

Neuropharmacologie

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

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

Séminaires-Symposium

Aspects dynamiques des interactions neurone-glie
Dynamic aspects of neuroglial interactions
(en collaboration avec Christian Giaume et la Société des Neurosciences)

Introduction par Jacques GLOWINSKI et Christian GIAUME

Session 1 : Propriétés astrocytaires et interactions neurone-glie

PFRIEGER F. (CNRS, Strasbourg) : Rôle des cellules gliales dans le développement des synapses.

MARIN P. (INSERM, Montpellier) : Le « secrétome » astrocytaire : rôle potentiel dans la transmission synaptique et la survie neuronale.

BELLAMY T. & OGDEN D. (National Institute for Medical Research, London) : Short term and long term changes of Bergmann glial cell responses to repetitive parallel fiber stimulation.

VERKHARTSKY A. (University of Manchester) : Neuroglial communications : role of electrical and chemical synapses.

Session 2 : Interactions neurone-glie et réponses neuronales

DIETMER J. (University of Kaiserslautern) : Synaptic activation in the rat cerebellum as modulated by glia and purinergic receptors.

OLIET S. (INSERM, Bordeaux) : Modulation des récepteurs NMDA par les astrocytes.

TROUSLARD J. (CNRS, Strasbourg) : Transporteur glial de la glycine et intégration synaptique dans la lamina X de la moelle épinière.

Session 3 : Mécanismes astrocytaires de libération

OHEIM M. (INSERM, ESPCI, Paris) : Imagerie de l'exocytose à partir des astrocytes en culture à l'échelle univésiculaire.

MOTHET J.-P. (CNRS, Gif) : Trafic intracellulaire, mécanismes de libération et fonction de la D-sérine dans le couplage glie-neurone.

DERMIETZEL R. (University of Bochum) : Connexin hemichannels in astrocytes.

MATTEOLI M. (CNR, Milan) : Different secretory pathways in astrocytes.

Session 4 : Aspects fonctionnels des interactions neurone-glie

ANGULO M.C. (INSERM, ESPCI, Paris) : Interactions neurone-glie dans la régulation de l'activité neuronale et la microcirculation corticale.

MOLLARD P. (INSERM, Montpellier) : Que sait-on des cellules gliales hors du système nerveux central ?

KIRCHHOFF F. (Max Planck, Gottingen) : Transgenic animals as tools to study neuroglial interaction.

RÉSUMÉ DU COLLOQUE

Ce colloque était consacré à l'exposé d'études récentes sur les interactions entre les cellules gliales et les neurones. Par des approches électrophysiologiques, biochimiques et d'imagerie, ces travaux ont contribué à démontrer que les astrocytes interagissent de manière active sur la transmission synaptique, une des thématiques émergentes en neurobiologie. Cette réunion a été également l'occasion de rendre hommage au Dr H.-M. Gerschenfeld, disparu au mois de juillet 2004, qui a été l'un des pionniers dans l'étude de la « Neuroglie » par ses travaux dans les années 60.

Les intervenants (8 français et 6 européens) ont effectué des avancées significatives dans leur discipline en montrant que l'activation des astrocytes modifie certaines propriétés neuronales et en détaillant certains des mécanismes contribuant à cette nouvelle modalité d'interaction cellulaire dans le cerveau.

Le programme comprenait quatre sessions portant sur les propriétés astrocytaires et les interactions neurone-glie, les interactions neurone-glie et les réponses neuronales, les mécanismes astrocytaires de libération, et finalement les aspects fonctionnels des interactions neurone-glie.

Ces dernières années, des données se sont accumulées pour démontrer que les astrocytes favorisent la synaptogénèse (F. Pfrieger, Strasbourg) et jouent un rôle important dans la survie neuronale (P. Marin, Montpellier).

Les interactions entre neurones et astrocytes s'effectuent par des connexions directes impliquant des jonctions communicantes (A. Verkhratsky, Manchester), et par l'intermédiaire de l'ATP qui agit sur des récepteurs purinergiques (J. Dietmer,

Kaiserslautern) ou les transporteurs du glutamate (S. Oliet, Bordeaux) et de la glycine (J. Trouslard, Strasbourg).

Une question essentielle concerne les mécanismes de libération par lesquels les astrocytes agissent sur l'activité neuronale. Actuellement deux voies ont été identifiées : une libération vésiculaire (M. Oheim, Paris ; M. Matteoli, Milan) ou par des hémi-canaux composés de connexines (R. Dermietzel, Bochum). Ces processus concernent principalement la libération de glutamate et d'ATP, mais interviendraient également dans la libération de D-serine (J.-P. Mothet).

