

Neuropharmacologie

M. Jacques GLOWINSKI, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Le cours de cette année n'a pas eu lieu.

Séminaires-Symposium

Nouvelles stratégies thérapeutiques dans le système nerveux central
(en collaboration avec Hervé Chneiweiss et le club des cellules gliales)

Introduction par Jacques GLOVINSKI et Hervé CHNEIWEISS

Session 1 : Stratégie de correction locale

Jean-Michel HEARD (Institut Pasteur, Paris) : Traitement de la neurodégénérescence associée aux maladies de surcharge lysosomale.

Patrick AEBISCHER (EPFL, Lausanne) : Approches de thérapie cellulaire et génique pour les maladies du système nerveux.

Pierre POLLAK (Institut des Neurosciences, Grenoble) : La stimulation à haute fréquence aujourd'hui.

Session 2 : Place de la pharmacologie

Christophe LABIE (Sanofi-Synthelabo Recherche) : Modulation de la neurogénèse adulte par des agents pharmacologiques.

Rebecca PRUSS (Trophos, Luminy biotech, Marseille) : Where's the target ? From original cell-based assays to novel therapeutics for neurodegenerative diseases.

Bruno GIROS (Créteil) : Trois approches expérimentales en Santé Mentale.

Session 3 : Stratégies anti-tumorales dans le SNC

Eric HOLLAND (Sloan-Kettering, New York) : *In vivo* models of gliomas.

Antoine CARPENTIER (Hôpital de la Salpêtrière, Paris) : Nouvelles approches thérapeutiques par voie locale dans les glioblastomes.

Didier FRAPPAZ (Centre Léon Bérard, Lyon) : Les radiothérapies des gliomes.

Session 4 : Vers la thérapie cellulaire

Gianvito MARTINO (San Raffaele Scientific Institute, Milan) : Neuroprotection in multiple sclerosis : the role of neural stem cells.

Monique DUBOIS-DALC (Institut Pasteur, Paris) : Progress in designing stem cells for myelin repair.

Karen CHANDROSS (Aventis) : Targeting resident progenitor cells in the human brain for regeneration based therapies.

François LACHAPELLE (Hôpital de la Salpêtrière, Paris) : Autologous engraftment of genetically-modified Schwann cells in an experimental model of demyelination in the adult macaque CNS.

Jacques GLOWINSKI : Conclusions.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE
(INSERM U.114)

1. RELATIONS ENTRE LE CORTEX CÉRÉBRAL
ET LES CIRCUITS NEURONAUX DES GANGLIONS DE LA BASE :
ANALYSE ANATOMO-FONCTIONNELLE

(Responsable de l'équipe : Jean-Michel Deniau)

1.1. INFLUENCE DE L'INNERVATION DOPAMINERGIQUE SUR LES INTERNEURONES
DU CORTEX PRÉFRONTAL CHEZ LE RAT
(Yves Gioanni, Patrick Tierney)

Le cortex préfrontal (CPF) joue un rôle important dans les processus cognitifs tels que la mémoire, la motivation et les émotions. L'innervation dopaminergique issue de l'aire tegmentale ventrale (AVT) régule les fonctions du CPF. De fait, selon des travaux du laboratoire effectués chez le rat, l'activation des afférences dopaminergiques par stimulation électrique de l'AVT ou l'application locale de dopamine induit une inhibition de la décharge spontanée des cellules pyramidales du CPF. Cette inhibition est bloquée dans la moitié des cas par un antagoniste dopaminergique des récepteurs D2 et dans l'autre moitié des cas par l'application d'un antagoniste GABAergique. Ainsi, l'activité des cellules pyramidales semble être inhibée directement par les afférences dopaminergiques ou indirectement par

l'intermédiaire des interneurons corticaux dont le neuromédiateur inhibiteur est le GABA.

Ces données nous ont conduit à étudier l'influence de l'activation de l'AVT sur les interneurons du CPF à l'aide d'enregistrements extracellulaires couplés à l'injection juxtacellulaire de neurobiotine, procédé qui permet de caractériser morphologiquement les neurones enregistrés. Nous avons ainsi montré qu'une population d'interneurons du CPF est excitée à courte latence par la stimulation électrique de l'AVT. Les neurones de l'AVT ont également été stimulés par microinjection locale d'un acide aminé excitateur, le NMDA, afin d'éviter la mise en jeu des réseaux d'interneurons corticaux par la stimulation antidromique des cellules pyramidales du CPF se projetant dans l'AVT. Cette stimulation chimique provoque une excitation des interneurons dans environ deux tiers des cas et une inhibition dans l'autre tiers. L'activation des interneurons est généralement accompagnée d'un changement de leur mode de décharge qui passe d'une activité tonique à une activité en bouffées de potentiels d'action. Une étude micropharmacologique devrait permettre de préciser la nature de ces réponses.

1.2. PROPAGATION DES ACTIVITÉS PAROXYSTIQUES DU TYPE ABSENCE DANS LES CIRCUITS DES GANGLIONS DE LA BASE (Stéphane Charpier, Tamar Paz)

L'épilepsie-absence est une épilepsie généralisée non-convulsive de l'enfant se traduisant essentiellement par une perte transitoire de conscience. Ces crises d'absence se caractérisent au niveau de l'électroencéphalogramme par des décharges de type pointes-ondes (DPO), bilatérales, symétriques et synchronisées dans le néocortex et le thalamus. Comme nous l'avons montré précédemment *in vivo* sur un modèle animal validé de cette épilepsie (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg ou GAERS), ces DPO résultent d'un dysfonctionnement de circuits synaptiques, et des propriétés intrinsèques membranaires des neurones de la boucle thalamo-corticale. Selon certaines données expérimentales et cliniques, les ganglions de la base moduleraient la survenue des DPO, mais les mécanismes impliqués restent inconnus. Nous avons donc entrepris une étude systématique *in vivo* des mécanismes de propagation des activités paroxystiques dans les ganglions de la base chez les GAERS pour déterminer les processus par lesquels ces structures, via leurs circuits de retour vers le cortex cérébral, modulent éventuellement les DPO.

Des enregistrements de l'activité intracellulaire des neurones cortico-striataux et striataux (qui constituent la principale entrée du système des ganglions de la base) ont tout d'abord permis de montrer que les activités rythmiques synchrones dans les neurones corticaux induisent, lors des DPO, une forte activation des interneurons striataux inhibiteurs conduisant à un arrêt de décharge dans les neurones de sortie de striatum. L'activité des neurones du noyau sous-thalamique, un autre système d'entrée des ganglions de la base, a ensuite été caractérisée.

Des enregistrements extracellulaires ont révélé que les cellules sous-thalamiques présentent des « bouffées » de potentiels d'action à haute fréquence en phase avec les DPO corticales. Dans ces conditions, selon des enregistrements intracellulaires, ces neurones présentent des potentiels synaptiques inhibiteurs conduisant, via une dé-inactivation de canaux calciques à bas-seuil, à un rebond d'excitation post-inhibiteur responsable, au moins en partie, des décharges répétées dans les neurones sous-thalamiques. L'origine des inhibitions rythmiques dans le noyau sous-thalamique est en cours d'élucidation.

En conclusion, lors des DPO, les activités paroxystiques dans les neurones sous-thalamiques associées au « silence » des neurones de sortie du striatum, devraient conduire à une forte excitation des neurones de la substance noire réticulée qui, par son action inhibitrice sur les neurones thalamo-corticaux, modulerait l'excitabilité corticale et donc l'expression des DPO.

1.3. ACTIVITÉS INTRACELLULAIRES DES NEURONES STRIATAUX

LORS DES DIFFÉRENTS ÉTATS DE VIGILANCE

(Stéphane Charpier, Séverine Mahon, Tamar Paz ; collaborations : Nicolas Vautrelle et Guy Chauvet, INSERM U512, Lyon)

Les neurones de sortie du striatum intègrent de nombreux potentiels synaptiques excitateurs glutamatergiques issus de multiples projections cortico-striatales convergentes. Par un mécanisme de désinhibition (via une inhibition des neurones GABAergiques de la substance noire réticulée), la décharge des neurones striataux entraîne une forte activation des réseaux pré-moteurs du thalamus et du colliculus supérieur. Ainsi, l'intégration des informations corticales par les neurones striataux constitue un processus clé dans le rôle fonctionnel des ganglions de la base. Selon de nombreux travaux réalisés chez le rat anesthésié à l'uréthane, et/ou par un mélange kétamine-xylazine, l'activité électrique « naturelle » des neurones striataux serait caractérisée par l'alternance de longs plateaux de dépolarisation (états « Hauts »), le plus souvent supraliminaires, et de périodes d'hyperpolarisation soutenue (états « Bas »). Ces observations ayant été obtenues chez l'animal anesthésié, nous avons réalisé des enregistrements intracellulaires des neurones striataux combinés à des enregistrements électroencéphalographiques (EEG) et électromyographiques (EMG), chez l'animal non-anesthésié afin de déterminer l'activité « naturelle » réelle des neurones striataux.

