont S, Croizé AC, Semah F, Hasboun D, Samson Y, Clémenceau S, et al. Is amygdalohippocampectomy really selective in medial temporal lobe epilepsy? A study using positron emission tomography with (18)fluorodeoxyglucose. *Epilepsia.* juin 2001;42(6):731-40.
44. Dupont S, Semah F, Clémenceau S, Adam C, Baulac M, Samson Y. Accurate prediction of postoperative outcome in mesial temporal lobe epilepsy: a study using positron emission tomography with 18fluorodeoxyglucose. *Arch Neurol.* sept 2000;57(9):1331-6.
45. Devous MD, Leroy RF, Homan RW. Single photon emission computed tomography in epilepsy. *Semin Nucl Med.* oct 1990;20(4):325-41.
46. Ho SS, Berkovic SF, McKay WJ, Kalnins RM, Bladin PF. Temporal lobe epilepsy subtypes: differential patterns of cerebral perfusion on ictal SPECT. *Epilepsia.* août 1996;37(8):788-95.
47. Huberfeld G, Habert MO, Clemenceau S, Maksud P, Baulac M, Adam C. Ictal brain hyperperfusion contralateral to seizure onset: the SPECT mirror image. *Epilepsia.* janv 2006;47(1):123-33.
48. Habert MO, Huberfeld G. [Ictal single photon computed tomography and SISCOM: methods and utility]. *Neurochirurgie.* mai 2008;54(3):226-30.
49. Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Bartolomei F, Bernasconi A, et al. International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia.* juill 2013;54(7):1315-29.
50. Deleo F, Garbelli R, Milesi G, Gozzo F, Bramerio M, Villani F, et al. Short- and long-term surgical outcomes of temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis: Relationships with neuropathology. *Epilepsia.* févr 2016;57(2):306-15.

51. Isnard J, Bourdillon P. Morphological imaging of the hippocampus in epilepsy. *Rev Neurol (Paris)*. mars 2015;171(3):298-306.
52. Hasboun D, Chantôme M, Zouaoui A, Sahel M, Deladoeuille M, Sourour N, et al. MR determination of hippocampal volume: comparison of three methods. *AJNR Am J Neuroradiol*. juill 1996;17(6):1091-8.
53. Oppenheim C, Dormont D, Biondi A, Lehericy S, Hasboun D, Clémenceau S, et al. Loss of digitations of the hippocampal head on high-resolution fast spin-echo MR: a sign of mesial temporal sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. mars 1998;19(3):457-63.
54. Scheltens P, Leys D, Barkhof F, Huglo D, Weinstein HC, Vermersch P, et al. Atrophy of medial temporal lobes on MRI in « probable » Alzheimer's disease and normal ageing: diagnostic value and neuropsychological correlates. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. oct 1992;55(10):967-72.
55. Cascino GD, Jack CR, Parisi JE, Sharbrough FW, Hirschorn KA, Meyer FB, et al. Magnetic resonance imaging-based volume studies in temporal lobe epilepsy: pathological correlations. *Ann Neurol*. juill 1991;30(1):31-6.
56. Kim H, Besson P, Colliot O, Bernasconi A, Bernasconi N. Surface-based vector analysis using heat equation interpolation: a new approach to quantify local hippocampal volume changes. *Med Image Comput Comput Assist Interv*. 2008;11(Pt 1):1008-15.
57. Chabardès S, Kahane P, Minotti L, Tassi L, Grand S, Hoffmann D, et al. The temporopolar cortex plays a pivotal role in temporal lobe seizures. *Brain*. août 2005;128(Pt 8):1818-31.
58. Lehericy S, Dormont D, Sémah F, Clémenceau S, Granat O, Marsault C, et al. Developmental abnormalities of the medial temporal lobe in patients with temporal lobe epilepsy. *AJNR Am J Neuroradiol*. avr 1995;16(4):617-26.
59. Baulac M, De Grissac N, Hasboun D, Oppenheim C, Adam C, Arzimanoglou A, et al. Hippocampal developmental changes in patients with partial epilepsy: magnetic resonance imaging and clinical aspects. *Ann Neurol*. août 1998;44(2):223-33.
60. Peltier B, Hurtevent P, Trehan G, Derambure P, Pruvo JP, Soto-Ares G. [MRI of hippocampal malformations in patients with intractable temporal lobe epilepsy]. *J Radiol*. janv 2005;86(1):69-75.
61. Kuzniecky R, Palmer C, Hugg J, Martin R, Sawrie S, Morawetz R, et al. Magnetic resonance spectroscopic imaging in temporal lobe epilepsy: neuronal dysfunction or cell loss? *Arch Neurol*. déc 2001;58(12):2048-53.
62. Mathon B, Bédos Ulvin L, Adam C, Baulac M, Dupont S, Navarro V, et al. Surgical treatment for mesial temporal lobe epilepsy associated with hippocampal sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. mars 2015;171(3):315-25.
63. Wiebe S, Blume WT, Girvin JP, Eliasziw M, Effectiveness and Efficiency of Surgery for Temporal Lobe Epilepsy Study Group. A randomized, controlled trial of surgery for temporal-lobe epilepsy. *N Engl J Med*. 2 août 2001;345(5):311-8.
64. McIntosh AM, Wilson SJ, Berkovic SF. Seizure outcome after temporal lobectomy: current research practice and findings. *Epilepsia*. oct 2001;42(10):1288-307.
65. Ladino LD, Hernández-Ronquillo L, Téllez-Zenteno JF. Management of antiepileptic drugs following epilepsy surgery: a meta-analysis. *Epilepsy Res*. mai 2014;108(4):765-74.
66. Mathon B, Clémenceau S. Surgery procedures in temporal lobe epilepsies. *Handb Clin Neurol*. 2022;187:531-56.
67. Barbaro NM, Quigg M, Broshek DK, Ward MM, Lamborn KR, Laxer KD, et al. A multicenter, prospective pilot study of gamma knife radiosurgery for mesial temporal lobe

epilepsy: seizure response, adverse events, and verbal memory. *Ann Neurol.* févr 2009;65(2):167-75.

68. Régis J, Rey M, Bartolomei F, Vladyka V, Liscak R, Schröttner O, et al. Gamma knife surgery in mesial temporal lobe epilepsy: a prospective multicenter study. *Epilepsia.* mai 2004;45(5):504-15.

69. Barbaro NM, Quigg M, Ward MM, Chang EF, Broshek DK, Langfitt JT, et al. Radiosurgery versus open surgery for mesial temporal lobe epilepsy: The randomized, controlled ROSE trial. *Epilepsia.* 2018;59(6):1198-207.

70. Wu C, Jermakowicz WJ, Chakravorti S, Cajigas I, Sharan AD, Jagid JR, et al. Effects of surgical targeting in laser interstitial thermal therapy for mesial temporal lobe epilepsy: A multicenter study of 234 patients. *Epilepsia.* 2019;60(6):1171-83.