Ces relations étroites mettant en jeu des partenaires gliaux sont sans doute plus diverses ; elles pourraient en effet être impliquées lors de la sécrétion d'hormones hypophysaires (P. Mollard, Montpellier) et dans le contrôle du débit sanguin (M.-C. Angulo). Enfin, nous disposons d'animaux transgéniques et de techniques d'imagerie qui permettent de suivre en temps réel la dynamique des changements morphologiques et le déplacement de différents types de cellules gliales (F. Kirchhoff, Göttingen).

Incontestablement, ces diverses données démontrent le rôle actif des astrocytes dans le contrôle de l'activité des neurones et dans les prochaines années un nombre croissant de neurobiologistes intégreront les partenaires gliaux dans leurs analyses sur le fonctionnement les propriétés de régulation et de plasticité des réseaux neuronaux.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE
(INSERM U.114)

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

1.1. RÔLES DES RÉCEPTEURS $\alpha 1$ B-ADRÉNERGIQUES ET SÉROTONINERGQUES 5-HT_{2A}
DANS LES EFFETS DES PSYCHOSTIMULANTS ET DES OPIACÉS

Il est généralement admis que les psychostimulants et les opiacés exercent leurs effets locomoteurs et favorisent les processus de récompense en facilitant la libération de dopamine dans le noyau accumbens. Lorsque les injections de ces substances psychoactives sont répétées, les effets locomoteurs qu'elles induisent pour une même dose augmentent régulièrement. Ce phénomène qui correspond à une « sensibilisation comportementale » reproduit certains aspects de la pharmacodépendance chez l'Homme. Il persiste plusieurs mois après le sevrage et son expression est facilitée par l'environnement associé au produit. Malgré des résultats inconstants, la « sensibilisation comportementale » a aussi été associée à

une augmentation de réactivité du système dopaminergique mésolimbique qui innerve le noyau accumbens.

Comme nous l'avons montré chez la souris, les effets comportementaux et biochimiques des psychostimulants et des opiacés (réponse locomotrice, libération de dopamine, induction et expression de la sensibilisation comportementale) sont complètement abolis par l'injection simultanée de la prazosine, un antagoniste des récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques, et du SR46349B, un antagoniste des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{2A}.

L'analyse comportementale et biochimique de souris « knock-out » privées de l'un ou l'autre de ces récepteurs confirme que les animaux qui ne possèdent plus de récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques ($\alpha 1b$ -AR KO) ou de récepteurs 5-HT_{2A} (5-HT_{2A}-AR KO) ne répondent plus aux psychostimulants et aux opiacés lorsqu'ils sont respectivement traités par le SR46349B ou la prazosine. Deux composantes régulatrices interviennent donc dans la réponse locomotrice aux drogues toxico-manogènes, une réponse $\alpha 1b$ -adrénergique (bloquée par la prazosine) et une réponse sérotoninergique (bloquée par le SR46349B).

L'étude de ces réponses chez ces souris mutées et leur comparaison avec celles des souris sauvages indique que la réponse sérotoninergique est augmentée chez les souris $\alpha 1b$ -AR KO et que la réponse $\alpha 1b$ -adrénergique est augmentée chez les souris 5-HT_{2A}-AR KO. Ces compensations mutuelles suggèrent l'existence d'une interaction étroite entre les transmissions mettant en jeu ces deux types de récepteurs.

De plus, les deux composantes régulatrices de la réponse locomotrice sont plus qu'additives (160 %) chez les souris sauvages naïves, mais uniquement additives (100 %) chez des souris sensibilisées. Cela suggère que la « sensibilisation comportementale » s'accompagne d'une modification de l'interaction entre les transmissions $\alpha 1b$ -adrénergique et sérotoninergique 5-HT_{2A}. Selon une analyse autoradiographique, les densités des récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques ou sérotoninergiques 5-HT_{2A} ne sont pas modifiées chez les souris 5-HT_{2A}-R KO et les souris $\alpha 1b$ -AR KO, respectivement. Toutefois, l'effet facilitateur de l'amphétamine sur la libération de noradrénaline dans le cortex cérébral est plus important chez les souris 5-HT_{2A}-R KO. Cette dernière observation suggère que la sérotonine via les récepteurs 5-HT_{2A} exerce un contrôle inhibiteur sur la réactivité des neurones noradrénergiques, ces animaux présentant également une réponse comportementale supérieure à celle des animaux sauvages lors d'un traitement aigu par l'amphétamine.

