

Université Paris Descartes

Ecole doctorale : ED 158. Cerveau, Cognition, Comportement

INSERM U1129 : Epilepsies de l'enfant et plasticité cérébrale

Dysplasies corticales focales de l'enfant : localisation par imagerie de perfusion in vivo et caractérisation électrophysiologique des activités épileptiques in vitro

Thomas BLAUWBLOMME

Thèse de doctorat de Neurosciences

Dirigée par : Pr. Rima NABBOUT (PUPH - HDR)

Co direction : Dr. Gilles HUBERFELD (MCUPH – HDR)

Présentée et soutenue publiquement le 4 avril 2017

Devant un jury composé de :

Pr. Louise Tyvaert. PUPH-HDR. Rapporteur

Dr. Liset Menendez De La Prida. Directeur de Recherche - HDR. Rapporteur

Dr. Jean-Christophe Poncer. Directeur de Recherche – HDR. Examineur

Pr. Marc Guénot. PUPH – HDR. Examineur.

Je remercie particulièrement les membres du jury, le Dr Jean-Christophe Poncer qui me fait l'honneur de présider le jury, le Dr Liset Menendez de la Prida, les Pr Louise Tyvaert et le Pr. Marc Guénot, qui ont accepté d'évaluer ce travail.

Mes remerciements se portent à :

- Monsieur le Professeur Christian Sainte-Rose. Vous m'avez accompagné depuis mon internat dans le chemin difficile mais passionnant de la neurochirurgie pédiatrique, et de la chirurgie de l'épilepsie. Vous m'avez appris que vieillir, c'est passer de l'enfance à la vieillesse sans aborder l'âge adulte....
- L'ARNP et sa trésorière Mme Marié-Hélène. Muzy (association pour la recherche en neurochirurgie pédiatrique) qui a financé le système d'enregistrement MEA, grâce aux dons de mécènes anonymes et généreux.
- L'INSERM U1129, et particulièrement le Dr. Catherine Chiron, pour son aide dans l'acquisition du MEA. Mes pensées se portent vers le Dr Archambaut qui a traité les données de PETscan.
- Madame le Dr Nathalie Rouach et le CIRB du Collège de France, qui nous ont amicalement accueillis au Collège de France à la suite des péripéties de notre précédent laboratoire.
- Madame le Dr Elena Dossi, sans qui aucun des enregistrements in vitro n'aurait eu lieu. Merci Elena, d'avoir franchi la porte du bloc opératoire, et de m'avoir accompagné avec tant de gentillesse et d'indulgence dans les manip au Collège.
- Madame le Pr Nathalie Boddaert, et l'équipe « Image pour Imagine », pour leur bienveillance et leur aide inestimable dans le traitement de l'imagerie de perfusion.
- Madame le Dr Pascale Varlet, du service de neuropathologie de Sainte-Anne.
- Monsieur Dr Christophe Pellegrino à l'INMED, pour les études immuno histochimiques des co transporteurs du chlore, et les marquages des

interneurones, clé de voûte des corrélations histologiques et électrophysiologiques sur MEA.

- Au centre de référence des épilepsies rares, et notamment le Pr Nabbout et le Dr Nicole Chémaly, les membres du service de neurophysiologie et de neurochirurgie de l'hôpital Necker : le Dr Anna Kaminska, le Dr Emma Losito et le Dr Bourgeois, pour l'analyse des EEG et la sélection des patients.
- L'équipe de Grenoble : le Pr Philippe Kahane, le Dr Lorella Minotti, et le Dr Dominique Hofmann, pour leur amitié qui nous a permis de débiter la SEEG à Necker ; le Pr Stéphan Chabardes qui m'a accueilli dans son laboratoire pour mon stage de Master 2.
- Aux malades et leur famille pour leur confiance, et pour avoir accepté de participer aux protocoles de recherche.
- Au service de neurochirurgie pédiatrique, et au Pr. Stéphanie Puget en particulier pour son aide et son amitié depuis 2008.

J'exprime toute ma reconnaissance au Pr Rima Nabbout et au Dr Gilles Huberfeld qui ont dirigé cette thèse, avec patience et partagé leurs visions de la recherche en épilepsie avec moi. Souhaitons que cette collaboration se poursuive dans les prochaines années.

Je dédie ce travail à ma famille, mes parents qui ont toujours soutenu mes décisions, et m'ont éveillé tôt aux mystères du cerveau, Agnès toujours à mes côtés malgré mon absence, mon amour grandit d'année en année, Arthur, te voir grandir est un émerveillement.

Liste des Abréviations

AMPA : Acide 2-Amino-3-(5-Méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)Propanoïque

ASL : Arterial Spin Labeling

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BCNU : Bis-ChloroethylNitrosoUrea

CCC : Cation Chloride Cotransporter

DNET : Dysembrioplastic Neuroepithelial Tumor

EEG : Electroencéphalogramme

FCD : Focal Cortical Dysplasia

GABA : Acide Gamma Amino Butyrique

GAD : Glutamic Acid Decarboxylase

GFAP : Protéine Acide Fibrillaire Gliale

HES : Hematoxylin and Eosin Stain

HFO : oscillations hautes fréquences

HPV : Human Papilloma Virus

ILAE : Ligue Internationale contre l'Epilepsie

IRM : Imagerie par résonance magnétique

MAM : MethylAzoxyMethanol Acetate

MEC : Matrice Extra Cellulaire

NeuN : Nuclear Neuronal Antigen

NF : Neurofilament

NF κ B : facteur nucléaire (κ B)

NMDA : N-Méthyl -D-Aspartate

PV : Parvalbumin

PET : Positron Emission Tomography

aRGC : Cellules gliales Radiales apicales

SPM : Statistical Parametric Mapping

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

mTOR : mammalian target of rapamycin

Table des Matières

- I. Introduction
 1. Généralités
 2. Définition histologique des dysplasies corticales focales
 - 2.1 : Rappel d'embryogenèse du neocortex
 - 2.2 : Historique : description princeps par Taylor (1971)
 - 2.3 : Classification de Barkovich / Palmini
 - 2.4 : Classification ILAE
 3. Expression clinique des FCD
 - 3.1 : Epidémiologie
 - 3.2 : Epilepsie
 4. Localisation par imagerie des FCD
 - 4.1 : Imagerie morphologique
 - 4.2 : Imagerie métabolique : PETscan
 - 4.3 : Imagerie de perfusion
 - 4.4 : Imagerie fonctionnelle : IRMf-EEG
 - 4.5 : Imagerie : conclusions
 5. Identification et délimitation de la zone épileptogène associée aux FCD : neurophysiologie
 - 5.1 : FCD type II
 - 5.2 : FCD type I
 - 5.3 : Electrophysiologie in vivo des FCD : conclusions
 6. Prises en charge thérapeutiques
 - 6.1 : Traitement médical
 - 6.2 : Résection chirurgicale
 7. Etiologies des FCD
 - 7.1 : HPV et autres hypothèses environnementales
 - 7.2 : Défect moléculaire : mTOR et voies apparentées
 - 7.3 : Modèles animaux
 - 7.3.1 : Freezing
 - 7.3.2 : MAM
 - 7.3.3 : Irradiation
 - 7.3.4 : BCNU

7.3.5 : Acide Iboténique

8. Epileptogénicité des FCD

8.1 : Implication des cellules anormales / architecture : données des cellules dissociées

8.2 : Transmission Glutamatergique

8.3 : Transmission GABAergique et interneurones

8.4 : Régulation neuronale du chlore : Co transporteurs du chlore et autres

8.4.1 : Defect CL- / EGABA / NKCC1 / KCC2

8.4.2 : Régulation des cotransporteurs du chlore

8.5 : Matrice extra cellulaire

8.6 : Astrocytes (dont Pannexines)

9. Objectifs de la thèse

II. Articles

1. Article 1: « Arterial Spin Labeling MRI : a step forward in the non invasive delineation of FCD »
2. Article 2: « Cerebral Blood Flow Improvement after Indirect revascularization for pediatric Moyamoya Disease: a statistical analysis of ASL-M”
3. Article 3: « Multi-Electrode-Array recordings of Human Epileptic Postoperative Cortical Tissue “
4. Article 4: « Mechanisms of Ictogénésis »
5. Article 5: « Altered Pannexin 1 channels control seizure generation in human: a therapeutic target for various epileptic conditions »
6. Article 6: « Altered GABAergic transmission underlies epileptogenicity in human pediatric malformations of cortical development »

III. Discussion-conclusion

1. Localisation des FCD
2. Hypodébit ASL et couplage neuro-vasculaire
3. Distinction des sous-types histologiques
4. Etudes in vitro

IV. Conclusion

V. Annexes

VI. Références bibliographiques

VII. Résumé

I. INTRODUCTION

1. Généralités :

Les dysplasies corticales focales (FCD) sont des malformations épileptogènes du développement cortical individualisées en 1971 par Taylor, et définies par une désorganisation de l'architecture du cortex cérébral, associée à la présence de cellules anormales neuronales et/ou gliales.

Révélees majoritairement dans la petite enfance elles sont hautement épileptogènes et impactent négativement les processus de maturation cérébrale, d'apprentissage et de la cognition. Rares dans la population générale, elles sont une cause fréquente et curable d'épilepsie lésionnelle dont la quête dans les centres de chirurgies de l'épilepsie implique un haut degré de technicité, en imagerie et en électrophysiologie. Leur mise en évidence reste parfois malaisée, de même que leur cartographie précise, tant sous l'angle des limites lésionnelles que de production des activités neuronales anormales. Ces difficultés sont amplifiées par la grande variabilité des FCD, définies actuellement sur des critères histologiques.

Les traitements médicamenteux restent peu efficaces, y compris les molécules de dernière génération, faisant évoquer des caractéristiques particulières d'épileptogénicité ou des mécanismes non ciblés par les médicaments antiépileptiques.

Les progrès de leur prise en charge ont été essentiellement chirurgicaux. L'exérèse complète des FCD a été facilitée par l'apport de l'électrophysiologie (EEG de surface, EEG intracrânien) et par la révolution de l'imagerie morphologique (scanner puis IRM), métabolique (PET scan) et fonctionnelle (IRMf-EEG).

Des causes moléculaires de certaines FCD commencent à être élucidées grâce aux techniques de séquençage de l'ADN, et l'altération de la voie mTOR semble centrale.

Les mécanismes de l'épileptogénicité se dessinent, notamment au travers d'une dysfonction du réseau inhibiteur des interneurons, et de leur interaction pathologique avec des cellules pyramidales hyperexcitables.

Dans une perspective chirurgicale, plusieurs thématiques de recherche restent d'actualité. Tout d'abord, l'imagerie peut-elle être optimisée, en vue de mieux circonscrire la zone épileptogène, nécessaire à réséquer pour guérir le patient ? Ensuite, peut on utiliser des pièces de résection chirurgicale, pour accroître la connaissance des mécanismes physiopathologiques des dysplasies mais aussi de l'épileptogénèse plus généralement ? Peut-on identifier des biomarqueurs du tissu dysplasique épileptique pour distinguer le cortex physiologiquement sain du cortex pathologique in vitro, puis mener cette translation in vivo?

Dans cette introduction, nous exposerons tout d'abord les connaissances actuelles sur les dysplasies corticales focales, sur le plan clinique, moléculaire et neurophysiologique. Nous exposerons par la suite les objectifs de ce travail de thèse, mené in vivo avec l'imagerie de perfusion ASL et in vitro par les enregistrements de tranches de cortex sur matrices de micro électrodes en précisant le rôle que ces 2 méthodologies apporte à notre questionnement.

2. Définition(s) histologique(s) des dysplasies corticales focales

La définition histologique des dysplasies corticales focales est un processus dynamique qui profite de l'avancée des connaissances en histologie, immunohistochimie mais aussi en imagerie. En effet cette classification a été revue 4 fois depuis la classification princeps de Taylor en 1971. (Barkovich, 1996; Blümcke, 2011; Mischel *et al.*, 1995; Palmieri *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 1971)

2.1. Rappel d'embryogenèse du néocortex

La constitution du néocortex, organisé en micro colonnes de 6 couches dépend de deux mécanismes, radiaux et tangentiels.

Dans la zone ventriculaire, les cellules neuro épithéliales, après division symétrique se différencient en cellules gliales radiales apicales (aRGC).

Une première phase de prolifération par division asymétrique donnera naissance à une aRGC et à un neurone ou à une cellule progénitrice intermédiaire dans la zone sous ventriculaire. Cette phase déterminera l'épaisseur du cortex.

Une deuxième phase de migration le long du processus basal de la glie radiale a lieu selon une organisation « inside out », où les cellules les plus jeunes deviennent les plus superficielles. Cette phase est sous le contrôle intrinsèque de la coordination des microtubules, et sous le contrôle extrinsèque de gradient de concentration de signaux de transduction tels que la Reelin sécrétée par les cellules de Cajal Retzius dans la zone marginale.

La troisième étape sera la synaptogenèse et la constitution de circuits neuronaux pérennes. (Jiang and Nardelli, 2016)

Figure 1: D'après Jiang. Neurobiology of Disease 2016

Les interneurons sont générés dans le subpallium (éminence ganglionnaire médiale et caudale), avant leur migration tangentielle vers le cortex sous l'influence de substrats répulsifs (SEMA 3A/3F), permissifs (NRG-CRD) ou chemo attractifs (NRG1-IG). Une fois dans le cortex, leur migration est radiale, également selon un mode

« inside out », et les interneurons et cellules pyramidales d'âge similaire se situent dans la même couche corticale. (Sultan *et al.*, 2013)

Les neurotransmetteurs ont un rôle majeur dans la migration neuronale. La transmission GABAergique, mature avant la signalisation glutamatergique, stimule la migration radiaire des cellules pyramidales, via des vagues calciques qui influent sur leur cytosquelette. Le GABA agit via les récepteurs GABA_A rho avec une action dichotomique sur la migration neuronale, permissive dans les couches inférieures et restrictive dans les couches supérieures. (Luhmann *et al.*, 2015) L'expression du co-transporteur du chlore NKCC1, chargeant les neurones en anions chlorure, permet de plus un rôle dépolarisant du GABA à l'origine d'activités spontanées primordiales du réseau neuronal, qui associées à la transmission glutamatergique interviennent dans la terminaison de la migration neuronale lorsque le réseau se synchronise. (Luhmann *et al.*, 2015)

2.2. Historique : description princeps par Taylor (1971)

En 1971, les anomalies histologiques du cerveau de 10 patients opérés pour une épilepsie partielle sont rapportées sous le terme « Dysplasie Focale du Cortex Cérébral ». (Taylor *et al.*, 1971)

L'épilepsie avait débuté dans l'enfance avec un caractère stéréotypé et des anomalies latéralisées de l'EEG ; les spécimens chirurgicaux provenaient de lobectomies temporales (6 cas), frontales (3 cas) ou pariétales (un cas). Les patients n'avaient pas de signe de sclérose tubéreuse de Bourneville. Les auteurs notent des troubles de l'organisation laminaire du cortex, mais également la présence de neurones géants, ainsi que de cellules géantes, dysmorphiques, d'origine gliale ou neuronale (les futures « balloon cells ») représentées dans toutes les couches du cortex sauf la couche I. Ces cellules pouvaient être multi nucléés, avec un cytoplasme pseudopodique et opalescent. (Taylor *et al.*, 1971)

« An unusual microscopic abnormality has been identified in the lobectomy specimens removed

surgically from the brains of 10 epileptic patients. The abnormality could seldom be identified by palpation or with the naked eye. Histologically, it consisted of congregations of large, bizarre neurons, which were littered through all but the first cortical layer. In most, but not all cases, grotesque cells, probably of glial origin, were also present in the depths of the affected cortex and in the subjacent white matter. This kind of abnormality appears to be a malformation. The picture is reminiscent of tuberous sclerosis but too many distinguishing features, both in the clinical and in the pathological aspects, make this diagnosis untenable. The cases are therefore looked on provisionally (since all but one are still alive) as comprising a distinct form of cortical dysplasia in which localized, exotic populations of nerve cells underlie the electrical and clinical manifestations of certain focal forms of epilepsy » (Taylor et al., 1971)

Figure 2 : D'après Taylor. JNNP 1971

I : désorganisation corticale avec perte de l'organisation laminaire et colonnaire (a) en comparaison avec un cortex sain (b) II : Cellules géantes multi nucléés

2.3. Classification de Barkovich / Palmini

Les anomalies histologiques observées au sein des malformations de développement cortical ont par la suite été classées en fonction de leur origine embryologique potentielle. Il peut ainsi s'agir de troubles de la prolifération neuronale ou gliale, d'anomalies de la migration, ou de l'organisation corticale. (Barkovich, 1996) Ces anomalies peuvent être focales ou généralisées, et relever de causes génétiques, idiopathiques ou acquises environnementales.

Cette classification a été par la suite simplifiée pour permettre aux cliniciens de mieux appréhender l'histoire naturelle, et comparer les traitements médicamenteux ou chirurgicaux. Cette proposition élaborée par un groupe d'experts a permis d'aboutir à une nouvelle classification : la classification de Palmini. (Palmini *et al.*, 2004)

Tableau 1 : Classification de Barkovich

Prolifération gliale / neuronale anormale		Migration neuronale anormale		Organisation corticale anormale	
Généralisée	Focale	Généralisée	Focale	Généralisée	Focale
<p>1. ↓Prolifération Micro lissencéphalie</p> <p>2. ↑Prolifération Inconnu</p> <p>3. Prolifération anormale Inconnu</p>	<p>1. ↓Prolifération Inconnu</p> <p>2. ↑Prolifération Inconnu</p> <p>3. Prolifération anormale <i>Non néoplasique</i> STB FCD et Balloon cells Hémimégalencéphalie <i>Néoplasique</i> DNET Gangliogliome Gangliocytome</p>	<p>1. Lissencéphalie type 1 Chromosome 17 Chromosome X Autres loci</p> <p>2. Lissencéphalie en pavé Dystrophie musculaire de Fukuyama Syndrome de Walker Walburg Maladie Muscle-yeux-cerveau</p> <p>3. Lissencéphalie non classifiée</p> <p>4. Hétérotopies Sous épendymaire Sous corticale Inclusion corticale Marginale glio-neuronale</p>	<p>1. Agyrie / Pachygyrie focale Bilatérale postérieure Bilatérale pariétale</p> <p>2. Hétérotopie focale Nodule sous épendymaire focal Nodule sous cortical focal Mixte sous corticale et sous épendymaire Inclusion corticale Hétérotopie glioneuronale marginale</p> <p>3. Hétérotopie focale et désorganisation corticale Nodule sous épendymaire focal Nodule sous cortical focal Mixte sous corticale et sous épendymaire SD Aicardi Peroxisomes AcylcoA deshydrogenase Inclusion corticale Hétérotopie glioneuronale marginale</p>	<p>Polymicrogyrie</p>	<p>1. Polymicrogyrie / schizencéphalie Bilatérales symétriques Asymétrique Schizencéphalie /PMG</p> <p>2. FCD sans balloon cells</p> <p>3. Microdysgenésie</p>

D'après Barkovich. Neuropediatrics 1996

Malformations de développement cortical modérées	Dysplasies corticales focales	
<i>Type I</i> Neurones ectopiques dans ou adjacents à la couche I	Type I : absence de neurones dysmorphiques ou de balloon cells	
	la : Dyslamination	Ib : Dyslamination et neurones géants ou immatures
<i>Type II</i> Hétérotopies neuronales ectopiques en dehors de la couche I	Type II : dysplasie de Taylor	
	Ila: anomalies architecturales, et neurones dysmorphiques.	Ilb : anomalies architecturales, neurones dysmorphiques et balloon cells

Tableau 2 : Classification de Palmini

2.4. Classification ILAE

La variabilité du diagnostic histologique, et la mauvaise corrélation avec les données IRM notamment des dysplasies de type I a conduit la « task force » de chirurgie de la ligue internationale contre l'épilepsie à proposer des critères histologiques consensuels. (Blümcke and Mühlebner, 2011; Blümcke, 2011) On distingue ainsi les FCD isolées, de type I (trouble architectural), de type II (trouble architectural et cellules anormales) et de type III (dysplasie associée à une lésion).

Les dysplasies de type I sont divisées en 3 sous groupes :

FCD Ia : organisation en micro colonnes définies comme au moins 8 neurones alignés verticalement, de diamètre inférieur à 250µm, si la section histologique est orthogonale au plan pial, sur une coupe de 4µm, avec un marquage NeuN (Neuronal Nuclear Antigen).

FCD Ib : absence d'organisation laminaire du cortex qui peut être globale ou restreinte aux couches II ou IV.

FCD Ic : trouble de l'organisation radiaire et laminaire du cortex

Des anomalies cellulaires peuvent être rencontrées dans les dysplasies de type I : neurones immatures de petit diamètre, ou neurones pyramidaux hypertrophiques en dehors de la couche V.

Les dysplasies de type II sont divisées en 2 sous groupes. Elles se caractérisent par des anomalies architecturales associées à des anomalies cytologiques spécifiques.

FCDIIa : caractérisées par la présence de neurones dysmorphiques qui ont une augmentation du diamètre cellulaire (16-43µm) et du diamètre nucléaire (15-28µm), l'agrégation de substance de Nissl, et l'agrégation cytoplasmique de neurofilaments. Ceci est révélé par l'immunomarquage 2F11 ou SMI32.

FCD IIb : présence de neurones dysmorphiques et de « balloon cells ». Les balloon ont des cytoplasmes larges, éosinophiles (HES+) sont souvent multi nucléés avec un marquage variable GFAP/NF (neurofilament).

Les dysplasies de type III sont des troubles de la lamination corticale associées à une lésion cérébrale :

FCD IIIa : association à une sclérose hippocampique

FCD IIIb : association à une tumeur épileptogène (gangliogliome, DNET)

FCD IIIc : association à une malformation vasculaire (cavernome, malformation artérioveneuse, télangiectasie, méningio angiomatose).

FCD Type I	Ia : Dyslamination radiaire	Ib : Dyslamination tangentielle	Ic : Dyslamination radiaire et tangentielle	
FCD Type II	IIa : neurones dysmorphiques		IIb : neurones dysmorphiques et balloon cells	
FCD Type III	IIIa : Dyslamination du lobe temporal et sclérose hippocampique	IIIb : Dyslamination adjacente à une tumeur gliale ou glio neuronale	IIIc : Dyslamination adjacente à une malformation vasculaire	IIId : Dyslamination adjacente à une lésion acquise en péri natal

Tableau 3 : Classification ILAE 2011

C'est cette dernière classification qui est utilisée actuellement malgré des difficultés persistantes dans la classification de certaines FCD....

Figure 3 : Histologie des FCD
Marquages Nissl-LFB et NeuN de 4 sous groupes de Dysplasies Corticales focales

3. Expression clinique des DCF

3.1. Epidémiologie

La prévalence des malformations de développement corticales n'est pas connue dans la population générale. Elles pourraient représenter 5 à 20 % des épilepsies focales de l'enfant. (Bast *et al.*, 2006)

Les dysplasies corticales focales sont rapportées dans des séries chirurgicales, ce qui introduit un biais pour leur prévalence, mais également pour la connaissance de leur histoire naturelle. Leur représentation dans les cohortes chirurgicales est également influencée par le recrutement, adulte et / ou pédiatrique, et par la spécialisation du centre.

Les FCD sont la première étiologie rapportée dans les séries chirurgicales pédiatriques, représentant 20 à 40 % des patients opérés d'une épilepsie lésionnelle. (Fauser *et al.*, 2006; Harvey *et al.*, 2008; Sisodiya *et al.*, 2009), suivies par les tumeurs associées à l'épilepsie (20%), les séquelles d'AVC (10%), les scléroses hippocampiques (6.5%) et des causes diverses (STB, hamartomes, Sturge Weber, Rasmussen). La prévalence des dysplasies de l'enfant sans épilepsie reste totalement inconnue. Des cas isolés de dysplasies sans épilepsie ont été rapportés chez des enfants souffrant d'autisme ou présentant un retard mental sans mention de l'histoire naturelle à l'âge adulte et sans connaître si une épilepsie est apparue à un moment de l'évolution.

Il s'agit d'une pathologie sporadique, même si quelques cas familiaux ont été rapportés, associés à une mutation du gène DEPDC5. (Leventer *et al.*, 2014; Scheffer *et al.*, 2014) Cet aspect familial est important à évaluer avec des FCD liées à des mutations sur la voie mTOR ou les Toropathies.

3.2. Epilepsie

Les premières crises surviennent typiquement dans les 5 premières années de vie, avec un âge médian de début de l'épilepsie entre 1.7 et 8 ans dans les grandes cohortes de FCD publiées. (Fauser *et al.*, 2006; Krsek *et al.*, 2008; 2009; Tassi *et al.*,

2002) Quelques cas de début tardif (après 60 ans) sont rapportés, mais 90% des patients ont une expression clinique de leur maladie avant 16 ans. (Fauser *et al.*, 2006)

La présence de facteurs précipitants associés à l'épilepsie tels que souffrance périnatale, crises hyperthermiques, traumatisme ou infection sont rapportés plus souvent dans les dysplasies de type I. (Krsek *et al.*, 2008) Ceci peut être expliqué par l'absence de distinction FCD type I / type III (associées à une sclérose hippocampique) car ces données ont été publiées avant la nouvelle classification ILAE de 2011.

La sémiologie des crises est variée, en relation avec la localisation des FCD et l'âge de début (myélinisation cérébrale). La sémiologie peut évoluer dans le temps, du fait de la maturation cérébrale, mais exclusivement entre l'âge de 1 et 14 ans. Ainsi avant 1 an, la majorité des crises sont des spasmes (dont l'asymétrie sera évocatrice) ou des crises généralisées tonico-cloniques ; entre 1 et 2 ans des crises généralisées, toniques / atoniques / tonico cloniques / hypomotrices ; et après 2 ans des crises focales. (Fauser *et al.*, 2006) Néanmoins, les crises décrites comme généralisées sont essentiellement des crises focales avec bilatéralisation rapide. De même, la prédominance nocturne des crises rapportée dans les dysplasies corticales focales peut être rapprochée de leur localisation majoritairement frontale. (Nobili *et al.*, 2009) Des états de mal épileptique peuvent survenir dans 15% des cas.

L'examen neurologique des patients est anormal dans un tiers des cas, (Tassi *et al.*, 2002) pouvant correspondre à des déficits moteurs (10 à 20%) ou d'autres déficits (ataxie, hypotonie, tétraparésie). (Krsek *et al.*, 2008)

Des troubles psychiatriques sont rapportés, plus fréquemment dans les localisations temporales et frontales.

Le reste de l'examen somatique est normal, mais doit être réalisé pour éliminer le diagnostic de sclérose tubéreuse de Bourneville. La recherche d'une atteinte cutanée ou cardiaque et l'aspect IRM avec les tubers mais surtout les nodules sous épendymaires quand les tubers sont uniques permettent d'évoquer ce diagnostic et de procéder à l'étude génétique de TSC1 et TSC2. Il n'y a pas de lien démontré entre les FCD et d'autres pathologies organiques.

Un retard cognitif est souvent soupçonné au début de la maladie, et confirmé chez 10 à 55% des patients opérés. (Krsek *et al.*, 2009; Lerner *et al.*, 2009; Sisodiya *et al.*, 2009; Tassi *et al.*, 2002)

Des encéphalopathies épileptiques (syndrome de West, syndrome de Lennox Gastaut) peuvent être observées dans les premières années de vie dans 30% des cas dans certaines séries. (Kwon *et al.*, 2016)

Le sous-type histologique est un facteur prédictif de retard mental. En effet, les patients atteints de FCD type I ont un $QI > 80$ dans moins de 30% des cas contre 50% des FCD type II. (Krsek *et al.*, 2008) Un retard sévère ($QI < 35$) est décrit dans 55% des FCD type I (Krsek *et al.*, 2009)

La taille de la lésion a un lien direct avec le QI puisque 65% des patients avec une chirurgie multi lobaire ont un retard mental contre 45% en cas de chirurgie uni lobaire. (Widdess-Walsh *et al.*, 2005)

La durée d'évolution de l'épilepsie avant chirurgie est probablement inversement corrélée au statut cognitif au long cours, (Jonas *et al.*, 2004) d'autant plus que le traitement anti épileptique peut être arrêté, même si cela n'a pas encore été démontré dans les FCD.

4. Identification et localisation par imagerie des FCD

La prévalence des FCD a augmenté dans les séries chirurgicales, notamment grâce à leur meilleure identification en imagerie qui a bénéficié d'une révolution ces 35 dernières années avec l'utilisation du scanner puis de l'IRM, notamment à haut champ (3 teslas, parfois 7)

4.1. Imagerie morphologique

L'imagerie morphologique de référence est l'IRM, de préférence à 3 teslas, selon un protocole dédié à l'épilepsie, interprété par un radiologue expérimenté, et de préférence revue en réunion pluridisciplinaire. Les séquences minimales sont des séquences axiales et coronales T2 et FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery), axiale T2*, et une acquisition 3DT1. (Sisodiya *et al.*, 2009)

Les FCD de type II ont la sémiologie radiologique la plus précise.

