



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
1996

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 14 novembre 1996
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
Mention Pharmacologie

par

Jean OILLET

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

**Caractérisation d'un modèle d'étude de l'hypoxie
sur les neurones centraux en culture.
Evaluation du rôle des radicaux libres
et des acides aminés excitateurs**

Membres du jury

Dr. Henri DREYFUS, Strasbourg, *rapporteur*
Pr. Tobias HEVOR, Orléans, *rapporteur*
Pr. Paul VERT, Nancy
Dr. Alain MINN, Nancy
Dr. Jean-Luc DAVAL, Nancy



REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué à l'unité INSERM 272 "Pathologie et Biologie du Développement Humain". Il a bénéficié d'un soutien de la Communauté Economique Européenne (Programme Biotechnologie, contrat BIO2-CT93-0108).

Je remercie vivement Mr le Professeur VERT, Directeur de l'Unité 272 et Chef du Service de Médecine et Réanimation Néonatales-Génétique de la Maternité Régionale de Nancy, pour m'avoir accueilli au laboratoire et permis de réaliser ce travail, ainsi que pour avoir accepté de siéger dans le jury de thèse.

Je souhaite également remercier avec gratitude Mr le Docteur Jean-Luc DAVAL, assurant la direction des recherches, pour m'avoir associé à ses travaux de mise au point d'un modèle *in vitro* d'étude de l'hypoxie périnatale, et pour m'avoir soutenu par ses conseils amicaux et éclairés.

Je tiens à remercier particulièrement les rapporteurs de thèse pour leur bienveillance et leur disponibilité et pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'avoir bien voulu accepter de remplir ce rôle essentiel dans le jury: à savoir Mr le Docteur Henri DREYFUS, Directeur de Recherche du CJF INSERM 92-02, Clinique Ophtalmologique du CHRU de Strasbourg, et Mr le Professeur et Docteur Tobias HEVOR, du Laboratoire de Physiologie Animale de l'Université d'Orléans, U.F.R. Sciences.

Enfin je remercie chaleureusement Mr le Docteur Alain MINN, Directeur de Recherche au CNRS URA 1288, Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine de Nancy, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de siéger dans le jury.

J'adresse ma reconnaissance personnelle à tous les membres de l'unité 272, étudiants et équipe technique, pour leur aide directe et les débats constructifs sans lesquels les travaux n'auraient pu progresser.



SOMMAIRE

I. L'HYPOXIE/ISCHEMIE

1) <u>Généralités</u>	9
2) <u>L'hypoxie/ischémie périnatale</u>	
2.1.un cas particulier	9
2.2.pathogenèse	10
2.3.spécificité régionale	11
2.4.manifestations pathologiques	11
2.4.1.nécrose neuronale sélective	
2.4.2.status marmoratus	
2.4.3.lésion cérébrale parasagittale	
2.4.4.leucomalacie périventriculaire	
2.4.5.nécrose cérébrale ischémique focale	
2.5.problèmes liés à la réoxygénation	12
3) <u>Modèles d'étude</u>	
3.1.modèles <i>in vivo</i>	13
3.2.modèles <i>in vitro</i>	15
3.2.1.coupes de cerveau	
3.2.2.cultures cellulaires	

4) <u>Mécanismes cellulaires impliqués dans les conséquences de l'hypoxie/ischémie</u>	
4.1. troubles du métabolisme énergétique	17
4.2. impact sur l'environnement ionique	17
4.2.1. effets sur les systèmes membranaires de transport des ions	
4.2.2. influx du calcium: l'hypothèse calcique	
4.3. rôle des acides aminés excitateurs: l'hypothèse excitotoxique	20
4.3.1. nécessité d'une structure synaptique	
4.3.2. accumulation du glutamate extracellulaire	
4.4. production de radicaux libres: le stress oxydatif	21
4.5. schéma récapitulatif	21

II. LES RADICAUX LIBRES DERIVES DE L'OXYGENE

1) <u>Définition</u>	22
2) <u>Cytotoxicité</u>	22
3) <u>Implication dans l'hypoxie/ischémie</u>	
3.1. origine des radicaux libres produits par les cellules soumises à l'hypoxie	22
3.2. lésions cellulaires produites par les radicaux libres	23
3.2.1. peroxydation des lipides	
3.2.2. inhibition de fonctions cellulaires	
3.2.3. dommages subis par l'ADN	
3.2.4. dommages cellulaires provoqués par le monoxyde d'azote NO	