Au cours du sommeil lent, identifié par la présence d'ondes EEG de grande amplitude et survenant avec une fréquence d'environ 2 Hz, les neurones striataux présentent des fluctuations rythmiques du potentiel de membrane s'exprimant par une succession de dépolarisations soutenues, le plus souvent supraliminaires, interrompues par des phases d'hyperpolarisation transitoires. Cette activité intracellulaire est assez proche du profil d'activité de type « Haut-Bas » obtenu chez l'animal anesthésié à l'uréthane ou kétamine/xylazine. Lors des phases d'éveil, l'activité EEG désynchronisée est associée dans les neurones striataux à des

potentiels synaptiques complexes, le plus souvent arythmiques, sculptés par de nombreux évènements synaptiques dépolarisants de faible amplitude et survenant à haute fréquence (de 40 à 100 Hz).

Ces résultats, qui constituent la première description de l'activité intracellulaire des neurones striataux au cours du cycle veille-sommeil, démontrent que ces cellules expriment une grande variété d'activités synaptiques spontanées qui dépendent des divers états de vigilance. Par conséquent, ils conduisent à réévaluer la théorie actuelle suggérant une activité spontanée « unique » dans les neurones striataux.

1.4. ÉTUDE DES INTERACTIONS LOCALES PAR SYNAPSES CHIMIQUES ET ÉLECTRIQUES DANS LES GANGLIONS DE LA BASE CHEZ LE RAT (Marie Vandecasteele, Elodie Fino, Laurent Venance)

Principal noyau d'entrée des ganglions de la base, le striatum joue un rôle clé dans l'organisation de l'activité motrice et l'apprentissage sensori-moteur. Dans le striatum, l'intégration synaptique est soumise à l'influence neuromodulatrice de la dopamine issue des neurones de la substance noire *pars compacta* (SNc), neurones dont la dégénérescence est responsable des troubles moteurs de la maladie de Parkinson. Paradoxalement, la nature et les propriétés des interactions locales (synapses chimiques et électriques) entre les neurones de sortie au sein de chacune de ces deux structures restent méconnues.

Au niveau du striatum, nous avons mis en évidence la présence de synapses fonctionnelles chimiques GABAergiques (19 %) et électriques (27 %) entre les neurones de sortie GABAergiques. Effectués sur des tranches de cerveaux de rats, des enregistrements en double patch-clamp nous ont permis de montrer que la transmission GABAergique est strictement unidirectionnelle et que les transmissions chimiques et électriques sont mutuellement exclusives. Ces résultats suggèrent que les neurones de projection du striatum sont organisés en réseaux préférentiels connectés par des synapses chimiques ou électriques et que ces réseaux assurent une ségrégation de la transmission des informations corticales au sein des ganglions de la base.

Au niveau de la SNc, 96 % des neurones dopaminergiques nigro-striataux sont connectés par des synapses électriques chez des rats âgés de P7-10, cette incidence diminuant à 20 % chez des rats plus âgés (P17-21). Comme dans le striatum, l'analyse de la nature moléculaire de ces synapses électriques suggère l'existence de canaux intercellulaires hétéromériques dont la composition en Connexines (Cx26, 30, 31.1, 32, 36 et 43) est fortement régulée au cours du développement. Fonctionnellement, ces synapses électriques permettent une modulation efficace de la fréquence de décharge spontanée des neurones dopaminergiques de la SNc.

Lorsque la synthèse de dopamine est inhibée par l' α -methyl-para-tyrosine, traitement qui induit un déficit dopaminergique, les propriétés membranaires et

de décharge évoquée des neurones striataux sont fortement modifiées. Ainsi, 75 % des neurones GABAergiques de sortie deviennent hypo-excitables (seuil d'activation de l'ordre de -46 mV au lieu de -54 mV en conditions normales) et 25 % deviennent incapables de générer un potentiel d'action. Si les interneurons à NO-synthase apparaissent insensibles aux changements de niveaux de dopamine, au contraire, les interneurons cholinergiques et GABAergiques deviennent hyper-excitables (seuils d'activation abaissés de 3.5 mV et 4 mV, respectivement).

La caractérisation moléculaire et fonctionnelle des interactions synaptiques locales entre neurones de projection du striatum et de la SNc et leur modulation possible par des neuromodulateurs tels que la dopamine et les endocannabinoïdes offrent de nouvelles perspectives pour l'étude des mécanismes physiopathologiques des ganglions de la base.

1.5. RÉGULATION DE LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE STRIATALE CHEZ LE RAT : RÔLE DE L'ENKÉPHALINE (Marie-Lou Kemel, Maritza Jabourian, Sylvie Pérez)

Précédemment, dans des études *in vitro* nous avons montré que la stimulation des récepteurs NMDA du striatum provoque une libération de l'enképhaline endogène à partir des collatérales récurrentes des neurones Gabaergiques efférents. Par son action sur les récepteurs opioïdes de type mu, l'enképhaline inhibe la libération de l'acétylcholine dans le territoire limbique mais pas dans le territoire sensori-moteur du striatum. Cette régulation est complexe et dépendante du cycle diurne. En effet, l'enképhaline inhibe la libération de l'acétylcholine selon deux modalités, l'une impliquant la dopamine et indépendante du cycle diurne et l'autre, dopamine indépendante et observée uniquement l'après-midi. La régulation indirecte, dopamine dépendante implique des récepteurs mu localisés sur les neurones efférents des striosomes qui contiennent le GABA et la dynorphine. Selon les effets des antagonistes spécifiques des récepteurs GABA A et opioïdes kappa (sensibles à la dynorphine), seul le GABA serait impliqué dans cette régulation.

Processus mis en jeu dans la régulation diurne de la libération de l'acétylcholine par l'enképhaline endogène via les récepteurs mu dans le territoire limbique du striatum.

La poursuite de cette étude a permis de révéler que l'inhibition par l'enképhaline de la libération de l'acétylcholine indépendante de la dopamine et liée au cycle diurne implique des récepteurs opioïdes de type mu localisés sur les interneurons cholinergiques du territoire limbique. En effet, en collaboration avec L. Venance, l'analyse des messagers du récepteur opioïde de type mu et de la choline-acétyl transférase (enzyme de synthèse de l'acétylcholine, spécifique des neurones cholinergiques) en RT-PCR sur cellule unique a permis de montrer

la présence des messagers de ces récepteurs opioïdes dans la population d'interneurones cholinergiques du territoire limbique, mais pas dans celle du territoire sensori-moteur. Ces données confirment des résultats immunohistochimiques obtenus à l'aide d'anticorps de la choline-acétyl transférase et des récepteurs opioïdes mu. Ces récepteurs opioïdes mu sont présents dans 80 % des interneurones cholinergiques l'après-midi, mais seulement dans 30 % d'entre eux le matin (animaux sacrifiés respectivement sept et deux heures après le début de l'éclairage de l'animalerie). Ces interneurones sont majoritairement localisés dans la matrice du territoire limbique. L'analyse en microscopie confocale indique que les récepteurs mu ont une distribution diffuse dans le corps cellulaire des interneurones le matin, mais qu'ils sont agrégés entre le noyau et la membrane, l'après-midi.

Précédemment, avec Sylvie Bourgoïn (U288), nous avons montré que, l'après-midi, la baisse des taux tissulaires de l'enképhaline est associée à une augmentation de la libération spontanée ou évoquée par le NMDA de l'enképhaline dans le territoire limbique. Avec Sylvie Ozon (U440), nous avons révélé que dans ce territoire, les taux des messagers de l'enképhaline sont identiques au cours du cycle diurne. Ainsi, la baisse des taux tissulaires observée l'après-midi, qui n'est pas compensée par une augmentation de synthèse, est en relation directe avec l'augmentation des libérations d'enképhaline observées au même moment.