L'IRM détecte une FCD type II dans 60 à 80% des cas. Les signes classiques sont : épaississement cortical, modification du signal cortical (hyper intensité T2 / FLAIR), modification du signal sous cortical (hyper T2 / FLAIR), dédifférenciation gris/blanc (G/W matter blurring), et le « trans mantle sign » (hyper signal prenant naissance au fond du sillon jusqu'à la paroi ventriculaire). (Colombo *et al.*, 2009; 2012; Mellerio *et al.*, 2012) La présence du trans mantle sign est très évocateur de FCD IIb.

L'âge du patient est à prendre en compte, car la myélinisation du système nerveux peut interférer avec la visualisation de l'anomalie. Les lésions sont plus simples à voir dans la première année de vie sous forme d'une hypo intensité T2, tandis que les IRM peuvent se normaliser entre 2 et 4 ans. (Eltze *et al.*, 2005) L'IRM morphologique permet de montrer la présence de l'anomalie, mais il n'y a pas de critère objectif pour déterminer sa limitation spatiale, et notamment la limite cortex dysplasique / cortex sain.

Figure 4 : D'après Colombo, neuroradiology 2012

IRM en coupe coronale et séquences FLAIR et inversion recovery.

Le traitement du signal IRM permet d'augmenter le taux de détection des dysplasies.

L'extraction sulcale automatique par le logiciel Brain VISA permet de mettre en évidence les petites dysplasies de fond de sillon. (Besson *et al.*, 2008) L'interface cortex / substance blanche peut être étudiée avec une analyse morphométrique. Des procédures semi automatisées permettent après normalisation du T1, d'extraire les cartes de Gris / Blanc / LCR, et de les comparer à une base de témoins sains, selon une méthode voxel à voxel par le logiciel SPM5. Il est ainsi possible de visualiser des zones statistiquement différentes (images d'extension : hypertrophie corticale ; ou de jonction : blurring). Cette méthode est plus sensible que l'analyse visuelle pour détecter les FCD IIa (82% vs 65%), et la combinaison de l'analyse visuelle et morphométrique permet de distinguer les FCD type II dans 98% des cas d'une série chirurgicale de 91 cas de FCD type II.(Wagner *et al.*, 2011) Plus récemment, une méthode entièrement automatisée, basée sur un auto apprentissage d'algorithmes (machine learning) a été proposée. Après reconstruction corticale 3D, différents paramètres sont inclus dans l'algorithme de détection : épaisseur corticale, profondeur du sillon, courbure, intensités relatives, et gradients au niveau de l'interface gris/blanc. La sensibilité de détection est de 74% et la spécificité de 95% sur 19 cas de FCD type II, avec une IRM 3T. (Hong *et al.*, 2014)

L'imagerie des dysplasies de type I, moins décrite dans la littérature est plus subtile.

Les lésions sont moins localisées, et plus fréquemment lobaires ou multi lobaires. Les anomalies les plus fréquentes sont une réduction de volume de la substance blanche, une dédifférenciation gris/blanc, et des anomalies de signal de la substance blanche (hyperintensité T2 / FLAIR). (Colombo *et al.*, 2009; Krsek *et al.*, 2008; 2009)

Figure 5 : D'après Krsek. Epilepsia 2009
IRM en coupes coronales T2

L'imagerie des FCD de type III n'est pas spécifique.

Localisées majoritairement dans le lobe temporal, elles associent généralement une dédifférenciation gris/blanc, et une anomalie de la myélinisation visible sous la forme d'un hyper signal FLAIR. (Bartolini *et al.*, 2017)

4.2. Imagerie métabolique : PET scan, et SPECT

L'utilisation chez l'homme de l'imagerie par tomographie par émission de photons au déoxyglucose marqué par le Fluor 18 (^{18}F FDG-PET) remonte à la fin des années 70. (Phelps *et al.*, 1979) Cette technique analyse le métabolisme cérébral, car le déoxyglucose n'est pas métabolisé par les neurones, et s'accumule dans le cytoplasme des cellules métaboliquement actives, capté en fonction de leur demande métabolique. Il ne s'agit pas d'une mesure du débit sanguin cérébral.

Les premières applications pédiatriques ont été l'analyse de la maturation cérébrale, démontrant une variation du métabolisme cérébral débutant dans le cortex moteur chez le nourrisson, avant de se développer secondairement dans les aires associatives. (Chugani and Phelps, 1986)

*Les premières applications en épilepsie pédiatrique remontent à la fin des années 80. (Chugani *et al.*, 1988)*

La réalisation d'un ^{18}F FDG-PET scan chez 13 enfants souffrant de spasmes épileptiques retrouvait un hypo-métabolisme inter ictal du carrefour pariéto-occipital chez 5 enfants. Quatre enfants étaient opérés (résection du carrefour postérieur) sous contrôle électro corticographique, avec un diagnostic histologique de malformation de développement cortical. (Chugani *et al.*, 1990) Ces données constituent une avancée significative dans la prise en charge des enfants avec spasmes épileptiques, car il s'agissait d'un nouvel argument pour un lien entre lésion cérébrale et spasmes infantiles, et surtout car ces enfants étaient opérés avec une IRM normale, sans EEG intra crânien pré-résection, réduisant la morbidité associée aux enregistrements par grilles sous durales.

L'utilisation du PET scan s'est ensuite démocratisée dans le bilan pré-chirurgical des épilepsies focales.

Les méthodes d'analyse initiales étaient visuelles, qualitatives, ou quantitatives, en comparant des ratios inter hémisphériques. La sensibilité de détection de la zone épileptogène, jugée selon l'EEG était au milieu des années 90 de 84% avec une spécificité de 86% dans l'épilepsie temporale, tandis que la sensibilité était de 33% avec une spécificité de 95% dans l'épilepsie extra temporale. (Spencer, 1994)

Plusieurs apports méthodologiques ont amélioré les performances du ¹⁸FDG-PET pour localiser les dysplasies corticales.

Tout d'abord l'analyse SPM (Statistical Parametric Mapping) permet, après normalisation des images, une analyse de groupe ou une analyse individuelle en comparant chaque patient avec un groupe témoin de 27 patients, ou par comparaison intra individuelle inter hémisphérique. (Archambaud *et al.*, 2013; Van Bogaert *et al.*, 2000) Cette méthode statistique a une sensibilité équivalente à l'analyse visuelle, aux environ de 65% pour la détection d'une zone hypo métabolique. (Kim *et al.*, 2002)

La co-régistration des imageries IRM et PET a permis d'améliorer encore la performance diagnostique du ¹⁸FDG-PET. Ainsi, en comparant leurs résultats avant (2001-2003) et après co-régistration (2004-2007), la concordance des anomalies PET et IRM évoluait de 48% pour les FCD de type I et 89% pour les FCD de type II avant 2004 à 98% après 2004. (Salamon *et al.*, 2008)

L'association de la co-régistration IRM et de l'analyse SPM améliore ainsi la prise en charge chirurgicale en ciblant les explorations EEG invasives, et en délimitant les zones à réséquer, même en l'absence de lésion IRM. Dans une série de 23 patients, avec une IRM négative et un diagnostic histologique de FCD IIb, la sensibilité de l'analyse visuelle était ainsi de 78% pour détecter une zone hypométabolique focale, et l'analyse statistique SPM était concordante dans 13/18 cas, avec 87% de patients libres de crises après chirurgie. (Chassoux *et al.*, 2010)

Figure 6 : D'après Salamon. Neuology 2008
IRM en coupe axiale , séquence T2 et Co régistrattion IRM / PET

D'autres traceurs ont été utilisés, ciblant les défauts moléculaires possibles dans les FCD, dans un but diagnostique ou de recherche fondamentale.

La méthionine marquée au carbon11 est un marqueur des tumeurs cérébrales. Néanmoins, il existe dans une étude sur 4 patients avec une FCD une augmentation du marquage à la MET dans 4 cas, tandis que le ^{18}F FDG-PET retrouvait un hypo métabolisme dans 2/4 cas. (Sasaki *et al.*, 1998) Des résultats discordants sont retrouvés dans une étude comparant le PET au glucose et à la méthionine, dans les FCD et les tumeurs neuro gliales bénignes associées à l'épilepsie. Les dysplasies avaient un marquage faible avec la MET, contrairement aux tumeurs. (Phi *et al.*, 2010)

Le Flumazénil marqué au carbone 11 permet d'évaluer la densité des récepteurs GABA_A dans les anomalies de développement cortical. (Richardson *et al.*, 1996) Les anomalies en FMZ-PET semblent plus focales qu'en FDG-PET. Ainsi une étude de 2 patients a montré que l'anomalie de densité des Récepteurs GABA en PET était restreinte au centre de la lésion IRM, tandis que l'hypo métabolisme PET était plus étendu. Ceci était corrélé aux données électro physiologiques intracrâniennes, et aux données d'autoradiographies des Rc aux benzodiazépines de la pièce de résection chirurgicale. (Arnold *et al.*, 2000)

Le (^{11}C) ABP688 est un ligand spécifique des récepteurs métabotropiques du Glutamate mGluR5. Une réduction de fixation était notée dans 7/10 cas de possible FCD, et dans 4/5 cas de FCD avérées. (DuBois *et al.*, 2016)

Sil le PET scan permet d'appréhender les anomalies métaboliques interictales, le SPECT au $^{99\text{mTc}}$ -hexamethyl-propylene-amine-oxime (HMPAO) permet d'étudier les anomalies ictales. (Krsek *et al.*, 2013) L'exérèse complète de la zone anormale en SPECT est un facteur prédictif indépendant de succès de la chirurgie. (Kaminska *et al.*, 2003; Krsek *et al.*, 2013)

4.3. Imagerie de perfusion :

L'imagerie par marquage de spins artériels (Arterial Spin Labelling – ASL) a été décrite au début des années 1990. (Williams *et al.*, 1992) Il s'agit d'une imagerie de perfusion, où les molécules d'eau marquées par une onde de radiofréquence sont utilisés comme traceur endogène. L'inversion de spin des protons est réalisée par une onde de radiofréquence au niveau des artères carotides et vertébrales. L'imagerie cérébrale est acquise par des séquences en spin écho, après un délai variable (post

label delay). Des séquences marquées et non marquées sont acquises, et la différence est indirectement proportionnelle au débit sanguin cérébral qui peut être estimé.

L'intérêt en pédiatrie est l'absence d'injection de produit de contraste, et la rapidité d'acquisition de la séquence (6 minutes). *Différentes applications ont émergé dans les années 2000* notamment dans les pathologies vasculaires (ischémiques ou hémorragiques), mais également dans les sciences cognitives. (Haller *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2008)

L'imagerie ASL a été comparée chez l'adulte aux méthodes de référence de mesure du débit sanguin cérébrale dans les pathologies vasculaires, et une excellente corrélation a été démontrée avec l'imagerie de perfusion IRM par injection de gadolinium, le SPECT (IMP) et le PET (¹⁵O-PET). (Kamano *et al.*, 2012; Noguchi *et al.*, 2011; 2013)

L'imagerie ASL a été utilisée dans des cas d'épilepsie temporale pour latéraliser le foyer épileptique. Dans 4 cas, il existait une concordance entre l'hypo débit ASL (mesuré en valeurs absolues, et par ratio inter hémisphère), les données EEG, et le ¹⁵O-PET. Il n'y avait pas de corrélation histologique puisque les patients n'étaient pas opérés. 16 patients épileptiques avec une hypoperfusion focale corrélée au ¹⁸FDG-PET étaient également rapportés, mais sans corrélation électrophysiologique. (Pendse *et al.*, 2010) Le même groupe décrivait également 3 cas d'hypoperfusion focale chez des enfants atteints de sclérose tubéreuse de Bourneville. (Wissmeyer *et al.*, 2010)

Deux cas d'hyper débit focal étaient rapportés chez 2 enfants opérés d'une dysplasie corticale focale. Une augmentation de la densité vasculaire était également observée sur la pièce opératoire, et les auteurs proposaient un lien entre micro vascularisation des FCD et hyper débit ASL. (Wintermark *et al.*, 2013) Néanmoins, cette observation histologique était inédite, et les auteurs ne précisaient pas si les patients étaient en période intercritique ou ictale pendant l'acquisition de l'imagerie. Or, l'analyse de la perfusion ASL par rapport au statut interictal, ictal ou post ictal immédiat montre qu'une hyperperfusion focale est observée pendant et juste après une crise comitiale. (Pizzini *et al.*, 2013; Storti *et al.*, 2014)

4.4. Imagerie fonctionnelle : IRMf - EEG

L'IRM fonctionnelle de repos couplée à l'EEG repose sur les modifications de l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependant contrast) associées aux décharges interictales (fonction de réponse hémodynamique), permettant de visualiser sur l'IRM du patient la source des anomalies électrophysiologiques. (Béнар *et al.*, 2006; Murta *et al.*, 2015).

Des études associant IRMf EEG et enregistrements intra crâniens de l'EEG (SEEG) ont montré une excellente colocalisation des modifications hémodynamiques analysées en IRM avec les variations de la puissance spectrale des anomalies EEG interictales en SEEG et par localisation de source. (Béнар *et al.*, 2006)

Dans les dysplasies corticales focales, les anomalies interictales et ictales enregistrées en IRMf EEG semblent co localisées avec la lésion anatomique, même si le cortex péri lésionnel est impliqué précocement dans la décharge ictale. (Tyvaert *et al.*, 2008) La concordance des anomalies BOLD interictales, et de la zone d'initiation des crises (en SEEG) semble avoir un rôle pronostique, puisqu'un mauvais résultat chirurgical était noté dans 5/6 patients avec des anomalies discordantes ou diffuses en IRMf-EEG. (Thornton *et al.*, 2011) De plus, l'exérèse de la zone irritative en EEG-fMRI est corrélée positivement avec le statut épileptique post opératoire. (Thornton *et al.*, 2010)

4.5. Imagerie cérébrale des FCD : conclusion

L'imagerie IRM a révolutionné la prise en charge chirurgicale des FCD, et l'association aux données métaboliques PET permet un diagnostic visuel de la FCD dans 80% des cas de FCD type II. L'imagerie des FCD type I reste problématique. La délimitation anatomique de la dysplasie est en effet de précision variable selon le sous-type. Mais elle pose surtout le problème de la corrélation entre la localisation de l'anomalie histologique, des anomalies IRM et des anomalies épileptiques, la prise en charge chirurgicale visant *in fine* à réséquer la zone d'initiation des crises.

Il n'y a actuellement pas de d'explication à l'hypo métabolisme des FCD. Les troubles de la perfusion associés illustrent peut-être une anomalie du couplage neuro-vasculaire, qui n'est pas démontré actuellement dans les FCD.

5. Identification et délimitation de la zone épileptogène associée aux FCD : neurophysiologie

Si l'identification morphologique est importante, la corrélation entre les symptômes décrits par le patient et les anomalies électrophysiologiques est primordiale. Les anomalies électrophysiologiques interictales et ictales, de surface et / ou intra crâniennes apportent des informations complémentaires dans la délimitation de la zone épileptogène qu'il faudra intégrer au bilan pré-chirurgical.

5.1. FCD type II

5.1.1. Anomalies inter ictales

Certaines dysplasies corticales focales ont une signature électrophysiologique caractéristique : *les pointes pseudo continues*, qui peuvent être enregistrées sur l'EEG de surface chez 44% des patients, si la lésion se situe sur la convexité. (Palmini *et al.*, 1995) D'autres anomalies non spécifiques sont notées : pointes interictales (focales ou régionales) et une altération du rythme de fond régionale de l'EEG dans 2/3 des cas. (Chassoux *et al.*, 2000)

Les enregistrements électro corticographiques per opératoires avec des grilles sous-durales ont décrit 3 types d'anomalies : (i) des crises électro corticographiques répétées, avec un pattern recrutant ; (ii) des décharges répétées >10 Hz ; (iii) des pointes continues ou pseudo continues de 1 à 8 Hz pendant plus de 10 secondes. (Palmini *et al.*, 1995) Ceci a été confirmé par les enregistrements chroniques intra corticaux en stéréo électro encéphalographie (SEEG). (Chassoux *et al.*, 2000; Francione *et al.*, 2003) *Ces pointes pseudo rythmiques* sont observées chez plus de 70% des patients, sont co-localisées avec la lésion, restent intra lésionnelles, dans les limites de la résolution spatiale des potentiels de champ en SEEG, sans s'étendre au cortex adjacent, et ne sont pas sensibles aux benzodiazépines.

Figure 7 : D'après Chassoux. Brain 2000
Anomalies SEEG interictales caractéristiques des FCD

La zone « lésionnelle » comportant des ondes lentes, fréquemment observée, n'est pas spécifique des FCD, et est plus étendue que la dysplasie.

L'épileptogénicité du cortex péri dysplasique a été récemment discutée grâce à l'analyse des oscillations hautes fréquences, et notamment les fast ripples (FR) définies par une fréquence entre 250 et 500 Hz.

Les FR semblent pathognomoniques de la zone épileptogène, et peuvent se rencontrer dans diverses pathologies (sclérose hippocampique, hétérotopies, FCD). (J. Jacobs *et al.*, 2009)

La comparaison du taux de fast ripples dans la lésion dysplasique, le cortex péri dysplasique (périmètre de 1 cm autour de la lésion IRM) et le cortex à distance a confirmé l'épileptogénicité intrinsèque des FCD. En effet, dans les FCD, le taux de ripples et fast ripples est le plus élevé au sein du cortex dysplasique. (Ferrari-Marinho *et al.*, 2015) Néanmoins, le taux de FR est plus important dans le cortex péri lésionnel que dans le cortex à distance, soutenant un gradient dans les anomalies histologiques entre la FCD et le cortex de voisinage, que l'IRM distingue mal.

5.1.2 Anomalies ictales

Le pattern de décharge ictal des FCD ne semble pas spécifique aux dysplasies corticales focales, même si le pattern prédominant est une activité rapide de bas voltage, qui peut s'observer dans d'autres sous types histologiques (sclérose hippocampique, cortex lésionnel, STB..). (Perucca *et al.*, 2014)

La zone d'initiation des crises se situe dans la dysplasie corticale focale, mais l'implication du cortex péri-lésionnel ou distant a été étudié par l'analyse du signal EEG avec des résultats discordants. De plus, la majorité des études ne détaille pas la localisation exacte des électrodes par rapport à l'anomalie radiologique ou histologique, et on ne peut pas éliminer que le cortex échantillonné soit péri lésionnel.

L'index d'épileptogénicité (EI, gradué de 0 à 1) quantifie l'implication des structures cérébrales, en fonction de leur chronologie d'implication dans la crise et du

ratio de la puissance spectrale du signal entre bandes de fréquences rapides et lentes. (Bartolomei *et al.*, 2008) Dans les FCD, l'EI est maximal en intra lésionnel (EI=0.87), et significativement réduit dans le cortex extra lésionnel (0.29). (Aubert *et al.*, 2009) Néanmoins dans cette étude le nombre de structure avec un EI>0.4 (seuil définissant une structure épileptique) était de 3, notamment dans le lobe frontal et seuls 30 % des patients n'avaient qu'une structure anatomique avec un EI>0.4, supportant un réseau épileptique dans les dysplasies, plutôt qu'une simple lésion épileptogène.

Cette théorie de réseau est néanmoins nuancée par l'analyse de la synchronisation du réseau selon la théorie des graphes. (Boccaletti *et al.*, 2006)

La zone dysplasique apparaissait comme le nœud du réseau à l'origine des anomalies interictales et ictales, tandis que le cortex péri lésionnel n'était qu'un générateur secondaire de l'activité synchrone. (Varotto *et al.*, 2012)

5.2. FCD type I

Il ne semble pas exister d'aspect EEG intercritique ou critique caractéristique des FCD de type I, sur l'EEG de surface ou en intra crânien. Les anomalies sont volontiers multi lobaires, et prédominent en temporo-occipital. La comparaison de l'EEG de surface intercritique a montré dans les FCD de type I une occurrence plus fréquente d'anomalies rythmiques continues lentes et irrégulières par rapport aux FCD de type II. (Krsek *et al.*, 2009)

5.3. Etudes électrophysiologiques in vivo des FCD : conclusions

Il semble exister un pattern spécifique des FCD type II, avec des anomalies interictales co localisées avec la lésion histologique. L'épileptogénicité du cortex péri lésionnel est possible, mais probablement sous évaluée en raison des biais d'échantillonnage inhérents à la méthodologie d'exploration : électrodes de SEEG (surface corticale explorée plus faible) vs. Grilles sous durales (pas d'exploration des fonds de sillon).

Les dysplasies de type I ne semblent pas avoir de signature électrophysiologique, mais ont reçu peu d'attention dans la littérature, et souffrent des

modifications de classification histologique, avec l'absence de distinction FCD type I vs. FCD type III, ou à l'inverse l'opposition FCD type Ia et Ib qui sont aujourd'hui regroupées.

Les indications d'exploration invasive semblent diminuer avec l'apport de l'imagerie IRM haute résolution, et du PET, et pourraient être partiellement substituées par l'enregistrement peropératoire de l'électrocorticogramme, et notamment la cartographie des HFO, pré et post résection.

6. Prises-en charge thérapeutique

6.1. Traitement médical

Il n'y a pas de recommandation dans les FCD sur le choix du traitement antiépileptique qui est déterminé en fonction du type de crises focales / généralisées, de l'âge du patient, de la présence d'une encéphalopathie épileptique.

*La pharmaco-résistance de ces lésions est élevée, mais la prévalence de l'échec des traitements antiépileptiques n'est pas connue, car les séries publiées sont chirurgicales. Néanmoins, dans l'analyse des facteurs de pharmaco-résistance à partir d'une cohorte de 2200 adultes épileptiques, le pourcentage de patients libres de crises avec une malformation de développement cortical n'était que de 24% comparé aux 82% de patients libres de crises en cas d'épilepsie idiopathique. (Semah *et al.*, 1998)*

*Des phases de sensibilité aux médicaments antiépileptiques sont rapportées, ainsi 17% des patients étaient libres de crises pendant au moins 1 an dans une cohorte de 120 malades. (Fauser *et al.*, 2006) La période sans crise était supérieure à 5 ans chez 5% des patients (un patient libre de crise pendant 28 ans). Le nombre de médicaments permettant la « guérison transitoire » de l'épilepsie était variable, et 3 patients n'avaient plus de crise malgré l'absence de traitement pendant 3 ans. Aucun mécanisme d'action antiépileptique ne s'avère spécifiquement efficace.*

*Une alternative au traitement médicamenteux, notamment en pédiatrie est le régime cétogène. Ainsi, une étude sur 47 enfants, avec une lésion IRM évocatrice de malformation de développement corticale (FCD, n=42/47) a montré un excellent contrôle de l'épilepsie à court et moyen terme. (Jung *et al.*, 2008) Trois mois après initiation de la diète, 61.7% des patients avaient une réduction > à 50% de la fréquence des crises, dont 21 cas (42%) étaient libres de crises. 16/21 patients continuèrent la diète pendant 2 ans, et 9/16 malades étaient libres de crise sous diète cétogénique à 2 ans.*

La stimulation du nerf vague (VNS) n'est pas indiquée en première intention dans la prise en charge des FCD. Néanmoins, la VNS peut être utilisée en cas d'échec

ou de contre indication à la résection chirurgicale. L'étiologie « malformation de développement cortical » n'est pas un facteur pronostique d'efficacité de la stimulation du nerf vague, avec un effet comparable aux autres pathologies (50% de patients répondeurs). (Englot *et al.*, 2011)

6.2. Résection chirurgicale

Le traitement chirurgical est le traitement de référence de ces épilepsies lésionnelles. Il doit être réalisé après un bilan permettant de relier les symptômes du patient à l'anomalie morphologique, métabolique et électrophysiologique.

Figure 8 : d'après Guerrini. Epilepsia 2015
Bilan préopératoire selon l'ILAE.

Les recommandations de la ligue internationale contre l'épilepsie sont d'inclure dans le bilan au minimum un examen neurologique détaillé, une IRM et un bilan vidéo EEG.

Les explorations intra crâniennes de l'EEG (SEEG, grilles sous durales) sont réalisées si la lésion est non visible ou mal limitée sur le bilan d'imagerie (IRM/¹⁸FDG-PET), ou en cas de proximité avec des aires fonctionnelles.

La prise en charge chirurgicale dépend de l'extension morphologique, et / ou électrophysiologique de la lésion dysplasique.

Différents types de procédure peuvent ainsi être réalisées à la demande : gyrectomie, (Chassoux *et al.*, 2012), résections lobaires, multi lobaires, ou déconnexions hémisphériques. (Lerner *et al.*, 2009)

*Le contrôle de l'épilepsie après chirurgie est bon, mais variable en fonction des séries chirurgicales, allant de 20 à 90% de patients libres de crise, un an après chirurgie. (Chassoux *et al.*, 2012; Cohen-Gadol *et al.*, 2004; Krsek *et al.*, 2009; Lerner *et al.*, 2009; Tassi *et al.*, 2010) Une méta analyse de 16 études et 469 patients opérés*

estimait à 59.7% le nombre de patients en classe Engel Ia, un an après chirurgie. (Chern *et al.*, 2010)

Plusieurs auteurs notaient une différence de pronostic selon l'histologie, avec un mauvais pronostic des dysplasies de type I (20 à 50% de patients libres de crises), alors que plus de trois quarts des FCD type II étaient Engel Ia (Krsek et al., 2009; Tassi et al., 2002)

Une méta analyse de 37 études portant sur 2014 patients a retrouvé 7 facteurs pronostiques prédictifs dans la chirurgie de l'épilepsie des dysplasies : caractère partiel des crises, localisation temporelle de la lésion, IRM anormale, type histologique (FCD type II), résection complète, âge >18 ans, et caractère unilatéral des anomalies EEG. (Rowland *et al.*, 2012) Les deux facteurs pronostiques principaux sont le caractère complet de l'exérèse et la présence d'anomalie IRM (odds ratio : 3.91 et 1.61 respectivement). L'importance de la résection complète a conduit certaines équipes à réaliser des biopsies systématiques des berges d'exérèse, et à montrer l'association statistiquement significative de la positivité des biopsies avec la rechute des crises. (Cohen-Gadol *et al.*, 2004)

Améliorer les résultats post opératoires implique d'améliorer la « visibilité » per opératoire de la lésion. Actuellement, l'utilisation de la neuronavigation, avec introduction de l'imagerie multimodale est standardisée dans l'ensemble des blocs opératoires, et a permis d'augmenter la précision du geste chirurgical, basé sur les données préopératoires. L'utilisation de l'imagerie per opératoire dans les dysplasies a été proposée pour éviter des exérèses incomplètes. L'échographie per opératoire peut révéler les dysplasies de type IIb qui sont spontanément hyperéchogènes. (Miller et al., 2008) L'échographie avec évaluation de l'élasticité du tissu (Shear Wave Elastography) semble également prometteuse, car capable de détecter une augmentation de rigidité au niveau de la dysplasie, même en cas d'IRM négative. (Chan et al., 2014)

L'IRM per opératoire semble également pertinente. Ainsi dans une série consécutive de 12 patients, l'IRM peropératoire détectait un résidu chez 5 malades, et l'exérèse était complétée avec de bons résultats puisque 11/12 malades étaient libres de crises. (Sacino *et al.*, 2016)

L'électrocorticographie per-opératoire peut aider à délimiter la résection, en prenant en compte des limites non pas morphologiques, mais électrophysiologiques, par l'enregistrement avant et après résection des anomalies interictales.

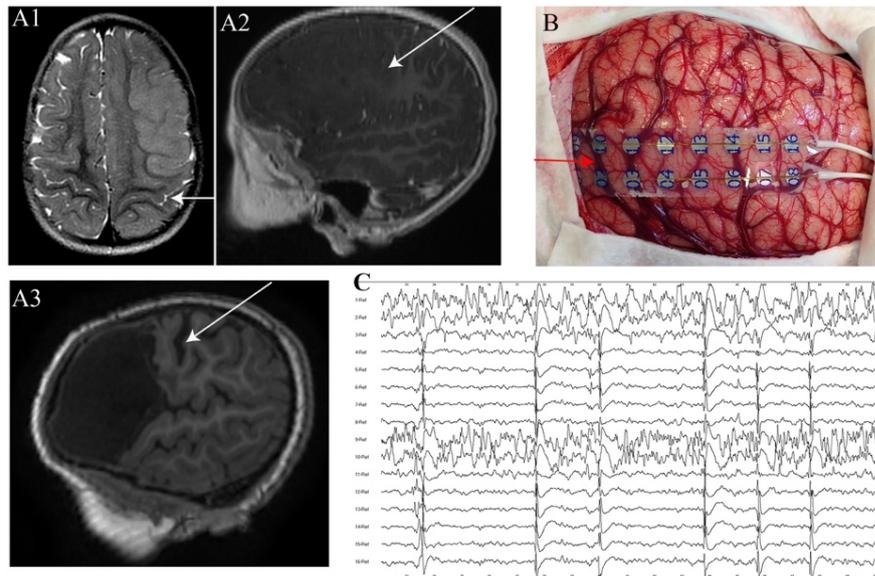


Figure 9 :

Exemple de résection lobaire avec électrocorticographie per-opératoire (données personnelles non publiées)

Si l'étude des pointes « classiques » n'a pas prouvé son apport pour améliorer le pronostic post opératoire dans la chirurgie de l'épilepsie, (Asano *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2013; Wray *et al.*, 2012) les oscillations hautes fréquences (ripples et fast ripples) semblent être des biomarqueurs de la zone épileptogène.