III. LE GLUTAMATE ET SES RECEPTEURS

1) <u>Généralités</u>	25
2) <u>Caractérisation des récepteurs du glutamate. Ligands spécifiques</u>	26
2.1. propriétés générales des agonistes	
2.2. classification des récepteurs du glutamate	
3) <u>Différentes classes de récepteurs: structure, ligands et fonctions</u>	28
3.1. Les récepteurs ionotropes	
3.1.1. récepteur NMDA	28
1) agonistes du récepteur NMDA	28
2) antagonistes du récepteur NMDA	29
(1) antagonistes compétitifs	
(2) antagonistes non compétitifs	
3) modulation allostérique du site récepteur NMDA	31
4) réponse NMDA et rôles physiologiques	31
3.1.2. récepteur AMPA	32
1) agonistes du récepteur AMPA	32
2) antagonistes du récepteur AMPA	33
3) réponse et rôles physiologiques du récepteur AMPA	33

3.1.3.récepteur kaïnate	34
1) agonistes du récepteur kaïnate	35
2) antagonistes du récepteur kaïnate	35
3) réponse et rôles physiologiques du récepteur kaïnate	35
3.1.4.récepteur L-AP4	36
1) identification	36
2) localisation et fonctions	36
3.2.Les récepteurs métabotropes	
3.2.1.caractérisation	37
3.2.2.pharmacologie des récepteurs métabotropes	38
3.2.3.localisation et fonctions	38
3.3.Apports de la biologie moléculaire	39
4) <u>Toxicité du glutamate vis à vis du neurone: l'excitotoxicité</u>	
4.1.généralités, définition	39
4.2.mécanismes de l'excitotoxicité	39
4.2.1.généralités	
4.2.2.récepteurs impliqués	
4.2.3.rôle du calcium	
4.2.4.voie de l'acide arachidonique	
4.3.l'excitotoxicité dans l'hypoxie/ischémie	42
4.3.1.mécanismes d'action	42
4.3.2.ontogenèse	43
4.3.3.topographie	44
4.3.4.limite de l'hypothèse excitotoxique	44

5) <u>Implication des radicaux libres dans l'excitotoxicité</u>	45
5.1.stimulation de la libération des acides aminés excitateurs	45
5.2.inhibition de la recapture du glutamate	46

IV. BUT DE L'ETUDE

1) <u>Cadre de l'étude et objectifs</u>	47
2) <u>Présentation des résultats</u>	49

V. SECTION EXPERIMENTALE

1) <u>Mise au point d'une méthode d'évaluation de la production du radical superoxyde dans des cellules nerveuses soumises à diverses conditions de culture: application à l'hypoxie</u>	
1.1.objectif de l'étude	50
1.2.approche expérimentale	50
1.3.principaux résultats	51
1.4.conclusion de l'étude	52
1.5.publication	52

2) Influence des conditions de réoxygénation post-hypoxique sur le métabolisme énergétique et la production de superoxyde dans des neurones en culture issus du cerveau de rat

2.1.objectif de l'étude	60
2.2.approche expérimentale	60
2.3.principaux résultats	61
2.4.conclusion de l'étude	61
2.5.publication	61

3) Analyse des récepteurs du glutamate dans des neurones de cerveau de rat foetal en culture primaire

3.1.objectif de l'étude	68
3.2.approche expérimentale	68
3.3.principaux résultats	69
3.4.conclusion de l'étude	69
3.5.publication	69

4) Evaluation de la participation de la neurotoxicité liée au glutamate dans l'hypoxie sur les neurones en culture. Influence du degré de maturation cellulaire.

4.1.objectif de l'étude	78
4.2.approche expérimentale	78
4.3.principaux résultats	79

4.4.conclusion de l'étude	79
4.5.publication	80

VI. DISCUSSION GENERALE. CONCLUSIONS.

1) Problèmes inhérents au modèle

1.1.avantages du modèle	104
1.2.inconvénients et contraintes du modèle	104

2) Mécanismes de la neurotoxicité dans l'hypoxie

2.1.statut énergétique-spécificité du cerveau immature	106
2.2.le stress oxydatif lié à l'hypoxie	107
2.3.rôle de l'excitotoxicité	108
2.4.autres mécanismes	109