Selon ces données, la « sensibilisation comportementale » résulterait de l'apparition progressive d'un découplage du contrôle réciproque des transmissions $\alpha 1b$ -adrénergiques et 5-HT_{2A} lors de l'activation répétée par les produits toxico-manogènes. L'intervention de ce type de mécanisme dans certaines pathologies, telles que les troubles bipolaires ne peut être exclue (Lucas Salomon, Christophe Lanteri, Agnès Auclair).

1.2. INTERVENTION DES MONOAMINES OXYDASES DANS LES EFFETS DU TABAC, ACTION SUR L'EFFET SÉROTONINERGIQUE DE LA NICOTINE

Le tabac est un produit réputé pour la forte dépendance qu'il déclenche chez l'Homme et cette réponse est généralement attribuée à la nicotine qu'il contient. Mais, la nicotine seule ne conduit pas à des consommations compulsives et l'utilisation de « patchs » 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 n'entraîne que de très faibles libérations de dopamine dans le noyau accumbens, un critère qui est pourtant considéré comme essentiel pour tous les produits qui déclenchent de la dépendance. Enfin, nous avons aussi montré que la « sensibilisation comportementale » induite chez le rat par la nicotine n'est que de courte durée, contrairement à ce qui est observé avec les psychostimulants et les opiacés.

La fumée de tabac contient des substances inhibitrices des monoamines oxydases (IMAOs) ce qui nous a conduit à rechercher si les IMAOs n'avaient pas la capacité de rendre les animaux sensibles à la nicotine. Effectivement, les IMAOs irréversibles et mixtes (MAO A et B), en particulier la tranlycypromine, provoquent une hyperactivité locomotrice chez la souris traitées par la nicotine et augmentent de façon très importante l'auto-administration de nicotine. Confirmant l'intervention de récepteurs nicotiniques, l'effet de la nicotine sur la réponse locomotrice des souris est supprimé chez des animaux dépourvus de la sous-unité bêta2 du récepteur nicotinique.

Nous avons aussi montré dans des expériences combinant la nicotine avec des produits libérant la dopamine (le GBR12783), la noradrénaline (la D-amphétamine) ou la sérotonine (la para-chloro-amphétamine), que les IMAOs exercent essentiellement leur effet sur la réponse nicotinique en facilitant l'augmentation des taux extracellulaires de 5-HT évoquée par la nicotine. Ceci a été confirmé chez des animaux prétraités par la tranlycypromine puisque dans ces conditions la nicotine augmente les taux extracellulaires de sérotonine dans le noyau accumbens. Par contre la nicotine est sans effet sur les animaux qui n'ont pas été prétraités par l'IMAO ou chez des animaux prétraités mais dépourvus de la sous-unité bêta2 du récepteur nicotinique (Anne-Sophie Villégier, Lucas Salomon, Gérard Godeheu, Gérard Blanc).

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

2.1. INCIDENCE DE LA MORT NEURONALE *IN VIVO* SUR L'EXPRESSION DES CONNEXINES ASTROCYTAIRES (Annette Koulakoff, Pascal Ezan)

L'impact de la mort neuronale sur la distribution des connexines (Cxs) astrocytaires a été étudié *in vivo* dans le cortex cérébral de souris adultes lésées par

injection stéréotaxique unilatérale d'acide kaïnique. Cette injection provoque une mort neuronale rapide et localisée qui s'accompagne d'une importante gliose réactive qui s'étend dans une large zone du cortex injecté sans affecter le cortex contralatéral. Cette gliose implique des modifications phénotypiques des astrocytes ainsi que l'activation des cellules microgliales.

L'expression des deux Cxs astrocytaires (Cx30 et Cx43) est largement perturbée dans le cortex lésé. Des doubles marquages immunohistochimiques autorisant la visualisation des Cxs dans les astrocytes réactifs identifiés par leur forte teneur en GFAP ont permis de distinguer trois zones une semaine après la lésion : i) une zone centrale dépourvue de neurones où les astrocytes hypertrophiés sont hyper-réactifs et caractérisés par une très faible expression des deux Cxs ; ii) cette zone est entourée par des astrocytes réactifs de morphologie étoilée dans laquelle l'expression des deux Cxs est accrue ; enfin, iii) une région périphérique caractérisée par la présence d'astrocytes dont la morphologie est « normale », la GFAP est fortement exprimée et l'expression des deux Cxs est comparable à celle du cortex non lésé.