Rôle de la dopamine dans l'expression et la mise en jeu des récepteurs opioïdes de type mu présents sur les interneurones cholinergiques

Selon des données de la littérature, l'expression des récepteurs opioïdes mu dans les neurones efférents des striosomes est régulée par la dopamine. Il n'en est pas de même de l'expression des récepteurs mu des neurones cholinergiques du territoire limbique comme nous l'avons montré à la suite d'une lésion bilatérale des systèmes dopaminergiques nigro-striés (perte des neurones de la substance noire compacte > 95 %, perte de l'immuno-réactivité à la tyrosine hydroxylase dans le striatum). En effet, les niveaux d'expression de ces récepteurs sont similaires à ceux observés le matin et l'après-midi chez des animaux contrôles. De plus, la β -funaltrexamine (antagoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type mu) induit toujours chez ces animaux lésés une augmentation de la libération de l'acétylcholine évoquée par la stimulation des récepteurs NMDA, cette réponse étant observée uniquement l'après midi et dans le territoire limbique du striatum, ce qui est en accord avec les données obtenues lors de la suppression aiguë de la transmission dopaminergique.

En conclusion, dans le striatum, les interneurones cholinergiques du territoire limbique (mais pas ceux du territoire sensori-moteur) possèdent des récepteurs opioïdes de type mu dont l'expression est indépendante de la dopamine, mais dépend du cycle diurne des animaux. La régulation par l'enképhaline de la libération évoquée de l'acétylcholine observée uniquement l'après-midi résulte à

la fois d'une libération évoquée plus importante de l'enképhaline et de la présence de récepteurs opioïdes mu dans la plupart des interneurons cholinergiques pendant cette période de la journée. Ces régulations pourraient jouer un rôle important dans l'élaboration du message striatal transmis dans le canal limbique aux structures de sortie des ganglions de la base.

2. INTERACTIONS DES VOIES MONOAMINERGIQUES ASCENDANTES : CONSÉQUENCES SUR LES PROCESSUS DE PHARMACO-DÉPENDANCE (Responsable de l'équipe : Jean-Pol Tassin)

2.1. RÔLE DES RÉCEPTEURS α 1b-ADRÉNERGIQUES ET 5-HT2A SUR LA LIBÉRATION DE DOPAMINE INDUITE PAR LES PSYCHOSTIMULANTS ET LES OPIACÉS

Selon plusieurs données de la littérature, les psychostimulants et les opiacés exercent leurs effets locomoteurs et récompensants en facilitant la libération de dopamine au niveau du noyau accumbens. Nous avons cependant montré il y a quelques années, chez le rat, que le blocage des récepteurs α 1b-adrénergiques par un antagoniste spécifique, la prazosine, abolit la facilitation par l'amphétamine de la libération de dopamine fonctionnelle, c'est-à-dire celle responsable de l'apparition de l'hyperactivité locomotrice. Ces résultats ont été ensuite confirmés chez la souris dépourvue de récepteurs α 1b-adrénergiques chez qui l'amphétamine n'induit plus de libération de dopamine.

L'analyse du rôle des récepteurs α 1b-adrénergiques dans la régulation de la libération de dopamine dans le noyau accumbens a été poursuivie en étudiant l'effet d'un opiacé, la morphine. Comme dans le cas de l'amphétamine, la prazosine bloque totalement la facilitation par la morphine de la libération de dopamine chez les souris sauvages. Cependant, la libération de dopamine évoquée par la morphine chez les souris dépourvues de récepteurs α 1b-adrénergiques est identique à celle des animaux sauvages et, en accord avec le fait que ces souris ne possèdent plus de récepteurs α 1b-adrénergiques, insensible à la prazosine. Nous avons envisagé que l'absence des récepteurs α 1b-adrénergiques chez ces souris mutées était compensé par une autre système régulateur. Une analyse comportementale nous a indiqué que l'hyperactivité locomotrice induite par la morphine chez ces souris mutées étaient devenue complètement dépendante de la stimulation des récepteurs 5-HT2A.

De fait, chez le rat, la stimulation des récepteurs 5-HT2A joue également un rôle dans la facilitation de la libération de dopamine induite par l'amphétamine, car le blocage de ces récepteurs par l'antagoniste SR46349B abolit la libération de dopamine fonctionnelle évoquée dans le noyau accumbens par l'amphétamine de façon identique à ce qui est observé lors du blocage des récepteurs α 1b-adrénergiques. Toutefois, comme indiqué par les effets des injections locales de prazosine et de SR46349B, les récepteurs α 1b-adrénergiques mis en jeu sont

localisés dans le cortex préfrontal alors que les sites 5-HT_{2A} se trouvent au niveau de l'aire tegmentale ventrale.

Chez les souris C57Bl6, la libération de dopamine évoquée par la morphine est totalement bloquée lorsque les animaux sont prétraités par le SR46349B. Cet antagoniste 5-HT_{2A} provoque un blocage semblable de la réponse de la morphine chez les souris dépourvues de récepteurs α 1b-adrénérgiques.

Ainsi, chaque antagoniste, α 1b-adrénérgique ou 5-HT_{2A}, induit un blocage total de la libération de dopamine évoquée par l'amphétamine chez le rat et par la morphine chez la souris. De même, l'hyperactivité locomotrice induite par l'amphétamine chez le rat ou par la morphine chez la souris est respectivement bloquée totalement ou à 80 % par chacun des deux antagonistes. Ces résultats suggèrent que les transmissions noradrénérgique et sérotoninergique régulent une voie neuronale commune qui contrôle *in fine* les systèmes dopaminérgiques (Agnès Auclair, Candice Drouin, Susanna Cotecchia, Gérard Blanc).

2.2. INTERACTION ENTRE LES RÉCEPTEURS 5-HT_{2A} ET α 1b-ADRÉNÉRGIQUES

Des souris dépourvues de récepteurs 5-HT_{2A} (données par Laurence Lanfumey, Inserm U.288) ont été utilisées pour rechercher une interaction éventuelle entre les récepteurs 5-HT_{2A} et α 1b-adrénérgiques. Ces souris, croisées afin de les mettre sur un fond génétique homogène de type C57Bl6, présentent une réponse locomotrice à la morphine identique à celles des souris dépourvues de récepteurs α 1b-adrénérgiques. De même, à l'instar des souris α 1b-adrénérgiques dont la réponse locomotrice à la morphine est totalement inhibée par l'antagoniste 5-HT_{2A} (SR46349B), la réponse locomotrice à la morphine des souris dépourvues de récepteurs 5-HT_{2A} est totalement inhibée par un antagoniste α 1b-adrénérgique (prazosine). Cependant, la situation entre ces deux récepteurs n'est pas totalement symétrique puisque l'induction de la sensibilisation à la morphine, qui est totalement inhibée par le SR46349B chez les souris dépourvues de récepteurs α 1b-adrénérgiques n'est pas modifiée par la prazosine chez les souris dépourvues de récepteurs 5-HT_{2A}.

Enfin, l'analyse autoradiographique des récepteurs 5-HT_{2A} dans l'aire tegmentale ventrale et le noyau accumbens des souris dépourvues de récepteurs α 1b-adrénérgique ainsi que l'étude du couplage du récepteur α 1b-adrénérgique au phosphatidylinostol dans le cortex de souris dépourvues de récepteurs 5-HT_{2A} ne nous ont pas encore permis de montrer des différences de densité ou de couplage expliquant les compensations observées chez les souris KO pour les récepteurs 5-HT_{2A} ou α 1b-adrénérgique (Lucas Salomon, Agnès Auclair).

2.3. INTERVENTION DES MONOAMINES OXYDASES DANS LES EFFETS DU TABAC ET DE LA NICOTINE

Le tabac déclenche une forte dépendance chez l'Homme qui dépend en partie de la nicotine. Néanmoins seule, la nicotine ne provoque pas des consommations

compulsives et l'utilisation de patch à la nicotine ne permet que rarement d'interrompre la consommation de tabac chez un fumeur dépendant. Chez le rat ou la souris, la nicotine seule ne provoque qu'une très faible libération de dopamine dans le noyau accumbens, critère considéré pourtant comme essentiel dans le cas des produits qui déclenchent de la dépendance. Enfin, comme nous l'avons montré, contrairement à ce qui est observé avec les psychostimulants et les opiacés, la sensibilisation comportementale induite chez le rat par la nicotine n'est que de courte durée.