71. Donos C, Breier J, Friedman E, Rollo P, Johnson J, Moss L, et al. Laser ablation for mesial temporal lobe epilepsy: Surgical and cognitive outcomes with and without mesial temporal sclerosis. *Epilepsia.* 2018;59(7):1421-32.

72. Fisher RS. Direct brain stimulation is an effective therapy for epilepsy. *Neurology.* 27 sept 2011;77(13):1220-1.

73. Vonck K, Sprengers M, Carrette E, Dauwe I, Miatton M, Meurs A, et al. A decade of experience with deep brain stimulation for patients with refractory medial temporal lobe epilepsy. *Int J Neural Syst.* févr 2013;23(1):1250034.

74. Boëx C, Seeck M, Vulliémoz S, Rossetti AO, Staedler C, Spinelli L, et al. Chronic deep brain stimulation in mesial temporal lobe epilepsy. *Seizure.* juill 2011;20(6):485-90.

75. Cukiert A, Cukiert CM, Burattini JA, Mariani PP, Bezerra DF. Seizure outcome after hippocampal deep brain stimulation in patients with refractory temporal lobe epilepsy: A prospective, controlled, randomized, double-blind study. *Epilepsia.* 2017;58(10):1728-33.

76. Cukiert A, Cukiert CM, Burattini JA, Lima AM. Seizure outcome after hippocampal deep brain stimulation in a prospective cohort of patients with refractory temporal lobe epilepsy. *Seizure.* janv 2014;23(1):6-9.

77. Vincent P, Mulle C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience.* 12 janv 2009;158(1):309-23.

78. Calderon-Garcidueñas AL, Mathon B, Lévy P, Bertrand A, Mokhtari K, Samson V, et al. New clinicopathological associations and histoprognostic markers in ILAE types of hippocampal sclerosis. *Brain Pathol.* 2018;28(5):644-55.

79. Ben-Ari Y, Cossart R. Kainate, a double agent that generates seizures: two decades of progress. *Trends Neurosci.* nov 2000;23(11):580-7.

80. Sloviter RS. Hippocampal epileptogenesis in animal models of mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis: the importance of the « latent period » and other concepts. *Epilepsia.* déc 2008;49 Suppl 9:85-92.

81. Depaulis A, Hamelin S. Animal models for mesiotemporal lobe epilepsy: The end of a misunderstanding? *Rev Neurol (Paris).* mars 2015;171(3):217-26.

82. Pernot F, Heinrich C, Barbier L, Peinnequin A, Carpentier P, Dhote F, et al. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* déc 2011;52(12):2315-25.

83. Riban V, Boulleret V, Pham-Lê BT, Fritschy JM, Marescaux C, Depaulis A. Evolution of hippocampal epileptic activity during the development of hippocampal sclerosis in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 2002;112(1):101-11.

84. Suzuki F, Junier MP, Guilhem D, Sørensen JC, Onteniente B. Morphogenetic effect of

kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*. févr 1995;64(3):665-74.

85. Heinrich C, Nitta N, Flubacher A, Müller M, Fahrner A, Kirsch M, et al. Reelin deficiency and displacement of mature neurons, but not neurogenesis, underlie the formation of granule cell dispersion in the epileptic hippocampus. *J Neurosci*. 26 avr 2006;26(17):4701-13.

86. Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, et al. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis*. avr 2011;42(1):35-47.

87. Langlois M, Polack PO, Bernard H, David O, Charpier S, Depaulis A, et al. Involvement of the thalamic parafascicular nucleus in mesial temporal lobe epilepsy. *J Neurosci*. 8 déc 2010;30(49):16523-35.

88. Hamelin S, Pouyatos B, Khalaf-Nazzal R, Chabrol T, Francis F, David O, et al. Long-term modifications of epileptogenesis and hippocampal rhythms after prolonged hyperthermic seizures in the mouse. *Neurobiol Dis*. sept 2014;69:156-68.

89. Burgess A, Dubey S, Yeung S, Hough O, Eterman N, Aubert I, et al. Alzheimer disease in a mouse model: MR imaging-guided focused ultrasound targeted to the hippocampus opens the blood-brain barrier and improves pathologic abnormalities and behavior. *Radiology*. déc 2014;273(3):736-45.

90. Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 30 mars 1962;135(3509):1127-8.

91. Altman J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec*. avr 1963;145:573-91.

92. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol*. juin 1965;124(3):319-35.

93. Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*. oct 2000;1(1):67-73.

94. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. nov 1998;4(11):1313-7.

95. Vescovi AL, Galli R, Reynolds BA. Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer*. juin 2006;6(6):425-36.

96. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. juin 2007;8(6):481-8.

97. Lunion S. Enrichissement environnemental, performances cognitives et neurogenèse hippocampique adulte chez un modèle murin du syndrome de Coffin-Lowry. Thèse de Doctorat en Neurosciences - Université Paris 11; 2014.

98. Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*. 22 févr 2008;132(4):645-60.

99. Bonaguidi MA, Song J, Ming GL, Song H. A unifying hypothesis on mammalian neural stem cell properties in the adult hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*. oct 2012;22(5):754-61.

100. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*. nov 2007;1(5):515-28.

101. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*. août 2004;27(8):447-52.

102. Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*. 4 janv

2006;26(1):3-11.

103. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol.* févr 2008;18(1):108-15.
104. Gu Y, Arruda-Carvalho M, Wang J, Janoschka SR, Josselyn SA, Frankland PW, et al. Optical controlling reveals time-dependent roles for adult-born dentate granule cells. *Nat Neurosci.* déc 2012;15(12):1700-6.
105. de Miranda AS, Zhang CJ, Katsumoto A, Teixeira AL. Hippocampal adult neurogenesis: Does the immune system matter? *J Neurol Sci.* 15 janv 2017;372:482-95.
106. Toda T, Gage FH. Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell Tissue Res.* sept 2018;373(3):693-709.
107. Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. *J Neurosci.* 18 nov 2009;29(46):14484-95.
108. Bekiari C, Grivas I, Tsingotjidou A, Papadopoulos GC. Adult neurogenesis and gliogenesis in the dorsal and ventral canine hippocampus. *J Comp Neurol.* mai 2020;528(7):1216-30.
109. Lafenetre P, Leske O, Wahle P, Heumann R. The beneficial effects of physical activity on impaired adult neurogenesis and cognitive performance. *Front Neurosci.* 2011;5:51.
110. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 nov 1999;96(23):13427-31.
111. Nithianantharajah J, Hannan AJ. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* sept 2006;7(9):697-709.
112. Sale A, Berardi N, Maffei L. Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy. *Physiol Rev.* janv 2014;94(1):189-234.
113. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature.* 3 avr 1997;386(6624):493-5.
114. Tashiro A, Makino H, Gage FH. Experience-specific functional modification of the dentate gyrus through adult neurogenesis: a critical period during an immature stage. *J Neurosci.* 21 mars 2007;27(12):3252-9.
115. Snyder JS, Glover LR, Sanzone KM, Kamhi JF, Cameron HA. The effects of exercise and stress on the survival and maturation of adult-generated granule cells. *Hippocampus.* oct 2009;19(10):898-906.
116. Wong-Goodrich SJE, Pfau ML, Flores CT, Fraser JA, Williams CL, Jones LW. Voluntary running prevents progressive memory decline and increases adult hippocampal neurogenesis and growth factor expression after whole-brain irradiation. *Cancer Res.* 15 nov 2010;70(22):9329-38.
117. Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, et al. The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neuroscience.* 2006;139(4):1173-85.
118. Ben Abdallah NMB, Slomianka L, Vyssotski AL, Lipp HP. Early age-related changes in adult hippocampal neurogenesis in C57 mice. *Neurobiol Aging.* janv 2010;31(1):151-61.
119. Lee SW, Clemenson GD, Gage FH. New neurons in an aged brain. *Behav Brain Res.* 14 févr 2012;227(2):497-507.
120. Schoenfeld TJ, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol.* janv 2012;233(1):12-21.
121. Thomas RM, Hotsenpiller G, Peterson DA. Acute psychosocial stress reduces cell