Plusieurs études comportant essentiellement des dysplasies ont montré que la persistance de HFO (et notamment fast ripples) après résection est corrélée à un mauvais pronostic épileptique post opératoire. (van 't Klooster *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2010)

Un essai prospectif randomisé a ainsi démarré à Utrecht, avec la détection peropératoire des HFO, et la randomisation en 2 bras : exérèse lésion et HFO vs. Exérèse lésion. (van 't Klooster *et al.*, 2015)

L'exérèse est également conditionnée par les relations anatomiques de la dysplasie et de zones cérébrales fonctionnelles. Or, la localisation frontale voire centrale des FCD est fréquente. Il est donc nécessaire de pouvoir cartographier les fonctions cérébrales par un bilan pré ou per opératoire. L'imagerie fonctionnelle et la stimulation corticale per opératoire permet de réaliser des exérèses même en région motrice, d'autant plus qu'il existe une réorganisation fonctionnelle corticale, avec un bon résultat épileptique et une morbidité acceptable. (Devaux *et al.*, 2008)

La problématique fonctionnelle est certainement plus importante dans les cohortes adultes, ou d'adolescents, car chez les nourrissons, et les enfants de moins de 3 ans, la réorganisation fonctionnelle est excellente. Certaines équipes proposent donc des chirurgies « maximalistes » chez les jeunes enfants, car la cognition est corrélée à l'arrêt des crises comitiales et du traitement. Une stratégie épargnant le cortex moteur dans les dysplasies étendues chez les patients de moins de 2 ans ne paraît pas souhaitable car le contrôle de l'épilepsie est alors nettement inférieur aux résultats des hémisphérotomies pour un gain fonctionnel modéré. (Krsek *et al.*, 2009; Lerner *et al.*, 2009)

Des stratégies chirurgicales alternatives à la chirurgie de résection sont également proposées. Les thermo-coagulations stéréotaxiques sont réalisées au décours d'un enregistrement SEEG, par un courant bipolaire de 50V/120mA délivré pendant 10 à 20 s, provoquant une élévation locale de la température à 78-82°C, et une lésion de 100 mm³ par cible. Les résultats des thermo-coagulations dans 14 malformations de développement (10 dysplasies) corticales ont été rapportés avec de bons résultats. Les lésions (25 cibles / procédure) étaient situées en territoire fonctionnel (région centrale n=3, insula n=5, face mésiale du lobe occipital n=1). La réduction de la fréquence des pointes sur l'enregistrement SEEG était immédiate. Il n'y avait pas de déficit neurologique au long cours, et 94% des patients avaient une réduction d'au moins 50% (patients répondeurs) de la fréquence des crises à 2 mois (et 64% au long cours). (Catenoix *et al.*, 2015) La morbidité faible de cette procédure était confirmée dans deux centres, sur une cohorte de 89 malades, (Cossu *et al.*, 2015) et 162 patients (44 dysplasies) successifs sur une période de 10 ans (1.1% de déficit). Les patients répondeurs avaient une forte probabilité d'être libres de crises, si une chirurgie d'exérèse était secondairement programmée. (Bourdillon *et al.*, 2017)

De nouvelles modalités de thermo lésion sont en cours de validation. La MRgLITT (laser intersitial thermal therapy) crée une lésion thermique sous contrôle IRM après introduction stéréotaxique d'une fibre laser dans la zone épileptogène. La morbidité semble faible, avec des résultats prometteurs, qui devront être vérifiés sur des séries prospectives multicentriques. (Lewis et al., 2015)

7. Etiologies des DCF

Plusieurs hypothèses virales, infectieuses et génétiques sont évoquées comme cause des FCD. L'explosion des connaissances sur le génome humain et le phénomène de mosaïque a permis d'identifier un début d'étiologie génétique des FCD, mettant en exergue la voie mTOR.

7.1. HPV et autres hypothèses environnementales

Les balloon cells rencontrées dans les FCD ressemblent morphologiquement aux balloon cells observées dans les dysplasies du col utérin après infection par Human Papilloma Virus (HPV 16). Or l'oncogenèse des cancers du col utérin dépend de l'activation de la voie de mTORC1 par l'oncoprotéine E6 du virus HPV16, et plusieurs études mettaient en évidence un « mTORpathie » dans les FCD. L'hypothèse d'une contamination virale materno fœtale a donc été soumise pour expliquer l'origine des FCD.

*Une étude portant sur 50 FCD type IIb a donc recherché des signes directs ou indirects d'une infection par Human Papilloma Virus (HPV) sur des spécimens de cortex cérébral. L'analyse immuno-histochimique retrouvait une positivité pour la protéine E6 au niveau des balloon cells, colocalisée avec l'expression de la protéine S6, suggérant une activation de la voie mTORC1. L'analyse par PCR retrouvait également l'ADN et l'ARN du virus HPV16E6 dans le cortex dysplasique. Enfin, l'électroporation in utero au jour embryonnaire 16 d'un plasmide codant la protéine E6 dans le cerveau d'embryon de souris aboutissait à des troubles de migration neuronale : les neurones s'accumulaient au niveau de la zone sous ventriculaire, et étaient positifs en immunohistochimie pour E6 et PS6. (Chen *et al.*, 2012)*

*La possibilité d'une infection virale materno-fœtale fut par la suite soutenue par une étude en PCR et immunohistochimie sur 47 spécimens chirurgicaux de FCD IIa (27 cas) et de FCD IIb (n=20). Quatre types de virus étaient retrouvés : HPV16 (n=24), CMV (n=9), HHV6B (n=6) et HSV1 (n=15). (Liu *et al.*, 2014)*

Ces résultats étaient surprenants car la transmission trans placentaire du HPV reste débattue, et l'hypothèse virale était finalement infirmée un an plus tard, par deux

études sur 14 pièces de résection chirurgicale de FCD IIb. Dans la première étude, l'ADN viral de HPV16 n'était retrouvé dans aucun des 14 cas en analyse par PCR, et l'immunomarquage de la protéine E6, n'était que faiblement positif, et non spécifique des balloon cells. (Coras *et al.*, 2015) Dans la seconde étude, la concordance des études en PCR, Hybridation in situ, et immunohistochimie n'était positive que dans un cas, remettant également en cause l'étiologie infectieuse des FCD IIb. (Shapiro *et al.*, 2015)

La non spécificité des Anticorps commerciaux utilisés dans l'étude de Chen en 2012 semble expliquer leurs résultats, et aujourd'hui, l'origine virale des FCD est fortement remise en cause.

Il n'y a actuellement pas d'argument scientifique pour une origine environnementale des dysplasies corticales focales.

7.2. Défects moléculaires : mTOR et voies apparentées

Figure 10 : La voie mTOR. D'après Lipton et Sahin. *Neuron*, 2014

L'implication de la voie mTOR / PI3K / AKT est reconnue dans la sclérose tubéreuse de Bourneville, les hémimégalencéphalies, et les malformations de développement corticales depuis quelques années. (J. H. Lee *et al.*, 2012; K.-C. Lim and Crino, 2013; Yasin *et al.*, 2013).

La protéine mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) est une protéine sérine/thréonine kinase du groupe phosphoinositide3kinase, jouant un rôle clé dans l'intégration des messages moléculaires pour interagir avec l'environnement. (Lipton and Sahin, 2014) Sa fonction est médiée par 2 complexes protéiques, mTORC1 (Deptor) et mTORC2 (Rictor). La voie de mTOR est activée par des signaux extracellulaires (BDNF, IGF1, VEGF, Glutamate, CNTF...) qui en inhibant le complexe TSC (TSC1-TSC2-TBC1D7) permettent l'activation de TSC1 par Rheb (Ras homolog enriched in brain). A l'inverse, les kinases dépendantes de l'AMP (AMPK) inhibent le complexe mTORC1 en activant le complexe TSC.

L'activation du complexe mTORC2 aboutit à une augmentation de la survie cellulaire, de la prolifération et du renforcement du cytosquelette. L'activation du complexe mTORC1 renforce la synthèse protéique (protéine phospho S6), et régule l'autophagie, la synthèse biolipidique, la genèse mitochondriale et la réponse à l'hypoxie. Dans le cerveau, l'activation de la voie mTOR a des conséquences cellulaires (morphologie anormale, épines dendritiques anormales, défaut d'autophagie, augmentation du stress cellulaire), neurophysiologiques (hyperexcitabilité, augmentation de la LTP, diminution de la LTD), et sur l'organisation des circuits neuronaux (dyslamination, trouble de la polarité neuronale, connectivité défectueuse). La voie mTOR joue un rôle fondamental dans le développement cérébral, prouvé dans un modèle transgénique de souris Emx1-mTOR, ou l'activation conditionnelle de la voie mTORC1 pendant l'embryogénèse aboutit à une microcéphalie par apoptose des progéniteurs neuronaux. (Kassai *et al.*, 2014).

Des arguments pour une cause génétique constitutionnelle de l'implication de la voie mTOR ont été apportées par l'étude de 3 familles épileptiques australiennes. (Scheffer *et al.*, 2014) Des mutations du gène DEPDC5 étaient associées à des épilepsies focales non lésionnelles chez certains membres de la famille, mais également associées à des lésions IRM (Dysplasie corticale focale n=3, hétérotopies n=1) chez d'autres. La protéine DEPDC5 fait partie du complexe GATOR, qui régule négativement la protéine mTORC1, aboutissant à une hyper-activation de la voie mTORC1 dans ces familles.

En mars 2015, des données expérimentales ont démontré l'existence et l'implication de mutations somatiques de mTOR. (J. S. Lim *et al.*, 2015) Le séquençage complet de l'exome (algorithmes Varimid et Mutect) d'échantillons couplés sang / cerveau de 4 patients avec une FCD type II retrouvait 3 variants de mTOR : c.4448G>A, c.7255G>A, c7280 T>A. Le séquençage par « deep site specific amplicon » retrouvait chez 2 patients une mutation mTOR c.7280T>C codant pour l'acide aminé p.leu2427pro. Tous les exons du gène mTOR étaient alors séquencés ainsi qu'un « specific amplicon sequencing » de 3 sites candidats chez 73 sujets, retrouvant 8 mutations somatiques différentes chez 10 sujets.

Au total, 15.6% des patients explorés présentaient 9 mutations somatiques différentes de mTOR. Ces mutations aboutissaient à une augmentation de l'activation

de mTOR (activité tyrosine kinase), démontrée par l'augmentation du nombre de neurones phosphoS6 positifs en immunohistochimie.

Enfin, l'électroporation in utero à des souris de la mutation p.Leu2427Pro provoquait des crises électro-cliniques spontanées, et en histologie des troubles de la migration neuronale, avec un immunomarquage positif pour phosphoS6. Ce phénotype était réversible sous traitement par rapamycine.

Figure 11 : D'après Lim, Nature Medecine 2015

La transfection de l'anomalie de mTOR provoque un phénotype clinique épileptique et histologique de FCD.

De telles mutations somatiques de MTOR ont été retrouvées récemment par une étude japonaise portant sur 13 FCD IIb. (Nakashima *et al.*, 2015) 6 mutations de mTOR étaient validées : c.4376C>A ; c.4379T>C ; c.6644C>A and c.6644C>T ; c.4379T>C and c.6644C>A.

*L'activation de la voie de mTORC1 peut également être expliquée par des mutations ou l'activation de voies en amont de mTOR. Ainsi, 4 mutations de PIK3C étaient retrouvées au sein d'une cohorte de 33 enfants épileptiques opérés de malformations de développement cortical localisées ou hémisphériques aboutissant à une activation de la voie PIK3/AKT/mTORC1, par inhibition de TSC2. (Jansen *et al.*, 2015)*

*Les anomalies de la voie PIK3/AKT dans les malformations de développement cortical peuvent également expliquer le défaut histologique par une voie différente de mTOR. (Baek *et al.*, 2015) Des microdissections de cortex provenant de patients épileptiques présentant une mutation somatique de AKT (c.49G>A; p.E17K) ont montré que la mutation était présente dans les cellules exprimant une activation de la voie mTORC1 (pS6 +). L'électroporation de cette mutation AKT3^{E17K} dans le cerveau d'embryons de souris au stade E14.5 provoquait des anomalies histologiques similaires aux dysplasies corticales focales (hétérotopies, neurones dysmorphiques),*

et l'apparition de crises électro cliniques répétées.

Si le traitement par rapamycine annulait les anomalies cellulaires, il persistait des troubles de la migration neuronale. La mutation AKT3^{E17K} activait le facteur de transcription FOXG1, via l'activité kinase de AKT, et aboutissait à une augmentation de la transcription de reelin. Cette sécrétion ectopique de reelin explique les troubles de migration car ceux-ci étaient réversibles en présence de ReIn SiRNA.

Figure 12 : D'après Baek. Nature Medecine 2015

La voie PI3K/AKT provoque une sécrétion ectopique de Reelin, à l'origine des troubles de migration.

7.3. Modèles animaux

7.3.1. Freezing

Décrie il y a 40 ans, il s'agit de l'application sur la calvaria d'une pointe de 4 mm, réfrigérée à -100°C pendant une durée de 10 secondes chez des rats à P1, provoquant une nécrose des couches corticales I et IV, secondairement repeuplée par des neurones après une phase inflammatoire (Dvorak *et al.*, 1978)

La lésion aboutit à un micro gyrus comportant 4 couches. La largeur de la sonde et sa durée d'application modifient l'expression histologique des lésions (possibilité de schizencéphalie). Néanmoins, il n'y a pas de crises spontanées, même si le cortex est hyperexcitable, et plus susceptible de produire des décharges critiques en condition hyperthermique. (Scantlebury *et al.*, 2004) Plus récemment, des lésions prénatales in utero, au stade embryonnaire E18 ont été réalisées. (Takase *et al.*, 2008) En post natal, à partir de P38, pendant 40 jours, la stimulation électrique par kindling des lobes frontaux permet d'obtenir secondairement des crises électro cliniques spontanées.

Le cortex péri lésionnel est hyperexcitable, et génère des post décharges après stimulation électrique. (K. M. Jacobs et al., 1996) Une modification de la balance excitation / inhibition a été proposée par des études en autoradiographies montrant une augmentation quantitative des récepteurs AMPA et Kainate et une réduction des récepteurs GABA_A dans le cortex péri dysplasique. (Zilles et al., 1998)

Des modifications de l'expression des cotransporteurs du chlore ont été montrées dans ce modèle par hybridation in situ, avec une augmentation d'expression de NKCC1 et une diminution d'expression de KCC2 à P4, pendant la migration neuronale, et se normalisant à P7, une fois le microgyrus constitué. (Shimizu-Okabe et al., 2007) (Les anomalies des cotransporteurs du chlore seront détaillées ultérieurement paragraphe 8.4).

Figure 13 : D'après Dvorak, Acta Neuropathol 1978.

Les lésions de freezing génèrent un micro gyrus à 4 couches.

7.3.2. MAM

L'injection in utero de methylazoxymethanol acetate a été rapportée il y a 50 ans. (Spatz and Laqueur, 1968) Cet agent cytotoxique provoque des troubles de la migration et de la différenciation neuronale, secondaires à une méthylation et une alkylation anormales de l'ADN. (Luhmann, 2016)

Le type de malformation induites dépend de la date d'injection qui est classiquement au stade embryonnaire E15, avec des lésions des champs CA1 et CA2 de l'hippocampe. Les hétérotopies neuronales se situent sur la paroi ventriculaire, et sont hyperexcitables, en rapport avec une réduction de la sous unité Kv4.2 des canaux potassiques voltages dépendant, de type A, à inactivation rapide. (Castro *et al.*, 2001) Ces neurones sont intégrés dans des réseaux anormaux, corticaux et sous corticaux.

7.3.3. Irradiation in utero

Cette technique a été développée chez le rat dans les années 50 pour étudier les conséquences de l'irradiation sur le développement cérébral. (McGrath *et al.*, 1956) Des doses moyennes d'irradiation (145-225 cGy) gamma sur des rates gestantes induisent différents types de malformation cérébrale en fonction du terme. Un microgyrus à 4 couches peut être produit au stade E16.

L'hyperexcitabilité corticale est expliquée dans ce modèle par une réduction de 50% du nombre d'interneurones GABAergiques. (Deukmedjian *et al.*, 2004)

Ce modèle provoque des crises spontanées, d'origine temporale ou frontale. (Kondo *et al.*, 2001)

7.3.4. BCNU

L'injection intra utérine à des rats au stade E15 de 1-3-bis-chloroethyl-nitrosurea provoque des malformations corticales associant une dyslamination, des neurones cytomégaliqes, des hétérotopies et des agrégats de cellules de Cajal-Retzius. (Benardete and Kriegstein, 2002)

On ignore actuellement si les rats développent des crises d'épilepsie in vivo,

par contre, in vitro les tranches corticales présentent une hyperexcitabilité associée à un défaut d'inhibition GABAergique.

7.3.5. Acide iboténique

L'injection à P2-P3 dans le cortex occipital de chat de l'agoniste glutamatergique ibotenate provoque des malformations évoquant chez l'homme des micro gyri ou des ulégurie. (Innocenti and Berbel, 1991)

Ces procédures ont été répliquées chez le hamster et le rat avec des lésions histologiques proches du modèle de freezing. Des crises spontanées n'ont pas été rapportées dans ce modèle animal.

Modèle	Espèce	Chronologie	Defect histologique	Physio-pathologie
MAM	Souris, rat, furet	Variable. E15	Hétérotopie nodulaire périvericulaire	Absence de crises spontanées. Hyperexcitable
Freezing	Souris, rat	P0-P1. E18	Microgyrie, hétérotopie, schizencéphalie	Crises spontanées si lésion à E18
Irradiation	Souris, rat, primate	E12-E17 Dysplasie corticale E17	Microgyrie, hétérotopie,	Hyperexcitable, crises spontanées
BCNU	Rat	E15	Dyslamination, hétérotopies, neurones cytomégaliques	Hyperexcitable. Trouble de la mémoire de travail
Ibotenic acid	Hamster, rat, chat	Rat : P0 Chat : P2/3	Microgyrie, ulegurie, hétérotopies nodulaires periventriculaires, schizencéphalie	Hyperexcitable

Tableau 4 : D'après Luhman. Journal of neuroscience method. 2016

8. Epileptogénicité des dysplasies

La compréhension de la physiopathologie de l'épileptogénicité des FCD est primordiale pour la proposition du traitement. Plusieurs hypothèses ont été proposées, concernant les cellules générant les rythmes épileptiques, l'anomalie de la balance inhibition / excitation, mais les causes ne semblent pas univoques, ce qui rend difficile un traitement pharmacologique visant un mécanisme unique.

8.1. Implication des cellules anormales / architecture : données de cellules dissociées

Pour déterminer quelles cellules présentaient des propriétés anormales, l'équipe de UCLA a développé une méthodologie spécifique dès la fin des années 90. A partir des données cliniques, de l'imagerie, et des enregistrements électrocorticographiques peropératoires, il était distingué des zones peu anormales et des zones très anormales (pointes en électrocorticographie, anomalie de signal IRM). Lors de la résection chirurgicale, des prélèvements destinés à la recherche étaient alors distingués pour permettre des corrélations entre clinique, histologie et données électrophysiologiques in vitro. (Cepeda *et al.*, 2005) Initialement, des enregistrements unitaires de neurones étaient réalisés in vitro sur tranche entière de cortex de 350-400µm d'épaisseur, et corrélées avec leur morphologie après injection de biocytine. (Mathern *et al.*, 2000) Puis, les enregistrements étaient réalisés essentiellement sur neurones dissociées par dégradation enzymatique (papaïne) et mécanique des tranches de cortex. (Cepeda *et al.*, 2003; Cepeda, André, *et al.*, 2005) Les résultats principaux de ces travaux peuvent être synthétisés :

- *Les neurones de morphologie normale* ont des propriétés membranaires normales.
- *Les neurones pyramidaux cytomégaliques* ont des propriétés membranaires anormales : capacitance élevée, résistance diminuée. Ces cellules génèrent de larges courants calciques lorsqu'elles sont dépolarisées en voltage clamp. Elles

sont localisées dans les « zones très anormales » sur le plan électrocorticographique et en imagerie.

- Les *neurones pyramidaux mal orientés dysmorphiques* ont des propriétés semblables aux neurones pyramidaux normaux.
- Les *neurones immatures* ont une faible capacitance et une résistance élevée. Les courants entrants sont essentiellement sodiques.
- Les *balloon cells* ne génèrent pas de courant sodique ou calcique. Elles ne semblent pas impliquées dans la genèse des activités épileptiques. D'ailleurs, des études histologiques par immunofluorescence et microscopie électroniques montrent qu'il n'y a pas de synapses sur le soma des balloon cells. (Alonso-Nanclares *et al.*, 2005)
- Les *interneurones cytomégaliqes* ont une taille augmentée (507 μ m) et un nombre plus élevé de dendrites et d'épines dendritiques que les interneurones normaux. (André *et al.*, 2007) La majorité sont des interneurones « basket cells » ou bipolaires. Leurs propriétés sont proches de celles des neurones pyramidaux cytomégaliqes : capacitance élevée, résistance diminuée. Néanmoins, ils n'ont pas de courants calciques, et leur potentiel de repos membranaire est comparable aux interneurones normaux. Leur fréquence de décharge est plus rapide que les interneurones, et ils sont spontanément hyperexcitables (dépolarisations membranaires spontanées, spikes sodiques non inactivant).

Figure 14 : D'après Cepda, 2003.

A et B : morphologie cellulaire en imagerie infrarouge A), et après injection de biocytine (B). D : apparition de courants calciques répétés (D2) dans les neurones cytomégaliqes lors de dépolérisation cellulaires imposées en voltage clamp. F : courants post synaptiques spontanés.

8.2. Transmission Glutamatergique

L'implication de la transmission glutamatergique a été montrée dans une étude in vitro sur tranches de cortex provenant de dysplasies corticales focales de patients opérés d'une épilepsie focale. (Avoli *et al.*, 1999) Spontanément silencieuses, les tranches généraient des activités ictales régulières, lors de l'infusion de 4 AP, un bloqueur potassique qui augmente la libération de neurotransmetteurs excitateurs et inhibiteurs. Les décharges étaient supprimées par les antagonistes spécifiques des récepteurs au Glutamate NMDA (APV et CPP), et par l'antagoniste des récepteurs AMPA/kainate CNQX. (Avoli *et al.*, 1999)

Les récepteurs glutamatergiques tendent à être surexprimés, et leur composition modifiée dans les dysplasies corticales focales. (Aronica *et al.*, 2003; Finardi *et al.*, 2013; Ying *et al.*, 1998) Ceci est confirmée en électrophysiologie in vitro par des études en patch clamp sur neurones dissociés provenant du cortex de patients opérés. (André *et al.*, 2004) L'application de NMDA dans le milieu extracellulaire provoquait des courants entrants, comparables entre les neurones de morphologie normale et les neurones cytomégaliques. Néanmoins la réduction d'amplitude plus faible des courants entrants des neurones cytomégaliques après infusion de Magnésium et la diminution de sensibilité à l'infusion de nifendipil témoignent d'une modification possible de la composition des Récepteurs NMDA des neurones cytomégaliques au niveau de la sous unité NR2B. Ceci était confirmé en PCR, et en immunofluorescence, avec une réduction quantitative de la sous unité NR2B dans les neurones cytomégaliques. (André *et al.*, 2004)

Figure 15 : d'après André. 2004.

Immunomarquage NeuN et NR2B en microscopie confocale Diminution d'expression de NR2B dans les neurones cytomégaliques (L) en comparaison des neurones de morphologie normale (I).

8.3. Transmission GABAergique et interneurones

- Données Histologiques

Des études histologiques, marquant les interneurones GABAergiques (immuno réactivité GAD), et notamment les interneurones en chandelier ou en panier (immuno

réactivité Parvalbumin) ont été réalisées sur de petits effectifs de patients opérés de dysplasie corticale focale.

En comparaison avec le cortex normal, il existe une *réduction globale de l'immuno réactivité PV/GAD dans les dysplasies*. (Garbelli *et al.*, 1999; Zamecnik *et al.*, 2006) Dans les dysplasies de type IIb, il existe un regroupement des terminaisons PV/GAD+, autour du soma des neurones cytomégaliques, alors qu'il n'y a aucune immunoréactivité autour des balloons cells. (Garbelli *et al.*, 1999; Spreafico *et al.*, 2000)

La combinaison d'études en immunofluorescence et en microscopie électronique a permis d'individualiser dans les FCD type IIb, autour des neurones cytomégaliques ectopiques de la substance blanche, des *formations hypertrophiques en panier, PV+*, correspondant au regroupement de synapses symétriques GABAergiques en microscopie électronique. (Alonso-Nanclares *et al.*, 2005) Si la distribution des synapses excitatrices et inhibitrices est clairement différente dans les FCD par rapport au cortex normal, il n'est pas possible de les systématiser dans les dysplasies et de faire un lien avec l'anomalie architecturale.

Figure 16 : D'après Alonso Nonclares 2005.

Formation Hypertrophique en panier : neurone cytomégaliique (rouge en marquage NeuN) entouré de synapses GABAergiques (vert Parvalbumin).

Enfin, la représentation des interneurones est différente en fonction du sous-groupe de dysplasie. En effet, dans les FCD type I et III, il existait une réduction quantitative des interneurones PV+, tandis que dans les FCD type II, leur nombre était conservé, mais leur répartition spatiale était anormale, sans pouvoir déterminer un pattern spécifique de leur localisation. (Medici *et al.*, 2016).

- *Electrophysiologie* :

L'anomalie quantitative et / ou qualitative des interneurones en histologie est corrélée au niveau électrophysiologique par une réduction de l'inhibition dans les

dysplasies corticales focales. En effet, les enregistrements en whole cell dans des tranches de FCD de patients opérés ont montré une réduction des courants post synaptiques inhibiteurs (IPSC spontanés et miniIPSC) en comparaison du cortex non dysplasique. (Calcagnotto, 2005)

La transmission GABAergique est cependant indispensable pour l'initiation de décharges épileptiques dans des tranches de cortex dysplasiques. (D'antuono *et al.*, 2004) En effet, après infusion de 4AP, des décharges ictales et interictales répétées, accompagnées d'élévation transitoire de $[K^+]_o$ étaient observées. L'application de l'antagoniste compétitif des Rc GABA_A Bicuculline methiodide (BMI, 10 μ M) transformait l'activité ictale en activité interictale régulière, pouvant correspondre aux décharges préictales identifiées dans d'autres travaux. Le renforcement de la transmission GABA par le phénobarbital (20 μ M) augmentait la fréquence et l'amplitude des événements ictaux. (D'antuono *et al.*, 2004) Enfin, l'hyperpolarisation des interneurons, principalement des cellules en paniers, par l'agoniste opioïde mu DAGO bloquait les décharges ictales, confirmant l'implication des interneurons dans la production des crises.

Figure 17 : d'après d'Antuono. 2004

Suppression des activités ictales in vitro par le bicuculline methiodide

L'enregistrement de neurones dissociés confirme les anomalies de la transmission GABAergique et distingue différents mécanismes selon le sous type histologique. En effet, dans les dysplasies de type II, les neurones cytomégaliques portent des courants GABAergiques d'amplitude augmentée et de cinétique réduite, en comparaison des neurones de morphologie normale et des FCD type I. (André *et al.*, 2008) Une altération de la composition des sous-unités des récepteurs GABA_A était proposée dans les FCD type II, car il existait une réduction de la sensibilité au zolpidem (sous unité α 1) et au zinc (sous-unité γ 2). L'augmentation des IPSCs après application de bretazenil (agoniste sous unité α 3-4-5) soutenait l'existence de modifications du Récepteur GABA_A dans les FCD type II, avec un profil embryonnaire, associant une réduction des sous unités unité α 1 et une augmentation d'expression des sous unités α 3-4-5. (André *et al.*, 2010) Ces études fonctionnelles étaient

confirmées par des études d'expression en western blot, qui montraient dans les FCD IIb, une réduction de la sous unité $\alpha 1$. (Talos *et al.*, 2012)

Figure 18 : d'après André 2010 et Talos 2012.