3) Conclusion et perspectives

VII. ANNEXE TECHNIQUE

VIII. BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

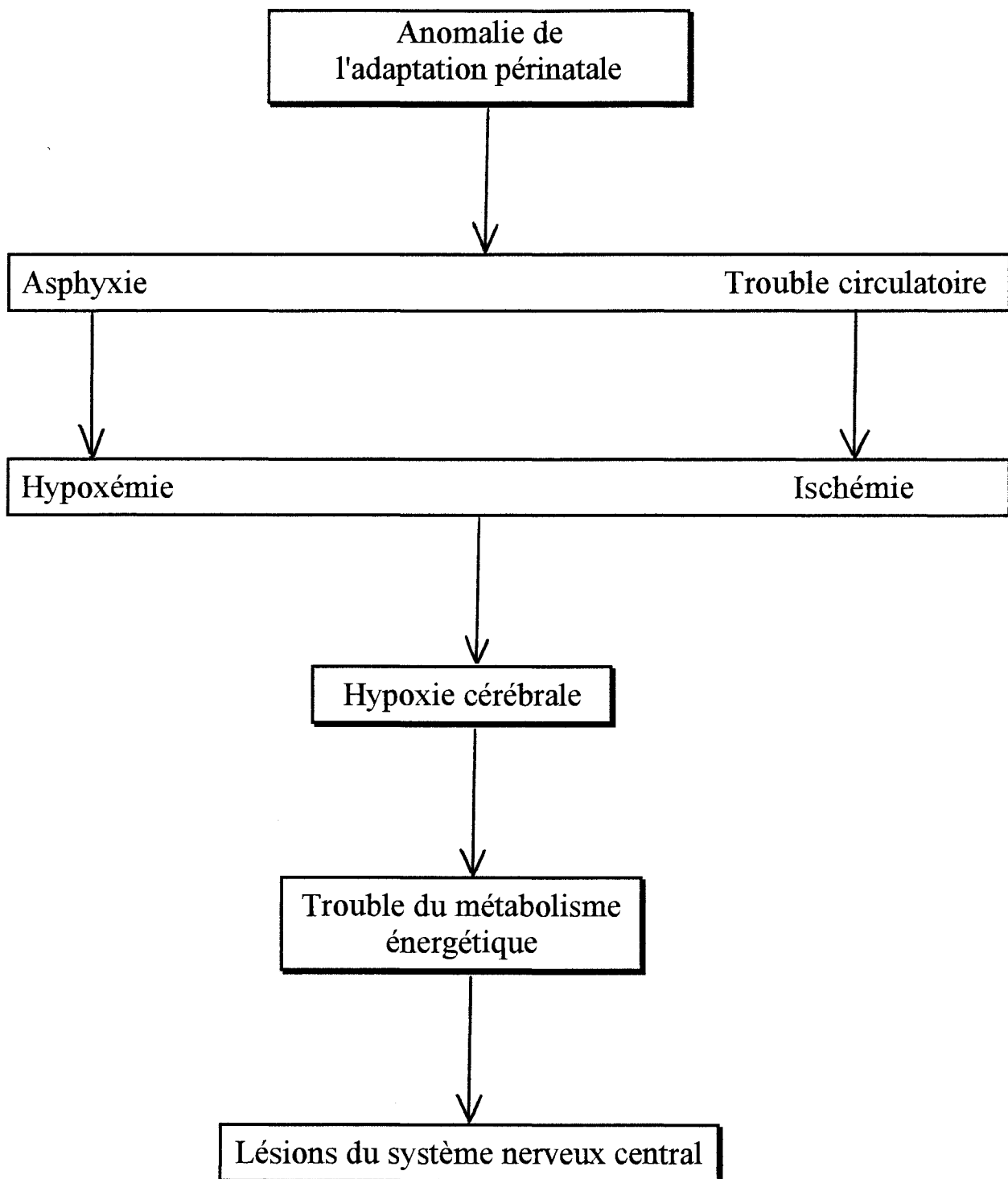


Figure 1:

Cascade des évènements susceptibles de provoquer ou d'aggraver les lésions cérébrales.

I. L'HYPOXIE/ISCHEMIE

1) Généralités

L'hypoxie consiste en une réduction de l'apport d'oxygène du sang vers les tissus.

Dans un cadre clinique, elle survient essentiellement lors de l'asphyxie où une difficulté, voire un arrêt de la respiration, se traduit par une privation en oxygène (anoxie) et une baisse de la pression partielle de l'oxygène dans le sang (hypoxémie).

L'ischémie, pathologie apparaissant généralement à la suite d'un trouble circulatoire et caractérisée par une diminution de la quantité de sang perfusé vers l'organe, se traduit également par une hypoxie au niveau tissulaire. Le terme d'hypoxie/ischémie est utilisé pour désigner deux processus étroitement associés et produisant des effets similaires, en particulier au niveau cérébral (fig.1). L'ischémie s'accompagne en outre d'une privation de glucose, tandis que l'hypoxie perturbe le métabolisme énergétique sans altérer l'apport en glucose.

2) L'hypoxie/ischémie périnatale

2.1.un cas particulier

Il a été établi depuis longtemps que le cerveau du nouveau-né résiste mieux à une privation en oxygène que celui de l'adulte. Cette observation a été confirmée par de nombreuses études réalisées chez plusieurs espèces, une telle tolérance diminuant avec l'âge. Ainsi, par opposition à l'adulte, l'effet d'une hypoxie sur l'homéostasie ionique dans les neurones cérébraux du nouveau-né est en général peu marqué, avec une période de latence relativement plus longue avant que n'apparaissent les premiers troubles (Haddad & Jiang, 1993).