La réaction inflammatoire qui se développe dans les phases initiales post-lésionnelles contribue vraisemblablement aux remaniements observés car la communication jonctionnelle et l'expression de la Cx43 sont diminuées dans des astrocytes co-cultivés avec des microglies activées ou soumises à des traitements pro-inflammatoires. De plus, l'analyse de la distribution des cellules microgliales visualisées à l'aide de l'isolectine B4 fluorescente indique un recouvrement des zones de microgliose et d'astrogliose qui s'étendent bien au-delà du cœur de la zone lésée.

La mort neuronale semble donc être en grande partie responsable de la forte diminution d'expression des Cxs astrocytaires au centre de la lésion. Un test fonctionnel chez l'animal anesthésié basé sur la mesure de la diffusion via les jonctions communicantes à l'aide d'un colorant (sulforhodamine 101) déposé à la surface du cortex et sélectivement capturé par les astrocytes sera utilisé pour étayer cette conclusion.

2.2. SUPPRESSION DE L'INHIBITION MICROGLIALE SUR LE COUPLAGE ASTROCYTAIRE PAR L'ACTIVATION DES RÉCEPTEURS AUX GLUCOCORTICOÏDES ET AUX CANNABINOÏDES (Nicolas Froger, Pascal Ezan en collaboration avec Charles-Félix Calvo et Edwige Amigou)

La présence d'une forte inflammation est associée à une astrogliose réactive au cours de lésions et de maladies neurodégénératives. Cela nous a conduit à nous intéresser à la régulation des jonctions communicantes des astrocytes dans des modèles d'inflammation. Nous avons donc étudié les effets de la stimulation de cellules microgliales, mimant une réaction inflammatoire, sur la régulation des jonctions communicantes des astrocytes (couplage astrocytaire) en utilisant différents modèles de cultures de cellules (astrocytes, neurones ou microglies) et

de co-cultures (astrocytes/microglies, astrocytes/neurones). La stimulation des cellules microgliales avec du LPS, sur des co-cultures spontanées astrocytes/microglies, provoque une diminution importante du couplage astrocytaire et de l'expression de la Cx43. La communication astrocytaire est également bloquée en stimulant, de la même façon, des cellules microgliales isolées puis ajoutées sur des cultures d'astrocytes ainsi que par le milieu conditionné de microglies activées par le LPS. Enfin, cet effet inhibiteur est reproduit par la co-application directe sur des astrocytes de deux cytokines pro-inflammatoires produites par les microglies activées, le TNF- α et l'IL-1 β . Dans ces trois modèles, un prétraitement des microglies et/ou des astrocytes avec des agonistes des récepteurs des glucocorticoïdes ou des cannabinoïdes réduit l'effet inhibiteur de la stimulation microgliale, comme celui de la co-application des deux cytokines pro-inflammatoires. Selon ces observations, la suppression de la « mise en silence » du couplage astrocytaire par les cellules microgliales activées peut-être réalisée par ces deux familles de composés connues pour leur action anti-inflammatoire. Cette étude a été faite en analysant les contributions respectives des deux types de cellules gliales dans le contrôle de la communication jonctionnelle astrocytaire et les effets de la stimulation des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux cannabinoïdes.

2.3. MÉCANISMES DE RÉGULATION DE LA COMMUNICATION ASTROCYTAIRE (Martine Tencé, Jocelyne Cordier, Pascal Ezan)

La communication jonctionnelle des astrocytes et son inhibition dans diverses situations pathologiques résultent de phénomènes complexes de régulation portant sur les connexines elles-mêmes, mais probablement aussi sur des protéines qui leur sont associées. Parmi celles-ci, l'actine et les protéines constituantes des « jonctions serrées » joueraient le rôle de partenaires privilégiés d'échafaudage et/ou de signalisation. Nous avons souhaité répondre aux questions suivantes : i) la fermeture des canaux formant les jonctions communicantes est-elle corrélée à une modification de la Cx43 ; ii) quelles sont les partenaires potentiels de la Cx43 dans les astrocytes, et iii) quelles sont leurs relations spatiales avec les jonctions communicantes et comment sont-elles modifiées dans différentes situations physiopathologiques. Nous avons utilisé des cultures primaires d'astrocytes de souris et trois types d'approches techniques : i) des marquages immunocytochimiques suivis d'une étude en microscopie confocale des différents partenaires de la Cx43 ; ii) une analyse en Western blots de son état de phosphorylation et, iii) une étude de la fonctionnalité des canaux jonctionnels.