A : réduction de l'expression de la sous unité $\alpha 1$ dans les FCD IIb. D et F : réduction de la sensibilité au zolpidem ($\alpha 1$) et au zinc ($\gamma 2$) dans les FCD II.

Ces anomalies de la transmission GABAergique peuvent être à l'origine des anomalies rythmiques épileptiques, puisque une activité « pacemaker » était enregistrée, essentiellement dans les zones les plus anormales de dysplasies de type II et III, au niveau des neurones cytomégaliques, caractérisée par des potentiels inhibiteurs post synaptiques miniatures rythmiques (mIPSP à 5-10 Hz), fortement autocorrélés, bloqués par les inhibiteurs GABA et indépendants de la transmission Glutamatergique. (Cepeda *et al.*, 2014).

8.4. Régulation neuronale du chlore : Co-transporteurs et autres

8.4.1. Défect : Cl⁻ / EGABA / KCC2 – NKCC1

Les études in vitro en whole cell recording montrent une modification du potentiel d'inversion du GABA qui tend à être dépolarisé, (Cepeda *et al.*, 2014) rendant compte d'une augmentation de concentration du chlore intra cellulaire.

La concentration intra neuronale en Cl⁻ ($[Cl^-]_i$) est majoritairement régulée par les cotransporteurs du chlore (CCC) qui assurent un transport de Cl⁻ via le gradient électrochimique d'une autre espèce ionique. Ces co-transporteurs sont représentés principalement par NKCC1 (co-transporteur sodium-potassium-chlore) et KCC2 (co-transporteur potassium-chlore) qui agissent sous l'influence du gradient transmembranaire sodique et potassique respectivement, créé par la pompe Na/K ATPase. (Kaila *et al.*, 2014)

KCC2 et NKCC1 ont des effets opposés. NKCC1 charge le neurone en chlore, augmente $[Cl^-]_i$ et favorise les réponses dépolarisante au GABA, lorsque le potentiel

d'inversion du Cl⁻ est dépolarisé par rapport au potentiel membranaire du neurone. KCC2 extrude le chlore intra cellulaire et maintient [Cl⁻]_i basse, favorisant, lors de l'ouverture des conductance GABA_A un flux entrant, hyperpolarisant de Cl⁻. Il faut néanmoins noter que la concentration de potassium extra cellulaire influe sur les flux ioniques via KCC2, qui agit proche de son équilibre thermodynamique, et que l'élévations de [K⁺]_o peut provoquer un flux entrant de Cl⁻ à travers KCC2, à l'origine d'une modification de l'excitabilité neuronale. (Blauwblomme *et al.*, 2014).

Figure 19 :D'après Blaesse, Neuron 2009 et Kahle, Neuroscientist 2016
Effets antagonistes des cotransporteurs du chlore.

L'expression des CCC est variable spatialement, au cours du développement et selon les conditions physiologiques ou pathologiques. (Blaesse *et al.*, 2009) NKCC1 est exprimé dans les astrocytes, au segment initial des axones des neurones, dès la première partie de la vie embryonnaire tandis que KCC2 est exprimée exclusivement dans les neurones à partir de la deuxième partie de gestation chez l'homme, conférant un phénotype mature aux neurones différenciés. (Kaila *e al.*, 2014) L'expression de NKCC1 atteint son maximum à 39 semaines de gestation chez l'homme, et chute durant la première année de vie, jusqu'à devenir quasiment indétectable à 2 ans et demi. L'expression de KCC2 est faible à la naissance, et atteint un niveau comparable à l'adulte vers un an de vie. (Dzhala *et al.*, 2005)

Figure 20 : d'après Dzhala 2005.

B : expression de NKCC1 et KCC2 chez l'homme, en western blot, exprimés en pourcentage par rapport aux valeurs adultes. C et D immuno marquage de NKCC1 et KCC2 chez l'homme.

La modification du potentiel électrochimique du Cl⁻ associée à une régulation négative de l'expression de KCC2 a été identifiée dans plusieurs conditions épileptiques à partir de tissu humain.

Tout d'abord, à partir de spécimens d'hippocampe sclérotiques de patients épileptiques, une activité interictale spontanée était enregistrée dans le subiculum, aire

de sortie de l'hippocampe. (Huberfeld *et al.*, 2007) Les cellules pyramidales dépolarisées pendant ces événements interictaux étaient majoritairement défectives pour l'expression de KCC2, tandis que les inhibiteurs de NKCC1 (Bumétanide) bloquaient les décharges inter ictales. Des enregistrements de neurones dissociés d'hamartome hypothalamique montraient que les neurones les plus larges avaient un potentiel d'équilibre du Cl⁻ moins négatif, avec un effet dépolarisant de la transmission GABAergique, et une réduction de l'expression de KCC2. (Wu *et al.*, 2005; 2008) Enfin, dans le tissu péri tumoral de gliomes, une activité interictale spontanée était également enregistrée *in vitro*, avec un effet dépolarisant du GABA dans 2/3 des neurones pyramidaux. L'homéostasie du chlore était perturbée en raison d'une altération des co transporteurs du chlore : augmentation d'expression de NKCC1 de 144% et réduction de KCC2 de 42%. (Pallud *et al.*, 2014a)

Cette modification des cotransporteurs du chlore vers un profil embryonnaire était également notée dans le modèle animal de dysplasie par freezing. En effet, 4 jours après la constitution de la lésion, les neurones du microgyrus exprimaient NKCC1 et peu KCC2. Ceci était réversible à J14, et il était proposé que la modification d'expression des co transporteurs du chlore permettait la migration neuronale dans le microgyrus. (Shimizu-Okabe *et al.*, 2007)

Les études de cortex dysplasique humain montraient également des anomalies des cotransporteurs du chlore lors des études d'expression en western blot ou en immuno histo chimie / fluorescence.

Si dans les dysplasies de type I, le cortex dysplasique avait un immunomarquage pour KCC2 comparable au cortex normal, les FCD type II étaient anormales. (Munakata *et al.*, 2007) L'expression de NKCC1 (dont les divers anticorps sont reconnus comme non spécifiques et pour lesquels les marquages sont essentiellement cytoplasmiques et non membranaires) était quantitativement augmentée dans les dysplasies de type II, (Shimizu-Okabe *et al.*, 2011) et localisée sur les cellules gliales et les neurones, tandis que l'expression de KCC2 était diminuée, notamment dans le neuropil, par rapport au soma. (Aronica *et al.*, 2007) Dans les FCD IIb, la distribution cellulaire de KCC2 était profondément altérée, avec peu ou pas d'immunoréactivité membranaire ou dans le neuropil, et une immunoréactivité intrasomatique cytoplasmique importante, témoignant soit d'un défaut d'adressage

membranaire, soit d'un excès d'endocytose de KCC2 dans les neurones cytomégaliqes. (Talos *et al.*, 2012)

Figure 21 : d'après Aronica2017.

Forte immunoréactivité de NKCC1 dans les FCD II, et localisation dans les neurones (H, marquage NeuN) exprimant des Rc GABA (I)

Les co transporteurs du chlore sont impliqués dans d'autres mécanismes que la régulation du chlore, et l'inhibition GABAergique (les fonctions non canoniques).

Ainsi, KCC2 a une distribution somato dendritique, et se concentre dans les épines dendritiques. (Chamma *et al.*, 2013) KCC2 participe à la la morphogénèse des épines dendritiques, (Chamma *et al.*, 2012) et contraint la répartition spatiale des récepteurs AMPA au niveau des épines dendritiques des synapses glutamatergiques. (Gauvain *et al.*, 2011) Ces processus morphologiques ne dépendent pas de la fonction de co transporteur du chlore mais de l'interaction du domaine C terminal de KCC2 avec le cytosquelette (protéines de la famille 4.1N ; actine). KCC2 a ainsi un rôle fonctionnel majeur dans la potentialisation synaptique au long terme (LTP).

8.4.2. : régulation des co transporteurs du chlore

Au delà de la régulation physiologique de l'expression des cotransporteurs du chlore durant le développement cérébral, leur dérégulation pathologique dans les dysplasies corticales focales n'a pas été spécifiquement étudiée. Néanmoins plusieurs facteurs peuvent être distingués.

Tout d'abord l'activation de la voie BDNF/Trkb régule négativement KCC2 au niveau transcriptionnel.

Des cultures organotypiques d'hippocampe de rat exposées au BDNF présentent une réduction dose dépendante de KCC2, via l'activation du récepteur de BDNF TrkB. L'expression de KCC2 est également diminuée après kindling, qui provoque une augmentation de BDNF. (Rivera *et al.*, 2002)

Plusieurs pathologies humaines illustrent ce mécanisme telles que l'épilepsie (hamartomes hypothalamiques et FCD, absence de preuve pour sclérose hippocampique et gliomes) et la douleur chronique où de nombreux arguments plaident pour une dysfonction GABAergique. La comparaison des neurones d'hamartome par rapport au cortex normal retrouvait des niveaux plus élevés de mBDNF et une activation de Trkb provoquant une diminution d'expression de KCC2, via la voie des MAP kinases et de la phospholipase C, (Semaan *et al.*, 2015) comme décrit dans des modèles murins d'épilepsie temporale. (Rivera *et al.*, 2004) Récemment, des études d'expression ont montré une augmentation quantitative de BDNF dans les FCD de type I, mais surtout de type II. (Zheng *et al.*, 2016) La localisation était majoritairement dans les neurones dysmorphiques, mais également dans les balloon cells.

Les douleurs neuropathiques par hyperexcitabilité des neurones de la couche I de la corne dorsale de la moelle spinale partagent la même physiopathologie. En effet, la libération de BDNF, par la microglie provoque une modification du potentiel d'équilibre du GABA, réversé par les antagonistes de TrkB. (Coull *et al.*, 2005)

Ensuite, la diminution de KCC2 membranaire dans les dysplasies de type II pourrait être lié à des mécanismes post traductionnels, tels qu'une augmentation d'endocytose puisque l'immunofluorescence intra cytoplasmique reste élevée. (Talos *et al.*, 2012) Or, la stabilité membranaire de KCC2 est sous la dépendance de la phosphorylation de sa partie C terminale cytosolique au niveau de Ser 940 par la protéine kinase C qui réduit son internalisation. (H. H. C. Lee *et al.*, 2007) La protéine Kinase C est sous l'influence directe de la voie mTORC2, avec une diminution d'activité kinase dans la sclérose tubéreuse de Bourneville. (Huang *et al.*, 2009) Il existe donc un lien possible entre voie mTOR, et localisation membranaire de KCC2, qui reste à explorer. (Talos *et al.*, 2012)

La phosphorylation des cotransporteurs du chlore, notamment étudiée dans le rein (HTA essentielle) et la corne dorsale de la moelle (douleur neuropathique) par la voie WNK-SPAR-OSR1, a des effets réciproques en activant NKCC1 et en inhibant

KCC2, et est sous la dépendance de la concentration de Cl^- intra cellulaire et de l'osmolarité. (Alessi *et al.*, 2014; Kahle *et al.*, 2016)

La phosphorylation de KCC2 dans le cerveau est également dépendante de l'activité neuronale, et notamment de l'excès de Glutamate ambiant. En effet, l'activation des récepteurs NMDA par une élévation prolongée du Glutamate dans des cultures neuronales provoquait un effet dépolarisant du GABA. Ceci était secondaire à une déphosphorylation de Ser 940 de KCC2, aboutissant à la perte de fonction de KCC2. (Lee *et al.*, 2011) L'élévation pathologique du Glutamate extra cellulaire est également rapportée dans les gliomes cérébraux, et aboutit à une régulation négative de KCC2 soit par déphosphorylation de Ser940, soit via une élévation du Zinc intra cellulaire et la voie Src/Trk. (Di Angelantonio *et al.*, 2014; MacKenzie *et al.*, 2016)

8.5. Matrice extra cellulaire

Il existe peu de données sur l'altération de la matrice extra cellulaire (MEC) dans les dysplasies, mais les charges des macromolécules de la MEC influent sur les concentrations cytoplasmiques des ions. La présence de protéines chargées négativement non diffusibles cytosoliques et extra cellulaires à des concentrations différentes crée une différence de charge transmembranaire compensée par des courants ioniques de diffusion (équilibre de Gibbs Donan). Une altération de la répartition de ces macromolécules anioniques peut donc modifier la concentration ionique intra et extra cellulaire.

*La relation directe entre la $[\text{Cl}^-]_i$ et les glycoprotéines anioniques de la matrice extra cellulaire a été montrée in vitro sur un modèle murin, exprimant un fluorophore quantifiant le Cl^- intra cellulaire (clomeleon). (Glykys *et al.*, 2014) Tout d'abord, dans cette étude la $[\text{Cl}^-]_i$ était peu influencée par le blocage des cotransporteurs du chlore, en opposition à de nombreuses études expérimentales préalables, incluant celles des auteurs. Ensuite, l'augmentation des anions intra cellulaires s'accompagnait d'une diminution de $[\text{Cl}^-]_i$ tandis que $[\text{Cl}^-]_i$ était inversement corrélée à la concentration des glycosaminoglycanes de la matrice extra cellulaire. La dissolution de ces protéines par la chondroitinase ABC réduit la charge négative des macromolécules extra cellulaires,*

et provoquait l'élévation de la $[Cl^-]_i$. Le potentiel d'équilibre du GABA peut donc être modifié par des altérations de la matrice extracellulaire.

Or, les *métalloprotéinases* (MMP) sont des enzymes permettant le remodelage de la matrice extra cellulaire dont le rôle dans diverses pathologies neurologiques est connu : inflammation, neurotraumatologie, neurodégénération, et plus récemment dans des modèles animaux d'épilepsie (kainate / Pentylentetrazole). (Wilczyński *et al.*, 2008) *La comparaison du cortex dysplasique avec un cortex contrôle montrait dans les dysplasies corticales une augmentation de l'expression des MMP9.* (Konopka *et al.*, 2013) La localisation cellulaire prédominait sur les cellules anormales : neurones géants ou dystrophiques et ballon cells, mais existait également dans une moindre mesure sur les astrocytes, tout en épargnant la microglie. (Li *et al.*, 2012)

L'étude de l'altération de la MEC par les métalloprotéinases est donc un champ d'étude ouvert également dans les FCD.

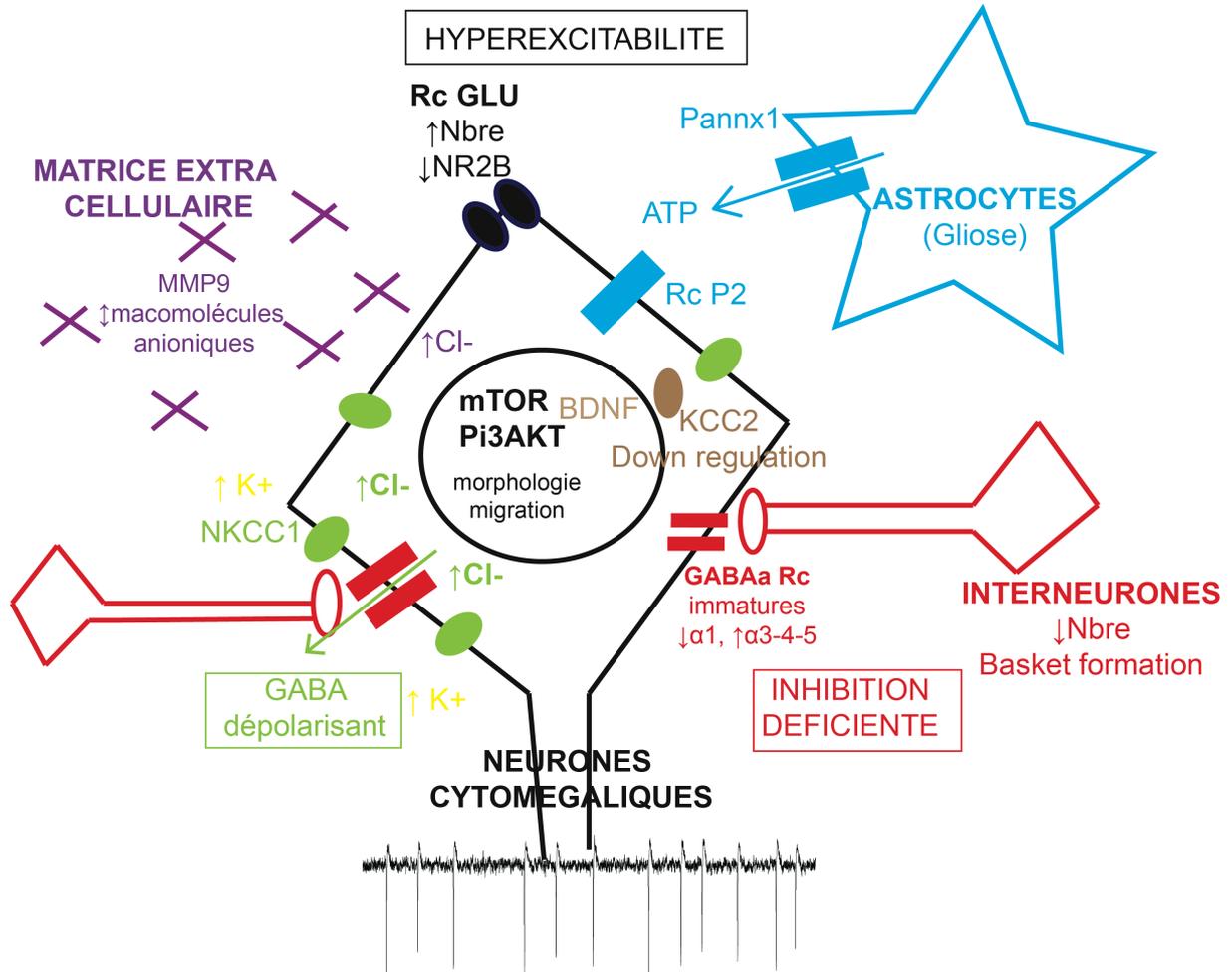
8.6. Astrocytes (et pannexines)

La *gliose astrocytaire* est un élément histologique classique de l'épilepsie chronique, notamment dans le lobe temporal. (de Lanerolle *et al.*, 2010) Les astrocytes ont un rôle reconnu dans l'épileptogénèse, et l'ictogénèse, (Blauwblomme *et al.*, 2014) par leur effet sur la recapture des acides aminés excitateurs, mais également les modifications de milieu extracellulaire en altérant la $[K^+]_o$, et le volume extra cellulaire.

Récemment, la *transmission purinergique astrocytaire*, et les héli-canaux de type pannexin ont été impliqués dans l'épileptogénicité. Dans des conditions physiologiques, la libération minimale d'ATP a un rôle dans la communication neurogliale, et du réseau astrocytaire, en conjonction avec la transmission glutamatergique. (Franke and Illes, 2014) Néanmoins, l'activation des Pannexin1 a été montrée essentiellement dans des processus pathologiques tels que inflammation, ischémie, (Velasquez and Eugenin, 2014) ou l'épilepsie en augmentant l'excitabilité neuronale. (Thompson *et al.*, 2008a) L'expression des Pannexin 1 est ainsi augmentée dans un modèle de crises *in vitro* sur tranches d'hippocampe murin, induites par le cobalt, mais également dans l'hippocampe de patients opérés d'une épilepsie temporale. (Carlen, 2012a; Mylvaganam *et al.*, 2010)

Une perturbation d'expression des Pannexin a été démontrée dans les FCD type II par western blot et immunohistochimie. En effet, l'expression des Pannx1 était plus élevée dans les FCD que dans le cortex contrôle, et était localisée dans les astrocytes, les balloon cells, et les neurones glutamatergiques. L'expression était positivement corrélée à la fréquence des crises d'épilepsie. L'implication de la libération d'ATP dans les processus épileptiques des dysplasies par les Pannx est possible, car des études immuno histo-chymiques ont montré une augmentation d'expression des récepteurs purinergiques astrocytaires P2. (Sukigara *et al.*, 2014)

SCHEMA SYNTHESE : EPILEPTOGENICITE DES DYSPLASIES



9. Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans une démarche multidisciplinaire d'amélioration de la prise en charge des enfants souffrant d'épilepsie et porteurs d'une dysplasie corticale focale dans un centre de référence d'épilepsies pédiatriques souvent pharmaco-résistantes.

Elle vise dans un premier temps à développer les méthodes d'identification des épilepsies lésionnelles suspectées sur des critères cliniques, sémiologiques et électrophysiologiques. L'identification de la lésion est d'autant plus importante que la chirurgie est plus efficace si la lésion est visible sur l'IRM. Notre premier objectif était alors de valider de nouvelles méthodologies d'imagerie dans les épilepsies lésionnelles de l'enfant afin de mieux détecter les FCD et de pouvoir les traiter. L'imagerie ASL semblait particulièrement prometteuse et adaptée à notre population pédiatrique (acquisition de courte durée, pas d'injection de traceur), et nous avons souhaité la comparer aux explorations de référence (PET) dans les FCD de type II. Par analogie au PETscan, nous avons souhaité développer une approche statistique observateur-indépendante, qui puisse être intégrée après normalisation spatiale dans un espace de travail commun aux autres méthodes de délimitation des FCD (Epileptogenicity Index, IRMf EEG, PETscan).

Dans un second temps, notre but a été d'approfondir les connaissances des mécanismes sous tendant l'épileptogénicité des FCD. Les modèles animaux étant imparfaits, nous avons souhaité valoriser nos prélèvements chirurgicaux par une approche électrophysiologique *in vitro* en faisant le lien entre les anomalies histologiques du cortex épileptique, et les anomalies électrophysiologiques qu'il génère. Nous avons donc adopté une méthode d'enregistrement par Multi Electrode Array (MEA) qui permet d'enregistrer *in vitro* sur une tranche de cortex 120 canaux simultanément en extracellulaire, et d'établir secondairement les corrélations spatiales entre les anomalies architecturales, la présence de cellules anormales et les activités épileptiques. A la lumière des données récentes sur les tissus épileptiques humains provenant du cortex péri tumoral ou de sclérose hippocampique, nous avons concentré nos recherches sur la transmission GABAergique pathologique, et les

troubles de la régulation du chlore associés aux anomalies d'expression des co-transporteurs du chlore.

La collaboration avec l'équipe du CIRB au collège de France, dont la thématique principale était les réseaux astrocytaires nous a permis de participer à une étude sur le rôle des Pannexins, dont le rôle dans l'ictogénèse a été récemment proposé dans des modèles animaux, et qui pourrait être une nouvelle cible pharmacologique.

Les objectifs de cette thèse sont donc :

- *Etude in vivo en IRM de perfusion ASL des dysplasies corticales focales*, et développement d'une approche statistique de la perfusion cérébrale
- *Etude in vitro des mécanismes sous tendant l'épileptogénicité des dysplasies corticales focales* :
 - . Méthodologie d'enregistrement des tissus corticaux humains par des matrices denses de micro électrodes (MEA)
 - . Anomalies de la transmission GABAergique et des co transporteurs du chlore dans la genèse des activités inter ictales
 - . Rôle des Pannexin1 dans l'initiation et l'entretien des activités ictales

II. Articles

1. ARTICLES

- 1.1. **Article 1:** Arterial Spin Labeling MRI: a step forward in non invasive delineation of focal cortical dysplasia in children
- 1.2. **Article 2:** Cerebral Blood Flow Improvement after Indirect revascularization for pediatric Moyamoya Disease: a statistical analysis of ASL-MRI
- 1.3. **Article 3:** Multi-Electrode-Array recordings of Human Epileptic Postoperative Cortical Tissue
- 1.4. **Article 4:** Mechanisms of ictogenesis
- 1.5. **Article 5 (soumis):** Pannexin1 channels control seizure generation in human: a therapeutic target for various epileptic conditions
- 1.6. **Article 6 (en cours):** Altered GABAergic transmission underlies epileptogenicity in human focal cortical dysplasia

1. Premier article : identification et localisation des FCD in vivo par imagerie de perfusion ASL

« *Arterial Spin Labeling MRI : a step forward in non invasive delineation of focal cortical dysplasia in children* ».

Blauwblomme T, Boddaert N, Chémaly N, Chiron C, Pages M, Varlet P, Bourgeois M, Bahi-Buisson N, Kaminska A, Grevent D, Brunelle F, Sainte-Rose C, Archambaud F, Nabbout R.

Epilepsy Research (2014) 108, 1932-1939

Contexte :

30% des patients porteurs d'une dysplasie corticale focale ne sont pas diagnostiqués par une IRM morphologique. L'utilisation de l'imagerie métabolique par PET scan permet de réduire à 15% le nombre de patients à « imagerie négative ». Néanmoins, en pédiatrie, cette technique est complexe, car elle nécessite l'injection d'un isotope radioactif, et n'est pas disponible dans tous les centres hospitaliers. L'IRM ASL est une technique d'imagerie de perfusion où le marquage des protons de l'eau circulante au niveau des artères carotides et vertébrales par une onde de radiofréquence sert de marqueur endogène. Les anomalies de perfusion cérébrale publiées montrent jusque là des résultats discordants : hypo versus hyper perfusion.

Objectifs :

Analyser les patterns de perfusion en IRM-ASL de patients porteurs d'une FCD visible en IRM, et comparaison au ¹⁸FDG-PETscan, et à l'histologie.

Méthodes :

Analyse rétrospective de l'imagerie pré et post opératoire de 9 enfants épileptiques présentant une possible FCD type II sur l'IRM, explorés par IRM morphologique 1.5 teslas, IRM avec séquences pseudo-continues d'ASL, et ¹⁸FDG-PETscan.

Comparaison par recalage semi automatique de l'imagerie.

Analyse de l'histologie avec marquage vasculaire CD34

Résultats :

1. Hypoperfusion ASL dans la FCD (45mL/100mg/mn)
2. Colocalisation de l'hypoperfusion à la lésion IRM, à l'hypo-métabolisme et à l'anomalie histologie (FCD IIb)
3. Micro-vascularisation quantitativement normale, mais désorganisation spatiale

Discussion :

Nous avons retrouvé une hypoperfusion focale colocalisée au PET dans les FCD de type II, et associée à une anomalie de la micro-vascularisation capillaire.

Néanmoins certaines limites sont à noter :

Faible effectif, ne permettant pas de déterminer la sensibilité et la spécificité.

Pas d'EEG pendant l'acquisition de l'IRM, ne permettant donc pas d'affirmer le statut intercritique de l'acquisition IRM.

Présence d'une lésion IRM morphologique

Cette étude s'est limitée aux FCD type II, et l'IRM ASL sera donc à évaluer également dans les FCD type I, dont les caractéristiques morphologiques sont peu spécifiques.

Cette étude sert donc de socle à de futures études, notamment sur la validation de la technique IRM-ASL chez les patients à IRM « normale », en utilisant comme outil de validation l'électrophysiologie par enregistrements intra crâniens (SEEG, epileptogenicity Index).

2. Analyse statistique du signal ASL.

« *Cerebral Blood Flow Improvement after Indirect revascularization for pediatric Moyamoya Disease: a statistical analysis of ASL-MRI* ».

Blauwblomme T, Lemaitre H, Naggara O, Calmon R, Kossorotoff M, Bourgeois M, Mathon B, Puget S, Zerah M, Brunelle F, Sainte-Rose C, Boddaert N.
AJNR (2016) 37, 706-712

Contexte :

Après avoir établi l'existence d'une hypoperfusion focale dans les FCD de type II, nous avons souhaité adapter la méthodologie statistique d'analyse sous SPM (Statistical Parametric mapping, www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/) utilisée en PET scan à l'IRM ASL. Nous avons choisi de développer la méthode sur une cohorte de patients présentant une ischémie cérébrale chronique (angiopathie de moyamoya), car le défaut de perfusion est sévère dans ces pathologies, rendant la validation de la méthode plus aisée. D'autre part, les corrélations sur les mesures du débit sanguin cérébral entre ASL IRM et PET ou SPECT avaient été réalisés dans ce groupe de pathologies vasculaires, l'utilisation de l'IRM ASL étant donc mieux acceptée dans ces pathologies que dans l'épilepsie.

Méthodes :

Etude prospective de 15 enfants atteints d'une angiopathie de moyamoya avant et après chirurgie de revascularisation cérébrale par une méthode indirecte « trous de trépan multiples ».

Une IRM avec séquence ASL pseudo continue était acquise en préopératoire, à 3 et 12 mois post-opératoires.

Un groupe témoin de 10 sujets sains appariés en âge et en sexe était constitué, avec le même protocole d'imagerie IRM morphologique et ASL.

La **méthodologie** d'analyse statistique développée sous logiciel SPM8 est la suivante :

1. Normalisation du T1 et de l'ASL dans l'espace du MNI (Montreal neurological institute)

2. Analyse individuelle : comparaison voxel à voxel de l'IRM ASL normalisée, lissée du patient par rapport au groupe témoin, selon le modèle linéaire général. Obtention de valeurs statistiques, interpolées sur l'IRM du patient selon un code couleur.
3. Analyse de groupe : transformation des hémisphères droits en hémisphères gauches par symétrie axiale sous SPM. Comparaison des hémisphères par rapport à eux même dans le temps. Obtention de valeurs statistiques, interpolées sur un template IRM selon un code couleur.