Les principales différences entre les cerveaux nouveau-né et adulte pouvant être à l'origine de la moindre sensibilité à l'agression hypoxique/ischémique en période périnatale sont les suivantes (Volpe, 1995):

- métabolisme énergétique cérébral plus faible chez le nouveau-né, avec un taux d'utilisation de l'ATP plus réduit, ce phénomène étant probablement secondaire à une activité synaptique moindre de la cellule nerveuse encore immature

-accumulation peu marquée de métabolites toxiques comme le lactate, grâce à la persistance de voies métaboliques utilisant le lactate et les corps cétoniques

-utilisation plus importante de la glycolyse anaérobie (caractère foetal)

-résistance de la fonction cardiaque, avec une adaptation cardiovasculaire plus efficace

-meilleure homéostasie ionique, possibilité de modifications de l'équilibre acido-basique

Cependant, si l'hypoxie persiste ou s'aggrave, les processus de défense du nouveau-né peuvent s'avérer insuffisants car la glycolyse anaérobie ne peut être utilisée que pour une courte durée, après quoi elle aboutit à trois conséquences graves (Pontonnier & Grandjean, 1985):

(1) la diminution de production de l'énergie, du fait du faible rendement énergétique de la glycolyse anaérobie: en effet, alors que l'oxydation aérobie d'une molécule de glucose aboutit à un gain de 36 molécules d'ATP, le catabolisme anaérobie de cette même molécule ne produit que 2 molécules d'ATP. En absence d'oxygène, pour générer l'énergie qui leur est nécessaire, les tissus doivent donc augmenter leur catabolisme glucidique. Dans le neurone où le stock en ATP est limité, la poursuite de l'anoxie va conduire progressivement à la déplétion en phosphates riches en énergie.

(2) l'épuisement des réserves glycogéniques cellulaires, localisées principalement, au niveau cérébral, dans les cellules gliales dont le rôle est essentiel pour le fonctionnement du neurone

(3) l'acidose métabolique, générée par l'accumulation de lactate issu de la dégradation du glucose en acide pyruvique, lequel en absence d'oxygène n'est plus décarboxylé et va se transformer en acide lactique. Au-delà d'un certain seuil de pH, la cellule ne peut plus effectuer la glycolyse anaérobie; le pH incompatible avec la survie est évalué à 6,9 environ.

2.2.pathogenèse

Le déficit dans l'approvisionnement cérébral en oxygène est la cause première de l'encéphalopathie hypoxique/ischémique. Deux mécanisme pathogéniques sont à l'origine de ce déficit: l'hypoxémie et l'ischémie, cette dernière apparaissant dans les données expérimentales et cliniques comme la plus importante (Volpe, 1995).

L'un comme l'autre de ces mécanismes pathogéniques résultent dans la plupart des cas d'une asphyxie qui conduit à des désordres biochimiques et métaboliques. Ainsi, l'asphyxie intra-utérine est la plus fréquente source de l'encéphalopathie hypoxique/ischémique au cours de la période périnatale (Gray *et al*, 1993), avec l'insuffisance respiratoire à la naissance comme facteur d'hypoxémie sévère, liée au syndrome de détresse respiratoire ou à des apnées récurrentes, et l'insuffisance cardiaque comme facteur d'ischémie, liée à une maladie cardiaque congénitale ou à un choc infectieux, ou encore les shunts cardiovasculaires avec persistance d'une circulation de type foetal après la naissance.

2.3.spécificité régionale

Il est bien établi que certaines régions du cerveau de même que des types cellulaires spécifiques sont particulièrement sensibles à de brèves périodes d'hypoxie/ischémie cérébrale. Il a ainsi été distingué des régions cérébrales vulnérables vis à vis d'une ischémie globale (Globus *et al*, 1991). Les types cellulaires les plus vulnérables correspondent aux cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe (Benveniste *et al*, 1988; Mitani & Kataoka, 1991) et à certains neurones du striatum (Obrenovitch *et al*, 1993; Hillered *et al*, 1989) ou du cortex cérébral (Shimada *et al*, 1993; Goldberg & Choi, 1990).

2.4.manifestations neuropathologiques

Les caractéristiques neuropathologiques de l'encéphalopathie néonatale hypoxique et/ou ischémique varient considérablement avec l'âge gestationnel de l'enfant, la nature des lésions, le type d'intervention et d'autres facteurs. Quoi qu'il en soit, il existe certaines lésions basales dont la reconnaissance fournit matière à la caractérisation clinique de diverses pathologies (Volpe, 1995).