Par des expériences de double ou triple marquage, nous avons mis en évidence la présence de l'occludine, de la claudine et de ZO-1 dans les cultures d'astrocytes. Lorsque les cellules sont quiescentes, ces protéines sont polymérisées et se présentent sous forme d'anneaux ancrés dans, ou sous, la membrane plasmique, et sont co-localisés avec les fibres sous-corticales d'actine sur lesquels sont disposés les canaux jonctionnels. Sous l'effet de la sphingosine-1-phosphate (S1P), un

inhibiteur de la communication intercellulaire, les anneaux d'actine et de ZO-1 disparaissent et sont remplacés pour les uns par des fibres de stress, et par une dispersion non structurée des deux autres protéines au sein de la cellule. Par contre, l'occludine et la claudine semblent inchangées. En parallèle, la Cx43 est maintenue à la membrane, mais elle subit une déphosphorylation. Cette déphosphorylation de la Cx43 résulte de l'activation, par la SIP, de deux voies de signalisation intracellulaires, l'une médiée par des récepteurs couplés à Gi et l'autre par des récepteurs couplés à la cascade G12/Rho GTPase/Rho kinase. Actuellement nos recherches visent à : comprendre les mécanismes intracellulaires impliqués dans déphosphorylation de la Cx43, identifier les cibles moléculaires de Gi et de Rho-kinase et déterminer si d'autres substances découplantes des jonctions communicantes utilisent les mêmes mécanismes moléculaires que la SIP.

2.4. EXPRESSION DES CONNEXINES ET COMMUNICATION JONCTIONNELLE ASTROCYTAIRES DANS LE CORTEX SOMATOSENSORIEL DE LA SOURIS

(Vanessa Houades, Nathalie Rouach, Annette Koulakoff et Pascal Ezan)

Nous avons montré à l'aide de modèles de co-culture que la présence et l'activité des neurones favorisent l'expression des deux principales Cxs astrocytaires (Cx43, Cx30) ainsi que la communication jonctionnelle au sein du réseau astrocytaire. Ainsi, l'activité de réseaux neuronaux pourrait contrôler l'étendue de ce réseau astrocytaire. Pour tester cette hypothèse dans un modèle plus intégré, la distribution de ces deux Cx ainsi que la diffusion intercellulaire de biocytine (index de la mesure du niveau de communication) ont été étudiées dans le cortex somatosensoriel primaire car dans cette structure, les neurones de la couche 4 sont anatomiquement et fonctionnellement compartimentalisés.

Dans cette région où les compartiments neuronaux sont organisés en « barils », aucune compartimentation astrocytaire n'a été observée sur des tranches de souris eGFP-GFAP. Par contre, à partir du 10^e jour post-natal (P10) pour la Cx43, et P15 pour la Cx30, l'expression de ces deux Cxs est enrichie dans les barils par rapport aux septa et aux autres régions du cortex. La diffusion intercellulaire de biocytine a également été étudiée dans des tranches coronales de souris P5-P20 dans lesquelles les barils sont visibles en lumière blanche et contraste interférentiel. La fonctionnalité des jonctions communicantes a été étudiée en dialysant un astrocyte, identifiée par ses propriétés électrophysiologiques avec une pipette de patch remplie de biocytine. Un large couplage intercellulaire peut ainsi être observé et son étendue est réduite en présence de carbenoxolone, un inhibiteur des jonctions communicantes. La forme de ce couplage a été analysée en mesurant deux paramètres correspondant à l'étendue du couplage parallèlement (x) ou perpendiculairement (y) à la surface du cortex. Alors que le rapport x/y est de 1.01 (n = 11) dans la couche 4 des autres régions corticales, révélant un couplage circulaire, il est réduit à 0.81 dans les barils, indiquant une restriction

transversale de la communication jonctionnelle dans cette région. Ces données suggèrent que la diffusion intercellulaire au sein du réseau astrocytaire dans le cortex somato-sensoriel primaire est modélisée par la compartimentation de l'expression des Cxs. L'étendue de ce réseau de cellules couplées dépassant largement la taille d'un baril, l'existence d'interactions neuro-gliales dynamiques pourrait rendre compte d'une possible contribution du réseau astrocytaire dans la communication entre barils adjacents.