Précédemment, en tenant compte des observations cliniques révélant l'existence d'une baisse importante de l'activité des monoamines oxydases chez les fumeurs, nous avons montré chez le rat, que l'administration conjointe de nicotine et d'inhibiteurs des monoamines oxydases (tranylcypromine ou pargyline) provoque une sensibilisation comportementale pendant plus de 90 jours. Selon ces données, les inhibiteurs des monoamines oxydases (IMAOs) présents dans le tabac (harmaline, norharmaline, acétaldéhyde...) pourraient jouer un rôle important dans les effets addictifs du tabac. D'autre part, ces données nous ont aussi permis de comprendre pourquoi la nicotine seule n'induit qu'une faible hyperactivité locomotrice chez le rat et ne déclenche aucune réponse locomotrice chez la souris, contrairement aux autres produits possédant de fortes propriétés addictives tels que les psychostimulants ou les opiacés. En effet, nous avons essayé d'obtenir une réponse locomotrice à la nicotine chez la souris, en l'associant à des IMAOs. L'utilisation de 15 combinaisons d'IMAOs présentant diverses caractéristiques vis-à-vis des deux monoamine oxydases A et B, nous a permis de montrer que la nicotine (1 mg/kg) ne peut provoquer une réponse locomotrice que lorsque les souris sont prétraitées avec des IMAOs irréversibles et bloquant à la fois les MAO A et B. De plus, des expériences complémentaires combinant des administrations de nicotine avec des produits libérant la dopamine (GBR12909), la noradrénaline (l'amphétamine) ou la sérotonine (la para-chloro-amphétamine) nous ont permis de montrer que les IMAOs permettent la réponse à la nicotine essentiellement en facilitant l'augmentation des taux extracellulaires de 5-HT par la nicotine. De plus, des expériences de micro-dialyse effectuées chez les souris prétraitées par un inhibiteur mixte et irréversible des monoamines oxydases ont montré que la nicotine augmente de façon importante les taux extracellulaires de 5-HT dans le noyau accumbens.

Enfin, en collaboration avec le laboratoire du Professeur Changeux, nous avons montré que des souris dépourvues des sous-unités β_2 , α_4 , et α_7 du récepteur nicotinique ne répondaient plus à la nicotine, y compris en présence d'IMAOs. En revanche, les souris dépourvues de la sous-unité α_6 du récepteur nicotinique continuent à répondre à la nicotine en présence d'IMAOs. Ces résultats confirment l'importance des récepteurs $\alpha_4\beta_2$ et α_7 dans les effets comportementaux de la nicotine. Nous avons aussi observé que les souris dépourvues de la sous-unité β_2 sont hyperréactives aux opiacés et aux psychostimulants, ce qui suggère que cette sous-unité, présente dans les interneurons GABAergiques de l'aire

tegmentale ventrale, intervient dans la régulation inhibitrice des neurones dopaminergiques par les interneurons GABAergiques (Anne-Sophie Villégier, Lucas Salomon, Gérard Godeheu, Gérard Blanc).

3. COMMUNICATION JONCTIONNELLE DANS LES RÉSEAUX NEURONAUX ET ASTROCYTAIRES (Responsable de l'équipe : Christian Giaume)

3.1. REDISTRIBUTION DES CONNEXINES ASTROCYTAIRES DANS LE CORTEX CÉRÉBRAL DE SOURIS APRÈS LÉSION EXCITOTOXIQUE À L'ACIDE KAINIQUE (Annette Koulakoff, Pascal Ezan)

Les astrocytes sont particulièrement riches en jonctions communicantes qui sont à l'origine de leur organisation en réseaux de cellules couplées. Ces jonctions sont formées par des connexines (Cx) qui établissent des pores aqueux intercellulaires. La majeure partie des jonctions entre astrocytes est constituée par deux de ces protéines, les Cx30 et Cx43. En utilisant des cultures de neurones et d'astrocytes corticaux de souris embryonnaires, nous avons précédemment montré que les neurones contrôlent l'expression des Cxs astrocytaires. En effet, en présence de neurones, l'expression de la Cx43 est augmentée dans les astrocytes et celle de la Cx30 est induite dans des sous-populations astrocytaires. Lorsque les neurones sont détruits dans les co-cultures, l'expression astrocytaire de ces deux Cxs est réduite, leur niveau d'expression se rapprochant de celui observé dans les astrocytes cultivés seuls.

Nous avons entrepris d'examiner *in vivo* l'incidence de la mort neuronale sur l'expression des Cxs astrocytaires en utilisant des souris adultes lésées par injection unilatérale stéréotaxique d'acide kainique dans le cortex cérébral. La zone lésée dépourvue de neurones, généralement bien circonscrite, a été déterminée immunohistochimiquement par l'absence de Neu-N, un marqueur nucléaire spécifique des neurones. Cette lésion s'accompagne d'une intense astrogliose réactionnelle, caractérisée par l'abondance de GFAP, protéine spécifique du cytosquelette astrocytaire. La zone de gliose s'étend bien au-delà de la région de mort neuronale. Au cœur de la zone lésée, les astrocytes apparaissent hypertrophiés avec des prolongements épais très riches en GFAP. Par contre, à la périphérie, bien que plus riches en GFAP, les astrocytes présentent des prolongements plus fins et arborisés semblables à ceux observés dans du tissu normal. Des doubles immunomarquages GFAP et Cxs ont permis d'observer une redistribution des deux Cxs gliales dans le cortex lésé par rapport à la région contralatérale non lésée. Ainsi, une semaine après la lésion, l'expression des deux Cxs est très diminuée dans les astrocytes hyper-réactifs localisés dans la région dépourvue de neurones mais accrue dans les astrocytes réactifs situés à la périphérie. Après deux et trois semaines, la teneur en Cx30 reste faible au cœur de la zone lésée qui apparaît encerclée par une zone enrichie en Cx30. L'expression de la Cx43 est largement

accrue mais hétérogène, des zones de très forte expression cohabitant avec des îlots de faible expression. Ainsi, selon ces premières données, le processus de gliose réactionnelle provoqué par une lésion excitotoxique s'accompagne d'importantes modifications de l'expression des connexines astrocytaires qui suggèrent l'existence de profondes altérations temporelles et topologiques des communications jonctionnelles astrocytaires.

3.2. INTERACTION ENTRE ASTROCYTES ET CELLULES MICROGLIALES : RÔLE DU TNFALPHA ET DE L'IL-1 BETA DANS LE CONTRÔLE DU COUPLAGE ASTROCYTAIRE

(William Mème, Nicolas Froger, Pascal Ezan, en collaboration avec Charles-Felix Calvo et Edwige Amigou)

A l'aide de co-cultures, nous avons mis en évidence un effet inhibiteur des cellules microgliales sur la communication jonctionnelle et l'expression de la Cx43 dans les astrocytes corticaux de la souris. Cette inhibition dépend de l'état d'activation des microglies puisqu'elle est de 25 % lorsque ces cellules sont au repos et de 75 % lorsqu'elles sont prétraitées avec du LPS (10ng/ml, 24h), traitement qui est sans effet sur le couplage lorsqu'il est appliqué seul sur les astrocytes. Cet effet est reproduit par le milieu conditionné de microglies activées par le LPS ou lorsque les astrocytes et les cellules microgliales en culture ne sont pas directement en contact. Comme l'indiquent des dosages par test Elisa du milieu conditionné de microglies activées, le LPS induit une production de facteurs pro-inflammatoires, notamment du TNF-alpha et de l'IL-1 beta, deux cytokines qui interviennent vraisemblablement dans l'effet inhibiteur des microglies sur le couplage astrocytaires. En effet, l'application simultanée de ces deux cytokines induit une forte inhibition du couplage et de l'expression de la Cx43, mais appliquées seules ces deux cytokines sont sans effet. De plus, l'effet du milieu conditionné est supprimé en présence d'un récepteur soluble du TNF alpha et d'un antagoniste de l'IL-1 beta.