2.4.1.nécrose neuronale sélective

Cette lésion neuronale caractéristique est la manifestation la plus répandue dans l'encéphalopathie hypoxique/ischémique néonatale, coexistant souvent à des degrés divers avec les autres types de lésion. Elle conduit à la destruction des neurones par un processus nécrotique, provoquant la formation de cavités en particulier dans le cortex cérébral. D'autres régions vulnérables sont l'hippocampe (principalement les cellules pyramidales), les noyaux de la base (noyau caudé, putamen et globus pallidus), le thalamus, le cervelet (cellules de Purkinje) et certaines régions de la moëlle épinière.

2.4.2. status marmoratus

Cette lésion implique la mort des neurones glutamatergiques des noyaux de la base et du thalamus. Elle est la moins fréquente des manifestations citées, et atteint davantage les nouveau-nés à terme que les prématurés.

2.4.3. lésion cérébrale parasagittale

Elle se caractérise par une nécrose bilatérale caractéristique des neurones du cortex cérébral et de la substance blanche sous-corticale. C'est la principale lésion ischémique des nouveau-nés à terme.

2.4.4. leucomalacie périventriculaire

Cette lésion se produit essentiellement chez le prématuré et dans une moindre mesure chez le nouveau-né à terme présentant des troubles de la fonction cardiorespiratoire. Elle se caractérise par une destruction de type nécrotique de la substance blanche adjacente aux ventricules latéraux.

2.4.5. nécrose cérébrale ischémique focale

Cette lésion de type nécrotique est associée à l'aire de distribution des vaisseaux cérébraux et se caractérise par une dégénérescence neuronale à localisation spécifique, essentiellement unilatérale, avec une étiologie variée incluant en particulier une thrombose veineuse. Un tiers seulement de ces lésions provient d'une asphyxie périnatale.

2.5. problèmes liés à la réoxygénation

L'enrichissement de l'apport d'oxygène dans l'air inspiré, ou oxygénothérapie, est la méthode la plus répandue du traitement de l'hypoxie néonatale. Son efficacité a été démontrée dans le traitement des accès de cyanose chez les prématurés, diminuant le taux de mortalité, et ses effets bénéfiques sur la respiration périodique du prématuré, souvent associée à l'apnée, et sur l'adaptation de la circulation pulmonaire à la vie extra-utérine sont indiscutables (Duc, 1985).

Cependant, son utilisation n'est pas sans risques et nécessite un étroit contrôle. En effet, l'excès d'oxygène, comme le manque, ont été associés à des complications tragiques. Dans le cas d'un

excès d'oxygène apparaissent des effets néfastes comme la fibroplasie rétrolentale, une rétinopathie dont l'incidence augmente à la suite de traitements à de trop fortes concentrations d'oxygène (supérieures à 40%), la dysplasie bronchopulmonaire et l'hémorragie pulmonaire. Un manque d'oxygène accroît la mortalité et la fréquence de la maladie des membranes hyalines et de la diplégie spastique. Il est malaisé de définir un taux optimal d'oxygène pour une thérapie efficace et sans dangers, la pression artérielle d'oxygène chez un même sujet pouvant être extrêmement variable dans le temps, ces variations étant particulièrement importantes au cours du syndrome de détresse respiratoire.

Ainsi, "l'histoire de l'utilisation de l'oxygène en Néonatalogie permet d'affirmer seulement que trop d'oxygène est associé à une augmentation de la fréquence de la fibroplasie rétrolentale et trop peu à une augmentation du taux de mortalité et des troubles neurologiques chez les survivants, sans qu'il soit possible de définir quantitativement les limites critiques de la pression artérielle d'oxygène où ces complications sont les moins fréquentes" (Duc, 1985).

3) Modèles d'étude

L'utilisation de divers modèles d'hypoxie est nécessaire pour déterminer les effets de la privation d'oxygène sur le fonctionnement cérébral et pour évaluer les hypothèses quant aux mécanismes sous-jacents à son action délétère pour la cellule nerveuse. A cette fin, des modèles tant *in vivo* que *in vitro* ont été mis au point soit en limitant l'apport d'oxygène, soit en diminuant la capacité des tissus à utiliser l'oxygène.

• 3.1.modèles *in vivo*

De nombreux résultats expérimentaux proviennent d'études réalisées sur des animaux entiers, utilisés à divers stades du développement.

Dans les modèles fœtaux, une hypoxie *in utero* a pu être réalisée en plaçant des femelles gestantes dans une chambre isobare en atmosphère contrôlée (Vierck & Meier, 1963). Une ischémie peut être déclenchée par la ligature des vaisseaux sanguins ombilicaux (Wigglesworth, 1964).