Résultats :

Les **résultats** principaux sont les suivants :

Obtention de cartes statistiques d'hypoperfusion préopératoires à l'échelle individuelle et de groupe

Amélioration post-opératoire objective à l'échelle individuelle et de groupe

Discussion :

Dans cette population de patients porteurs d'une angiopathie, nous avons développé une approche statistique de l'imagerie de perfusion en comparant le patient à un groupe témoin.

Cette méthode sera ultérieurement systématiquement appliquée aux patients présentant une épilepsie focale, à IRM normale ou pathologique. La normalisation de l'IRM ASL dans l'espace du MNI permettra également à l'échelle individuelle et de groupe de corrélérer les anomalies interictales de perfusion (ASL IRM), métaboliques (^{18}F FDG-PET), et électrophysiologiques (EEG-IRMf), et les anomalies ictales enregistrées en SEEG (epileptogenicity index).

L'hypoperfusion dans l'angiopathie de moyamoya s'explique par des causes hémodynamiques secondaires à la sténose de l'artère carotide interne. L'hypoperfusion des FCD peut être liée à des anomalies de la micro-vascularisation (cf article 1), à une anomalie du couplage neuro-vasculaire (pathologie astrocytaire), ou à une déafférentation fonctionnelle. L'analyse statistique de la perfusion cérébrale par IRM ASL sera donc également étudiée chez les patients opérés d'une épilepsie hémisphérique avec réalisation d'une hémisphérotomie, en corrélant la perfusion avec la connectivité fonctionnelle en IRM fonctionnelle. En effet, cette chirurgie provoque la déafférentation complète du cortex, et est un « modèle expérimental » de couplage

neurovasculaire, car le cortex est totalement déconnecté. Ces résultats seront abordés dans la discussion et rapportés dans l'annexe 2.

3. Enregistrements par MEA des tissus humains épileptiques.

« *Multi-Electrode-Array recordings of Human Epileptic Postoperative Cortical Tissue* ».

Dossi E, Blauwblomme T, Nabbout R, Huberfeld G, Rouach N.
Journal of Visual Experimentation. JoVE (2014) 92, e51870

Contexte:

Les prélèvements opératoires réalisés pendant une chirurgie cérébrale, à visée anti épileptique ou oncologique sont majoritairement utilisés à visée diagnostique. De plus en plus, une partie du tissu réséqué est congelée pour réaliser des analyses en biologie moléculaire, mais l'analyse fonctionnelle du cortex épileptique reste rare.

Conserver le cortex intact, capable de générer des activités physiologiques in vitro est un défi qui nécessite une collaboration étroite entre les équipes chirurgicales et de recherche fondamentale, et l'adhésion des patients au projet de recherche. Peu d'équipes de recherche pratiquent ces enregistrements qui permettent pourtant de s'affranchir des modèles animaux dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'épilepsie.

La difficulté d'obtenir des activités épileptiques interictales spontanée, et/ ou ictales met en lumière la nécessité de partager chaque étape des protocoles d'enregistrement du cortex humain, depuis le prélèvement au bloc opératoire, jusqu'à l'analyse du signal. Le milieu de conservation de la tranche corticale semble conditionner la viabilité du tissu, à l'avantage des chambres d'interface, où le cortex est en partie dans une phase liquide et en partie dans une phase gazeuse d'ACSF vaporisé et oxygéné. (Jones *et al.*, 2016) Néanmoins, les techniques d'exploration sont aussi limitées par l'environnement in vitro, et les enregistrements en patch clamp sont plus aisés en chambre d'immersion pouvant être combinés à de l'imagerie cellulaire bi-photonique, (Kerekes *et al.*, 2014) même si certaines équipes font des études combinées en potentiel de champ et en patch clamp en milieu d'interface. (Aivar *et al.*, 2014)

But des enregistrements, choix du système d'enregistrement :

Le but de nos enregistrements est de corrélérer les activités épileptiques in vitro avec les anomalies histologiques. Nous avons donc choisi un système de matrice de micro

électrode dense (120MEA 12X10, Multichannel System), en solution immergée, pour pouvoir réaliser des enregistrements en potentiels de champs locaux, évolutif, permettant d'adapter une colonne de patch clamp. Notre choix était également conditionné par des contraintes économiques et d'encombrement spatial.

La présence d'une cellule photographique intégrée permet de localiser les contacts d'électrodes, et de les corrélérer secondairement à l'analyse histologique. Nous avons fait réaliser sur mesure des chambres d'immersion avec des contacts espacés de 1000 μ m / 1500 μ m, afin de s'adapter à la taille des prélèvements corticaux humains, d'environ 2 cm de large. Notre but était ainsi d'enregistrer les activités physiologiques du cortex lésionnel, mais aussi du cortex transitionnel péri-lésionnel, pour cartographier les activités épileptiques.

Méthodologie

Cet article a été réalisé sous forme manuscrite, mais également sous forme vidéo, afin de permettre la reproductibilité de chaque étape du protocole expérimental, et est disponible sur le site :

<http://www.jove.com/video/51870>

Nous détaillons ainsi : le prélèvement de cortex au bloc opératoire, la préparation du milieu de transport, et l'acheminement du spécimen au laboratoire. L'ensemble des solutions d'ACSF sont détaillées. Nous exposons la technique de dissection de la tranche de cortex (méninges, vaisseaux) permettant sa découpe en tranche de 400 μ m d'épaisseur, l'incubation en chambre d'interface, avant le transfert de la tranche dans le MEA pour l'enregistrement des activités électrophysiologiques.

Résultats :

Nous insistons sur la collaboration entre les différents acteurs du protocole expérimental depuis le bloc opératoire jusqu'au laboratoire. Nous montrons quelques exemples d'activité épileptique interictale spontanées en ACSF et ictales induites après alcalinisation et réduction du Magnésium.

Discussion :

Cette méthode a été appliquée dans les 2 études détaillées ultérieurement sur les Pannexins et les altérations GABAergiques.

Les contraintes matérielles du laboratoire ne nous ont pas permis de combiner les enregistrements en potentiel de champ, ou de l'imagerie bi-photonique, mais ces projets restent d'actualité dans la thématique de notre équipe de recherche.

4. Article de revue de la littérature sur l'ictogénèse

« *Mechanisms of Ictogenesis* ».

Blauwblomme T, Jiruska P, Huberfeld G.

International review of neurobiology (2014) 114, 155-185

L'épileptogénèse est le processus graduel permettant au cortex de générer des crises d'épilepsie en raison de transformations structurelles, moléculaires, voire génétiques.

L'ictogénèse est le processus de transition entre l'état inter ictal et le début de la crise d'épilepsie.

Cette revue expose la dynamique des réseaux neuronaux dans la transition à la crise, et analyse les substrats cellulaires (interneurones, cellules pyramidales, astrocytes), ioniques (Cl^- , K^+ , Ca^{++}) et la neurotransmission (Glutamate, GABA) impliquée dans la transition ictale.

Nous proposons un scénario, où la perturbation des gradients de chlore et de potassium aboutit à renforcer l'excitabilité et la synchronie neuronale médiée par les interneurones et les cellules pyramidales, permettant le départ de la crise épileptique.

5. Implication des Pannexines dans les processus d'ictogénèse dans le tissu humain.

« Pannexin1 channels control seizure generation in humans: a therapeutic target for various epileptic conditions »

E. Dossi, T. Blauwblomme, J. Moulard, O. Chever, J. Pallud, L. Capelle, G. Huberfeld, N. Rouach.

En revue pour Science Translational Medicine.

Contexte :

Les Pannexins sont des hémicanaux astrocytaires et neuronaux formant de larges pores transmembranaires permettant un mécanisme de signalisation autocrine ou paracrine. Des données récentes et contradictoires chez l'animal montraient un rôle des Pannexins1 dans l'initiation des activités épileptiques. (Carlen *et al.*, 2012b; Thompson *et al.*, 2008b)

Objectifs de l'étude :

Cette étude a pour but d'étudier *in vitro* le rôle des Pannexins1 dans l'initiation et la maintenance des activités épileptiques ictales dans le cortex épileptique humain

Méthodes :

Cette étude a tout d'abord été réalisée en conditions *in vitro* avec l'enregistrement de 82 tranches sur MEA provenant de 42 patients opérés pour une épilepsie. Trois types histologiques sont représentés : malformations de développement cortical, DNET, et gliomes.

Les événements épileptiques étaient induits en réduisant le Magnésium du milieu extra cellulaire (ACSF 0Mg⁺⁺). Les études pharmacologiques utilisaient des bloqueurs des Pannexins 1 (Pannx1 mimetic peptide, probénécide), des bloqueurs des Récepteurs Purinergiques P2

Les résultats in vitro étaient par la suite confirmées in vivo sur un modèle de souris kainate.

Résultats :

Les principaux résultats sont les suivants :

1. L'activité électrophysiologique interictale spontanée est variable en fonction de l'histologie
2. L'induction de l'activité ictale a lieu selon 2 patterns : synchronisant ou activité rapide de bas voltage, et n'est pas différente selon l'histologie
3. L'activité épileptique ictale active les Pannexines 1
4. Bloquer les Pannexines 1 arrête les décharges ictales, et prévient leur survenue
5. L'activation des pannexines augmente la libération d'ATP en extracellulaire, et active les récepteurs purinergiques P2
6. Le probénécide (médicament contre la goutte) est un bloqueur des Pannexines. Il bloque l'activité ictale in vitro sur tranches de cortex humain, et in vivo sur un modèle de souris Kainate.

Discussion :

Cette étude a montré in vitro le rôle des hémicanaux neuronaux et astrocytaires Pannexins 1 dans l'initiation et la maintenance des activités épileptiques in vitro dans le cortex humain.

Il s'agit d'une nouvelle voie thérapeutique car les Pannx1 peuvent être bloqués par le Probénécide, qui est un agent médicamenteux connu en pharmacologie humaine (traitement de l'hyperuricémie et de la goutte)

6. Implication des perturbations de la signalisation GABAergique dans l'épileptogénicité des Dysplasies Corticales Focales

“Altered GABAergic transmission underlies epileptogenicity in human malformations of cortical development “

Thomas Blauwblomme, Elena Dossi, Christophe Pellegrino, Emmanuelle Goubert, Pascale Varlet, Nathalie Rouach, Rima Nabbout, Gilles Huberfeld.

En preparation

Contexte :

Les anomalies de la transmission GABAergique dans la genèse des activités interictales des épilepsies lésionnelles ont été démontrées dans le cortex péri-tumoral, ou les scléroses hippocampiques. (Huberfeld *et al.*, 2007; Pallud *et al.*, 2014b) L'effet dépolarisant paradoxal du GABA est secondaire à une augmentation du chlore intracellulaire associée à la perte d'expression de l'extrudeur du chlore KCC2, et la réexpression de NKCC1, chargeant les cellules en Cl⁻. Dans les FCD, les données histologiques ont montré des anomalies des interneurones, et de la répartition / expression des co-transporteurs du chlore. Le lien entre les activités électrophysiologiques et le défaut histologique / moléculaire n'a pas encore été réalisé.

Objectif :

Etudier *in vitro* les activités épileptiques générées spontanément par le cortex dysplasique humain, corrélérer spatialement ces activités avec les désordres architecturaux, et analyser l'implication de la transmission GABA et des cotransporteurs du chlore dans la genèse des activités interictales

Méthodes :

Il s'agit d'une étude *in vitro* sur 28 tranches de cortex provenant de 9 patients opérés d'une dysplasie corticale focale.

La première étape est l'enregistrement des activités épileptiques interictales spontanées sur une matrice dense de micro électrodes (120 MEA 12x10, MultiChannel Systems).

La seconde étape est l'analyse pharmacologique in vitro, avec un inhibiteur de la transmission GABAergique (PicROTOXINE), et un bloqueur du co-transporteur du chlore NKCC1 (bumetanide).

La troisième étape est la quantification de l'expression des co-transporteurs du chlore NKCC1 et KCC2 par western blot.

La quatrième étape est la corrélation des anomalies histologiques, avec les anomalies électrophysiologiques des tranches de cortex enregistrées in vitro. L'analyse immunohistochimique cible les interneurons (marquage GAD/PV) et KCC2.

Résultats :

La partie électrophysiologique de cette étude est complète, mais l'analyse histologique est en cours en collaboration avec le Dr. Pellegrino (INMED)

Les résultats principaux sont les suivants :

1. Au niveau électrophysiologique :

- Une activité interictale spontanée (IID) était enregistrée dans 19/28 cas. Les IID étaient focales, représentant 8.9% de la surface corticale explorée par le MEA.

Les IID sont spécifiques du sous type histologique de dysplasie. Les FCD de type III génèrent une activité régulière monomorphe, tandis que les FCD type I et II ont une activité plus lente et d'amplitude variable.

- Les IID sont dépendantes de la signalisation GABAergique, car majoritairement bloquées par les antagonistes GABAergiques
- Les IID sont bloquées par les inhibiteurs des co transporteurs du chlore NKCC1

2. Au niveau histologique

Les tranches corticales ont pu être conservées intègres entre l'analyse électrophysiologique, et la nouvelle section pour immunomarquage, et les corrélations électro-histologiques sont en cours.

Les résultats préliminaires en microscopie confocale retrouvent : une réduction globale du marquage KCC2, plus marquée au niveau des zones générant les IID, et une réduction du nombre d'interneurones en comparaison avec les tissus contrôle.

Les analyses en western blot (NKCC1) sont en cours

Discussion

Dans cette étude en cours, nous analysons les corrélations entre activités épileptiques in vitro et anomalies histologiques.

Nos résultats orientent, pour les FCD, vers une transmission GABAergique pathologique, secondaire à un trouble de la régulation du chlore. Ces résultats confirment les données préexistantes de la littérature.

L'originalité de cette étude est la corrélation des activités épileptiques avec l'anomalie structurale histologique, et leur localisation spatiale précise entre MEA et microscopie confocale.

Cette étude est limitée par l'effectif et l'hétérogénéité des dysplasies, par l'absence d'étude électrophysiologique unitaire permettant de distinguer les sous types d'interneurones responsables des activités interictales. De même, le potentiel d'équilibre électrochimique du chlore n'a pas été évalué, et nous n'avons que des preuves indirectes (abolition des activités par le bumétanide, expression faible de KCC2) de l'élévation de $[Cl^-]_i$.

Néanmoins, cette étude ouvre la voie à la localisation précise des activités épileptiques dans les épilepsies lésionnelles, et notamment au niveau du cortex transitionnel. Cette méthode de corrélation histo-électrophysiologique aura un intérêt particulier dans les FCD IIb de fond de sillon, où l'exérèse chirurgicale monobloc permet l'ablation du cortex lésionnel et péri lésionnel. En effet, les méthodes d'exploration in vivo classiques (SEEG) ne permettent pas de discriminer ces régions en raison de la conduction électrique, et du biais d'échantillonnage spatiale. D'autres applications pourraient être le cortex péri tumoral dans les LEAT (Low Grade Epilepsy Associated Tumor), tels que gangliogliomes et DNET, où un contingent dysplasique associé et des cellules tumorales infiltrantes coexistent, et peuvent contribuer aux activités épileptiques.

Altered GABAergic transmission underlies epileptogenicity in human pediatric malformations of cortical development

Thomas Blauwblomme^{1,2,3}, Elena Dossi⁴⁺, Christophe Pellegrino⁵⁺, Emmanuelle Goubert⁵⁺, Pascale Varlet^{2,6}, Nathalie Rouach⁵, Rima Nabbout^{2,7}, Gilles Huberfeld^{8,3}.

1. APHP, Department of Pediatric Neurosurgery, Hospital Necker, Paris, France
2. Université René Descartes. PRES Sorbonne Paris Cité, Paris, France
3. INSERM U1129, Infantile Epilepsies and Brain Plasticity
4. Neuroglial Interactions in Cerebral Physiopathology, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Collège de France, CNR UMR 7241, INSERM U1050
5. INMED,
6. Department of Neuropathology, Hospital Saint-Anne, Paris, France
7. APHP, Department of Neuropediatrics, Hospital Necker, Paris, France
8. Sorbonne and UPMC University, AP-HP, Department of Neurophysiology, UPMC and La Pitié-Salpêtrière Hospital

+ These authors contributed equally

Corresponding author:
Dr. Gilles Huberfeld.
Gilles.huberfeld@upmc.fr

Key Words:
Focal Cortical Dysplasia, NKCC1, KCC2, cation chloride cotransporter, GABA

ABSTRACT

Objective: Dysregulation of GABAergic transmission is suspected to underlie epileptogenicity of malformations of cortical development through alterations of chloride co-transporters expression.

Methods: In vitro recording of human cortical slices from 9 pediatric patients operated from a FCD were performed on Multi Electrode Array, under physiologic conditions, or after pharmacological modulation of GABAergic signaling. Quantification of chloride co-transporters NKCC1 and KCC2 were performed with western Blot analysis. Immuno-staining for chloride co-transporter (KCC2) or interneurons (GAD, PV), were done on the same slices, and correlation between electro physiological and histological abnormalities were analyzed. *Results:* 19/28 slices displayed spontaneous interictal discharges, along a pattern specific to the histological subtypes. IID were mainly GABAergic as Picrotoxin stopped IID in 2/3 slices. Blockade of NKCC1 Cl⁻ co-transporters stopped IID in 7/8 cases. [Immuno-staining showed....](#) *Interpretation:* Spontaneous interictal discharges may be mediated by paradoxical depolarization of pyramidal cells by interneurons, because of altered chloride co-transporters expression. This may be an alternative target for the research of new antiepileptic drugs.

INTRODUCTION

Malformations of cortical development are an emblematic etiology of drug resistant lesional epilepsy in children. Since pioneer description of focal cortical dysplasia by Taylor, (Taylor *et al.*, 1971) with “*congregations of large bizarre neurons which were littered through all but the first cortical layer*”, the classification has step by step evolved in 3 main types of focal cortical dysplasia (FCD) according to the type of dyslamination, presence of abnormal cells (cytomegalic neurons, balloon cells), and the association with another brain lesion (Blümcke and Mühlebner, 2011). This histological classification, crucial to categorize the various features of FCDs however does not take into account the mechanisms of genesis of epileptic activities and does not incriminate a subtype of abnormal cell or neuronal network. Moreover, the site of genesis of the epileptic discharges is not assessed yet, either within the histological defect or at its boundary with the surrounding cortex, which is a key issue since surgical resection is often the main therapeutic option, but actually fails to cure 40% of the patients, mainly in type I FCD and / or because of incomplete resection (Hauptman and Mathern, 2012; Rowland *et al.*, 2012). Mapping epileptic activities and exploring the epileptogenicity mechanisms in various types of FCDs is therefore mandatory to optimize the extent of their removal and to identify for new drug targets. Surgery of FCDs is a unique opportunity to study these features in postoperative human tissues.

Enhanced excitatory neurotransmission has been shown in FCD in dissociated neurons from human cortical dysplasia. Increased NMDA currents, reduced Mg^{++} sensitivity along with a decreased expression of the NR2B subunit have been reported (André *et al.*, 2004). Abnormal features of GABAergic neurotransmission have also been involved in FCD's epileptogenicity. The amount of inhibitory interneurons is globally reduced in type I-III FCD, while rearrangement of their cortical distribution is seen in type II FCD, where CB-PV+ interneurons surround cytomegalic neurons, but not balloon cells (Alonso-Nanclares *et al.*, 2005; Calcagnotto, 2005; Medici *et al.*, 2016). Moreover, in cortical slices from human postoperative FCD tissues, ictal like events pharmacologically induced in vitro by 4 AP were abolished by hyperpolarizing interneurons (with DAGO) or blocking GABAergic transmission (with Bicuculline) (D'antuono *et al.*, 2004). In dissociated neurons from human FCDs, cytomegalic neurons receive increased GABAergic currents with longer kinetics and decreased sensitivity to zinc or zolpidem, reminiscent of immature neurons (André *et al.*, 2008) and display a pacemaker $GABA_A$ receptor mediated activity (Cepeda *et al.*, 2014). However, as in other human epileptic conditions such as hippocampal sclerosis (Huberfeld *et al.*, 2007) or gliomas (Pallud *et al.*, 2014), excitatory effects of GABAergic signals may contribute to FCD epileptogenicity. Previous studies have reported chloride co-transporters (NKCC1/KCC2) abnormalities in both freeze animal models of FCD and in human FCD (Shimizu-Okabe *et al.*, 2007; 2011 Tallos 2012), which may result in increased neuronal concentrations of chloride and a shift to depolarizing responses to GABA via an outward chloride flux through $GABA_A$ receptors (Kaila *et al.*, 2014). However, previously published studies were not performed at the network level and did not specially address the positive involvement of GABAergic signaling and the precise mapping of epileptic activities within the malformation.

We report here that spontaneous interictal-like discharges may be recorded in vitro from cortical slices of human postoperative FCD. In all cases, GABAergic signals positively participated to their genesis since $GABA_A$ receptors antagonists blocked

epileptic discharges. This effects was related to perturbations of neuronal chloride regulation with a reduced expression of the chloride extruder KCC2 and an excess of its counterpart NKCC1, with a control of epileptic discharges when the later was blocked by bumetanide.

METHODS

Patients selection and surgery

Patient's parents gave informed written consent according to the Internal Review Board protocol (n° D2009-955 for storage of brain samples).

Cortical samples were obtained from epileptic children operated for focal drug resistant epilepsy. Surgery was planned after multimodal preoperative evaluation with videoEEG recording, neuropsychological examination, MRI and ¹⁸FDG PETscan. When required, intracranial chronic recording was performed according to the SEEG methodology. Antiepileptic drugs were maintained during the perioperative course. General anesthesia was induced with intravenous propofol injection, and maintained by inhaled sevoflurane and intravenous sufentanyl. Surgery was not modified for the research protocol, and consisted in lobar or gyral "en bloc" resection, performed via a subpial technique, avoiding excessive specimen manipulation or coagulation.

A total of 9 pediatric patients were included in the study. Clinical data are summarized in table1. Briefly, M/F ratio was 1.25, mean duration of epilepsy was 5.4 years (+/-4.4), age at surgery was 8.8 years old (+/- 4.4), localization of the epileptogenic zone was frontal (n=4), temporal (n=3), occipital (n=1) or in the posterior quadrant (n=1).

Histology was FCD type I (Ib n=1, Ic n=3), FCD type IIb (n=2) and FCD type III (IIIA n=2, IIIB n=1)

Tissue Preparation

Cortical specimen was immediately placed in the operative room in iced sucrose-based ACSF containing (in mM): 250 sucrose, 3 KCl, 25 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 1 CaCl₂, 10 MgCl₂, equilibrated with 5%CO₂ in 95%O₂ and transported to the laboratory (Cohen *et al.*, 2002; Dossi *et al.*, 2014; Huberfeld *et al.*, 2007). Meninges, blood clots and vessels were gently removed and neocortical transverse slices of 400µM were then cut with a vibratome (HM650V, Microm Microtech, France) and incubated in an interface chamber at 37°C, with ACSF at 2mL/min during at least 1 hour, containing (in mM): 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 10 D-Glucose, 1.6 CaCl₂, 1.3 MgCl₂ oxygenated with carbogen (5%CO₂ in 95%O₂)

MEA recordings

Cortical slices were then placed on a 16.5/9 mm planar micro electrode arrays petri dishes (Multi Channel Systems, Germany) organized in 12*10 layout grids, with an electrode diameter of 30 µm, and an inter-contact interval of 1500 µm / 1000 µm. They were kept in place by using a platinum anchor and continuously perfused at a rate of 5-6 ml/min with ACSF at 37°C. Pictures of cortical slices on MEAs were acquired with a video microscope table (MEA-VMT1; Multichannel Systems, Germany) through MEA_Monitor software (Multichannel Systems, Germany) to identify the location of the electrodes relatively to the pial surface of the slices. Electrophysiological activities were recorded with the MEA 210-120 system (bandwidth 1-3000 Hz, gain 5x, Multichannel Systems, Germany) through MC_Rack 4.5.1 software (Multichannel Systems, Germany) and sampled at 10kHz. The activity of the slices was recorded in ACSF containing (in mM) 124 NaCl, 3 KCl, 26 NaHCO₃, 1.6 CaCl₂, 1.3 MgCl₂ and 10 D-glucose.

Pharmacological studies for interictal discharges were performed in modified ACSF containing Bumetanide (8µM) or Picrotoxine (100 µM).

We only studied slices generating spontaneous IID.

Western Blot Analysis

Histology

After electrophysiological recording, slices were immediately fixed in 4% Zn Formalin (Microm, Microtech, France) for 24 hours, and permeabilized in PBS. Cortical slices were then processed for immune-histostaining with KCC2 antibodies, NeuN, GAD, and PV.

Data Analysis and Statistics

Local Field Potentials (LFP) were analyzed with Clampfit (pClamp Software, Molecular Devices), using visual analysis and the automated spike detector toolbox. Statistical analysis was performed on IBM SPSS. Results were expressed as mean +/- standard deviation, and significance level was set at $p < 0.05$. Intergroup analysis was done with non parametric Kruskal Wallis test, and Wilcoxon test for repeated measurement on a single sample.

Visual analysis of the LFP matrix under MC-Data software (multichannel systems) was used to count the number of contacts displaying consistent interictal activity. The area of cortex generating IID was then calculated by multiplying with the surface underneath each electrode (1.5 mm^2).

The depth of IID initiation was measured orthogonally to the tangent of the pial surface between the pia and the electrode contact showing either phase inversion or maximum amplitude.

RESULTS

Post operative tissues from human FCD generate spontaneous IID.

See Figure 1

28 slices from 9 patients were studied on MEA (mean 3 slices / patient). Spontaneous interictal discharges (IID) were recorded in 19 slices (67.9%) in control ACSF. IID were generated at a mean depth of 2000 μ m (+/-1000 μ m) from the pial surface, and the mean cortical surface displaying IID was 7,4 mm² (+/- 2.9), corresponding to 8.9% of the cortical surface explored with MEA contacts. We observed a rhythmic pattern of IID, with a mean frequency of 0.9 Hz (+/- 0.7), a mean duration of 348.5 ms (+/- 75.3 ms), and a mean amplitude of 17.8 μ V (+/-11.2).

IID pattern was different, according to the FCD histological type. Types I and II FCDs produced relatively sparse IID with variable amplitude while Type III FCDs generated homogeneous, regular frequent IIDs. The active electrode surface was smaller (Mann-Whitney test, $p < 0.001$) in FCD III (4.8 mm² +/-1.2) than in FCD type I (9.2mm² +/-2.8) or FCD type II (7.3 mm² +/- 2.7). Frequency of IID recurrence was higher (Kruskal Wallis test, $p < 0.001$) in FCD III (1.12 Hz +/- 0.7 than in FCD I (0.83 Hz +/-0.6) and FCD II (0.2 Hz +/-0.2), with a shorter duration (Kruskal Wallis test, $p < 0.001$) of IID in type III (340.5 ms +/-11.8) than in type I (342.9 ms +/- 96ms) or II (413.7 ms +/- 84.2). Amplitude was smaller (Kruskal Wallis test, $p < 0.001$) in FCD III (17.2 μ V +/- 10.9) than in FCD I (18.3 μ V +/-11) and II (18.2 μ V +/-12).

IID mapping within the histological defect.

GABAergic neurotransmission is actively involved in IID production.

See Figure 2

The role avec GABAergic signaling was tested in 3 slices from 3 patients (FCD type Ic, IIb, and IIIa) by applying the specific antagonist Picrotoxin100 μ M. In 2 out of 3 slices, Picrotoxin stopped IID after a delay of 90 and 1001 seconds respectively. In the third slice (FCD type Ic), IID frequency in picrotoxin (0.5 Hz +/-0.27) was significantly (Mann whitney test $p < 0.001$) lower than in ACSF (0.9 +/-0.7Hz). On the other hand, amplitude was significantly higher ($p < 0.001$) in Picrotoxin (13.5 μ V +/-5) than in ACSF (11.3 μ V +/-8), and IID duration was significantly ($p < 0.001$) longer in Picrotoxin (367ms+/-60) than in ACSF (356 ms+/-50).

IID are suppressed by the NKCC1 inhibitor Bumetanide

See Figure 3

The effects of the specific blockade of the chloride co-transporter NKCC1 by the diuretic bumetanide was assessed in 8 slices from 7 patients. Bumetanide (8 μ M) suppressed IID in 7/8 slices with a mean delay of 1205 s (+/- 670), and IID reappeared after washout in normal ACSF with a mean delay of 422 s (+/-290).

Expression of chloride co-transporters is altered in FCD

DISCUSSION

This study shows that slices from postoperative human pediatric dysplastic tissues retain epileptogenic cellular and network properties and continue to generate spontaneous interictal epileptic discharges in vitro. The electrophysiological pattern depends of the subtype of FCD but interictal discharges (IID) are spatially restricted in the slice. GABAergic signaling is actively involved in their genesis, putative depolarizing effects of GABA being related to a dysregulation of neuronal chloride with an excessive load by the co-transporter NKCC1 and a defective extrusion by its counterpart KCC2.