L'inhibition par les microglies du couplage astrocytaire pourrait accroître la mort neuronale car selon certaines données, les astrocytes qui ne communiquent plus sont moins neuroprotecteurs.

3.3. INHIBITION DE LA COMMUNICATION JONCTIONNELLE ASTROCYTAIRE PAR LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE

(Martine Tencé, Jocelyne Cordier)

Lors d'une lésion vasculaire et d'une hémorragie cérébrale, les cellules nerveuses se trouvent en contact avec des médiateurs plaquettaires tels que la sphingosine-1-phosphate (S1P) et l'acide lysophosphatidique (LPA) qui, comme nous l'avons montré précédemment, modifient des fonctions gliales importantes pour la survie neuronale. Ainsi, par exemple, la production microgliale de TNF alpha est inhibée

par le LPA et la communication astrocytaire est inhibée par la SIP. Le mécanisme d'action de la SIP a été recherché sachant que ses récepteurs membranaires astrocytaires sont couplés aux protéines G et que deux cascades de signalisation indépendantes et complémentaires peuvent être impliquées, l'une médiée par l'activation des récepteurs couplés à Gi/o et l'autre par la voie G12/13/Rho/Rho kinase. La Cx43 et/ou ses partenaires moléculaires (protéines d'échafaudage par exemple) pourraient être les cibles moléculaires de ces cascades. Nos recherches se sont orientées sur l'actine et sur plusieurs protéines qui, dans les cellules polarisées, constituent les éléments structuraux d'autres types de jonctions, les « jonctions serrées », car ces protéines sont des cibles potentielles de la kinase activée par Rho. Des marquages par immunofluorescence suivis d'analyses en microscopie confocale, nous ont permis de montrer que deux de ces protéines, l'occludine et ZO-1, sont exprimées dans les astrocytes. Nous tentons actuellement de vérifier que ces protéines sont associées à la Cx43.

3.4. COUPLAGE DIFFUSIONNEL ET EXPRESSION DE CONNEXINES ENTRE ASTROCYTES ÉTUDIÉS DANS LE CORTEX SOMATO-SENSORIEL DE LA SOURIS (Vanessa Houades, Annette Koulakoff, Pascal Ezan).

Nous avons montré que la présence et l'activité synaptique des neurones facilitent la communication jonctionnelle entre les astrocytes ainsi que l'expression des Cxs43 et 30, ce qui suggère que l'activité des réseaux neuronaux contrôle l'étendue de réseaux astrocytaires. Pour vérifier cette hypothèse, les propriétés fonctionnelles et la distribution des connexines astrocytaires ont été étudiées dans le cortex somato-sensoriel de projection des vibrisses de la souris. Cette structure présente la caractéristique d'une compartimentation importante des neurones corticaux de la couche IV, les « barils », qui reçoivent des afférences d'origine thalamique. Chaque baril représente une unité fonctionnelle qui peut être activée indépendamment par la stimulation d'une vibrisse.

L'analyse par immunofluorescence en microscopie confocale de la distribution des connexines dans des tranches de cortex indique que leur expression est compartimentée dès P5 pour la Cx43 et à P15 pour la Cx30 dont l'apparition est plus tardive et que ces distributions sont toujours observée à P40. Les barils sont enrichis en connexines en comparaison de la région des « septa » située entre chaque baril dont l'intensité de marquage est équivalente à celle des autres régions du cortex somato-sensoriel. Le couplage diffusionnel astrocytaire a été étudié à l'aide d'enregistrements en patch-clamp sur les tranches de cortex. Deux populations d'astrocytes correspondent à la classification décrite précédemment dans l'hippocampe ont été observées : des astrocytes « passifs » présentant une relation courant-voltage linéaire et des astrocytes « complexes » présentant des courants voltage-dépendants. L'injection de biocytine a permis de mettre en évidence des réseaux astrocytaires de plus de 50 cellules à P10 dont l'étendue est réduite par le carbenoxolone, un agent découplant des jonctions communicantes.

L'étendue du couplage est plus importante verticalement et l'étendue moyenne du couplage diffusionnel est supérieure à la taille moyenne d'un « baril » déterminé après marquage à la cytochrome oxydase. Ainsi, les réseaux astrocytaires visualisés par l'injection d'un traceur intercellulaire ne se superposent pas avec les compartiments neuronaux des barils. Cependant, compte tenue des interactions fonctionnelles entre astrocytes et neurones, l'existence d'une communication astrocytaire entre barils voisins pourrait contribuer aux relations transversales entre les barils décrits.

*4. ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES NEUROTOXIQUES
ET DES MODIFICATIONS DES PROTÉOMES NEURONAUX
ET ASTROCYTAIRES*

(Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

*4.1. MODIFICATION DE LA CARTE PROTÉIQUE NEURONALE LORS DES PHÉNOMÈNES
NEUROTOXIQUES : RÔLE DES CRMPs (COLLAPSIN-RESPONSE-MEDIATOR-PROTEINS)
(Christian Gauchy, Sylvie Bretin-Trocme)*

Précédemment, nous avons montré (grâce à l'analyse par spectrométrie de masse, MALDI-TOFF en collaboration avec P. Marin UPR CNRS 2580) qu'une exposition transitoire et toxique de NMDA sur des neurones corticaux en culture provoque des modifications de la carte protéique des neurones survivants. Parmi les 500 protéines détectées sur les gels en deux dimensions, des modifications des taux d'expression de 12 protéines ont été observées et 9 de ces protéines appartiennent à une même famille, les CRMPs (Collapsin Response Mediator Proteins, 64 kDa). Une collaboration entreprise avec l'unité INSERM U433 (Neurobiologie Expérimentale et Physiopathologique, Lyon) nous a permis de confirmer et quantifier ces résultats à l'aide d'anticorps spécifiques de chacune des CRMPs. L'action neurotoxique du NMDA induit, dans les neurones survivants, une diminution du taux d'expression des formes majoritaires (62-64 kDa) de CRMP1, 2, 3, et 5 alors que la CRMP4 est fortement augmentée. De plus, les variations des taux de ces protéines sont étroitement liées au processus neurotoxique induit par le NMDA.

Une analyse plus détaillée des résultats obtenus en western blot a permis de mettre en évidence que la baisse des taux de la protéine intacte de 64 Kd était toujours associée à une augmentation de formes plus courtes de 55 kDa également détectées par nos anticorps. Il est finalement apparu que la dégradation des CRMPs provenait de l'action d'une protéase activée par un influx de calcium induit par le NMDA : la calpaïne. En effet, la dégradation des CRMPs dans les neurones survivants est complètement bloquée par un prétraitement des neurones par des inhibiteurs de la calpaïne tels que le MDL28170 ou la calpeptine. Des expériences complémentaires ont également montré que la présence de ces CRMPs courtes est indissociable du processus toxique puisque les neurones

survivants à une première application de NMDA sont à nouveau résistants à une seconde toxicité. D'autre part, l'apparition des formes courtes des CRMPs n'est pas modifiée par la seconde application de NMDA. De surcroît, leur formation est proportionnelle à la concentration de NMDA et à la toxicité qui en résulte. Il semblerait donc que l'apparition de CRMPs « courtes » soit étroitement liée à la résistance des neurones. Des publications récentes nous ont amené à envisager que ces formes de CRMPs clivées étaient à l'origine de la résistance des neurones en régulant la présence du récepteur NMDA à la membrane. En effet, la forme non clivée de CRMP2 en se liant à une protéine spécifique, Numb, empêche l'endocytose de la protéine L1. Nous avons donc envisagé que la présence de CRMP2 clivée provoque l'endocytose du récepteur NMDA réduisant par la même la capacité neurotoxique du NMDA. Des expériences de biotinylation (considérée comme un index de la présence d'une protéine à la membrane) sont en faveur de cette hypothèse puisque les neurones survivants à une application neurotoxique de NMDA présentent une diminution de 50 % du taux de récepteurs NMDA biotinylés.

Afin de valider notre hypothèse, nous mettons au point des méthodes de transfection à l'aide d'un vecteur viral visant à sur-exprimer les formes clivées ou non dégradées de CRMP2 sur des cultures primaires neuronales. Sur ces cellules transfectées, nous souhaitons à la fois déterminer les modifications de sensibilité de cellules exprimant majoritairement une forme de CRMP2 (clivée ou non) vis-à-vis d'une toxicité NMDA et effectuer des corrélations entre la présence du récepteur NMDA à la membrane et la neurotoxicité.