De la même manière, des études post-natales ont été mises en œuvre soit en plaçant les animaux dans une chambre en atmosphère contrôlée, en abaissant le taux d'oxygène externe (Slotkin *et al*, 1986), soit en ligaturant une artère carotide (Mitani & Kataoka, 1991; Obrenovitch *et al*, 1993) ou, plus directement, une artère cérébrale (Wahl *et al*, 1994; Hillered *et al*, 1989), ce qui entraîne l'ischémie, soit en combinant ces deux techniques hypoxie et ischémie (Rice *et al*, 1981), soit enfin par l'injection d'une substance neurotoxique excitatrice (Marret *et al*, 1995).

Les études réalisées sur les modèles *in vivo* pour l'analyse des conséquences d'un épisode hypoxique/ischémique cérébral périnatal ont ainsi permis de montrer que certaines fonctions cellulaires sont irréversiblement compromises, parmi lesquelles le métabolisme énergétique et la synthèse protéique. Ces altérations conduisent à la dégénérescence de populations neuronales spécifiques dans des territoires cérébraux particulièrement sensibles à une privation en oxygène comme l'hippocampe, le cortex cérébral ou le striatum (Benveniste *et al*, 1988; Shimada *et al*, 1993; Obrenovitch *et al*, 1993). Par ailleurs, ces modèles sont considérés comme étant bien adaptés pour l'étude des séquelles neurologiques et comportementales à long terme (Hermans *et al*, 1992).

Cependant, l'interprétation des résultats à partir des modèles *in vivo* demeure difficile lorsqu'on s'intéresse aux mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu, du fait de la diversité des phénotypes cellulaires rassemblés dans le cerveau et interagissant entre eux, de l'interférence de paramètres périphériques ou centraux difficiles à maîtriser et de la présence de systèmes d'autorégulation et/ou d'adaptation (par exemple ceux de la fonction cardiovasculaire, mis en cause dans la réponse de l'organisme à une situation hypoxique et/ou ischémique).

Ainsi, l'introduction ou la variation d'un paramètre exogène (l'impact de la manipulation de l'animal, comme par exemple l'anesthésie, sur ses fonctions vitales ou encore l'injection d'un composé pharmacologique) peut conduire à la perturbation d'une telle diversité de systèmes que la réponse recherchée sera peu quantifiable, difficile à analyser puis à interpréter.

De ce fait, devant la grande complexité du cerveau *in situ* et afin d'appréhender de façon plus fine les mécanismes moléculaires et cellulaires de la réponse à l'agression hypoxique/ischémique, il est apparu nécessaire, pour contourner ces problèmes, de mettre au point des modèles simplifiés *in vitro*.

• 3.2.modèles *in vitro*

Des modèles expérimentaux *in vitro* ont été mis au point à partir de préparations tissulaires ou de cellules dissociées puis mises en culture.

Permettant un meilleur contrôle des conditions expérimentales, ces techniques ont rendu possible l'étude plus fine et plus poussée des mécanismes de la mort neuronale consécutive à une agression hypoxique/ischémique. Deux types principaux de modèles *in vitro* peuvent être distingués, les coupes de cerveau et les cultures cellulaires.

3.2.1.coupes de cerveau

Des tranches de cerveau sont maintenues en survie dans une chambre d'immersion et peuvent être soumises soit à une hypoxie seule, par modification de la composition gazeuse de l'atmosphère d'incubation, soit à la combinaison d'une hypoxie et d'une aglycémie en supprimant le glucose dans le liquide de perfusion (ischémie simulée).

Ce modèle est très adapté pour la caractérisation de l'activité électrique des neurones en réponse à une hypoxie/ischémie puis au cours de la phase de réoxygénation car l'organisation des réseaux neuronaux est conservée (Takata & Okada, 1995; Rice *et al*, 1981). Il est aussi utilisé pour des études biochimiques et morphologiques à court terme (Paschen & Djuricic, 1995), mais demeure de pratique moins aisée que les cultures de cellules du fait de l'hétérogénéité des populations cellulaires subsistant dans les coupes de cerveau.