This study admits several limitations. First, the size of our cohort is small and based on variable FCD subtypes and larger studies are necessary to validate our findings. Second, MEA recordings are performed at the LFP level, and the distance between contacts does not allow to perform spike sorting, and therefore to identify the neuronal subgroups initiating IID. Moreover, no intracellular recordings allowed to identify cellular subtypes involvement in population discharges nor measurement of Chloride-related GABAergic currents' reversal potential. Slicing the cortex has been demonstrated to alter the extracellular matrix, and to modify the chloride reversal potential (Glykys *et al.*, 2014). However, in our past studies, spontaneous epileptic activities have never been recorded in vitro from control human tissue (Pallud Science Transl Med 2014 – Dossi In Rev) and interictal discharges were found to be generated at a similar site from a slice to the other in the same tissue, indicating local preexisting modifications than direct traumatism related to the slicing procedure.

First, we show that FCDs display different IID patterns according to their histology. Frequency was higher in type III than in types I and II, suggesting that the severity of cortical disorganization was inversely correlated with the ability to generate IID. Histological studies have already segregated FCD type I-III from FCD type II (Medici *et al.*, 2016). Immunostaining of Parvalbumin+ (PV) interneurons showed a global reduction of PV immunoreactivity in type I and II FCDs, without significant differences from cryptogenic cases. In type III FCDs, on the other hand, the number of PV+ / GAD65/67 neurons does not appear to be modified, but their location is redistributed. Differences in electrophysiological properties were also shown at the cellular level between subtypes of FCD, and within extensive FCD. Correlation between clinical, imaging, electrocorticography, histology and electrophysiological responses from dissociated neurons showed that in the most severe areas of CD there was a decrease in glutamatergic activity, and an increase in GABAergic activity (Cepeda *et al.*, 2005).

Second, GABA_A receptor competitive antagonist Picrotoxine blocked IID in 2/3 cases in the present study. Dysfunction of GABAergic transmission has already been demonstrated in acute human slices of FCD and on dissociated neurons but previous data have proposed that reduced inhibition contributed to FCD epileptogenicity or did not directly studied the characteristics of GABAergic signaling in basal conditions. Whole cell patch clamp recordings from pyramidal cells in human FCD slices displayed reduced IPSC frequency, along with a decrease in transporter mediated GABA reuptake function (Calcagnotto, 2005). Increased GABAergic currents were recorded on cytomegalic neurons along with a decreased sensitivity to zolpidem and zinc illustrating altered $\alpha 1$ and $\gamma 2$ subunits alteration of GABA receptor composition (André *et al.*, 2008). When bathed in the potassium channels blocker 4AP ACSF, acute slices

of FCD from epileptic patients could generate interictal and ictal discharges but no activity has already been reported in basal condition (Avoli *et al.*, 1999). Blocking GABA_A receptors with bicuculline transformed the ictal activity into regular interictal-like activity, whereas increasing GABAergic transmission with phenobarbital increased the duration and amplitude of both ictal and interictal events (D'antuono *et al.*, 2004). Our data stress the positive involvement of GABAergic transmission and shows, for the first time, that spontaneous interictal discharges are triggered rather than controlled by GABA_A signals.

Third, the specific NKCC1 blocker Bumetanide stopped IID generated in the dysplastic cortex. To our knowledge, this is the first report of the antiepileptic effect of Bumetanide in human cortical slices of FCD. NKCC1 drives neuronal chloride influx, and supports depolarizing effect of GABA early in embryonic life, and is later counterbalanced by KCC2 chloride cotransporter expression that leads to chloride hyperpolarizing currents with GABA_AR activation (Kaila *et al.*, 2014). Immunostaining studies showed in FCD type IIb an increase in NKCC1 immunoreactivity in both neurons and glial cells as compared to control cortex (Aronica *et al.*, 2007), especially in neurons expressing α 1 subunit of GABA_A receptors. In contrast, if neuronal somatic KCC2 immunoreactivity was observed in 67% of the cases, their cellular distribution was altered. This was confirmed in both TSC and FCDIIb post operative human tissues with an increase of the NKCC1/KCC2 ratio (Talós *et al.*, 2012). This shift in Chloride cotransporter toward embryonic expression may also be worsened by the localization of KCC2 in FCDIIb, as immunoreactivity was found in the cytoplasm of cytomegalic neurons, but not on the membrane per se. It is suggested that mTOR pathway could be implicated, as phosphorylation of KCC2, mediated by Protein Kinase C, itself activated by mTORC2, reduces endocytosis process.

CONCLUSION:

In vitro recording of cortical slices from human FCD enlighten the role of GABAergic transmission through perturbed chloride homeostasis in the generation of spontaneous interictal discharges.

Table 1:
Summary of the patient data

Patient	Patient / Sex / Age	Age of 1 st Seizures Sz frequency Seizure semiology	EEG	MRI	Number and Name of AEDs	Surgery	Localization of Sample	Histology	Number of slices with spontaneous IID
1	1 / M / 2.8y	6 months >5 Sz/day Epileptic spasms	Spasms posterior quadrant	Right TPO blurring and ASL hypoperfusion	2 Vigabatrin / Topiramate	Right posterior quadrant disconnection	Inferior parietal lobule	FCD I b	1/3
2	2 / M / 5y	18 months 2Sz / day Loss of consciousness Ictal blindness	Rhythmic L occipital spikes	Left occipital lobe cortical thickening G/W matter blurring ASL hypoperfusion	3 Stiripentol /Vigabatrin / Topiramate/	Left occipital lobectomy	Left occipital pole (V2)	FCD II b	2/3
3	3/ F / 11y	9y 1Sz/day Gustatory hallucinations / loss of consciousness / Tonic seizures	Rhythmic R frontal spikes and waves	FLAIR hypersignal and ASL hypoperfusion right frontal operculum	3 Carbamazepine / Zonisamide / Clobazam	Right frontal + insular cortectomy after SEEG	Pars opercularis	FCD I c	3 / 4
4	4 / M / 4.6y	10 months >3 Sz / Day Hypermotor Seizures	Right frontal slow waves	Right frontal lobe hypotrophy and G/W blurring	3 Lamotrigine / Valproate / Topiramate	Right fronto-insular lobectomy after SEEG	Pars orbitalis	FCD II b + PIAL angiomatosis	4/5

				ASL hypoperfusion					
5	5 / F / 9.9y	5 yo 1 Sz / day Partial Seizures	Left temporal spikes and waves	Left temporal lob G/W blurring and ASL Hypoperfusion FLAIR hypersignal of the uncus	3 Levetiracetam / Lamotrigine / Topiramate	Left temporal lobectomy	Temporal pole	FCD III b + ganglioglioma	2/2
6	6 / M / 9.4y	7yo 10Sz / day Partial Seizures + motor manifestations	Left fronto temporal slow waves	Left temporal lobe G/W blurring and ASL hypoperfusion	1 Carbamazepine	Left temporo-insular lobectomy after SEEG	Temporal pole	FCD I c + neuronal heterotopia	2/2
7	7 / F / 7.4y	3yo 1Sz/day Partial Sz + Head deviation	Rythmic left spike-wave	Normal morphological MRI F1/F2 sulcal hypoperfusion on ASL	2 Valproate / Lamotrigine	Right frontal pole cortectomy after SEEG	Superior frontal sulcus	FCD I c	2/2
8	8 / F / 16.9	3yo >1 Sz /day Partial Seizures	Right temporal slow waves	Right temporal lobe G/W blurring, and ASL hypoperfusion Hippocampal sclerosis	3 Lacosamide / Lamotrigine / Clobazam	Right temporal lobectomy	Temporal pole	FCD III a + Hippocampal sclerosis	2/3
9	9 / M / 13.1	1,5yo 1Sz/day Partial Seizures	Right temporal spikes	Right temporal lobe G/W blurring,	3 Valproate / Carbamazepine / Clobazam	Right temporal lobectomy after SEEG	Temporal pole	FCDIII a + Hippocampal sclerosis	1 / 4

				and ASL hypoperfusion Hippocampal sclerosis					
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

FIGURES

Figure 1:

Overview of spontaneous Interictal Discharges

A: Cortical slice on the MEA. The LFP are superimposed on the slice at the location of each contact of the 12/10 matrix. IID are recorded on 18 electrodes (red).

C: MRI of 3 subtypes of FCD and the associate LFP recordings of spontaneous interictal discharges in type III, I, and type II FCD

C: Box plot illustrating the different pattern of IID according to histological subtype in term of amplitude, frequency and duration.

Figure 2:

Effect of Picrotoxin on spontaneous interictal discharges

LFP recordings under ACSF, Picrotoxin, and after wash out

Figure 3:

Effect of Bumetanide on spontaneous interictal discharges

A: LFP recordings under ACSF, Bumetanide and after wash out

B: Scatterplot graph from one slice showing the evolution of amplitude and frequency of IID as a function of time under ACSF, Bumetanide, and after wash out

REFERENCES

- Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, et al. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *brain* 2005; 128: 158–173.
- André VM, Cepeda C, Vinters HV, Huynh M, Mathern GW, Levine MS. Pyramidal cell responses to gamma-aminobutyric acid differ in type I and type II cortical dysplasia. *Journal of Neuroscience Research* 2008; 86: 3151–3162.
- André VM, Flores-Hernández J, Cepeda C, Starling AJ, Nguyen S, Lobo MK, et al. NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. *Cereb. Cortex* 2004; 14: 634–646.
- Aronica E, Boer K, Redeker S, Spliet WGM, van Rijen PC, Troost D, et al. Differential expression patterns of chloride transporters, Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter and K⁺-Cl⁻-cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuroscience* 2007; 145: 185–196.
- Avoli M, Bernasconi A, Mattia D, Olivier A, Hwa G. Epileptiform Discharges in the Human Dysplastic Neocortex: In Vitro Physiology and Pharmacology. *Ann Neurol*. 1999; 46: 816–826.
- Blümcke I, Mühlebner A. Neuropathological work-up of focal cortical dysplasias using the new ILAE consensus classification system – practical guideline article invited by the Euro-CNS Research Committee [Internet]. 2011: 1–14. Available from: <http://www.dustri.com/index.php?id=8&artId=8769&doi=10.5414/NP300398&L=0>
- Calcagnotto ME. Dysfunction of Synaptic Inhibition in Epilepsy Associated with Focal Cortical Dysplasia. *Journal of Neuroscience* 2005; 25: 9649–9657.
- Cepeda C, André VM, Flores-Hernández J, Nguyen OK, Wu N, Klapstein GJ, et al. Pediatric cortical dysplasia: correlations between neuroimaging, electrophysiology and location of cytomegalic neurons and balloon cells and glutamate/GABA synaptic circuits. *Dev. Neurosci.* 2005; 27: 59–76.
- Cepeda C, Chen JY, Wu JY, Fisher RS, Vinters HV, Mathern GW, et al. Pacemaker GABA synaptic activity may contribute to network synchronization in pediatric cortical dysplasia. *Neurobiol. Dis.* 2014; 62: 208–217.
- Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the Origin of Interictal Activity in Human Temporal Lobe Epilepsy in Vitro. *Science* 2002; 298: 1418–1421.
- D'antuono M, Louvel J, Kohling R, Mattia D, Bernasconi A, Olivier A, et al. GABA_A receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. *brain* 2004; 127: 1626–1640.

Dossi E, Blauwblomme T, Nabbout R, Huberfeld G, Rouach N. Multi-electrode Array Recordings of Human Epileptic Postoperative Cortical Tissue. *JoVE* 2014

Glykys J, Dzhala V, Egawa K, Balena T, Saponjian Y, Kuchibhotla KV, et al. Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. *Science* 2014; 343: 670–675.

Hauptman JS, Mathern GW. Surgical treatment of epilepsy associated with cortical dysplasia: 2012 update. *Epilepsia* 2012; 53 Suppl 4: 98–104.

Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, et al. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 2007; 27: 9866–9873.

Medici V, Rossini L, Deleo F, Tringali G, Tassi L, Cardinale F, et al. Different parvalbumin and GABA expression in human epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2016; 57: 1109–1119.

Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, et al. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med* 2014; 6: 244ra89–244ra89.

Rowland NC, Englot DJ, Cage TA, Sughrue ME, Barbaro NM, Chang EF. A meta-analysis of predictors of seizure freedom in the surgical management of focal cortical dysplasia. *Journal of neurosurgery* 2012; 116: 1035–1041.

Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A. Changes in the expression of cation-Cl⁻ cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neuroscience Research* 2007; 59: 288–295.

Shimizu-Okabe C, Tanaka M, Matsuda K, Mihara T, Okabe A, Sato K, et al. KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Research* 2011; 93: 177–184.

Talos DM, Sun H, Kosaras B, Joseph A, Folkerth RD, Poduri A, et al. Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIb cortical dysplasia. *Ann Neurol.* 2012; 71: 539–551.

Taylor DC, Falconer, Bruton, Corsellis. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1971: 369–387.

Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. 2014; 15: 637–654.

III. DISCUSSION

Les buts de cette thèse étaient de développer des méthodes de localisation in vivo des dysplasies corticales par imagerie ASL, et de caractériser les anomalies électrophysiologiques qui sous tendent leur activité épileptique in vitro.

Nous avons montré une hypoperfusion focale dans les dysplasies de type II, et développé une méthode d'analyse statistique de l'imagerie aidant à les identifier.

Les enregistrements in vitro sur matrice de micro électrodes nous ont permis d'enregistrer les anomalies électrophysiologiques interictales des FCD et de les corrélérer à un défaut histologique et de neurotransmission. Nos résultats préliminaires orientent vers une dysfonction GABAergique et une anomalie des co-transporteurs du chlore.

Notre collaboration avec l'équipe du Dr. Rouach et du Dr. Dossi au CIRB a permis de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique dans les épilepsies lésionnelles par inhibition des Pannexins¹.

Ces travaux soulèvent des questionnements qui nécessiteront des études ultérieures, dans le cadre d'un programme translationnel de prise en charge médico chirurgicale et de recherche sur les épilepsies lésionnelles pédiatriques à l'hôpital Necker / université Paris Descartes.

3.1 Localisation des dysplasies

L'hypoperfusion ASL est maintenant intégrée en pratique courante dans notre bilan diagnostique par imagerie des épilepsies lésionnelles, et notamment pour localiser la zone épileptogène.

3.1.1 Validation sensibilité / spécificité / extension aux FCD type I

Nos études ont été réalisées sur de petits effectifs, avec une lésion visible sur l'IRM, et nécessitent une validation plus large. Actuellement, les données de perfusion ASL sont colligées dans la base de données des enfants épileptiques bénéficiant d'un bilan pré-chirurgical. Il sera donc possible prochainement de calculer la sensibilité et la

spécificité de l'hypoperfusion ASL, et d'estimer son apport en comparaison à des techniques validées telles que le PET.

Notre étude s'est limitée aux FCD type II, or le développement des enregistrements intra crâniens de l'EEG (SEEG) dans notre centre depuis début 2015 nous a permis d'opérer des patients avec une FCD mal limitée et notamment des FCD de type I. Nos données préliminaires sur les FCD de type I retrouvent également une hypoperfusion, mais qui est mal limitée, comme en imagerie métabolique par ^{18}F FDG-PET. Grâce à l'équipe « Image pour Imagine », la méthodologie d'analyse statistique sous SPM est utilisée pour les patients bénéficiant d'un bilan pré-implantation d'électrodes intra cérébrales (SEEG), avec une analyse conjointe du T1 (voxel based morphometry VBM), du FLAIR, et de l'ASL. Nous recueillons actuellement ces données pour les FCD de type I, avec le but d'ici 3 ans (effectif suffisant de la cohorte) de comparer les patterns de perfusion, aux anomalies IRM morphologiques (T1-FLAIR), métaboliques (^{18}F FDG PET), et au pronostic post opératoire (la résection de la zone hypo perfusée est elle un facteur pronostique ?).

3.1.2 Approche multimodale des anomalies interictales des FCD

Depuis 2016, nous avons acquis un système d'enregistrement de l'EEG couplé à l'IRM fonctionnelle (IRMf-EEG). Nous avons déposé fin 2016 un projet au comité de protection des personnes (CPP, protocole n° 2016-A00744-47) intitulé « cartographie des réseaux épileptiques par imagerie multimodale ».

Tous les patients coopérants ont avant leur SEEG un protocole d'imagerie multimodale, associant des séquences morphologiques (3D T1, cube FLAIR, axial et coronal T2, cube DIR), des séquences de perfusion ASL (ASL et eASL), et des séquences d'IRM fonctionnelle couplée à l'enregistrement de l'EEG.

L'acquisition de l'EEG pendant l'IRM nous permet d'étudier le de débit sanguin cérébral en IRM ASL et de le caractériser en fonction des périodes interictales, ictales ou post ictales immédiates.

Grâce aux méthodes de normalisation sous SPM développées dans l'article 2 nous intégrons dans le même espace du MNI les différentes modalités d'imagerie, notamment les zones en hypo-débit ASL, et les zones présentant une variation de l'effet BOLD pendant les pointes.

Nous souhaitons corrélérer ces anomalies IRM avec le « gold standard » électrophysiologique, par l'analyse des anomalies interictales et ictales en SEEG. Nous interpolerons sur l'IRM la localisation des oscillations hautes fréquences (fast ripples) interictales, (Crépon *et al.*, 2010; J. Jacobs *et al.*, 2010) et l'épileptogenicity Index calculé à partir des crises enregistrées en SEEG. (Davidet *al.*, 2011) Nous pourrons ainsi comparer la localisation de l'hypodébit en IRM ASL et les anomalies BOLD en IRMf EEG avec les anomalies électrophysiologiques (ANNEXE 1).

Notre ambition à moyen terme, est de réduire les bilans invasifs de l'EEG, en développant l'électrophysiologie peropératoire guidée par imagerie multimodale. Nous projetons d'intégrer les anomalies de perfusion interictales préopératoires au système de navigation peropératoire pour cibler les enregistrements électrocorticographiques per opératoires, et optimiser les cortectomies, en intégrant les oscillations hautes fréquences dans le plan de résection.

3.2 Hypodébit ASL et couplage neurovasculaire

Nous avons montré une réduction du débit sanguin cérébral dans les FCD de type II, colocalisée à l'anomalie histologique, et associée à une anomalie architecturale de la micro-vascularisation. Néanmoins, diverses causes peuvent expliquer l'hypo-débit et seront à investiguer prochainement.

3.2.1 Connectivité fonctionnelle

Plusieurs études d'imagerie ASL ont illustré le couplage neuro vasculaire en corrélant activité neuronale et débit sanguin cérébral. L'augmentation du débit sanguin cérébral associée aux tâches d'activations motrices permet ainsi de localiser le cortex moteur, et de réaliser une ASL « fonctionnelle ». (Raoult *et al.*, 2011) A l'inverse, le déclin cognitif mnésique peut être détecté dans différences sortes de démence, par une réduction du débit sanguin cérébral dans les aires limbiques. (Xu *et al.*, 2007) De plus, la signal ASL évolue avec l'âge de l'enfant et la myélinisation progressive de l'encéphale, (Wang *et al.*, 2008). Le lien entre connectivité fonctionnelle et débit sanguin cérébral a été montré par des études associant IRM fonctionnelle de repos et

ASL, puisque le débit sanguin cérébral est maximal au niveau des nœuds de réseau (hubs). (Liang *et al.*, 2013; Várkuti *et al.*, 2011)

Une étude en cours (IRMf EEG-ASL) sur 9 patients après hémisphérotomie vise à illustrer ce lien entre connectivité anatomique, fonctionnelle et chute de la perfusion dans les hémisphères déconnectés (annexe2).

Nous émettons donc l'hypothèse que l'hypoperfusion des FCD pourrait être liée à une déafférentation fonctionnelle de la zone dysplasique. Nous projetons d'étudier la connectivité anatomique (imagerie par tenseur de diffusion, ADC), connectivité fonctionnelle (IRMf-EEG) et la perfusion dans les dysplasies (IRM ASL).

3.2.2 mTOR

Une autre hypothèse repose sur des anomalies de la micro-vascularisation dans les dysplasies corticales focales, associées aux anomalies moléculaires de la voie mTOR. En effet, une des cibles de mTOR est le facteur de transcription HIF1 α , impliqué dans les mécanismes d'angiogénèse associés à l'hypoxie. (Lipton and Sahin, 2014; Sharp and Bernaudin, 2004)

3.2.3 Astrocytes

L'association d'une réduction du métabolisme neuronal en ¹⁸F-DG-PET scan à l'hypodébit ASL soulève également l'hypothèse d'une dysfonction du réseau astrocytaire, ou la déficience de la transmission glutamatergique en période interictale dans les FCD.

En effet, le réseau astroglial permet la circulation du glucose via des gap junction (connexin 30-connexin 43), en assurant l'apport énergétique aux neurones via la libération du lactate dans le milieu extra cellulaire. Ces transports inter cellulaires sont activés dépendants, via la signalisation glutamatergique des récepteurs AMPA. (Rouach *et al.*, 2008) De plus, les podocytes des astrocytes entourant les vaisseaux sont riches en connexins, et régulent la vasodilatation capillaire donc le débit sanguin via des vagues calciques astrocytaires. (Giaume *et al.*, 2010)

Des anomalies de la répartition des Connexins 43 ont été retrouvées dans les FCD IIb (mais pas les FCD I, et IIa), avec la constitution d'aggrégats, autour des ballon cells, mais sans tropisme péri-vasculaire.

Il serait donc pertinent, dans une future étude de corréler les zones en hypodébit ASL / hypométabolisme PET, avec l'expression quantitative et qualitative des Connexins 30-43, et de les comparer à des zones hémodynamiquement saines. Une analyse fonctionnelle du réseau astrocytaire in vitro pendant les décharges interictales serait également intéressante dans les FCD. Un enregistrement combiné des anomalies électrophysiologiques sur le MEA, associée à l'analyse en imagerie bi-photonique des vagues calciques du réseau astrocytaire permettrait de faire le lien entre les décharges interictales et le couplage astroglial, et pourrait être associé à des études pharmacologiques bloquant les connexins 30-43.

3.3 Distinction des sous types histologiques de FCD

Les FCD de type I et II ont été regroupées sous une même appellation, pour faciliter le travail des cliniciens. Les données de cette étude, et de la littérature orientent vers des pathologies distinctes : anomalie architecturale plus modérée, moins focale dans les FCD de type I, en comparaison des FCD de type II, plus restreintes géographiquement mais comportant une perte complète de l'organisation corticale et la présence de cellules morphologiquement et physiologiquement anormales.

Le profil homogène des FCD type II a permis de les caractériser clairement sur le plan électrique et radiologique, et plus récemment sur le plan moléculaire, avec l'anomalie de la voie de mTOR.

Il n'y a actuellement pas de données probantes sur le défaut génétique à l'origine des FCD de type I, et une perspective de ce travail de thèse serait de réaliser le séquençage du génome, et du transcriptome des FCD de type I, d'autant que les prélèvements per opératoires sont systématiquement congelés et conservés dans la tumorothèque de notre centre. Cette démarche pourrait notamment s'intégrer dans les thématiques de biologie du développement cortical, développées dans l'institut de recherche Imagine sur le site de l'hôpital Necker.

3.4 Etudes in vitro

Nous avons montré que les anomalies interictales des dysplasies corticales focales étaient spécifiques du sous type histologique, et étaient associées à une anomalie

d'expression des co transporteurs du chlore, aboutissant à une dysfonction de la transmission GABAergique.

Nous avons distingué l'activation des héli-canaux de type pannexine 1, qui sont activés pendant les évènements ictaux, et participent à l'hyperexcitabilité neuronale avec l'activation des récepteurs purinergiques P2 par l'ATP extra cellulaire

3.4.1 Suite de cette étude

Notre étude a étudié un nombre limité de patients, et s'est concentrée sur les anomalies interictales, sans analyser les décharges ictales induites.

Les enregistrements MEA étaient exclusivement en potentiels de champ locaux, ne permettant pas de réaliser de « spike sorting » en raison de la distance inter-électrodes élevée. Les sous types de neurones à l'origine des décharges inter ictales n'ont donc pas été identifiés

Cette étude devra donc être poursuivie sur un nombre plus important de malades, en intégrant des enregistrements en patch clamp, ou avec des tétrodes, pour calculer le potentiel d'inversion du GABA, et déterminer les populations neuronales à l'origine des décharges interictales (interneurones, vs. Cellules pyramidales).

L'étude de l'ictogénèse dans les FCD devra également être réalisée, pour déterminer, si par homologie aux données de l'épilepsie temporelle par sclérose hippocampique, la transition à la crise implique des décharges pré-ictales glutamatergiques, élargissant le scénario établi dans le cortex péri-tumoral ou la sclérose aux pathologies malformatives.

3.4.2 Matrice extra cellulaire

Si les anomalies du chlore associées aux modifications pathologiques d'expression des co transporteurs du Cl⁻ semblent universels dans les études in vitro de cortex humain d'épilepsies lésionnelles, ces données pourraient être artéfactuelles, secondaires à la section de la tranche et l'altération des macromolécules de la matrice extra cellulaire. En effet, dans un modèle murin de tranche d'hippocampe, la concentration de chlore intra cellulaire est inversement proportionnelle à la profondeur des neurones par rapport à la surface de la tranche de cortex. Les neurones « traumatisés » ayant une haute concentration en chlore sont hyper excitables, en

raison d'une action dépolarisante du GABA. (Dzhala *et al.*, 2012) La section de la tranche de cortex pourrait ainsi provoquer une dégradation artéfactuelle des glycosaminoglycanes de la matrice extra cellulaire, responsables du gradient de chlore transmembranaire et de l'épileptogénicité *in vitro*. (Glykys *et al.*, 2014) Les glycosaminoglycanes de la matrice extracellulaire pourraient directement être impliqués dans l'épileptogénicité de diverses lésions cérébrales.

Cette thèse va être suivie par une mobilité de 6 mois en tant que « post doctoral research fellowship » dans le laboratoire du Pr Kevin Staley, sur cette thématique particulière. Le laboratoire porte un projet translationnel sur l'épilepsie post traumatique, *in vitro*, *in vivo* dans un modèle porcin de traumatisme crânien, et chez l'homme. L'hypothèse est une altération des glycosaminoglycanes de la matrice extra cellulaire dans le traumatisme cérébral, à l'origine d'une augmentation de $[Cl^-]_i$, expliquant l'œdème cérébral et l'épilepsie, associée à une activation des métalloprotéinases (MMP9).

Cette expérience me permettra une vision critique de nos protocoles *in vitro* sur tissu humain, et me permettra d'acquérir des techniques de laboratoire d'étude de la matrice extra cellulaire, et de mesure du $[Cl^-]_i$ par imagerie bi-photonique, qui pourront être appliqués à l'étude expérimentale du cortex dysplasique humain.

3.4.3 Enregistrements par MEA

Les chambres d'enregistrement des MEA utilisés dans cette étude sur les FCD ont été spécialement dessinés pour l'étude du tissu humain, leur grande surface permet d'enregistrer des surfaces corticales de 10 / 15 mm. La photographie de la tranche sur le MEA permet par la suite de corréler les données électriques et histologiques.

L'application idéale du MEA est donc l'enregistrement de la transition entre cortex lésionnel et péri lésionnel, afin de cartographier les activités interictales et ictales en relation avec la localisation de la lésion. Les dysplasies de fond de sillon sont des candidates idéales pour de telles études, de même que les LEAT (Low Grade Epilepsy Associated Tumors) tels que gliogliomes et DNET, qui ont un contingent dysplasique associé à la tumeur. Des immunomarquages multiples ciblant les neurones (NeuN), interneurons (PV, GAD), astrocytes (GFAP), les connexins ou pannexins, la voie mTOR (pS6), ou même des marquages tumoraux permettront des

corrélations histo-électriques, à l'échelle cellulaire ou du réseau de neurones. De plus, les techniques récentes de clarification du tissu associées à l'imagerie tridimensionnelle en immuno fluorescence, (Renier *et al.*, 2014) seraient particulièrement adaptées pour les troubles de l'architecture colonnaire ou laminaire associés.

Par ailleurs, le MEA peut aider à cibler les explorations en biologie moléculaire, notamment dans les FCD de type I. En effet, il est possible de réaliser des micro dissections des tranches corticales, en isolant les zones générant spontanément une activité inter ictale des zones normales. Une analyse comparée en biologie moléculaire pourrait montrer des mosaïques au sein du cortex dysplasique, expliquant la difficulté des explorations génétiques prenant en compte l'ensemble du cortex réséqué.