survival in adult hippocampal neurogenesis without altering proliferation. *J Neurosci.* 14 mars 2007;27(11):2734-43.

122. Yap JJ, Takase LF, Kochman LJ, Fornal CA, Miczek KA, Jacobs BL. Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus. *Behav Brain Res.* 25 sept 2006;172(2):344-50.

123. Czéh B, Müller-Keuker JH, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, et al. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology.* juill 2007;32(7):1490-503.

124. Sandoval CJ, Martínez-Claros M, Bello-Medina PC, Pérez O, Ramírez-Amaya V. When are new hippocampal neurons, born in the adult brain, integrated into the network that processes spatial information? *PLoS One.* 9 mars 2011;6(3):e17689.

125. Ramirez-Amaya V, Marrone DF, Gage FH, Worley PF, Barnes CA. Integration of new neurons into functional neural networks. *J Neurosci.* 22 nov 2006;26(47):12237-41.

126. Waddell J, Anderson ML, Shors TJ. Changing the rate and hippocampal dependence of trace eyeblink conditioning: slow learning enhances survival of new neurons. *Neurobiol Learn Mem.* févr 2011;95(2):159-65.

127. Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci.* mars 1999;2(3):260-5.

128. Hairston IS, Little MTM, Scanlon MD, Barakat MT, Palmer TD, Sapolsky RM, et al. Sleep restriction suppresses neurogenesis induced by hippocampus-dependent learning. *J Neurophysiol.* déc 2005;94(6):4224-33.

129. Epp JR, Spritzer MD, Galea L a. M. Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience.* 26 oct 2007;149(2):273-85.

130. Trouche S, Bontempi B, Roullet P, Rampon C. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 7 avr 2009;106(14):5919-24.

131. Veyrac A, Gros A, Bruel-Jungerman E, Rochefort C, Kleine Borgmann FB, Jessberger S, et al. Zif268/egr1 gene controls the selection, maturation and functional integration of adult hippocampal newborn neurons by learning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 avr 2013;110(17):7062-7.

132. Epp JR, Chow C, Galea LAM. Hippocampus-dependent learning influences hippocampal neurogenesis. *Front Neurosci.* 2013;7:57.

133. Leuner B, Waddell J, Gould E, Shors TJ. Temporal discontinuity is neither necessary nor sufficient for learning-induced effects on adult neurogenesis. *J Neurosci.* 27 déc 2006;26(52):13437-42.

134. Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, et al. Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol.* août 2007;5(8):e214.

135. Cardoso G, Gomes-Leal W, Franco E, Gomes G. Compensatory hippocampal neurogenesis in the absence of cognitive impairment following experimental hippocampectomy in adult rats. *BioRxiv.* 2020;

136. Parent JM, Lowenstein DH. Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog Brain Res.* 2002;135:121-31.

137. McCloskey DP, Hintz TM, Pierce JP, Scharfman HE. Stereological methods reveal the robust size and stability of ectopic hilar granule cells after pilocarpine-induced status

epilepticus in the adult rat. *Eur J Neurosci.* oct 2006;24(8):2203-10.

138. Parent JM, Elliott RC, Pleasure SJ, Barbaro NM, Lowenstein DH. Aberrant seizure-induced neurogenesis in experimental temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol.* janv 2006;59(1):81-91.

139. Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL. Granule-like neurons at the hilar/CA3 border after status epilepticus and their synchrony with area CA3 pyramidal cells: functional implications of seizure-induced neurogenesis. *J Neurosci.* 15 août 2000;20(16):6144-58.

140. Dashtipour K, Tran PH, Okazaki MM, Nadler JV, Ribak CE. Ultrastructural features and synaptic connections of hilar ectopic granule cells in the rat dentate gyrus are different from those of granule cells in the granule cell layer. *Brain Res.* 2 févr 2001;890(2):261-71.

141. Ribak CE, Tran PH, Spigelman I, Okazaki MM, Nadler JV. Status epilepticus-induced hilar basal dendrites on rodent granule cells contribute to recurrent excitatory circuitry. *J Comp Neurol.* 11 déc 2000;428(2):240-53.

142. Scharfman HE, Smith KL, Goodman JH, Sollas AL. Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. *Neuroscience.* 2001;104(3):741-59.

143. Pierce JP, Punsoni M, McCloskey DP, Scharfman HE. Mossy cell axon synaptic contacts on ectopic granule cells that are born following pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett.* 11 juill 2007;422(2):136-40.

144. Cho KO, Lybrand ZR, Ito N, Brulet R, Tafacory F, Zhang L, et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat Commun.* 26 mars 2015;6:6606.

145. Pierce JP, McCloskey DP, Scharfman HE. Morphometry of hilar ectopic granule cells in the rat. *J Comp Neurol.* 15 avr 2011;519(6):1196-218.

146. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* sept 2006;1(3):223-36.

147. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. [Biology of the blood-brain barrier: Part I]. *Rev Neurol (Paris).* nov 2009;165(11):863-74.

148. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol.* juin 2002;38(6):323-37.

149. Murakami N, Sakata Y, Watanabe T. Central action sites of interleukin-1 beta for inducing fever in rabbits. *J Physiol.* sept 1990;428:299-312.

150. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* avr 2009;1788(4):842-57.

151. McKinley MJ, McAllen RM, Davern P, Giles ME, Penschow J, Sunn N, et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2003;172:III-XII, 1-122, back cover.

152. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* déc 2013;19(12):1584-96.

153. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* juin 2004;16(1):1-13.

154. Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* nov 2009;31(4):497-511.

155. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. [Implication of the blood-brain barrier in neurological diseases: part II]. *Rev Neurol (Paris).* déc 2009;165(12):1010-22.