3. ANALYSE DE MÉCANISMES ASSOCIÉS AUX PROCESSUS NEUROTOXIQUES OU INFLAMMATOIRES

3.1. ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES NEUROTOXIQUES ET DES MODIFICATIONS DES PROTÉOMES NEURONAUX ET ASTROCYTAIRES

(Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

3.1.1. Modification de la carte protéique neuronale lors des phénomènes neurotoxiques : rôle des CRMPs (collapsin-response-mediator-proteins) (Christian Gauchy, Sylvie Bretin-Trocmé, Marion Maus-Moatti, Yvette Torrens et Joël Prémont)

Nous avons montré que certains agents neurotoxiques impliqués dans les dégénérescences neuronales intervenant lors d'une ischémie cérébrale (le glutamate, le zinc et le peroxyde d'hydrogène) inhibent la synthèse protéique globale dans les neurones en bloquant l'étape d'élongation et/ou d'initiation. Mais, selon des données d'autres auteurs, ces inhibitions de synthèse protéique globale peuvent être associées à des phénomènes encore mal connus de superinduction de mRNA de protéines spécifiques comme la CaMKII. Nous avons aussi montré sur des neurones embryonnaires de souris en culture que l'application transitoire de NMDA provoque une mort cellulaire et que les neurones survivants à ce traitement résistent à une deuxième application de NMDA. Ces observations rappellent les phénomènes de « pré-conditionnement physiologique » dans lesquels une ischémie ou l'application d'un agent neurotoxique dans des conditions sub-létales exercent une protection contre une stimulation normalement neurotoxique pour le tissu.

Nous avons donc recherché en utilisant des neurones corticaux de souris embryonnaires en culture des modifications de la carte protéique des neurones survivants après une application neurotoxique de NMDA. Neuf protéines appartenant à une même famille, les CRMPs (Collapsin Response Mediator Proteins) dont les taux varient chez des neurones corticaux survivants 24 heures après une exposition toxique de NMDA ont pu être ainsi identifiées. L'apparition de CRMPs de plus petits poids moléculaires (inconnues jusqu'à maintenant) dont la formation est associée aux phénomènes de neurorésistance a également été mise en évidence. La formation de ces CRMPs « courtes » résulte de l'activation

d'une protéase (la calpaïne) par l'influx de calcium évoqué par le NMDA. La présence de ces CRMPs « courtes » est indissociable du processus toxique, car l'apparition des CRMPs « courtes » n'est pas modifiée par la seconde application de NMDA. Dans des expériences complémentaires, nous avons montré que la sous-unité NR2B du récepteur NMDA était internalisée après la première application de NMDA, et qu'une surexpression d'une forme courte de CRMP2 ou de sa forme « native » (résultant de transfections) induisait une plus forte résistance neuronale. Cette protection résulte d'une diminution des quantités de récepteurs NMDA au niveau de la membrane cellulaire puisque la transfection de CRMP2 clivée induit une internalisation de la sous-unité NR2B. Ainsi la survie neuronale semble dépendre de l'apparition de CRMPs clivées responsables d'une régulation de l'endocytose des récepteurs NMDA.

3.1.2. Inhibition de la synthèse protéique dans les neurones corticaux par le NMDA et par un déficit métabolique (Marion Maus, Yvette Torrens, Christian Gauchy et Joël Prémont)

Nous avons déjà indiqué que l'inhibition de synthèse protéique dans les neurones corticaux par le NMDA résulte d'une phosphorylation du facteur d'élongation de la traduction (EF2) par une protéine kinase Ca²⁺-dépendante (EF2-kinase), alors que l'inhibition de synthèse protéique induite par le zinc ou H₂O₂ se situe au niveau de l'étape de pré-initiation de la traduction. L'activation des récepteurs NMDA conduisant à une forte baisse de la charge énergétique neuronale, nous avons recherché si le déficit métabolique jouait un rôle dans l'inhibition de synthèse protéique induite par cet acide aminé. Un déficit métabolique dans les neurones entraîne une forte inhibition de la synthèse protéique et une phosphorylation du facteur d'élongation EF-2, sans modification du facteur d'initiation eIF2 α . Cependant, nous avons pu montrer que les mécanismes impliqués dans les effets du NMDA et d'un déficit métabolique étaient distincts (activations respectives d'EF-2 kinase par le Ca²⁺ et par l'AMP-kinase). Ces deux mécanismes pourraient intervenir dans l'inhibition de synthèse protéique associée à l'ischémie cérébrale.