Enfin, l'utilisation récente dans notre pratique de la SEEG, et aussi de l'électrocorticographie per opératoire ouvre la voie à des comparaisons in vitro des zones réséquées générant ou pas in vivo des anomalies interictales. Particulièrement, les zones générant des HFO pourraient être ciblées, et étudiées en combinant MEA, patch et imagerie biphotonique avec un fluorophore potassique, afin de mieux appréhender les mécanismes des oscillations hautes fréquences dans le cortex humain.

IV. Conclusion

Cette étude a permis de consolider le travail multidisciplinaire autour de la chirurgie de l'épilepsie. Elle a donné naissance à des données originales dans le domaine de la localisation des FCD mais aussi dans l'étude in vitro des pièces opératoires afin de comprendre les mécanismes de l'épileptogénicité des FCD.

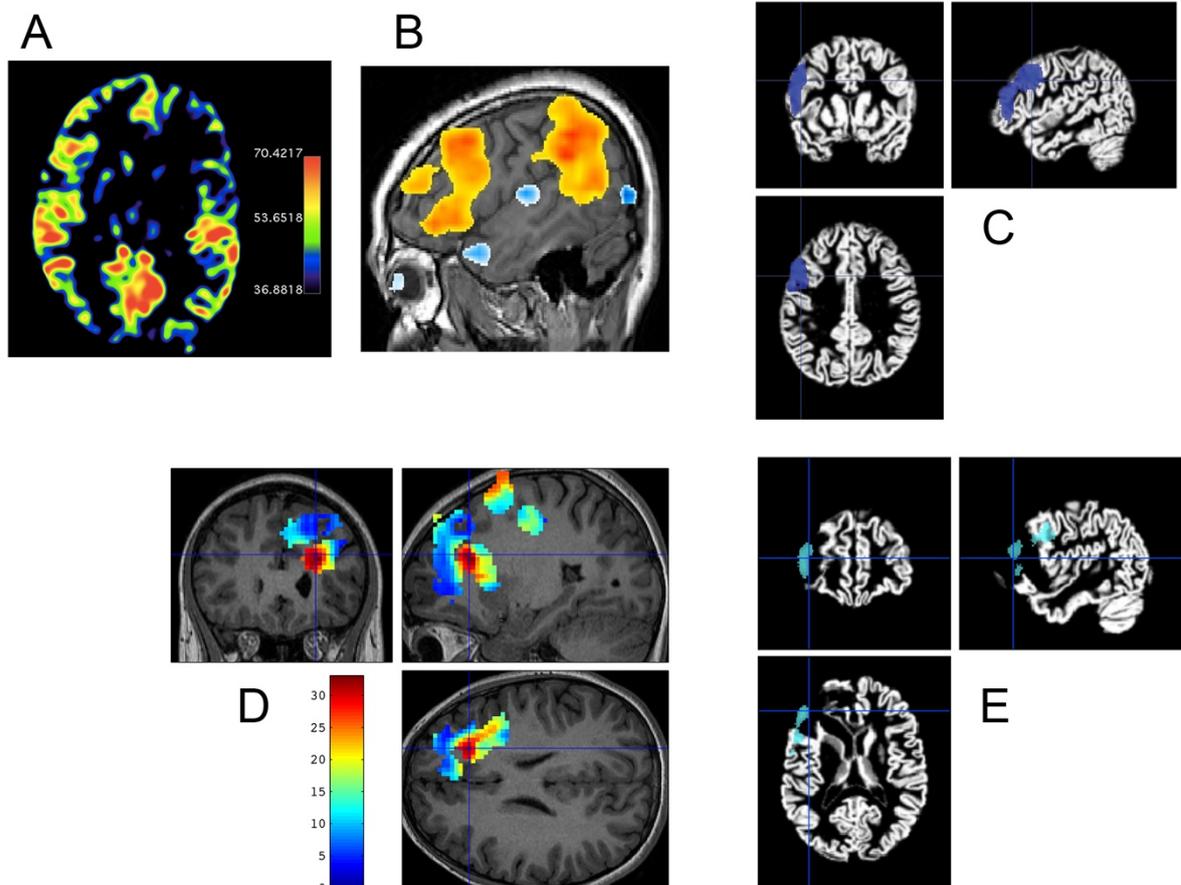
Elle a surtout permis de mettre en perspectives des travaux prospectifs couplant les données radiologiques (IRM ASL), électrophysiologiques de surface (IRMf-EEG) et intracrâniennes (SEEG/électrocorticographie) aux approches in vitro électrophysiologiques et histologiques.

Cette approche multidisciplinaire et multimodale est prometteuse pour une meilleure thérapie des FCD de l'enfant.

V. Annexes

Annexe 1 : approche multimodale des dysplasies par IRM-ASL, EEG-IRMf, et SEEG

L'ensemble des imageries sont normalisées dans l'espace du MNI, et analysées sous SPM permettant la comparaison des anomalies électrophysiologiques et de perfusion interictales et ictales.



A : IRM ASL, montrant une hypoperfusion frontale gauche (débit sanguin cérébral= 40mL / 100mg / m,)

B : IRMf-EEG, orientant vers les gyri F2-F3 gauches

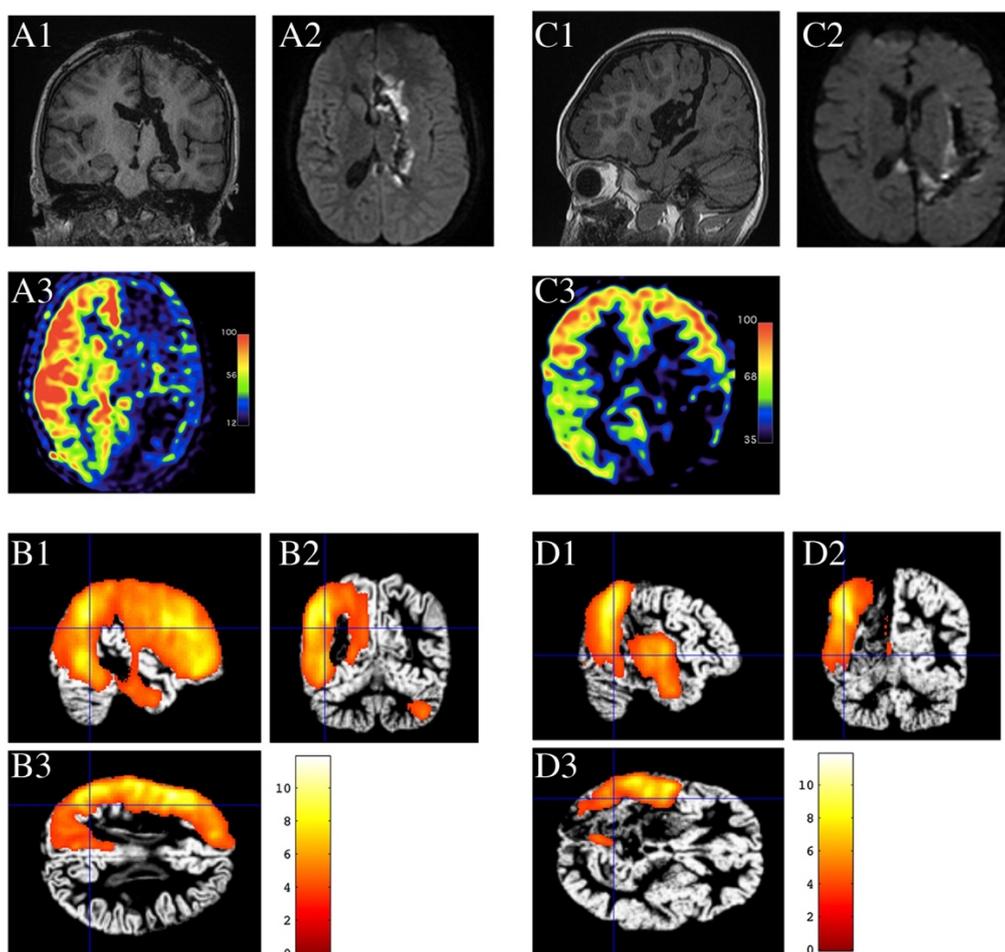
C : Analyse statistique de l'ASL préopératoire interpolée sur l'IRM préopératoire normalisée. Hypoperfusion statistiquement significative ($p < 0.001$) au niveau du sillon frontal inférieur et de F2

D : Carte d'Epileptogénicité obtenue après traitement du signal SEEG selon la méthodologie de l'epileptogenicity index. (Blauwblomme *et al.*, 2013; David *et al.*, 2011). Le maximum d'épileptogénicité se situe dans le sillon F2/F3

E : Analyse statistique de l'ASL post opératoire, interpolée sur l'IRM postopératoire normalisée. Colocalisation de l'hypoperfusion et de la résection chirurgicale (sauf la région motrice qui n'a pas été réséquée)

Annexe 2 : Hypoperfusion après déconnection hémisphérique

Lors d'une déconnection hémisphérique, le cortex est préservé, mais l'ensemble des voies d'associations inter hémisphérique, thalamo-corticales, et de projections sous corticales sont sectionnées. Nous illustrons ainsi le couplage connectivité anatomique et fonctionnelle avec la perfusion cérébrale.



A : Imagerie post opératoire hémisphérotomie gauche. A1 : T1 coronale, A2 : diffusion, A3 : ASL.

Hypoperfusion de l'hémisphère gauche, sans anomalie de diffusion corticale

B : analyse statistique de l'ASL montrant une diminution significative du débit sanguin cérébral dans l'hémisphère opéré

C : imagerie post déconnection temporo pariéto occipitale gauche et résection insulaire. C1 : T1 sagittal, C2 : Diffusion, C3 : ASL.

Hypoperfusion du carrefour gauche sans anomalie de diffusion corticale

D : analyse statistique de l'ASL montrant une diminution significative du débit sanguin cérébral dans le carrefour gauche.

VI. REFERENCES

Aivar P, Valero M, Bellistri E, Menendez De La Prida L. Extracellular calcium controls the expression of two different forms of ripple-like hippocampal oscillations. *Journal of Neuroscience* 2014; 34: 2989–3004.

Alessi DR, Zhang J, Khanna A, Hochdörfer T, Shang Y, Kahle KT. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci Signal* 2014; 7: re3–re3.

Alonso-Nanclares L, Garbelli R, Sola RG, Pastor J, Tassi L, Spreafico R, et al. Microanatomy of the dysplastic neocortex from epileptic patients. *brain* 2005; 128: 158–173.

André VM, Cepeda C, Vinters HV, Huynh M, Mathern GW, Levine MS. Pyramidal cell responses to gamma-aminobutyric acid differ in type I and type II cortical dysplasia. *Journal of Neuroscience Research* 2008; 86: 3151–3162.

André VM, Cepeda C, Vinters HV, Huynh M, Mathern GW, Levine MS. Interneurons, GABAA currents, and subunit composition of the GABAA receptor in type I and type II cortical dysplasia. *Epilepsia* 2010; 51 Suppl 3: 166–170.

André VM, Flores-Hernández J, Cepeda C, Starling AJ, Nguyen S, Lobo MK, et al. NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. *Cereb. Cortex* 2004; 14: 634–646.

André VM, Wu N, Yamazaki I, Nguyen ST, Fisher RS, Vinters HV, et al. Cytomegalic interneurons: a new abnormal cell type in severe pediatric cortical dysplasia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2007; 66: 491–504.

Archambaud F, Boullieret V, Hertz-Pannier L, Chaumet-Riffaud P, Rodrigo S, Dulac O, et al. Optimizing statistical parametric mapping analysis of 18F-FDG PET in children. *EJNMMI Research* 2013; 3: 1–1.

Arnold S, Berthele A, Drzezga A, Tölle TR, Weis S, Werhahn KJ, et al. Reduction of benzodiazepine receptor binding is related to the seizure onset zone in extratemporal focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2000; 41: 818–824.

Aronica E, Boer K, Redeker S, Spliet WGM, van Rijen PC, Troost D, et al. Differential expression patterns of chloride transporters, Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter and K⁺-Cl⁻-cotransporter, in epilepsy-associated malformations of cortical development. *Neuroscience* 2007; 145: 185–196.

Aronica E, Gorter JA, Jansen GH, van Veelen CWM, Van Rijen PC, Ramkema M, et al. Expression and cell distribution of group I and group II metabotropic glutamate receptor subtypes in taylor-type focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2003; 44: 785–795.

Asano E, Juhasz C, Shah A, Sood S, Chugani HT. Role of subdural electrocorticography in prediction of long-term seizure outcome in epilepsy surgery.

brain 2009; 132: 1038–1047.

Aubert S, Wendling F, Regis J, McGonigal A, Figarella-Branger D, Peragut JC, et al. Local and remote epileptogenicity in focal cortical dysplasias and neurodevelopmental tumours. *brain* 2009; 132: 3072–3086.

Avoli M, Bernasconi A, Mattia D, Olivier A, Hwa G. Epileptiform Discharges in the Human Dysplastic Neocortex: In Vitro Physiology and Pharmacology. *Ann Neurol*. 1999; 46: 816–826.

Baek ST, Copeland B, Yun E-J, Kwon S-K, Guemez-Gamboa A, Schaffer AE, et al. An AKT3-FOXP1-reelin network underlies defective migration in human focal malformations of cortical development. *Nat Med* 2015; 21: 1445–1454.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 1996a; 27: 59–63.

Barkovich AJ, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Jackson GD, Becker LE, Evrard P. A classification scheme for malformations of cortical development. *Neuropediatrics* 1996b; 27: 59–63.

Bartolini L, Whitehead MT, Ho C-Y, Sepeta LN, Oluigbo CO, Havens K, et al. Temporal lobe epilepsy and focal cortical dysplasia in children: A tip to find the abnormality. *Epilepsia* 2017; 58: 113–122.

Bartolomei F, Chauvel P, Wendling F. Epileptogenicity of brain structures in human temporal lobe epilepsy: a quantified study from intracerebral EEG. *brain* 2008; 131: 1818–1830.

Bast T, Ramantani G, Seitz A, Rating D. Focal cortical dysplasia: prevalence, clinical presentation and epilepsy in children and adults. *Acta Neurol. Scand.* 2006; 113: 72–81.

Benardete EA, Kriegstein AR. Increased excitability and decreased sensitivity to GABA in an animal model of dysplastic cortex. *Epilepsia* 2002; 43: 970–982.

Besson P, Andermann F, Dubeau F, Bernasconi A. Small focal cortical dysplasia lesions are located at the bottom of a deep sulcus. *brain* 2008; 131: 3246–3255.

Bénar CG, Grova C, Kobayashi E, Bagshaw AP, Aghakhani Y, Dubeau F, et al. EEG-fMRI of epileptic spikes: concordance with EEG source localization and intracranial EEG. *NeuroImage* 2006; 30: 1161–1170.

Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron* 2009; 61: 820–838.

Blauwblomme T, David O, Minotti L, Job A-S, Chassagnon S, Hoffman D, et al. Prognostic value of insular lobe involvement in temporal lobe epilepsy: A stereoelectroencephalographic study. *Epilepsia* 2013; 54: n/a–n/a.

Blauwblomme T, Jiruska P, Huberfeld G. Mechanisms of ictogenesis. *Int. Rev.*

Neurobiol. 2014; 114: 155–185.

Blümcke I, Mühlebner A. Neuropathological work-up of focal cortical dysplasias using the new ILAE consensus classification system - practical guideline article invited by the Euro-CNS Research Committee. *NP* 2011; 30: 164–177.

Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Guerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara C, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salamon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A, Spreafico R. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011a; 52: 158–174.

Blümcke I, Thom M, Aronica E, Armstrong DD, Vinters HV, Palmini A, Jacques TS, Avanzini G, Barkovich AJ, Battaglia G, Becker A, Cepeda C, Cendes F, Colombo N, Crino P, Cross JH, Delalande O, Dubeau F, Duncan J, Guerrini R, Kahane P, Mathern G, Najm I, Ozkara C, Raybaud C, Represa A, Roper SN, Salamon N, Schulze-Bonhage A, Tassi L, Vezzani A, Spreafico R. The clinicopathologic spectrum of focal cortical dysplasias: a consensus classification proposed by an ad hoc Task Force of the ILAE Diagnostic Methods Commission. *Epilepsia* 2011b; 52: 158–174.

Boccaletti S, Hwang D-U, Chavez M, Amann A, Kurths J, Pecora LM. Synchronization in dynamical networks: evolution along commutative graphs. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2006; 74: 016102.

Bourdillon P, Isnard J, Catenoix H, Montavont A, Rheims S, Ryvlin P, et al. Stereo electroencephalography-guided radiofrequency thermocoagulation (SEEG-guided RF-TC) in drug-resistant focal epilepsy: Results from a 10-year experience. *Epilepsia* 2017; 58: 85–93.

Calcagnotto ME. Dysfunction of Synaptic Inhibition in Epilepsy Associated with Focal Cortical Dysplasia. *Journal of Neuroscience* 2005; 25: 9649–9657.

Carlen PL. Curious and contradictory roles of glial connexins and pannexins in epilepsy. *Brain Research* 2012a; 1487: 54–60.

Carlen PL. Curious and contradictory roles of glial connexins and pannexins in epilepsy. *Brain Research* 2012b; 1487: 54–60.

Castro PA, Cooper EC, Lowenstein DH, Baraban SC. Hippocampal heterotopia lack functional Kv4.2 potassium channels in the methylazoxymethanol model of cortical malformations and epilepsy. *Journal of Neuroscience* 2001; 21: 6626–6634.

Catenoix H, Mauguiere F, Montavont A, Ryvlin P, Guénot M, Isnard J. Seizures Outcome After Stereoelectroencephalography-Guided Thermocoagulations in Malformations of Cortical Development Poorly Accessible to Surgical Resection. *Neurosurgery* 2015; 77: 9–14– discussion 14–5.

Cepeda C, Andr eacute VM, Flores-Hern Aacute Ndez J, Nguyen OK, Wu N, Klapstein GJ, et al. Pediatric cortical dysplasia: correlations between neuroimaging, electrophysiology and location of cytomegalic neurons and balloon cells and

glutamate/GABA synaptic circuits. *Dev. Neurosci.* 2005; 27: 59–76.

Cepeda C, André VM, Vinters HV, Levine MS, Mathern GW. Are cytomegalic neurons and balloon cells generators of epileptic activity in pediatric cortical dysplasia? *Epilepsia* 2005; 46 Suppl 5: 82–88.

Cepeda C, Chen JY, Wu JY, Fisher RS, Vinters HV, Mathern GW, et al. Pacemaker GABA synaptic activity may contribute to network synchronization in pediatric cortical dysplasia. *Neurobiol. Dis.* 2014; 62: 208–217.

Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernandez J, Hernandez-Echeagaray E, Klapstein GJ, Boylan MK, et al. Morphological and electrophysiological characterization of abnormal cell types in pediatric cortical dysplasia. *Journal of Neuroscience Research* 2003; 72: 472–486.

Chamma I, Chevy Q, Poncer JC, Lévi S. Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci* 2012; 6: 5.

Chamma I, Heubl M, Chevy Q, Renner M, Moutkine I, Eugène E, et al. Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience* 2013; 33: 15488–15503.

Chan HW, Pressler R, Uff C, Gunny R, St Piers K, Cross H, et al. A novel technique of detecting MRI-negative lesion in focal symptomatic epilepsy: intraoperative ShearWave elastography. *Epilepsia* 2014; 55: e30–3.

Chassoux F, Devaux B, Landre E, Turak B, Nataf F, Varlet P, et al. Stereoelectroencephalography in focal cortical dysplasia: A 3D approach to delineating the dysplastic cortex. *brain* 2000; 123: 1733–1751.

Chassoux F, Landré E, Mellerio C, Turak B, Mann MW, Daumas-Duport C, et al. Type II focal cortical dysplasia: electroclinical phenotype and surgical outcome related to imaging. *Epilepsia* 2012; 53: 349–358.

Chassoux F, Rodrigo S, Semah F, Beuvon F, Landre E, Devaux B, et al. FDG-PET improves surgical outcome in negative MRI Taylor-type focal cortical dysplasias. *Neurology* 2010; 75: 2168–2175.

Chen J, Tsai V, Parker WE, Aronica E, Baybis M, Crino PB. Detection of human papillomavirus in human focal cortical dysplasia type IIB. *Ann Neurol.* 2012; 72: 881–892.

Chern JJ, Patel AJ, Jea A, Curry DJ, Comair YG. Surgical outcome for focal cortical dysplasia: an analysis of recent surgical series. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 2010; 6: 452–458.

Chever O, Dossi E, Pannasch U, Derangeon M, Rouach N. Astroglial networks promote neuronal coordination. *Sci Signal* 2016; 9: ra6–ra6.

Chever O, Lee C-Y, Rouach N. Astroglial connexin43 hemichannels tune basal excitatory synaptic transmission. *Journal of Neuroscience* 2014; 34: 11228–11232.

Chevy Q, Heubl M, Goutierre M, Backer S, Moutkine I, Eugène E, et al. KCC2 Gates Activity-Driven AMPA Receptor Traffic through Cofilin Phosphorylation. *Journal of Neuroscience* 2015; 35: 15772–15786.

Chugani HT, Phelps ME. Maturation changes in cerebral function in infants determined by 18FDG positron emission tomography. *Science* 1986; 231: 840–843.

Chugani HT, Shewmon DA, Peacock WJ, Shields WD, Mazziotta JC, Phelps ME. Surgical treatment of intractable neonatal-onset seizures: the role of positron emission tomography. *Neurology* 1988; 38: 1178–1188.

Chugani HT, Shields WD, Shewmon DA, Olson DM, Phelps ME, Peacock WJ. Infantile spasms: I. PET identifies focal cortical dysgenesis in cryptogenic cases for surgical treatment. *Ann Neurol.* 1990; 27: 406–413.

Cohen-Gadol AA, Ozduman K, Bronen RA, Kim JH, Spencer DD. Long-term outcome after epilepsy surgery for focal cortical dysplasia. *Journal of neurosurgery* 2004; 101: 55–65.

Colombo N, Salamon N, Raybaud C, Ozkara C, Barkovich AJ. Imaging of malformations of cortical development. *epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 2009; 11: 194–205.

Colombo N, Tassi L, Deleo F, Citterio A, Bramerio M, Mai R, et al. Focal cortical dysplasia type IIa and IIb: MRI aspects in 118 cases proven by histopathology. *Neuroradiology* 2012; 54: 1065–1077.

Coras R, Korn K, Bien CG, Kalbhenn T, Rössler K, Kobow K, et al. No evidence for human papillomavirus infection in focal cortical dysplasia IIb. *Ann Neurol.* 2015; 77: 312–319.

Cossu M, Fuschillo D, Casaceli G, Pelliccia V, Castana L, Mai R, et al. Stereoelectroencephalography-guided radiofrequency thermocoagulation in the epileptogenic zone: a retrospective study on 89 cases. *Neurosurgery* 2015; 123: 1358–1367.

Coull JAM, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 2005; 438: 1017–1021.

Crépon B, Navarro V, Hasboun D, Clemenceau S, Martinerie J, Baulac M, et al. Mapping interictal oscillations greater than 200 Hz recorded with intracranial macroelectrodes in human epilepsy. *brain* 2010; 133: 33–45.

D'antuono M, Louvel J, Kohling R, Mattia D, Bernasconi A, Olivier A, et al. GABAA receptor-dependent synchronization leads to ictogenesis in the human dysplastic cortex. *brain* 2004; 127: 1626–1640.

David O, Blauwblomme T, Job A-S, Chabardès S, Hoffmann D, Minotti L, Kahane P. Imaging the seizure onset zone with stereo-electroencephalography. *brain* 2011a; 134: 2898–2911.

David O, Blauwblomme T, Job A-S, Chabardès S, Hoffmann D, Minotti L, Kahane P. Imaging the seizure onset zone with stereo-electroencephalography. *brain* 2011b; 134: 2898–2911.

de Lanerolle NC, Lee T-S, Spencer DD. Astrocytes and epilepsy. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 424–438.

Deukmedjian AJ, King MA, Cuda C, Roper SN. The GABAergic system of the developing neocortex has a reduced capacity to recover from in utero injury in experimental cortical dysplasia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 1265–1273.

Devaux B, Chassoux F, Landre E, Turak B, Abou-Salma Z, Mann M, et al. [Surgical resections in functional areas: report of 89 cases]. *Neurochirurgie* 2008; 54: 409–417.

Di Angelantonio S, Murana E, Cocco S, Scala F, Bertollini C, Molinari MG, et al. A role for intracellular zinc in glioma alteration of neuronal chloride equilibrium. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1501.

DuBois JM, Rousset OG, Guiot M-C, Hall JA, Reader AJ, Soucy J-P, et al. Metabotropic Glutamate Receptor Type 5 (mGluR5) Cortical Abnormalities in Focal Cortical Dysplasia Identified In Vivo With [¹¹C]ABP688 Positron-Emission Tomography (PET) Imaging. *Cerebral Cortex* 2016; 26: 4170–4179.

Dvorak K, Feit J, Juránková Z. Experimentally induced focal microgyria and status verrucosus deformis in rats--pathogenesis and interrelation. *Histological and autoradiographical study. Acta Neuropathol* 1978; 44: 121–129.

Dzhala V, Valeeva G, Glykys J, Khazipov R, Staley K. Traumatic alterations in GABA signaling disrupt hippocampal network activity in the developing brain. *Journal of Neuroscience* 2012; 32: 4017–4031.

Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, et al. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 2005; 11: 1205–1213.

Eltze CM, Chong WK, Bhate S, Harding B, Neville BGR, Cross JH. Taylor-type focal cortical dysplasia in infants: some MRI lesions almost disappear with maturation of myelination. *Epilepsia* 2005; 46: 1988–1992.

Englot DJ, Chang EF, Auguste KI. Vagus nerve stimulation for epilepsy: a meta-analysis of efficacy and predictors of response. *Journal of neurosurgery* 2011; 115: 1248–1255.

Fauser S, Huppertz H-J, Bast T, Strobl K, Pantazis G, Altenmueller D-M, et al. Clinical characteristics in focal cortical dysplasia: a retrospective evaluation in a series of 120 patients. *brain* 2006; 129: 1907–1916.

Fernández IS, Loddenkemper T. Electrocorticography for Seizure Foci Mapping in Epilepsy Surgery. *Journal of Clinical Neurophysiology* 1BC; 30: 1–17.

Ferrari-Marinho T, Perucca P, Mok K, Olivier A, Hall J, Dubeau F, et al. Pathologic

substrates of focal epilepsy influence the generation of high-frequency oscillations. *Epilepsia* 2015; 56: 592–598.

Finardi A, Colciaghi F, Castana L, Locatelli D, Marras CE, Nobili P, et al. Long-duration epilepsy affects cell morphology and glutamatergic synapses in type IIB focal cortical dysplasia. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 219–235.

Francione S, Nobili L, Cardinale F, Citterio A, Galli C, Tassi L. Intra-lesional stereo-EEG activity in Taylor 's focal cortical dysplasia. *epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 2003; 5 Suppl 2: S105–14.

Franke H, Illes P. Nucleotide signaling in astrogliosis. *Neurosci. Lett.* 2014; 565: 14–22.

Garbelli R, Munari C, De Biasi S, Vitellaro-Zuccarello L, Galli C, Bramerio M, et al. Taylor's cortical dysplasia: a confocal and ultrastructural immunohistochemical study. *Brain Pathol.* 1999; 9: 445–461.

Gauvain G, Chamma I, Chevy Q, Cabezas C, Irinopoulou T, Bodrug N, et al. The neuronal K-Cl cotransporter KCC2 influences postsynaptic AMPA receptor content and lateral diffusion in dendritic spines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 15474–15479.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 87–99.

Glykys J, Dzhalal V, Egawa K, Balena T, Saponjian Y, Kuchibhotla KV, et al. Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. *Science* 2014; 343: 670–675.

Haller S, Zaharchuk G, Thomas DL, Lovblad K-O, Barkhof F, Golay X. Arterial Spin Labeling Perfusion of the Brain: Emerging Clinical Applications. *Radiology* 2016; 281: 337–356.

Harvey AS, Cross JH, Shinnar S, Mathern GW. Defining the spectrum of international practice in pediatric epilepsy surgery patients. *Epilepsia* 2008; 49: 146–155.

Hong S-J, Kim H, Schrader D, Bernasconi N, Bernhardt BC, Bernasconi A. Automated detection of cortical dysplasia type II in MRI-negative epilepsy. *Neurology* 2014; 83: 48–55.

Huang J, Wu S, Wu C-L, Manning BD. Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Res.* 2009; 69: 6107–6114.

Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, et al. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience* 2007; 27: 9866–9873.

Innocenti GM, Berbel P. Analysis of an experimental cortical network: I). Architectonics of visual areas 17 and 18 after neonatal injections of ibotenic acid; similarities with human microgyria. *J Neural Transplant Plast* 1991; 2: 1–28.

Jacobs J, Levan P, Chatillon C-É, Olivier A, Dubeau F, Gotman J. High frequency oscillations in intracranial EEGs mark epileptogenicity rather than lesion type. *brain* 2009; 132: 1022–1037.