4.2. RÔLE DES MODIFICATIONS DE pH INTRACELLULAIRE ET DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DANS LES INHIBITIONS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE INDUITES PAR LE NMDA DANS LES NEURONES CORTICAUX EN CULTURE PRIMAIRE (M. Maus-Moatti, Y. Torrens, J. Prémont).

Nous avons étudié depuis plusieurs années le rôle de la régulation de la synthèse protéique dans les processus de neurotoxicité (toxicité du NMDA, du zinc ou de H_2O_2). L'inhibition de synthèse protéique dans les neurones par le NMDA a été attribuée à une phosphorylation du facteur d'élongation de la traduction (EF2) par une protéine kinase Ca^{2+} -dépendante (EF2-kinase). L'inhibition de la synthèse protéique par le zinc ou H_2O_2 se situe au niveau de l'étape de préinitiation de la traduction et semble impliquer la phosphorylation du facteur EIF2 α (activation des kinases PKR ou PERK par des agents de stress ou suite à une mobilisation importante des pools intracellulaires de Ca^{2+}). La phosphorylation du facteur EIF2 α entraîne la séquestration du facteur d'échange EIF2B et conduit à des inhibitions très importantes de la synthèse protéique.

Le NMDA (30-200 μM) induit des modifications non seulement de la synthèse globale des protéines dans les neurones, mais également du pH intracellulaire ainsi qu'une forte réduction de la charge énergétique neuronale. Nous avons

donc recherché si l'acidification du cytoplasme des neurones ou le déficit métabolique jouaient un rôle dans l'inhibition de synthèse protéique induite par le NMDA. Un déficit métabolique dans les neurones (utilisation de déoxyglucose, oligomycine et autres inhibiteurs de la chaîne respiratoire mitochondriale) provoque une forte inhibition de la synthèse protéique et une phosphorylation du facteur d'élongation EF-2, sans modification de l'état de phosphorylation du facteur d'initiation EIF2 α . Cependant, les mécanismes impliqués dans les effets du NMDA et d'un déficit métabolique semblent distincts (activation respective d'EF2 kinase par le Ca²⁺ et par l'AMP kinase).

En effet, le NMDA entraîne une forte augmentation du Ca²⁺ libre cytosolique et conduit à l'activation d'EF-2 kinase par la voie Ca²⁺-calmoduline dépendante alors que l'activation de la voie EF-2 kinase par le deoxyglucose n'est pas Ca²⁺-dépendante et semble donc plutôt faire intervenir l'AMP-kinase (kinase dépendante du niveau d'AMP, susceptible de phosphoryler et d'activer EF-2 kinase). De plus, les antagonistes des récepteurs NMDA (MK 801, etc.) n'inhibent pas la phosphorylation d'EF-2 induite par le deoxyglucose. Par ailleurs, la voie métabolique PI3-kinase/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) impliquant la phosphorylation et l'altération du facteur d'initiation EIF4E-BP ne semble pas intervenir dans la régulation de la synthèse protéique par le deoxyglucose, confirmant qu'un déficit métabolique dans les neurones agit au niveau de l'étape d'élongation plutôt qu'à celui de la préinitiation de la traduction des protéines.

4.3. RÔLE DES CELLULES MACROPHAGES AU COURS DE L'INFLAMMATION (Edwige Amigou, Charles-Félix Calvo)

Nous avons pu montrer que l'activation des macrophages cérébraux de souris *in vitro* induit l'expression de cytokine pro-(TNF α) et anti-inflammatoire (IL10) dans des cellules distinctes, suggérant ainsi une hétérogénéité fonctionnelle au sein de cette population. L'expression du TNF α et de l'IL10 en réponse au stimulus inflammatoire LPS est similaire pour la période de développement couvrant le jour embryonnaire E17 au jour 8 postnatal. Ainsi, 9 et 40 % des cellules totales synthétisent exclusivement l'IL10 et le TNF α , respectivement, tandis que 8 % des cellules produisent les deux cytokines en même temps. Pour cette dernière population, des expériences de double marquage sur des cellules en division, ont montré une répartition du TNF α et de l'IL10 à chacun des pôles d'une même cellule, suggérant que les cellules doublement marquées sont amenées à générer des cellules ne produisant qu'une seule cytokine au cours de leur maturation.

L'action du LPS étant dépendante de l'expression spécifique du récepteur TLR4, nous avons entrepris d'étudier les phénotypes sécrétoires des macrophages cérébraux lors d'une stimulation dépendante d'un autre type de récepteur membranaire, comme le TLR2. Cette stimulation réalisée avec le zymosan et le

peptidoglycan, composants de particules de levure et de parois de bactéries Gram positive, respectivement, induit une proportion de phénotypes sécrétoires pour le TNF α et l'IL10 comparable à celle obtenue avec le LPS. Cette approche ne nous a donc pas permis d'expliquer la nature de la population ne produisant aucune des deux cytokines.

Nous avons également identifié dans les macrophages cérébraux, une population de cellules dendritiques qui portent le marqueur CD11c. Un enrichissement de la population cellulaire macrophagique par déplétion des cellules CD11c positives, avant stimulation, n'a pas modifié la fréquence des phénotypes de sécrétion d'IL10 ou de TNF α et indique donc que les cellules dendritiques ne participent pas à l'hétérogénéité observée.

Les voies intracellulaires conduisant à la synthèse de ces cytokines passent par l'activation en cascade de seconds messagers, comprenant les Mitogen Activated Protein Kinases de type P38 et P42/44. Nous avons pu bloquer chacune de ces kinases par un antagoniste sélectif au cours de l'activation des macrophages cérébraux par le LPS. Ainsi, U0126, en agissant sur p42/44 bloque la synthèse de TNF α , sans affecter celle de l'IL10, tandis que SB203580 en bloquant p38, inhibe la production de ces deux cytokines. Par ailleurs, nous avons pu montrer que la prostaglandine E2 abolit la synthèse de TNF α , et augmente celle de l'IL10 dans les sous populations décrites précédemment. Ces résultats indiquent clairement que des macrophages cérébraux distincts synthétisant une cytokine pro- ou anti-inflammatoire peuvent être soumis à une régulation indépendante.

5. NEURO-ONCOLOGIE : APPROCHE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE DU DÉVELOPPEMENT DES GLIOMES

(Responsable de l'équipe : Hervé Chneiweiss (avec Alain Anselmet, Brigitte Canton, Hervé Chneiweiss, Marie-Pierre Junier, Cristina Mondet, François Renault, Ariane Shariff, Jeanne-Marie Studler))

Les tumeurs primaires cérébrales représentent environ 2 % des diagnostics de malignité. L'incidence de la maladie est de 6 à 9 cas pour 100 000, ce qui correspond à environ 3 000 nouveaux cas par an en France. Dans le cas des tumeurs de bas grade, la barrière hémato-encéphalique est respectée et l'espérance de vie du patient supérieure à 10 voire 15 ans selon le type de cellules à l'origine de ces cancers. Puis surviennent les tumeurs de haut grade, dont la forme la plus grave, le glioblastome, est de mauvais pronostic à 1 an. Les mécanismes de cette progression par étape qui nécessitent plusieurs événements successifs mettant en jeu une hyperactivation de cascades de signalisation intracellulaires ne sont actuellement pas connus. Leur compréhension et leur contrôle permettraient d'inhiber le développement de ces tumeurs vers les hauts grades. De plus, un problème majeur qui s'oppose à un traitement curatif des gliomes est la migration à distance de cellules tumorales puisque celles-ci ne peuvent être éliminées par

chirurgie et sont la source des récives. Une amélioration des traitements nécessite de comprendre ce phénomène de migration et de le contrôler.

Les astrocytes qui sont capables de se différencier en progéniteur ou les cellules souches neurales elles-mêmes pourraient être impliquées dans la tumorigénèse. Le TGF α est un facteur de croissance dont la présence est amplifiée dès les étapes précoces de la tumeur. Le premier objectif de nos études est de comprendre les mécanismes par lesquels le TGF α participe à la progression tumorale via son récepteur ErbB1, ou comme le suggèrent des données préliminaires par un nouveau mécanisme de signalisation que nous nous proposons de caractériser.