3.2. MACROPHAGES CÉRÉBRAUX ET CELLULES DENDRITIQUES (Edwige Amigou, Charles-Félix Calvo)

Nous avons démontré l'existence d'une hétérogénéité fonctionnelle au sein de la population de macrophages cérébraux de souris cultivés *in vitro*. Ces sous-populations sont caractérisées par leur production exclusive de cytokines pro-(TNF α) ou anti-inflammatoire (IL10), en réponse à une stimulation innée (LPS, peptidoglycan ou zymosan) faisant intervenir un récepteur de type TLR (TLR4, TLR2). Au cours du phénomène d'induction de tolérance, généré par des stimulations successives des cellules avec le LPS, nous avons pu montrer une suppression de la synthèse de TNF α , tandis que la population synthétisant l'IL10 est

toujours capable de répondre. Cette observation est à rapprocher des résultats obtenus après un traitement des cellules par la prostaglandine PGE2. En effet, une exposition prolongée des cellules au LPS induit la synthèse de PGE2, qui peut alors exercer son rôle inhibiteur sur le TNF α , et activateur sur la production d'IL10.

Pour le travail décrit ci-dessus, nous avons enrichi la population cellulaire en macrophages cérébraux par une déplétion des cellules portant le marqueur CD11c (marqueur spécifique des cellules dendritiques) avec des billes couplées à l'anti-corps anti-CD11c. Avec ces cellules CD11c positivement isolées, nous avons développé un nouveau sujet de recherche portant sur le rôle des cellules dendritiques dans le parenchyme cérébral. En effet, des cellules portant ce marqueur sont uniquement décrites dans les zones périvasculaires, tandis que leur existence dans le parenchyme porte à discussion. Les cellules CD11c positives interviennent dans la présentation des antigènes aux cellules T, et pourraient ainsi jouer un rôle dans l'initiation d'une réponse cérébrale de type adaptative. Une hypothèse de travail consiste à dire que les CD11c sont réprimées dans l'environnement cérébral, puis réactivées au cours d'une inflammation locale. En cela, elles suivraient le phénotype des macrophages cérébraux qui se trouvent à l'état de repos chez l'adulte sain, et sous une forme activée au cours d'une lésion cérébrale. Cette transformation pourrait s'accompagner de l'acquisition de propriétés fonctionnelles spécifiques des cellules dendritiques.

En cultivant des cellules CD11c sur des extraits de cerveau pendant 20 heures, nous avons pu observer une forte diminution de l'expression de ce marqueur cellulaire. Les gangliosides, présents en abondance dans le cerveau, sont déjà responsables d'une diminution de la sécrétion de cytokines par des monocytes et d'une diminution de l'expression des marqueurs de MHC de classe I et II sur des astrocytes activés. En utilisant une préparation commerciale de gangliosides, nous avons reproduit une baisse de l'expression du CD11c, aussi bien par immunocytochimie que par des expériences de Western blot. Le traitement des extraits de cerveau à la neuraminidase semble indiquer que les gangliosides sont bien responsables de l'inhibition d'expression du CD11c. Il reste à démontrer que l'activité fonctionnelle de ces cellules est également altérée par les gangliosides.

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

(Responsable de l'équipe : Hervé Chneiweiss (Brigitte Canton, Marie-Pierre Junier, Cristina Mondet, François Renault, Ariane Sharif, Luciana Romao, 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, où la barrière hémato-encéphalique est respectée, l'espérance

de vie est supérieure à 10 voire 15 ans selon le type de cellules à l'origine de ces cancers. Par contre, le pronostic est de 1 an dans le cas des tumeurs de haut grade, dont la forme la plus grave est le glioblastome. Les mécanismes de cette progression par étapes ne sont pas connus, mais ils nécessitent plusieurs événements successifs mettant en jeu une hyperactivation de cascades de signalisation intracellulaires. Nous avons donc étudié les rôles de TGF α et de PEA-15 dans la progression tumorale et caractérisé des cellules souches tumorales pour tenter de comprendre ces mécanismes de progression car leur contrôle permettrait d'inhiber le développement de ces tumeurs vers les hauts grades.