3.2.2.cultures cellulaires

Les cellules du système nerveux central de mammifère peuvent être cultivées par dissociation de types cellulaires embryonnaires peu différenciés. Les cultures ainsi réalisées sont dites primaires, une seule population de cellules ne servant qu'une fois pour une durée limitée et ne pouvant pas être repiquée du fait de la différenciation des types neuronaux. Selon les conditions de culture, elles comportent un seul type cellulaire, neuronal ou glial (culture pure), ou une combinaison des deux (culture mixte). Dans le second cas, de même que pour les coupes de cerveau, il est impossible d'attribuer tel ou tel mécanisme à un phénotype particulier. Cependant, bien qu'il soit admis que les cellules gliales en co-culture avec les neurones protègent ces derniers des conséquences délétères de divers types d'agression, il a également été montré que la microglie pouvait participer à la mort neuronale retardée induite par

l'ischémie (Lees, 1993). Les neurones et les astrocytes résistent plus ou moins à une hypoxie ou à une ischémie, cette variabilité dépendant du type cellulaire et du type de culture, pure ou mixte, les astrocytes étant très résistants à l'hypoxie et protégeant les neurones en coculture (Sochocka *et al*, 1994).

Il existe également plusieurs lignées cellulaires immortalisées, telles que les cellules PC12 du phéochromocytome de rat, très utilisées du fait d'une grande maniabilité (Froissard & Duval, 1994; Carroll *et al*, 1992), mais dont les caractéristiques ne sont pas purement neuronales et qui ne présentent pas les propriétés des cellules du cerveau immature.

Le développement des techniques de culture en milieu défini a permis d'isoler un phénotype particulier de cellules cérébrales, comme les neurones centraux dans notre étude, et de le maintenir dans des conditions garantissant la croissance et la différenciation (Cestelli *et al*, 1992). Le neurone est supposé fonctionnel au même titre que celui intégré au tissu cérébral intact, par exemple dans l'expression de protéines telles que les récepteurs membranaires (Oillet *et al*, 1995), ou dans son activité électrique (Ramakers *et al*, 1993) et métabolique (Daval *et al*, 1991).

Il est alors possible de perturber l'environnement physique ou chimique de ces cellules, en modifiant le mélange gazeux d'incubation ou en les exposant à un agent pharmacologique pour une durée et une concentration données. L'ensemble des paramètres expérimentaux étant contrôlé, l'étude porte sur les effets d'une seule variable à la fois ou sur l'interaction de plusieurs variables dans le même temps, par exemple en soumettant les cellules à une hypoxie et à une privation en glucose (ischémie simulée), et en testant l'influence d'autres paramètres, comme la température.

La possibilité de contrôler et de modifier les paramètres expérimentaux dans les cultures de cellules en font un outil de choix pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires de la mort neuronale consécutive à l'agression hypoxique/ischémique, permettant l'établissement d'un modèle conceptuel de base. Néanmoins, les résultats issus des approches *in vitro* sont à replacer dans le cadre physiologique intégral de l'animal entier et sont donc complémentaires de ceux issus de l'expérimentation *in vivo*.

4) Mécanismes cellulaires impliqués dans les conséquences de l'hypoxie

4.1. troubles du métabolisme énergétique

L'ischémie, qui résulte de l'interruption du débit sanguin, induit non seulement un déficit en oxygène mais aussi une réduction de l'apport de substrats métaboliques, en particulier le glucose. Par ailleurs, il est couramment admis que la mort cellulaire qui suit une privation en oxygène est liée à une baisse marquée de la production de phosphates énergétiques issus de la glycolyse anaérobie (Haddad & Jiang, 1993; Volpe, 1995). Du fait de la limitation de leurs réserves énergétiques, les neurones sont particulièrement vulnérables en milieu hypoxique. La déficience en ATP, nécessaire à la synthèse de macromolécules et de lipides et à l'activité de la plupart des transporteurs membranaires, produit des troubles fonctionnels et une altération des structures cellulaires. Ainsi, l'activité neuronale électrique est réduite avec disparition des potentiels d'action (Nabetani *et al*, 1995), tandis que la synthèse protéique chute progressivement (Paschen & Djuricic, 1995).

Il a été montré par ailleurs que l'inhibition de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, pendant l'ischémie et au-delà, lors de la reperfusion, est une cause majeure de la déplétion en ATP (Almeida *et al*, 1995).

Enfin, l'évolution du métabolisme énergétique pendant et après l'hypoxie a été étudiée dans des neurones centraux de rat en culture, en mesurant le transport du 2-désoxyglucose (Daval *et al*, 1991). Ces travaux ont montré qu'une augmentation du métabolisme énergétique accompagne l'excitation neuronale pendant l'hypoxie, tandis qu'après le retour en normoxie le métabolisme chute parallèlement à l'apparition des premiers signes de dégénérescence.

4.2. impact sur l'environnement ionique

L'ischémie est à l'origine d'une redistribution des ions de part et d'autre des membranes du neurone, affectant leurs gradients physiologiques de concentration et perturbant leur homéostasie. Ceci implique une dérégulation de leurs systèmes de transport.