La protéine PEA-15 est un adaptateur modulant plusieurs voies de communication dans la cellule responsable de la prolifération, la survie et de plus la migration des cellules comme nous l'avons montré récemment. Notre second objectif est de déterminer les mécanismes d'action de PEA-15 et de caractériser des molécules d'intérêt pharmacologique capables d'agir sur la protéine.

Cette double approche devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'évolution de la tumeur, de définir de nouveaux profils permettant un meilleur diagnostic et de trouver des stratégies pour le développement de nouveaux traitements.

5.1. RECHERCHE ET CARACTÉRISATION DE CELLULES SOUCHES TUMORALES

En collaboration avec le Pr Catherine Daumas-Duport et son équipe (Hôpital Ste Anne, Paris) nous avons émis l'hypothèse que des cellules souches neurales interviennent dans les processus de tumorigénèse et que des cellules présentant des caractéristiques de cellules souches tumorales existent au sein des tumeurs. Pour vérifier cette hypothèse nous nous sommes particulièrement intéressés à une nouvelle forme de glioblastomes, les tumeurs glio-neurales malignes (TGNM) (Varlet *et al.*, 2004 sous presse) qui contiennent des cellules exprimant à la fois des marqueurs neuronaux telle que la NF70 et des marqueurs gliaux comme la GFAP. Confirmant l'existence dans ces tumeurs de l'adulte de cellules souches tumorales, nous avons mis en évidence dans une dizaine de tumeurs humaines de type TGNM, des cellules capables de prolifération, d'autorenouvellement et de différenciation selon les conditions de culture.

5.2. DÉVELOPPEMENT DE MODÈLES D'ANALYSES DES GLIOMES *IN VIVO*

Le TGF alpha est l'une des principales molécules dont les processus de régulation sont perturbés dans les gliomes dès les stades les plus précoces. La sur-expression de son récepteur est aussi fréquemment observée dans les tumeurs de haut grade. Selon notre hypothèse, le TGF α participerait à l'initiation de la transformation tumorale en provoquant une régression de l'astrocyte mature vers un type cellulaire moins différencié, la glie radiaire considérée comme une cellule

souche neurale cible de la tumorigénèse. Favorisant cette hypothèse nous avons montré que les astrocytes acquièrent la morphologie et l'expression de certains marqueurs spécifiques de la glie radiaire, une forme de neuroprogéniteurs, lorsqu'ils sont soumis à une exposition prolongée au TGF α . Or les données les plus récentes suggèrent que la transformation d'un astrocyte passe par sa dédifférenciation. Nos résultats suggèrent que le TGF α serait l'un des inducteurs de cette dédifférenciation. Il est cependant nécessaire de poursuivre la caractérisation des propriétés des astrocytes traités au TGF α afin de déterminer si le TGF α induit réellement un changement complet du phénotype cellulaire incluant l'acquisition des propriétés fonctionnelles de la glie radiaire.

Par ailleurs nous avons poursuivi en collaboration avec la société Hybrigenics la caractérisation de nouveaux partenaires intracellulaires de TGF α . Nous avons pu confirmer récemment par surexpression dans différents types cellulaires des interactions observées initialement en double hybride chez la levure. Ceci devrait nous permettre maintenant de décrire une nouvelle voie de régulation de la sécrétion de TGF α .

5.3. POURSUITE DES ÉTUDES DES FONCTIONS DE PEA-15

Nous avons poursuivi l'analyse des fonctions de la protéine PEA-15 que nous avons préalablement identifiée. Il s'agit d'une phosphoprotéine de 15 kDa, PEA-15, enrichie dans les astrocytes normaux, qui agit comme une double-clé contrôlant les cascades menant la cellule vers l'entrée dans le cycle de division ou sa mort par activation du programme d'apoptose. PEA-15 est fortement exprimée dans les tumeurs de bas grade tandis que cette expression disparaît au sein des glioblastomes. Nous avons analysé les conséquences de l'expression de PEA-15 sur la motilité astrocytaire et de cellules gliomales. Nos résultats indiquent que son expression est associée à une inhibition de la migration cellulaire. Il existe des facteurs intrinsèques, les astrocytes n'exprimant pas PEA-15 ayant une motilité accrue, et des facteurs extrinsèques, les tissus cérébraux n'exprimant pas PEA-15 étant plus permissifs à la diffusion de cellules tumorales que les tissus normaux. Les remaniements du cytosquelette sous-jacent à la motilité cellulaire peuvent également être modulés par la signalisation associée au couple EGFR/TGF α . De fait, TGF α stimule la motilité astrocytaire. Ceci nous permet actuellement d'analyser les cascades de signalisation intracellulaires impliquées dans le contrôle de la motilité astrocytaire et celles plus particulièrement modifiées par l'expression de PEA-15.

PUBLICATIONS ORIGINALES

E. DEGENETAIS, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, Y. GIOANNI, *Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study.* (Cerebral Cortex, 13, 782-792, 2003).

M. SHAO, J. HIRSCH, C. GIAUME, K.D. PEUSNER, *Spontaneous synaptic activity is primarily GABAergic in vestibular nucleus neurons of the chick embryo.* (J. Neurophysiol., 90, 1182-1192, 2003).

A. POPRATILOFF, C. GIAUME, K.D. PEUSNER, *Developmental change in expression and subcellular localization of two shaker-related potassium channel proteins (Kv1.1 and Kv1.2) in the chick tangential vestibular nucleus.* (The J. Compar. Neurol., 461, 466-482, 2003).

P. MAILLY, S. CHARPIER, A. MENETREY, J.M. DENIAU, *Three dimensional organization of the recurrent axon collateral network of the substantia nigra pars reticulata in the rat.* (J. Neurosci., 23, 5247-5257, 2003).

S. MAHON, G. CASASSUS, C. MULLE, S. CHARPIER, *Spike-dependent intrinsic plasticity increases firing probability in rat striatal neurons in vivo.* (J. Physiol., 550, 3, 947-959, 2003).

S. BOILLEE, M. PESCHANSKI, M.P. JUNIER, *The wobbler mouse : a neurodegeneration jigsaw puzzle.* (Molecular Neurobiology, 28, 65-106, 2003).

M.L. KEMEL, S. PEREZ, J.C. BEAUJOUAN, M. JABOURIAN, P. SOUBRIE, J. GLOWINSKI, *The new neurokinin 1-sensitive receptor mediates the facilitation of endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine after suppression of dopaminergic transmission in the matrix of the rat striatum.* (J. Neurochem., 2, 487-493 2003).

N. ROUACH, M. SEGAL, A. KOULAKOFF, C. GIAUME, E. AVIGNONE, *Carbenoxolone blockade of neuronal network activity in culture is not mediated by an action on gap junctions.* (J. Physiol., 553, 3, 729-745, 2003).

N. MAURICE, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, J.M. DENIAU, *Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus.* (J. Neurosci., 23 (30), 9929-9936, 2003).

A.S. VILLEGIER, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Transient behavioral sensitization to nicotine becomes long-lasting with monoamine oxidases inhibitors.* (Pharmacol. Biochem. Behav., 76 (2), 267-274, 2003).

L. VENANCE, J. GLOWINSKI, *Heterogeneity of spike frequency adaptation among medium spiny neurones from the rat striatum.* (Neuroscience, 122, 77-92, 2003).

A. KOULAKOFF, W. MÊME, C.F. CALVO, P. EZAN, N. ROUACH, C. GIAUME, *Neurons and brain macrophages regulate connexin expression in cultured astrocytes.* (Cell comm. & adhes. 10, 407-411, 2003).

N. ROUACH, C.F. CALVO, H. DUQUENNOY, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Hydrogen peroxide increases gap junctional communication and induces astrocyte toxicity : regulation by brain macrophage.* (Glia, 45, 28-38, 2004).

M. JABOURIAN, S. BOURGOIN, S. PEREZ, G. GODEHEU, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Opioid control of the n-methyl-d-aspartate-evoked release of (3H) acetylcholine in the limbic territory of the rat striatum in vitro : diurnal variations and implication of a dopamine link.* (Neuroscience, 123, 733-742, 2004).