156. Rigau V, Morin M, Rousset MC, de Bock F, Lebrun A, Coubes P, et al. Angiogenesis is associated with blood-brain barrier permeability in temporal lobe epilepsy. *Brain*. juill 2007;130(Pt 7):1942-56.
157. van Vliet EA, da Costa Araújo S, Redeker S, van Schaik R, Aronica E, Gorter JA. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*. févr 2007;130(Pt 2):521-34.
158. Librizzi L, Regondi MC, Pastori C, Frigerio S, Frassoni C, de Curtis M. Expression of adhesion factors induced by epileptiform activity in the endothelium of the isolated guinea pig brain in vitro. *Epilepsia*. avr 2007;48(4):743-51.
159. Milikovsky DZ, Ofer J, Senatorov VV, Friedman AR, Prager O, Sheintuch L, et al. Paroxysmal slow cortical activity in Alzheimer's disease and epilepsy is associated with blood-brain barrier dysfunction. *Sci Transl Med*. 04 2019;11(521).
160. Sisodiya SM, Lin WR, Harding BN, Squier MV, Thom M. Drug resistance in epilepsy: expression of drug resistance proteins in common causes of refractory epilepsy. *Brain*. janv 2002;125(Pt 1):22-31.
161. Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, et al. Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*. déc 2001;42(12):1501-6.
162. Löscher W, Potschka H. Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci*. août 2005;6(8):591-602.
163. Löscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol*. mai 2005;76(1):22-76.
164. Rizzi M, Caccia S, Guiso G, Richichi C, Gorter JA, Aronica E, et al. Limbic seizures induce P-glycoprotein in rodent brain: functional implications for pharmacoresistance. *J Neurosci*. 15 juill 2002;22(14):5833-9.
165. Clinckers R, Smolders I, Meurs A, Ebinger G, Michotte Y. Quantitative in vivo microdialysis study on the influence of multidrug transporters on the blood-brain barrier passage of oxcarbazepine: concomitant use of hippocampal monoamines as pharmacodynamic markers for the anticonvulsant activity. *J Pharmacol Exp Ther*. août 2005;314(2):725-31.
166. Summers MA, Moore JL, McAuley JW. Use of verapamil as a potential P-glycoprotein inhibitor in a patient with refractory epilepsy. *Ann Pharmacother*. oct 2004;38(10):1631-4.
167. Beccaria K, Canney M, Goldwirt L, Fernandez C, Piquet J, Perier MC, et al. Ultrasound-induced opening of the blood-brain barrier to enhance temozolomide and irinotecan delivery: an experimental study in rabbits. *J Neurosurg*. juin 2016;124(6):1602-10.
168. Beccaria K, Canney M, Goldwirt L, Fernandez C, Adam C, Piquet J, et al. Opening of the blood-brain barrier with an unfocused ultrasound device in rabbits. *J Neurosurg*. oct 2013;119(4):887-98.
169. Monteith S, Sheehan J, Medel R, Wintermark M, Eames M, Snell J, et al. Potential intracranial applications of magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery. *J Neurosurg*. févr 2013;118(2):215-21.
170. Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, et al. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med*. 15 2016;8(343):343re2.
171. Idbaih A, Canney M, Belin L, Desseaux C, Vignot A, Bouchoux G, et al. Safety and Feasibility of Repeated and Transient Blood-Brain Barrier Disruption by Pulsed Ultrasound in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 1 juill 2019;25(13):3793-801.

172. Dréan A, Lemaire N, Bouchoux G, Goldwirt L, Canney M, Goli L, et al. Temporary blood-brain barrier disruption by low intensity pulsed ultrasound increases carboplatin delivery and efficacy in preclinical models of glioblastoma. *J Neurooncol.* août 2019;144(1):33-41.
173. Horodyckid C, Canney M, Vignot A, Boisgard R, Drier A, Huberfeld G, et al. Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J Neurosurg.* avr 2017;126(4):1351-61.
174. Tufail Y, Matyushov A, Baldwin N, Tauchmann ML, Georges J, Yoshihiro A, et al. Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits. *Neuron.* 10 juin 2010;66(5):681-94.
175. Scarcelli T, Jordão JF, O'Reilly MA, Ellens N, Hynynen K, Aubert I. Stimulation of hippocampal neurogenesis by transcranial focused ultrasound and microbubbles in adult mice. *Brain Stimul.* avr 2014;7(2):304-7.
176. Shin J, Kong C, Lee J, Choi BY, Sim J, Koh CS, et al. Focused ultrasound-induced blood-brain barrier opening improves adult hippocampal neurogenesis and cognitive function in a cholinergic degeneration dementia rat model. *Alzheimers Res Ther.* 27 2019;11(1):110.
177. Mooney SJ, Nobrega JN, Levitt AJ, Hynynen K. Antidepressant effects of focused ultrasound induced blood-brain-barrier opening. *Behav Brain Res.* 16 2018;342:57-61.
178. Mooney SJ, Shah K, Yeung S, Burgess A, Aubert I, Hynynen K. Focused Ultrasound-Induced Neurogenesis Requires an Increase in Blood-Brain Barrier Permeability. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159892.
179. Mathew A, Gorick C, Thim A, Garrison W, Wilson Miller G, Sheybani N, et al. Transcriptomic response of brain tissue to focused ultrasound-mediated blood-brain barrier disruption depends strongly on anesthesia. *Focused Ultrasound Foundation Virtual Meeting.* 2020;
180. Sheikov N, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz F, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol.* juill 2004;30(7):979-89.
181. Chongsathidkiet P, Jackson C, Koyama S, Loebel F, Cui X, Farber SH, et al. Sequestration of T cells in bone marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors. *Nat Med.* 2018;24(9):1459-68.
182. Hsu YH, Liu RS, Lin WL, Yuh YS, Lin SP, Wong TT. Transcranial pulsed ultrasound facilitates brain uptake of laronidase in enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type I disease. *Orphanet J Rare Dis.* 08 2017;12(1):109.
183. Alkins R, Burgess A, Ganguly M, Francia G, Kerbel R, Wels WS, et al. Focused ultrasound delivers targeted immune cells to metastatic brain tumors. *Cancer Res.* 15 mars 2013;73(6):1892-9.
184. Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Targeted delivery of antibodies through the blood-brain barrier by MRI-guided focused ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun.* 24 févr 2006;340(4):1085-90.
185. Janowicz PW, Leinenga G, Götz J, Nisbet RM. Ultrasound-mediated blood-brain barrier opening enhances delivery of therapeutically relevant formats of a tau-specific antibody. *Sci Rep.* 25 2019;9(1):9255.
186. Leinenga G, Götz J. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci Transl Med.* 11 mars 2015;7(278):278ra33.
187. Cohen-Inbar O, Xu Z, Sheehan JP. Focused ultrasound-aided immunomodulation in glioblastoma multiforme: a therapeutic concept. *J Ther Ultrasound.* 2016;4:2.
188. Jordão JF, Thévenot E, Markham-Coultes K, Scarcelli T, Weng YQ, Xhima K, et al.

Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound. *Exp Neurol.* oct 2013;248:16-29.

189. Stavarache MA, Petersen N, Jurgens EM, Milstein ER, Rosenfeld ZB, Ballon DJ, et al. Safe and stable noninvasive focal gene delivery to the mammalian brain following focused ultrasound. *J Neurosurg.* 27 2018;130(3):989-98.

190. Hsu PH, Wei KC, Huang CY, Wen CJ, Yen TC, Liu CL, et al. Noninvasive and targeted gene delivery into the brain using microbubble-facilitated focused ultrasound. *PLoS One.* 2013;8(2):e57682.

191. Liu HL, Wai YY, Hsu PH, Lyu LA, Wu JS, Shen CR, et al. In vivo assessment of macrophage CNS infiltration during disruption of the blood-brain barrier with focused ultrasound: a magnetic resonance imaging study. *J Cereb Blood Flow Metab.* janv 2010;30(1):177-86.

192. Kovacs ZI, Kim S, Jikaria N, Qureshi F, Milo B, Lewis BK, et al. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 03 2017;114(1):E75-84.

193. Zhu L, Cheng G, Ye D, Nazeri A, Yue Y, Liu W, et al. Focused Ultrasound-enabled Brain Tumor Liquid Biopsy. *Sci Rep.* 26 2018;8(1):6553.

194. Chen PY, Wei KC, Liu HL. Neural immune modulation and immunotherapy assisted by focused ultrasound induced blood-brain barrier opening. *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(11):2682-7.

195. Alkins R, Burgess A, Kerbel R, Wels WS, Hynynen K. Early treatment of HER2-amplified brain tumors with targeted NK-92 cells and focused ultrasound improves survival. *Neuro Oncol.* 2016;18(7):974-81.

196. Min BK, Bystritsky A, Jung KI, Fischer K, Zhang Y, Maeng LS, et al. Focused ultrasound-mediated suppression of chemically-induced acute epileptic EEG activity. *BMC Neurosci.* 6 mars 2011;12:23.

197. Hakimova H, Kim S, Chu K, Lee SK, Jeong B, Jeon D. Ultrasound stimulation inhibits recurrent seizures and improves behavioral outcome in an experimental model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav.* août 2015;49:26-32.

198. Li X, Yang H, Yan J, Wang X, Li X, Yuan Y. Low-Intensity Pulsed Ultrasound Stimulation Modulates the Nonlinear Dynamics of Local Field Potentials in Temporal Lobe Epilepsy. *Front Neurosci.* 2019;13:287.

199. Li X, Yang H, Yan J, Wang X, Yuan Y, Li X. Seizure control by low-intensity ultrasound in mice with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2019;154:1-7.

200. Zhang Z, Qiu W, Gong H, Li G, Jiang Q, Liang P, et al. Low-intensity ultrasound suppresses low-Mg²⁺-induced epileptiform discharges in juvenile mouse hippocampal slices. *J Neural Eng.* 2019;16(3):036006.

201. Bex A, Bex V, Carpentier A, Mathon B. Therapeutic ultrasound: The future of epilepsy surgery? *Rev Neurol (Paris).* 16 juill 2022;S0035-3787(22)00641-5.

202. Toledano R, Campo P, Gil-Nagel A. Temporal pole epilepsy: Do not forget to look for occult encephaloceles. *Epilepsia.* déc 2020;61(12):2859-60.

203. Lee JE, Lee N, Kim T, Kim J, Hyeon T. Multifunctional mesoporous silica nanocomposite nanoparticles for theranostic applications. *Acc Chem Res.* 18 oct 2011;44(10):893-902.

204. Shaalan M, Saleh M, El-Mahdy M, El-Matbouli M. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine.* avr 2016;12(3):701-10.

205. Khlebtsov N, Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles:

a review of in vitro and in vivo studies. *Chem Soc Rev.* mars 2011;40(3):1647-71.

206. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 9 févr 1973;179(4073):588-90.

207. www.lelementarium.fr.

208. Clark LC, Combs GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, et al. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA.* 25 déc 1996;276(24):1957-63.

209. Hurwitz BE, Klaus JR, Llabre MM, Gonzalez A, Lawrence PJ, Maher KJ, et al. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 viral load with selenium supplementation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.* 22 janv 2007;167(2):148-54.

210. Landucci F, Mancinelli P, De Gaudio AR, Virgili G. Selenium supplementation in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. *J Crit Care.* févr 2014;29(1):150-6.

211. Rayman MP. Selenium and human health. *Lancet.* 31 mars 2012;379(9822):1256-68.

212. Kovács R, Schuchmann S, Gabriel S, Kann O, Kardos J, Heinemann U. Free radical-mediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol.* déc 2002;88(6):2909-18.

213. Schweizer U, Bräuer AU, Köhrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Res Brain Res Rev.* juill 2004;45(3):164-78.

214. Colegrove SL, Albrecht MA, Friel DD. Dissection of mitochondrial Ca²⁺ uptake and release fluxes in situ after depolarization-evoked [Ca²⁺]_i elevations in sympathetic neurons. *J Gen Physiol.* mars 2000;115(3):351-70.

215. Nazıroglu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res.* déc 2009;34(12):2181-91.

216. Ashrafi MR, Shabanian R, Abbaskhanian A, Nasirian A, Ghofrani M, Mohammadi M, et al. Selenium and intractable epilepsy: is there any correlation? *Pediatr Neurol.* janv 2007;36(1):25-9.

217. Ashrafi MR, Shams S, Nouri M, Mohseni M, Shabanian R, Yekaninejad MS, et al. A probable causative factor for an old problem: selenium and glutathione peroxidase appear to play important roles in epilepsy pathogenesis. *Epilepsia.* sept 2007;48(9):1750-5.

218. Seven M, Basaran SY, Cengiz M, Unal S, Yuksel A. Deficiency of selenium and zinc as a causative factor for idiopathic intractable epilepsy. *Epilepsy Res.* mars 2013;104(1-2):35-9.

219. Hamed SA, Abdallah MM, El-Melegy N. Blood levels of trace elements, electrolytes, and oxidative stress/antioxidant systems in epileptic patients. *J Pharmacol Sci.* déc 2004;96(4):465-73.

220. Jia W, Song Y, Yang L, Kong J, Boczek T, He Z, et al. The changes of serum zinc, copper, and selenium levels in epileptic patients: a systematic review and meta-analysis. *Expert Rev Clin Pharmacol.* sept 2020;13(9):1047-58.

221. Volpe SL, Schall JI, Gallagher PR, Stallings VA, Bergqvist AGC. Nutrient intake of children with intractable epilepsy compared with healthy children. *J Am Diet Assoc.* juin 2007;107(6):1014-8.

222. Chen J, Berry MJ. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem.* juill 2003;86(1):1-12.

223. Ramaekers VT, Calomme M, Vanden Berghe D, Makropoulos W. Selenium deficiency

triggering intractable seizures. *Neuropediatrics*. août 1994;25(4):217-23.