Jacobs J, Zijlmans M, Zelmann R, Chatillon C-É, Hall J, Olivier A, et al. High-frequency electroencephalographic oscillations correlate with outcome of epilepsy surgery. *Ann Neurol*. 2010; 67: 209–220.

Jacobs KM, Gutnick MJ, Prince DA. Hyperexcitability in a model of cortical maldevelopment. *Cereb. Cortex* 1996; 6: 514–523.

Jansen LA, Mirzaa GM, Ishak GE, O'Roak BJ, Hiatt JB, Roden WH, et al. PI3K/AKT pathway mutations cause a spectrum of brain malformations from megalencephaly to focal cortical dysplasia. *brain* 2015; 138: 1613–1628.

Jiang X, Nardelli J. Cellular and molecular introduction to brain development. *Neurobiol. Dis.* 2016; 92: 3–17.

Jonas R, Nguyen S, Hu B, Asarnow RF, LoPresti C, Curtiss S, et al. Cerebral hemispherectomy: hospital course, seizure, developmental, language, and motor outcomes. *Neurology* 2004; 62: 1712–1721.

Jones RSG, da Silva AB, Whittaker RG, Woodhall GL, Cunningham MO. Human brain slices for epilepsy research: Pitfalls, solutions and future challenges. *Journal of Neuroscience Methods* 2016; 260: 221–232.

Jung DE, Kang H-C, Kim HD. Long-term outcome of the ketogenic diet for intractable childhood epilepsy with focal malformation of cortical development. *PEDIATRICS* 2008; 122: e330–3.

Kahle KT, Khanna AR, Duan J, Staley KJ, Delpire E, Poduri A. The KCC2 Cotransporter and Human Epilepsy: Getting Excited About Inhibition. *Neuroscientist* 2016; 22: 555–562.

Kamano H, Yoshiura T, Hiwatashi A, Abe K, Togao O, Yamashita K, et al. Arterial spin labeling in patients with chronic cerebral artery steno-occlusive disease: correlation with 15O-PET. [Internet]. *Acta Radiol* 2012 Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=23091237&retmode=ref&cmd=prlinks>

Kaminska A, Chiron C, Ville D, Dellatolas G, Hollo A, Cieuta C, et al. Ictal SPECT in children with epilepsy: comparison with intracranial EEG and relation to postsurgical outcome. *brain* 2003; 126: 248–260.

Kassai H, Sugaya Y, Noda S, Nakao K, Maeda T, Kano M, et al. Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell Rep* 2014; 7: 1626–1639.

Kerekes BP, Tóth K, Kaszás A, Chiovini B, Szadai Z, Szalay G, et al. Combined two-photon imaging, electrophysiological, and anatomical investigation of the human neocortex in vitro. *Neurophoton* 2014; 1: 011013.

Kim YK, Lee DS, Lee SK, Chung CK, Chung J-K, Lee MC. (18)F-FDG PET in localization of frontal lobe epilepsy: comparison of visual and SPM analysis. *J. Nucl. Med.* 2002; 43: 1167–1174.

Kondo S, Najm I, Kunieda T, Perryman S, Yacubova K, Lüders HO. Electroencephalographic characterization of an adult rat model of radiation-induced cortical dysplasia. *Epilepsia* 2001; 42: 1221–1227.

Konopka A, Grajkowska W, Ziemiańska K, Roszkowski M, Daszkiewicz P, Rysz A, et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human intractable epilepsy caused by focal cortical dysplasia. *Epilepsy Research* 2013; 104: 45–58.

Krsek P, Kudr M, Jahodova A, Komarek V, Maton B, Malone S, et al. Localizing value of ictal SPECT is comparable to MRI and EEG in children with focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2013; 54: 351–358.

Krsek P, Maton B, Korman B, Pacheco-Jacome E, Jayakar P, Dunoyer C, et al. Different features of histopathological subtypes of pediatric focal cortical dysplasia. *Ann Neurol.* 2008; 63: 758–769.

Krsek P, Pieper T, Karlmeier A, Hildebrandt M, Kolodziejczyk D, Winkler P, et al. Different presurgical characteristics and seizure outcomes in children with focal cortical dysplasia type I or II. *Epilepsia* 2009; 50: 125–137.

Kwon HE, Eom S, Kang H-C, Lee JS, Kim SH, Kim D-S, et al. Surgical treatment of pediatric focal cortical dysplasia: Clinical spectrum and surgical outcome. *Neurology* 2016; 87: 945–951.

Lee HHC, Deeb TZ, Walker JA, Davies PA, Moss SJ. NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABA_A receptor-mediated currents. *Nat Neurosci* 2011; 14: 736–743.

Lee HHC, Walker JA, Williams JR, Goodier RJ, Payne JA, Moss SJ. Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride cotransporter KCC2. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 29777–29784.

Lee JH, Huynh M, Silhavy JL, Kim S, Dixon-Salazar T, Heiberg A, et al. De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly. *Nat. Genet.* 2012; 44: 941–945.

Lerner JT, Salamon N, Hauptman JS, Velasco TR, Hemb M, Wu JY, et al. Assessment and surgical outcomes for mild type I and severe type II cortical dysplasia: a critical review and the UCLA experience. *Epilepsia* 2009; 50: 1310–1335.

Leventer RJ, Jansen FE, Mandelstam SA, Ho A, Mohamed I, Sarnat HB, et al. Is focal cortical dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. *Epilepsia* 2014; 55: e22–e26.

Lewis EC, Weil AG, Duchowny M, Bhatia S, Ragheb J, Miller I. MR-guided laser interstitial thermal therapy for pediatric drug-resistant lesional epilepsy. *Epilepsia* 2015; 56: 1590–1598.

Li S, Yu S, Zhang C, Shu H, Liu S, An N, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 in cortical lesions from patients with focal cortical dysplasia type IIb and tuberous sclerosis complex. *Brain Research* 2012; 1453: 46–55.

Liang X, Zou G, He Y, Yang Y. Coupling of functional connectivity and regional cerebral blood flow reveals a physiological basis for network hubs of the human brain. *PNAS* 2013; 110: 1929–1934.

Lim JS, Kim W-I, Kang H-C, Kim SH, Park AH, Park EK, et al. Brain somatic mutations in MTOR cause focal cortical dysplasia type II leading to intractable epilepsy. *Nat Med* 2015; 21: 395–400.

Lim K-C, Crino PB. Focal malformations of cortical development: new vistas for molecular pathogenesis. *Neuroscience* 2013; 252: 262–276.

Lipton JO, Sahin M. The Neurology of mTOR. *Neuron* 2014; 84: 275–291.

Liu S, Lu L, Cheng X, Xu G, Yang H. Viral infection and focal cortical dysplasia. *Ann Neurol*. 2014; 75: 614–616.

Luhmann HJ, Fukuda A, Kilb W. Control of cortical neuronal migration by glutamate and GABA. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 4.

Luhmann HJ. Models of cortical malformation--Chemical and physical. *Journal of Neuroscience Methods* 2016; 260: 62–72.

MacKenzie G, O'Toole KK, Moss SJ, Maguire J. Compromised GABAergic inhibition contributes to tumor-associated epilepsy. *Epilepsy Research* 2016; 126: 185–196.

Mathern GW, Cepeda C, Hurst RS, Flores-Hernández J, Mendoza D, Levine MS. Neurons recorded from pediatric epilepsy surgery patients with cortical dysplasia. *Epilepsia* 2000; 41 Suppl 6: S162–7.

MCGRATH JJ, RIGGS HE, SCHWARZ HP. Malformation of the adult brain (albino rat) resulting from prenatal irradiation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1956; 15: 432–46– discussion– 446–7.

Medici V, Rossini L, Deleo F, Tringali G, Tassi L, Cardinale F, et al. Different parvalbumin and GABA expression in human epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2016; 57: 1109–1119.

Mellerio C, Labeyrie M-A, Chassoux F, Daumas-Duport C, Landre E, Turak B, et al. Optimizing MR Imaging Detection of Type 2 Focal Cortical Dysplasia: Best Criteria for Clinical Practice. *AJNR Am J Neuroradiol* 2012; 33: 1932–1938.

Miller D, Knake S, Bauer S, Krakow K, Pagenstecher A, Sure U, et al. Intraoperative ultrasound to define focal cortical dysplasia in epilepsy surgery. *Epilepsia* 2008; 49: 156–158.

Mischel PS, Nguyen LP, Vinters HV. Cerebral cortical dysplasia associated with pediatric epilepsy. Review of neuropathologic features and proposal for a grading system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1995; 54: 137–153.

- Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Nakama H, Arima K, Itoh M, et al. Altered distribution of KCC2 in cortical dysplasia in patients with intractable epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 837–844.
- Murta T, Leite M, Carmichael DW, Figueiredo P, Lemieux L. Electrophysiological correlates of the BOLD signal for EEG-informed fMRI. *Hum. Brain Mapp.* 2015; 36: 391–414.
- Mylvaganam S, Zhang L, Wu C, Zhang ZJ, Samoiloa M, Eubanks J, et al. Hippocampal seizures alter the expression of the pannexin and connexin transcriptome. *J. Neurochem.* 2010; 112: 92–102.
- Nakashima M, Saitsu H, Takei N, Tohyama J, Kato M, Kitaura H, et al. Somatic Mutations in the MTOR gene cause focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol.* 2015; 78: 375–386.
- Nobili L, Cardinale F, Magliola U, Cicolin A, Didato G, Brammerio M, et al. Taylor's focal cortical dysplasia increases the risk of sleep-related epilepsy. *Epilepsia* 2009; 50: 2599–2604.
- Noguchi T, Kawashima M, Irie H, Ootsuka T, Nishihara M, Matsushima T, et al. Arterial spin-labeling MR imaging in moyamoya disease compared with SPECT imaging. *Eur J Radiol* 2011; 80: e557–62.
- Noguchi T, Kawashima M, Nishihara M, Hirai T, Matsushima T, Irie H. *European Journal of Radiology.* *Eur J Radiol* 2013; 82: e840–e847.
- Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, Cresto N, Dieme M-J, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L, Huberfeld G. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med* 2014a; 6: 244ra89–244ra89.
- Pallud J, Le Van Quyen M, Bielle F, Pellegrino C, Varlet P, Labussiere M, Cresto N, Dieme M-J, Baulac M, Duyckaerts C, Kourdougli N, Chazal G, Devaux B, Rivera C, Miles R, Capelle L, Huberfeld G. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. *Sci Transl Med* 2014b; 6: 244ra89–244ra89.
- Palmini A, Gambardella A, Andermann, Dubeau F, da Costa JC, Olivier A, et al. Intrinsic epileptogenicity of human dysplastic cortex as suggested by corticography and surgical results. *Ann Neurol.* 1995: 476–487.
- Palmini A, Najm I, Avanzini G, Babb T, Guerrini R, Foldvary-Schaefer N, et al. Terminology and classification of the cortical dysplasias. *Neurology* 2004; 62: S2–8.
- Pendse N, Wissmeyer M, Altrichter S, Vargas M, Delavelle J, Viallon M, et al. Interictal arterial spin-labeling MRI perfusion in intractable epilepsy. *J Neuroradiol* 2010; 37: 60–63.
- Perucca P, Dubeau F, Gotman J. Intracranial electroencephalographic seizure-onset patterns: effect of underlying pathology. *brain* 2014; 137: 183–196.

Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol*. 1979; 6: 371–388.

Phi JH, Paeng JC, Lee HS, Wang K-C, Cho B-K, Lee JY, et al. Evaluation of focal cortical dysplasia and mixed neuronal and glial tumors in pediatric epilepsy patients using 18F-FDG and 11C-methionine pet. *J. Nucl. Med*. 2010; 51: 728–734.

Pizzini FB, Farace P, Manganotti P, Zoccatelli G, Bongiovanni LG, Golay X, et al. Cerebral perfusion alterations in epileptic patients during peri-ictal and post-ictal phase: PASL vs DSC-MRI. *Magnetic Resonance Imaging* 2013; 31: 1001–1005.

Raoult H, Petr J, Bannier E, Stamm A, Gauvrit J-Y, Barillot C, et al. Arterial spin labeling for motor activation mapping at 3T with a 32-channel coil: reproducibility and spatial accuracy in comparison with BOLD fMRI. *NeuroImage* 2011; 58: 157–167.

Renier N, Wu Z, Simon DJ, Yang J, Ariel P, Tessier-Lavigne M. iDISCO: a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell* 2014; 159: 896–910.

Richardson MP, Koepp MJ, Brooks DJ, Fish DR, Duncan JS. Benzodiazepine receptors in focal epilepsy with cortical dysgenesis: an 11C-flumazenil PET study. *Ann Neurol*. 1996; 40: 188–198.

Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, et al. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *The Journal of Cell Biology* 2002; 159: 747–752.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipilä S, et al. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *Journal of Neuroscience* 2004; 24: 4683–4691.

Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 2008; 322: 1551–1555.

Rowland NC, Englot DJ, Cage TA, Sughrue ME, Barbaro NM, Chang EF. A meta-analysis of predictors of seizure freedom in the surgical management of focal cortical dysplasia. *Journal of neurosurgery* 2012; 116: 1035–1041.

Sacino MF, Ho C-Y, Murnick J, Tsuchida T, Magge SN, Keating RF, et al. Intraoperative MRI-guided resection of focal cortical dysplasia in pediatric patients: technique and outcomes. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 2016; 17: 1–7.

Salamon N, Kung J, Shaw SJ, Koo J, Koh S, Wu JY, et al. FDG-PET/MRI coregistration improves detection of cortical dysplasia in patients with epilepsy. *Neurology* 2008; 71: 1594–1601.

Sasaki M, Kuwabara Y, Yoshida T, Fukumura T, Morioka T, Nishio S, et al. Carbon-11-methionine PET in focal cortical dysplasia: a comparison with fluorine-18-FDG PET and technetium-99m-ECD SPECT. *J. Nucl. Med*. 1998; 39: 974–977.

Scantlebury MH, Ouellet P-L, Psarropoulou C, Carmant L. Freeze lesion-induced focal cortical dysplasia predisposes to atypical hyperthermic seizures in the immature rat. *Epilepsia* 2004; 45: 592–600.

Scheffer IE, Heron SE, Regan BM, Mandelstam S, Crompton DE, Hodgson BL, et al. Mutations in mammalian target of rapamycin regulator DEPDC5 cause focal epilepsy with brain malformations. *Ann Neurol*. 2014; 75: 782–787.

Semaan S, Wu J, Gan Y, Jin Y, Li G-H, Kerrigan JF, et al. Hyperactivation of BDNF-TrkB signaling cascades in human hypothalamic hamartoma (HH): a potential mechanism contributing to epileptogenesis. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21: 164–172.

Semah F, Picot MC, Adam C, Broglin D, Arzimanoglou A, Bazin B, et al. Is the underlying cause of epilepsy a major prognostic factor for recurrence? *Neurology* 1998; 51: 1256–1262.

Shapiro KA, McGuone D, Deshpande V, Sadow PM, Stemmer-Rachamimov A, Staley KJ. Failure to detect human papillomavirus in focal cortical dysplasia type IIb. *Ann Neurol*. 2015; 78: 63–67.

Sharp FR, Beraud M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nature Publishing Group* 2004; 5: 437–448.

Shimizu-Okabe C, Okabe A, Kilb W, Sato K, Luhmann HJ, Fukuda A. Changes in the expression of cation-Cl⁻ cotransporters, NKCC1 and KCC2, during cortical malformation induced by neonatal freeze-lesion. *Neuroscience Research* 2007; 59: 288–295.

Shimizu-Okabe C, Tanaka M, Matsuda K, Mihara T, Okabe A, Sato K, et al. KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Research* 2011; 93: 177–184.

Sisodiya SM, Fauser S, Cross JH, Thom M. Focal cortical dysplasia type II: biological features and clinical perspectives. *The Lancet Neurology* 2009; 8: 830–843.

Spatz M, Laqueur GL. Transplacental chemical induction of microencephaly in two strains of rats. I. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968; 129: 705–710.

Spencer SS. The relative contributions of MRI, SPECT, and PET imaging in epilepsy. *Epilepsia* 1994; 35 Suppl 6: S72–89.

Spreafico R, Tassi L, Colombo N, Brammerio M, Galli C, Garbelli R, et al. Inhibitory Circuits in Human Dysplastic Tissue. *Epilepsia* 2000; 41: 168–173.

Storti SF, Boscolo Galazzo I, Del Felice A, Pizzini FB, Arcaro C, Formaggio E, et al. Combining ESI, ASL and PET for quantitative assessment of drug-resistant focal epilepsy. *NeuroImage* 2014; 102 Pt 1: 49–59.

Sukigara S, Dai H, Nabatame S, Otsuki T, Hanai S, Honda R, et al. Expression of astrocyte-related receptors in cortical dysplasia with intractable epilepsy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2014; 73: 798–806.

- Sultan KT, Brown KN, Shi S-H. Production and organization of neocortical interneurons. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 221.
- Takase K-I, Shigeto H, Suzuki SO, Kikuchi H, Ohyagi Y, Kira J-I. Prenatal freeze lesioning produces epileptogenic focal cortical dysplasia. *Epilepsia* 2008; 49: 997–1010.
- Talos DM, Sun H, Kosaras B, Joseph A, Folkerth RD, Poduri A, et al. Altered inhibition in tuberous sclerosis and type IIb cortical dysplasia. *Ann Neurol*. 2012; 71: 539–551.
- Tassi L, Colombo N, Garbelli R, Francione S, Russo Lo G, Mai R, et al. Focal cortical dysplasia: neuropathological subtypes, EEG, neuroimaging and surgical outcome. *brain* 2002; 125: 1719–1732.
- Tassi L, Garbelli R, Colombo N, Bramerio M, Russo Lo G, Deleo F, et al. Type I focal cortical dysplasia: surgical outcome is related to histopathology. *epileptic disorders : international epilepsy journal with videotape* 2010; 12: 181–191.
- Taylor DC, Falconer, Bruton, Corsellis. Focal dysplasia of the cerebral cortex in epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1971: 369–387.
- Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, MacDonald JF, MacVicar BA. Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* 2008a; 322: 1555–1559.
- Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, Rungta RL, Hines DJ, Beazely MA, MacDonald JF, MacVicar BA. Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* 2008b; 322: 1555–1559.
- Thornton R, Laufs H, Rodionov R, Cannadathu S, Carmichael DW, Vulliemoz S, et al. EEG correlated functional MRI and postoperative outcome in focal epilepsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2010; 81: 922–927.
- Thornton R, Vulliemoz S, Rodionov R, Carmichael DW, Chaudhary UJ, Diehl B, et al. Epileptic networks in focal cortical dysplasia revealed using electroencephalography-functional magnetic resonance imaging. *Ann Neurol*. 2011; 70: 822–837.
- Tyvaert L, Hawco C, Kobayashi E, Levan P, Dubeau F, Gotman J. Different structures involved during ictal and interictal epileptic activity in malformations of cortical development: an EEG-fMRI study. *brain* 2008; 131: 2042–2060.
- van 't Klooster MA, Leijten FSS, Huiskamp G, Ronner HE, Baayen JC, Van Rijen PC, et al. High frequency oscillations in the intra-operative ECoG to guide epilepsy surgery ('The HFO Trial'): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015: 1–10.
- van 't Klooster MA, van Klink NEC, Leijten FSS, Zelmann R, Gebbink TA, Gosselaar PH, et al. Residual fast ripples in the intraoperative corticogram predict epilepsy surgery outcome. *Neurology* 2015; 85: 120–128.
- Van Bogaert P, Massager N, Tugendhaft P, Wikler D, Damhaut P, Levivier M, et al.

Statistical parametric mapping of regional glucose metabolism in mesial temporal lobe epilepsy. *NeuroImage* 2000; 12: 129–138.

Varotto G, Tassi L, Franceschetti S, Spreafico R, Panzica F. Epileptogenic networks of type II focal cortical dysplasia: a stereo-EEG study. *NeuroImage* 2012; 61: 591–598.

Várkuti B, Cavusoglu M, Kullik A, Schiffler B, Veit R, Yilmaz Ö, et al. Quantifying the Link between Anatomical Connectivity, Gray Matter Volume and Regional Cerebral Blood Flow: An Integrative MRI Study. *PLoS ONE* 2011; 6: e14801.

Velasquez S, Eugenin EA. Role of Pannexin-1 hemichannels and purinergic receptors in the pathogenesis of human diseases. *Front Physiol* 2014; 5: 96.

Wagner J, Weber B, Urbach H, Elger CE, Huppertz H-J. Morphometric MRI analysis improves detection of focal cortical dysplasia type II. *brain* 2011; 134: 2844–2854.

Wang Z, Fernandez-Seara M, Alsop D, Liu W-C, Flax J, Benasich A, et al. Assessment of functional development in normal infant brain using arterial spin labeled perfusion MRI. *NeuroImage* 2008; 39: 973–978.

Widdess-Walsh P, Kellinghaus C, Jeha L, Kotagal P, Prayson R, Bingaman W, et al. Electro-clinical and imaging characteristics of focal cortical dysplasia: correlation with pathological subtypes. *Epilepsy Research* 2005; 67: 25–33.

Wilczyński GM, Konopacki FA, Wilczek E, Lasiecka Z, Gorlewicz A, Michaluk P, et al. Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *The Journal of Cell Biology* 2008; 180: 1021–1035.

Williams D, Detre JA, Leigh J, Koretsky A. Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterialwater. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 212–216.

Wintermark P, Lechpammer M, Warfield SK, Kosaras B, Takeoka M, Poduri A, et al. Perfusion Imaging of Focal Cortical Dysplasia Using Arterial Spin Labeling: Correlation With Histopathological Vascular Density. *Journal of child neurology* 2013

Wissmeyer M, Altrichter S, Pereira VM, Viallon M, Federspiel A, Seeck M, et al. Arterial spin-labeling MRI perfusion in tuberous sclerosis: Correlation with PET. *J Neuroradiol* 2010; 37: 127–130.

Wray CD, McDaniel S, Saneto RP, Novotny EJ, Ojemann JG. Is postresective intraoperative electrocorticography predictive of seizure outcomes in children? *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* 2012; 9: 546–551.

Wu J, DeChon J, Xue F, Li G, Ellsworth K, Gao M, et al. GABA(A) receptor-mediated excitation in dissociated neurons from human hypothalamic hamartomas. *Experimental Neurology* 2008; 213: 397–404.

Wu J, Xu L, Do Young Kim, Rho JM, John PAS, Lue L-F, et al. Electrophysiological Properties of Human Hypothalamic Hamartomas. *Ann Neurol.* 2005; 58: 371–382.

Wu JY, Sankar R, Lerner JT, Matsumoto JH, Vinters HV, Mathern GW. Removing

interictal fast ripples on electrocorticography linked with seizure freedom in children. *Neurology* 2010; 75: 1–9.

Xu G, Antuono PG, Jones J, Xu Y, Wu G, Ward D, et al. Perfusion fMRI detects deficits in regional CBF during memory-encoding tasks in MCI subjects. *Neurology* 2007; 69: 1650–1656.

Yasin SA, Ali AM, Tata M, Picker SR, Anderson GW, Latimer-Bowman E, et al. mTOR-dependent abnormalities in autophagy characterize human malformations of cortical development: evidence from focal cortical dysplasia and tuberous sclerosis. *Acta Neuropathol* 2013; 126: 207–218.

Ying Z, Babb TL, Comair YG, Bingaman W, Bushey M, Touhalisky K. Induced expression of NMDAR2 proteins and differential expression of NMDAR1 splice variants in dysplastic neurons of human epileptic neocortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998; 57: 47–62.

Zamecnik J, Krsek P, Druga R, Marusic P, Benes V, Tichy M, et al. Densities of parvalbumin-immunoreactive neurons in non-malformed hippocampal sclerosis-temporal neocortex and in cortical dysplasias. *Brain Res. Bull.* 2006; 68: 474–481.

Zheng D-H, Guo W, Sun F-J, Xu G-Z, Zang Z-L, Shu H-F, et al. Expression of TRPC6 and BDNF in Cortical Lesions From Patients With Focal Cortical Dysplasia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2016; 75: 718–730.

Zilles K, Qü M, Schleicher A, Luhmann HJ. Characterization of neuronal migration disorders in neocortical structures: quantitative receptor autoradiography of ionotropic glutamate, GABA(A) and GABA(B) receptors. *Eur. J. Neurosci.* 1998; 10: 3095–3106.

Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. 2014; 15: 637–654.

VII. RESUME

Les dysplasies corticales (FCD) sont une cause fréquente d'épilepsie lésionnelle requérant un traitement chirurgical, caractérisées par l'association de troubles de l'architecture corticale et la présence de cellules neuronales et/ou gliales anormales. Les FCD restent parfois difficiles à identifier / localiser et la physiopathologie des activités épileptiques qu'elles produisent reste mal connue.

L'objectif de ce travail est d'optimiser la localisation anatomique et fonctionnelle des FCD chez l'enfant et d'étudier leur épileptogénicité par une double approche, in vivo en imagerie de perfusion IRM-ASL (Arterial Spin Labeling), et in vitro par enregistrements de tissus humains post-opératoires sur matrice de micro électrodes. L'intérêt de l'étude de ces dysplasies chez l'enfant est majeure à un âge où la récurrence des crises n'a pas encore modifié le réseau

Tout d'abord, nous avons montré une *hypoperfusion focale* des dysplasies corticales focales de type II colocalisée à l'hypo métabolisme en ^{18}F FDG-PET scan et au défaut histologique. Nous avons développé une méthode *d'analyse statistique* du signal ASL permettant l'intégration des données objectives de l'imagerie dans une approche multimodale des anomalies interictales associant ASL et IRM fonctionnelle-EEG.

Ensuite, nous avons exploré in vitro des tranches de cortex humain dysplasique post-opératoire. La présence d'activités *épileptiques interictales* spontanées témoignait de la persistance des caractéristiques épileptogéniques des FCD, variables selon les sous types histologiques. L'étude de la signalisation GABAergique et de la régulation du chlore a montré que le co transporteur du chlore NKCC1 chargeait excessivement les neurones en chlore alors que son concurrent KCC2, extrudant normalement ces anions, était down-régulé. *La dérégulation neuronale du chlore* qui en résulte est à l'origine d'effets paradoxalement *dépolarisants du GABA*, rendant compte non pas d'une perte d'inhibition GABAergique mais de son implication active dans les processus épileptiques.

Enfin, nous avons contribué à mettre en évidence le *rôle des hémicanaux Pannexines1*, et de la transmission purinergique dans l'initiation et la maintenance des activités ictales, ouvrant une nouvelle piste thérapeutique chez les patients présentant ces épilepsies pharmaco résistantes.

Mots clés :

Dysplasie Corticale Focale. ASL-MRI. ^{18}F FDGPET. MEA. Ictogénèse. Co transporteurs du chlore. NKCC1. KCC2. GABA. Pannexine 1.

Laboratoire de Rattachement :

INSERM U1129. Hôpital Necker. 149 rue de Sèvres. 75015 Paris.

ABSTRACT:

Focal cortical Dysplasias (FCD) are a frequent etiology of lesional epilepsy, requiring surgical treatment. They are defined by abnormalities of cortical architecture intermixed with the presence of abnormal neuronal or glial cells. Imaging FCD remains challenging, both to detect and map the lesion, and the pathophysiology of the epileptic discharges they produce is incompletely understood.

The aim of this PhD is to improve in vivo FCD mapping in children with perfusion MRI, and to study in vitro their epileptogenicity with human postoperative cortical slices electrophysiological recordings on micro electrode arrays.

First, we showed with *ASL MRI (Arterial Spin Labeling)* a *focal hypoperfusion* in type II FCD, colocalized with ^{18}F FDG-PET hypo metabolism and histological defects. We developed a *statistical analysis* of ASL under SPM integrated in a multimodal approach of FCD with EEG-fMRI and ASL-MRI.

Second, we studied in vitro slices of human postoperative dysplastic cortex. We could record reliable *spontaneous inter ictal discharges*, specific of the histological subtype, showing that tissues retain epileptogenic features. We focused our study on GABAergic signaling and neuronal chloride regulation. We have identified an excessive chloride load in neurons by the co transporter NKCC1 whereas chloride extrusion was deficient because of KCC2 down regulation. The consequent *chloride dysregulation* resulted in paradoxical *GABAergic depolarization*, responsible for a loss of inhibitory processes but also a shift to excitatory effects of GABAergic signals.

Third, we also contributed to a study on Pannexin hemichannels, revealing that *Pannexin1 channels* sustain initiation and maintenance of ictal activity though purinergic neurotransmission in human cortical slices, supporting new anti epileptic targets in human pharmaco resistant epilepsies.

KEY WORDS

Focal Cortical Dysplasia, ASL-MRI. ^{18}F FDGPET, MEA, Ictogenesis, Chloride Co Transporters, NKCC1, KCC2, GABA, Pannexine 1.

LABORATORY

INSERM U1129. Pediatric Epilepsy and Brain Plasticity