F. BLOMSTRAND, L. VENANCE, A.L. SIREN, P. EZAN, E. HANS, J. GLOWINSKI, H. EHRENREICH, C. GIAUME, *Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices*. (Europ. J. Neuroscience, 19, 1005-1015, 2004).

D. ZVALOVA, J. CORDIER, M. MESNIL, M.P. JUNIER, H. CHNEIWEISS, *P38/SAPK2 controls gap junction closure in astrocytes*. (Glia, 46, 323-333, 2004).

W. MÊME, P. EZAN, L. VENANCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *ATP-induced inhibition of gap junctional communication is enhanced by interleukin-1 β treatment in cultured astrocytes*. (Neuroscience, 126, 95-104, 2004).

A. POPRATILOFF, Y.X. WANG, J. NARVID, R.S. PETRALIA, C. GIAUME, K. PEUSNER, *AMPA receptor subunit expression in chick vestibular nucleus neurons*. (Neuroscience, 76, 662-677, 2004).

P.L. TIERNEY, E. DEGENETAIS, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, Y. GIOANNI, *Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex*. (Europ. J. Neuroscience, 20, 514-524, 2004).

A. SHARIF, F. RENAULT, F. BEUVON, R. CASTELLANOS, B. CANTON, L. BARBEITO, M.P. JUNIER, H. CHNEIWEISS, *The expression of PEA-15 (phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa) defines subpopulations of astrocytes and neurons throughout the adult mouse brain*. (Neuroscience, 126, 263-275, 2004).

REVUES GÉNÉRALES

H. CHNEIWEISS, *Chroniques bio-éthiques (5) : Sur les rivages de la misère. Épisode 1 : le marché des médicaments essentiels*. (Médecine Sciences, 19, n° 892-894, 2003).

H. CHNEIWEISS, *Je me souviens de la révision des lois de bioéthique*. (Sciences, Editorial, 19, 11, 143-144, 2003).

H. CHNEIWEISS, J.Y. NAU, *Bioéthique Avis de tempêtes ; les nouveaux enjeux de la maîtrise du vivant*. (Éditions ALTVIK, 2003).

F. RENAULT, E. FORMSTECHE, I. CALLEBAUT, M.P. JUNIER, H. CHNEIWEISS, *The multifunctional protein PEA-15 is involved in the control of apoptosis and cell cycle in astrocytes*. (Biochem. Pharmacology, 66, 1581-1588, 2003).

L. VENANCE, R. MALDONADO, O. MANZONI, *Le système endocannabinoïde central*. (Médecine Sciences, 20, n° 1, 1-9, 2004).

H. CHNEIWEISS, *Éthique et développement de l'innovation*. (Biofutur, 240, 29-34, 2004).

H. CHNEIWEISS, *De l'innovation en matière de médicaments à la thérapeutique : Nouvelle donne éthique*. (Médecine Sciences, 20, n° 3, 259-260, 2004).

H. CHNEIWEISS, *La révision des lois de bioéthique : une assemblée peut en cacher une autre*. (Médecine Sciences, 20, n° 3, 374-376, 2004).

C. GIAUME, W. MÊME, A. KOULAKOFF, *Astrocyte gap junctions and glutamate-induced neurotoxicity*. (In : « Glial neuronal signaling » eds. Purpura V. & Hatton G. eds., Kluwer Acad. Pub. Norwell, chap.13, p. 323-348, 2004).

N. ROUACH, A. KOULAKOFF, C. GIAUME, *Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks*. (Neurochem. Intern., 45, 265-272, 2004).

J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, M. SAFFROY, M.L. KEMEL, J. GLOWINSKI, *A 25 year adventure in the field of tachykinins*. (In : Peptides, 25, 339-357, 2004).

Différents chercheurs du laboratoire ont présenté leurs travaux dans les congrès suivants :

A. KOULAKOFF, W. MÊME, C.F. CALVO, P. EZAN, N. ROUACH, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Neurons and brain macrophages regulate connexin expression and gap junctional communication in cultured cortical astrocytes*. International gap junction conference, Cambridge, août 2003.

M. VANDECASTEELE, J. GLOWINSKI, L. VENANCE, *Synapses électriques entre les neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta chez le rat : caractéristiques électrophysiologiques et moléculaires*. « Imagerie en neurobiologie » Roscoff, 17-21/09/03.

L. VENANCE, T. HOFER, W. MÊME, M. VANDECASTEELE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Anandamide controls gap junction permeability and propagation of intercellular calcium waves in astrocytic network*. Euroglia meeting, Berlin, 6-9 sept. 2003.

A. KOULAKOFF, P. EZAN, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Astrocyte, connexin, neuron-glia interactions, gap junction*. 33rd Annual Meeting Sty Neuroscience, New Orleans, USA, 8-12 nov. 2003.

L. VENANCE, M. VANDECASTEELE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Striatal output neurons are connected through electrical and unidirectional chemical synapses in rat brain slices*. 33rd Annual Meeting Sty Neuroscience, New Orleans, USA, 8-12 nov. 2003.

N. MAURICE, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, J.M. DENIAU, *Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high frequency stimulation of the subthalamic nucleus*. 33rd Annual Meeting Sty Neuroscience, New Orleans, USA, 8-12 nov. 2003.

A. SHARIF, F. RENAULT, F. BEUVON, B. CANTON, M.P. JUNIER, H. CHNEIWEISS, *Cellular expression and localization of the antiapoptotic and anti-proliferative molecule PEA-15 in the mouse adult brain*. 33rd Annual Meeting Sty Neuroscience, New Orleans, USA, 8-12 nov. 2003.

M. JABOURIAN, S. BOURGOIN, S. PEREZ, G. GODEHEU, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Mu opioid control of the NMDA-evoked release of acetylcholine in limbic territory of the rat striatum : diurnal variations and implication of a dopa-*

mine link. 33rd Annual Meeting Sty Neuroscience, New Orleans, USA, 8-12 nov. 2003.

A.S. VILLEGIER, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, Behavioral sensitization to nicotine is transient but becomes long-lasting in presence of monoamine oxidases inhibitors. 33rd Annual Meeting Sty Neuroscience, New Orleans, USA, 8-12 nov. 2003.

J.T. PAZ, S.J. SLAGHT, S. MAHON, M. CHAVEZ, J.M. DENIAU, S. CHARPIER, Ganglions de la base et épilepsie-absence : apport des enregistrements intracellulaires. CGBC, Bordeaux, 3-4/02/04.

K.D. PEUSNER, M. SHAO, A. POPRATILOFF, J.C. HIRSCH, C. GIAUME, Development of firing pattern in chick vestibular nucleus neurons. XIII^e meeting Barany society, Paris, 2-9/07/04.

A. SHARIF, V. PREVOT, F. RENAULT, B. CANTON, H. CHNEIWEISS, J.P. JUNIER, Transforming growth factor alpha : a gliatrophin or astrocytes ? FENS forum, Lisbonne, 10-15/07/04.

M. TENCE, J. CORDIER, Y. CHALAL, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, Sphingosine-1-phosphate induces actin cytoskeleton remodeling and inhibits gap junctional communication in mouse astrocytes : a critical role of Rho GTPase. FENS forum, Lisbonne, 10-15/07/04.

LISTE DES DIPLÔMÉS — 2003-2004

JUNIER Marie-Pierre
HDR (12 mai 2003).

CHARPIER Stéphane
HDR (23 mai 2003).

PAZ Tamar-Jeanne (sous la direction de S. Charpier)

Activité électrophysiologique *in vivo* des neurones du noyau sous-thalamique durant les décharges « pointe-onde » dans un modèle génétique d'épilepsie de type « absence ».

DEA de Neurosciences, Université Pierre et Marie Curie, juillet 2003.

DEGENETAIS Eric

Caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques des neurones du cortex préfrontal et influence synaptique de l'hippocampe sur ces neurones chez le rat *in vivo*.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris Sud Orsay, soutenue le 15 septembre 2003.

ADHUMEAU-AUCLAIR Agnès

Rôle des interactions monoaminergiques dans la libération de dopamine et les réponses comportementales induites par les psychostimulants et les opiacés.

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, soutenue le 29 octobre 2003.

VILLEGIER Anne-Sophie

Implication des systèmes monoaminergiques dans les réponses comportementales induites par la nicotine et les stimulants dopaminergiques.

Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, soutenue le 2 mars 2004.