4.1. LE TGF ALPHA CONTRÔLE LA DIFFÉRENCIATION ASTROCYTAIRE

TGF alpha est un facteur de croissance sur-exprimé dès les étapes précoces de la tumeur. Les mécanismes par lesquels TGF alpha à la progression tumorale via son récepteur ErbB1 ou par un nouveau mécanisme de signalisation rétro-grade impliquant la partie intracellulaire de son précurseur ont été recherchés. L'application prolongée de TGF α induit une régression de l'astrocyte mature vers un type cellulaire moins différencié, la glie radiaire, fonctionnelle car capable de générer des cellules neuronales. En collaborant avec la société Hybrigenics, nous avons poursuivi la caractérisation de nouveaux partenaires intracellulaires du précurseur du TGF alpha. Par surexpression dans différents types cellulaires, nous avons confirmé certaines interactions observées initialement en double hybride chez la levure, ce qui nous a permis de décrire une nouvelle voie de régulation de la sécrétion de TGF alpha.

4.2 PEA-15 INHIBE LA MOTILITÉ CELLULAIRE

PEA-15 est une phosphoprotéine de 15 kDa 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. Nos données indiquent que l'expression de PEA-15 est associée à une inhibition de la migration cellulaire. Les astrocytes n'exprimant pas PEA-15 ont une motilité accrue. Le contrôle de l'activité d'une protéine kinase C est important dans ce phénomène. De plus, les tissus cérébraux n'exprimant pas PEA-15 sont plus permissifs à la diffusion de cellules tumorales que les tissus normaux.

4.3. RECHERCHE ET CARACTÉRISATION DE CELLULES SOUCHES TUMORALES

En collaborant avec le Pr. Catherine Daumas-Duport et son équipe (hôpital Ste Anne, Paris), nous avons émis l'hypothèse que les cellules souches neurales seraient une des cibles du processus de tumorigénèse et qu'il existerait au sein des tumeurs des cellules présentant des caractéristiques de cellules souches tumorales. Une nouvelle forme de glioblastome, les tumeurs glio-neuronales malignes

(TGNM) (Varlet et al., 2004) qui contiennent des cellules exprimant des marqueurs neuronaux comme la NF70, mais aussi des marqueurs gliaux comme la GFAP ont été utilisées dans notre étude. Sur une dizaine de tumeurs humaines de type TGNM, nous avons mis en évidence, l'existence de cellules capables de prolifération, d'auto renouvellement et de différenciation, selon les conditions de culture, démontrant ainsi la présence de cellules souches tumorales dans des tumeurs de l'adulte des cellules souches tumorales.

PUBLICATIONS ORIGINALES

L. VENANCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Electrical and chemical transmission between striatal GABAergic output neurones in rat brain slices* (J. Physiol, 559 : 215-230, 2004).

A. AUCLAIR, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Role of serotonin receptors in the d-amphetamine-induced release of dopamine : comparison with previous data on alpha1b-adrenergic receptors* (J. Neurochem., 91 (2) : 318-326, 2004).

A. AUCLAIR, C. DROUIN, S. COTECCHIA, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, E-HY2A and alpha1b-adrenergic receptors entirely mediate dopamine release, locomotor response ad behavioural sensitization to opiates and psychostimulants. (Europ. J. Neuroscience, 20 : 3073-3084, 2004).

S.J. SLAGHT, J.T. PAZ, M. CHAVEZ, J.M. DENIAU, S. MAHON, S. CHARPIER, *On the activity of the corticostriatal networks during spike-and-wave discharges in a genetic model of absence epilepsy.* (J. Neurosci., 24 (30) : 6816-6825, 2004).

C.F. CALVO, E. AMIGOU, M. TENCE, T. YOSHIMURA, J. GLOWINSKI, *Albumin stimulates monocyte chemotactic protein-1 expression in rat embryonic mixed brain cells.* (J. Neurosci. Res., 80, 5, 707-714, 2005).

M. VANDECASTEELE, J. GLOWINSKI, L. VENANCE, *Electrical synapses between output neurons from the striatum and the substantia nigra pars compacta.* (J. Neurosci., 25, 2, 291-298, 2005).

S. BRETIN, S. REIBEL, E. CHARRIER, M. MAUS-MOATTI, N. AUVERGNON, A. THEVENUX, J. GLOWINSKI, V. ROGEMOND, J. PREMONT J., HONNORAT, C. GAUCHY, *Differential expression of CRMP1, CRMP2A, CRMP2B and CRMP5 in axons or dendrites of distinct neurons in the mouse brain.* (J. Comp. Neurol., 486, 1, 1-17, 2005).