224. Weber GF, Maertens P, Meng XZ, Pippenger CE. Glutathione peroxidase deficiency and childhood seizures. *Lancet*. 15 juin 1991;337(8755):1443-4.

225. Willmore LJ, Rubin JJ. Antiperoxidant pretreatment and iron-induced epileptiform discharges in the rat: EEG and histopathologic studies. *Neurology*. janv 1981;31(1):63-9.

226. Rubin JJ, Willmore LJ. Prevention of iron-induced epileptiform discharges in rats by treatment with antiperoxidants. *Exp Neurol*. mars 1980;67(3):472-80.

227. Savaskan NE, Bräuer AU, Kühbacher M, Eyüpoglu IY, Kyriakopoulos A, Ninnemann O, et al. Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *FASEB J*. janv 2003;17(1):112-4.

228. Mohammed HS, Aboul Ezz HS, Zedan A, Ali MA. Electrophysiological and Neurochemical Assessment of Selenium Alone or Combined with Carbamazepine in an Animal Model of Epilepsy. *Biol Trace Elem Res*. juin 2020;195(2):579-90.

229. Brown MR, Cohen HJ, Lyons JM, Curtis TW, Thunberg B, Cochran WJ, et al. Proximal muscle weakness and selenium deficiency associated with long term parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr*. avr 1986;43(4):549-54.

230. Dominiak A, Wilkaniec A, Wroczyński P, Adamczyk A. Selenium in the Therapy of Neurological Diseases. Where is it Going? *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(3):282-99.

231. Rehni AK, Singh TG. Selenium induced anticonvulsant effect: a potential role of prostaglandin E(1) receptor activation linked mechanism. *J Trace Elem Med Biol*. janv 2013;27(1):31-9.

232. Solovyev ND. Importance of selenium and selenoprotein for brain function: From antioxidant protection to neuronal signalling. *J Inorg Biochem*. déc 2015;153:1-12.

233. Khurana A, Tekula S, Saifi MA, Venkatesh P, Godugu C. Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomed Pharmacother*. mars 2019;111:802-12.

234. Loeschner K, Hadrup N, Hansen M, Pereira SA, Gammelgaard B, Møller LH, et al. Absorption, distribution, metabolism and excretion of selenium following oral administration of elemental selenium nanoparticles or selenite in rats. *Metallomics*. févr 2014;6(2):330-7.

235. Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S, Fernandez C, Ruttkay-Nedecky B, Peng Q, et al. Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *Int J Nanomedicine*. 2018;13:2107-28.

236. Nazıroğlu M, Muhamad S, Pecze L. Nanoparticles as potential clinical therapeutic agents in Alzheimer's disease: focus on selenium nanoparticles. *Expert Rev Clin Pharmacol*. juill 2017;10(7):773-82.

237. Javdani M, Habibi A, Shirian S, Kojouri GA, Hosseini F. Effect of Selenium Nanoparticle Supplementation on Tissue Inflammation, Blood Cell Count, and IGF-1 Levels in Spinal Cord Injury-Induced Rats. *Biol Trace Elem Res*. janv 2019;187(1):202-11.

238. Xu B, Zhang Q, Luo X, Ning X, Luo J, Guo J, et al. Selenium nanoparticles reduce glucose metabolism and promote apoptosis of glioma cells through reactive oxygen species-dependent manner. *Neuroreport*. 5 févr 2020;31(3):226-34.

239. Yuan X, Fu Z, Ji P, Guo L, Al-Ghamdy AO, Alkandiri A, et al. Selenium Nanoparticles Pre-Treatment Reverse Behavioral, Oxidative Damage, Neuronal Loss and Neurochemical Alterations in Pentylentetrazole-Induced Epileptic Seizures in Mice. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:6339-53.

240. Mathon B, Nassar M, Simonnet J, Le Duigou C, Clemenceau S, Miles R, et al. Increasing the effectiveness of intracerebral injections in adult and neonatal mice: a

neurosurgical point of view. *Neurosci Bull.* déc 2015;31(6):685-96.

241. Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* mars 1972;32(3):281-94.

242. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today.* janv 2007;12(1-2):54-61.

243. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* janv 2010;37(1):13-25.

244. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx.* janv 2005;2(1):3-14.

245. Mendes NF, Pansani AP, Carmanhães ERF, Tange P, Meireles JV, Ochikubo M, et al. The Blood-Brain Barrier Breakdown During Acute Phase of the Pilocarpine Model of Epilepsy Is Dynamic and Time-Dependent. *Front Neurol.* 2019;10:382.

246. van Vliet EA, Aronica E, Gorter JA. Role of blood-brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience.* 26 sept 2014;277:455-73.

247. Tomkins O, Shelef I, Kaizerman I, Eliushin A, Afawi Z, Misk A, et al. Blood-brain barrier disruption in post-traumatic epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* juill 2008;79(7):774-7.

248. Scott RC. What are the effects of prolonged seizures in the brain? *Epileptic Disord.* oct 2014;16 Spec No 1:S6-11.

249. Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. *Radiology.* sept 2001;220(3):640-6.

250. Meng Y, Hynynen K, Lipsman N. Applications of focused ultrasound in the brain: from thermoablation to drug delivery. *Nat Rev Neurol.* janv 2021;17(1):7-22.

251. Lipsman N, Meng Y, Bethune AJ, Huang Y, Lam B, Masellis M, et al. Blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun.* 25 juill 2018;9(1):2336.

252. Abrahao A, Meng Y, Llinas M, Huang Y, Hamani C, Mainprize T, et al. First-in-human trial of blood-brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun.* 26 sept 2019;10(1):4373.

253. Rezai AR, Ranjan M, D'Haese PF, Haut MW, Carpenter J, Najib U, et al. Noninvasive hippocampal blood-brain barrier opening in Alzheimer's disease with focused ultrasound. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28 avr 2020;117(17):9180-2.

254. Mainprize T, Lipsman N, Huang Y, Meng Y, Bethune A, Ironside S, et al. Blood-Brain Barrier Opening in Primary Brain Tumors with Non-invasive MR-Guided Focused Ultrasound: A Clinical Safety and Feasibility Study. *Sci Rep.* 23 janv 2019;9(1):321.

255. Sabbagh A, Beccaria K, Ling X, Marisetty A, Ott M, Caruso H, et al. Opening of the Blood-Brain Barrier Using Low-Intensity Pulsed Ultrasound Enhances Responses to Immunotherapy in Preclinical Glioma Models. *Clin Cancer Res.* 24 mai 2021;

256. Uyama O, Okamura N, Yanase M, Narita M, Kawabata K, Sugita M. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence. *J Cereb Blood Flow Metab.* avr 1988;8(2):282-4.

257. Franklin K, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. compact. 3rd ed. Waltham, MA: Academic Press. 2008.

258. Oztaş B, Kaya M. The effect of acute hypertension on blood-brain barrier permeability to albumin during experimentally induced epileptic seizures. *Pharmacol Res.* janv 1991;23(1):41-6.

259. Oztaş B, Kiliç S, Dural E, Ispir T. Influence of antioxidants on the blood-brain barrier

- permeability during epileptic seizures. *J Neurosci Res.* 15 nov 2001;66(4):674-8.
260. Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* nov 2005;46(11):1724-43.
261. Gorter JA, Mesquita ARM, van Vliet EA, da Silva FHL, Aronica E. Increased expression of ferritin, an iron-storage protein, in specific regions of the parahippocampal cortex of epileptic rats. *Epilepsia.* sept 2005;46(9):1371-9.
262. Auvin S, Mazarati A, Shin D, Sankar R. Inflammation enhances epileptogenesis in the developing rat brain. *Neurobiol Dis.* oct 2010;40(1):303-10.
263. Ravizza T, Balosso S, Vezzani A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neurosci Lett.* 27 juin 2011;497(3):223-30.
264. Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci.* juin 2015;38(6):364-74.
265. Ramazi S, Fahanik-Babaei J, Mohamadi-Zarch SM, Tashakori-Miyanroudi M, Nourabadi D, Nazari-Serenjeh M, et al. Neuroprotective and anticonvulsant effects of sinomenine in kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Involvement of oxidative stress, inflammation and pyroptosis. *J Chem Neuroanat.* oct 2020;108:101800.
266. Bouilleret V, Ridoux V, Depaulis A, Marescaux C, Nehlig A, Le Gal La Salle G. Recurrent seizures and hippocampal sclerosis following intrahippocampal kainate injection in adult mice: electroencephalography, histopathology and synaptic reorganization similar to mesial temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* mars 1999;89(3):717-29.
267. Seifert G, Carmignoto G, Steinhäuser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev.* mai 2010;63(1-2):212-21.
268. Ravizza T, Gagliardi B, Noé F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* janv 2008;29(1):142-60.
269. Alonso A, Reinz E, Fatar M, Hennerici MG, Meairs S. Clearance of albumin following ultrasound-induced blood-brain barrier opening is mediated by glial but not neuronal cells. *Brain Res.* 9 sept 2011;1411:9-16.
270. Pascal A, Li N, Lechtenberg KJ, Rosenberg J, Airan RD, James ML, et al. Histologic evaluation of activation of acute inflammatory response in a mouse model following ultrasound-mediated blood-brain barrier using different acoustic pressures and microbubble doses. *Nanotheranostics.* 2020;4(4):210-23.
271. McMahon D, Hynynen K. Acute Inflammatory Response Following Increased Blood-Brain Barrier Permeability Induced by Focused Ultrasound is Dependent on Microbubble Dose. *Theranostics.* 2017;7(16):3989-4000.
272. Goertz DE. An overview of the influence of therapeutic ultrasound exposures on the vasculature: high intensity ultrasound and microbubble-mediated bioeffects. *Int J Hyperthermia.* mars 2015;31(2):134-44.
273. Beccaria K, Sabbagh A, de Groot J, Canney M, Carpentier A, Heimberger AB. Blood-brain barrier opening with low intensity pulsed ultrasound for immune modulation and immune therapeutic delivery to CNS tumors. *J Neurooncol.* janv 2021;151(1):65-73.
274. Montero AS, Bielle F, Goldwirt L, Lalot A, Bouchoux G, Canney M, et al. Ultrasound-Induced Blood-Spinal Cord Barrier Opening in Rabbits. *Ultrasound Med Biol.* sept 2019;45(9):2417-26.
275. Suarez-Castellanos IM, Dossi E, Vion-Bailly J, Salette L, Chapelon JY, Carpentier A, et al. Spatio-temporal characterization of causal electrophysiological activity stimulated by single pulse focused ultrasound: an ex vivo study on hippocampal brain slices. *J Neural Eng.* 2

mars 2021;18(2).

276. Gavrilov LR, Tsurulnikov EM, Davies IA. Application of focused ultrasound for the stimulation of neural structures. *Ultrasound Med Biol.* 1996;22(2):179-92.
277. Rinaldi PC, Jones JP, Reines F, Price LR. Modification by focused ultrasound pulses of electrically evoked responses from an in vitro hippocampal preparation. *Brain Res.* 30 août 1991;558(1):36-42.
278. Tyler WJ, Tufail Y, Finsterwald M, Tauchmann ML, Olson EJ, Majestic C. Remote excitation of neuronal circuits using low-intensity, low-frequency ultrasound. *PLoS One.* 2008;3(10):e3511.
279. Sundaram J, Mellein BR, Mitragotri S. An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J.* mai 2003;84(5):3087-101.
280. Chen SG, Tsai CH, Lin CJ, Lee CC, Yu HY, Hsieh TH, et al. Transcranial focused ultrasound pulsation suppresses pentylentetrazol induced epilepsy in vivo. *Brain Stimul.* févr 2020;13(1):35-46.
281. Dkhil MA, Zrieq R, Al-Quraishy S, Abdel Moneim AE. Selenium Nanoparticles Attenuate Oxidative Stress and Testicular Damage in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecules.* 19 nov 2016;21(11):E1517.
282. Bystritsky A, Korb AS, Douglas PK, Cohen MS, Melega WP, Mulgaonkar AP, et al. A review of low-intensity focused ultrasound pulsation. *Brain Stimul.* juill 2011;4(3):125-36.
283. Darrow DP. Focused Ultrasound for Neuromodulation. *Neurotherapeutics.* janv 2019;16(1):88-99.
284. Baek H, Pahk KJ, Kim H. A review of low-intensity focused ultrasound for neuromodulation. *Biomed Eng Lett.* mai 2017;7(2):135-42.
285. Foley JL, Little JW, Vaezy S. Image-guided high-intensity focused ultrasound for conduction block of peripheral nerves. *Ann Biomed Eng.* janv 2007;35(1):109-19.
286. Foley JL, Little JW, Vaezy S. Effects of high-intensity focused ultrasound on nerve conduction. *Muscle Nerve.* févr 2008;37(2):241-50.
287. Colucci V, Strichartz G, Jolesz F, Vykhodtseva N, Hynynen K. Focused ultrasound effects on nerve action potential in vitro. *Ultrasound Med Biol.* oct 2009;35(10):1737-47.
288. Schofield CM, Kleiman-Weiner M, Rudolph U, Huguenard JR. A gain in GABAA receptor synaptic strength in thalamus reduces oscillatory activity and absence seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 mai 2009;106(18):7630-5.
289. Dinno MA, Dyson M, Young SR, Mortimer AJ, Hart J, Crum LA. The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Phys Med Biol.* nov 1989;34(11):1543-52.
290. Al Omairi NE, Albrakati A, Alsharif KF, Almalki AS, Alsanie W, Abd Elmageed ZY, et al. Selenium Nanoparticles with Prodigiosin Rescue Hippocampal Damage Associated with Epileptic Seizures Induced by Pentylentetrazole in Rats. *Biology (Basel).* 23 févr 2022;11(3):354.
291. Albrakati A, Alsharif KF, Al Omairi NE, Alsanie WF, Almalki ASA, Abd Elmageed ZY, et al. Neuroprotective Efficiency of Prodigiosins Conjugated with Selenium Nanoparticles in Rats Exposed to Chronic Unpredictable Mild Stress is Mediated Through Antioxidative, Anti-Inflammatory, Anti-Apoptotic, and Neuromodulatory Activities. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:8447-64.
292. Pierce JP, Melton J, Punsoni M, McCloskey DP, Scharfman HE. Mossy fibers are the primary source of afferent input to ectopic granule cells that are born after pilocarpine-induced seizures. *Exp Neurol.* déc 2005;196(2):316-31.

293. Hanin A, Baudin P, Demeret S, Roussel D, Lecas S, Teyssou E, et al. Disturbances of brain cholesterol metabolism: A new excitotoxic process associated with status epilepticus. *Neurobiol Dis.* juill 2021;154:105346.
294. Licht T, Keshet E. The vascular niche in adult neurogenesis. *Mech Dev.* nov 2015;138 Pt 1:56-62.
295. Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, et al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* nov 2003;18(10):2803-12.
296. Reher P, Doan N, Bradnock B, Meghji S, Harris M. Effect of ultrasound on the production of IL-8, basic FGF and VEGF. *Cytokine.* juin 1999;11(6):416-23.
297. Jalali S, Huang Y, Dumont DJ, Hynynen K. Focused ultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: experimental study in rats. *BMC Neurol.* 15 nov 2010;10:114.
298. Li L, Xu B, Zhu Y, Chen L, Sokabe M, Chen L. DHEA prevents A β 25-35-impaired survival of newborn neurons in the dentate gyrus through a modulation of PI3K-Akt-mTOR signaling. *Neuropharmacology.* oct 2010;59(4-5):323-33.
299. Dubey S, Heinen S, Krantic S, McLaurin J, Branch DR, Hynynen K, et al. Clinically approved IVIg delivered to the hippocampus with focused ultrasound promotes neurogenesis in a model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 22 déc 2020;117(51):32691-700.
300. Jossin Y. Reelin Functions, Mechanisms of Action and Signaling Pathways During Brain Development and Maturation. *Biomolecules.* 26 juin 2020;10(6):E964.
301. Liu TT, Li Y, Shu Y, Xiao B, Feng L. Ephrin-b3 modulates hippocampal neurogenesis and the reelin signaling pathway in a pilocarpine-induced model of epilepsy. *Int J Mol Med.* juin 2018;41(6):3457-67.
302. Hamad MIK, Jbara A, Rabaya O, Petrova P, Daoud S, Melliti N, et al. Reelin signaling modulates GABAB receptor function in the neocortex. *Journal of Neurochemistry.* 2021;156(5):589-603.
303. Gong C, Wang TW, Huang HS, Parent JM. Reelin regulates neuronal progenitor migration in intact and epileptic hippocampus. *J Neurosci.* 21 févr 2007;27(8):1803-11.

RESUME

L'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique est le syndrome épileptique le plus fréquent et est connue pour sa grande pharmacorésistance. Le traitement de référence de ce syndrome est la chirurgie de résection des structures amygdalo-hippocampiques qui permet d'aboutir à l'arrêt des crises dans 80% des cas. Il existe également des alternatives chirurgicales comme la radiochirurgie et la thérapie au laser. Quelle que soit la modalité chirurgicale utilisée, celle-ci peut être associée à une morbidité postopératoire cognitive, psychiatrique et/ou neurologique pour le patient. Notre travail visait donc à évaluer, sur un modèle animal d'épilepsie mésiotemporale, une alternative thérapeutique aux techniques chirurgicales ablatives : l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par ultrasons pulsés de basse intensité, à l'aide de la plateforme préclinique SonoCloud. Nous avons par la suite couplé l'ouverture de la BHE avec l'administration de nanoparticules de Sélénium (NpSe) qui sont des molécules aux propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires qui franchissent spontanément peu la BHE.

Nous avons étudié les conséquences cliniques, électrophysiologiques et histologiques de l'ouverture ultrasonore de la BHE, associée ou non à l'injection intraveineuse de NpSe, à la fois chez des souris wild-type C57BL6/J ainsi que sur le modèle de la souris Kaïnate qui reproduit assez fidèlement les caractéristiques du syndrome d'épilepsie mésiotemporale associée à une sclérose hippocampique de l'Homme.

Nos résultats ont indiqué que les ultrasons pulsés de basse intensité, délivrés à l'aide de la plateforme préclinique SonoCloud, ouvrent de manière reproductible et transitoire la BHE chez les souris épileptiques du modèle Kaïnate, y compris lorsqu'elles sont implantées avec des électrodes intracérébrales d'enregistrement EEG. Nous avons confirmé que l'ouverture de la BHE par les ultrasons pulsés de basse intensité est transitoire et conduit à une extravasation d'albumine et à une astrogliose légère réversible dans l'hippocampe des souris non épileptiques. Fait nouveau, nous avons démontré que l'ouverture ultrasonore répétée de la BHE n'induit pas, à court terme (1 mois) de crises d'épilepsie ni d'anomalies épileptiques en EEG chez les souris non épileptiques implantées avec des électrodes profondes.

Chez les souris Kaïnate, l'extravasation transitoire d'albumine dans l'hippocampe médiée par l'ouverture ultrasonore de la BHE n'entraîne pas de changements histologiques significatifs en raison des caractéristiques histologiques et neuroinflammatoires préexistantes associées à la sclérose hippocampique. Si l'ouverture répétée de la BHE par ultrasons pulsés seule ne semble pas avoir d'effet antiépileptique significatif sur la souris Kaïnate, nous avons montré que l'ouverture répétée de la BHE couplée à l'administration IV de Nanoparticules de sélénium est sûre, bien tolérée et permet une réduction des crises épileptiques généralisées d'environ 90%. Notre travail a également permis de formuler des hypothèses expliquant ce dernier résultat. Ainsi, nous avons observé chez les souris Kaïnate traitée par ouverture ultrasonore de la BHE et Nanoparticules de Sélénium des modifications histologiques à court terme (réduction de la neurogenèse aberrante dans le hile de l'hippocampe, baisse de la mortalité neuronale sur l'ensemble de l'hippocampe) et long terme (réduction de l'activation microgliale hippocampique) qui pourraient en partie expliquer l'effet antiépileptique mis en évidence. Ces modifications histologiques peuvent être dues aux différentes propriétés des nanoparticules de sélénium : anti-inflammatoires, antioxydantes et facilitation de la neurotransmission des neurones GABAergiques qui jouent un rôle sur les voies de signalisation qui contrôlent la migration des neurones nouveau-nés depuis la niche neurogénique.