4.2.1. effets de l'hypoxie/ischémie sur les systèmes membranaires de transport des ions

La déplétion en énergie lors de l'hypoxie/ischémie, à la suite du blocage de la phosphorylation oxydative mitochondriale, de la diminution de l'apport en glucose et de l'épuisement des réserves d'ATP, conduit à l'inhibition de systèmes de transport actif des ions à travers les membranes cellulaires, lesquels dépendent des taux en ATP et sont responsables de l'établissement et du maintien des gradients de concentration ioniques transmembranaires. Cette inhibition fonctionnelle est à l'origine de perturbations de l'homéostasie ionique, laquelle est particulièrement importante dans une cellule excitable telle que le neurone (Haddad & Jiang, 1993). Parmi les systèmes de transport des ions sensibles à l'hypoxie, le plus important est la Na^+/K^+ -ATPase. Il s'agit d'une pompe ionique membranaire dont l'activité est liée aux taux d'ATP et par ailleurs grande consommatrice d'énergie. Sa fonction consiste à rejeter activement le sodium hors de la cellule, tout en pompant le potassium extracellulaire vers le cytosol. Elle participe ainsi à des fonctions membranaires essentielles dépendant des gradients ioniques transmembranaires, comme l'excitabilité neuronale en déterminant les potentiels de membrane, permet les transports, couplés au sodium, de divers acides aminés (dont le glutamate), du glucose et d'autres ions à travers des systèmes échangeurs tels que les transporteurs Na^+/H^+ et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

A l'opposé, d'autres systèmes de transport des ions sont activés, au moins transitoirement, par les effets secondaires à l'hypoxie. Ces derniers participent aux mécanismes de défense enclenchés par la cellule agressée, mécanismes qui limitent la dépolarisation, diminuent l'excitabilité membranaire et la consommation d'oxygène pendant la période d'hypoxie. Ainsi, une baisse des taux d'ATP active des canaux potassiques et inactive des canaux sodiques sensibles à l'ATP, tandis que l'augmentation du calcium intracellulaire active des canaux potassiques dépendant du calcium (Haddad & Jiang, 1993).

Globalement, ces perturbations résultent en une augmentation du potassium extracellulaire, un influx sodique et calcique suivi de l'entrée d'ions chlorures et d'eau, produisant un gonflement cellulaire et l'apparition de dommages.

4.2.2. influx du calcium: hypothèse calcique

L'hypothèse calcique avance qu'une surcharge intracellulaire en calcium se produit pendant l'hypoxie et induit une cascade d'événements qui entraîne la mort cellulaire (Siesjö *et al*, 1991; Siesjö & Bengtsson, 1989; Meyer, 1989).

Dans une cellule au repos, l'ion calcium est présent à faible concentration, car il est en permanence refoulé dans le milieu extracellulaire contre un gradient de concentration, et il est stocké dans plusieurs organites cellulaires comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau. La distribution du calcium crée un gradient électrochimique élevé de part et d'autre de la membrane plasmique. L'homéostasie calcique est capitale pour la cellule, le calcium étant impliqué dans d'importantes fonctions régulatrices de la transmission nerveuse, jouant le rôle de second messager dans la transduction du signal.

De nombreuses fonctions cellulaires requièrent ainsi des élévations réduites et transitoires du calcium intracellulaire, mais une augmentation ample et soutenue est dommageable pour les cellules nerveuses (Orrenius *et al*, 1989). Par activation de systèmes enzymatiques incluant des protéases, des lipases et des endonucléases, le calcium entraîne une série de réactions cellulaires autotoxiques, à savoir la dégradation des lipides membranaires par l'activation de la phospholipase C, l'hydrolyse du cytosquelette et la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène, une dépolarisation accrue du neurone et la libération d'acides aminés excitateurs. L'amplification de l'influx calcique et le développement d'un cercle vicieux conduisent finalement à la mort cellulaire.

L'élévation du calcium intracellulaire pendant l'hypoxie relève de différents mécanismes étroitement associés:

(1) à partir du compartiment extracellulaire, une entrée du calcium à travers d'une part des canaux calciques voltage-dépendants ouverts par la dépolarisation induite par l'hypoxie, et d'autre part des canaux couplés aux récepteurs NMDA activés par la libération d'acides aminés excitateurs (voir chapitre III)

(2) une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires, avec mise en jeu dans le même temps des protéines de liaison du calcium, dont la capacité de fixation de l'ion est réduite par l'acidose intracellulaire liée à l'hypoxie

(3) une inhibition du transport membranaire du calcium vers le compartiment extracellulaire, mécanisme essentiel du maintien de l'homéostasie calcique, effectué normalement par les pompes calciques ATP-dépendantes (à activité ATPase membranaire) et par les échanges sodium/calcium dépendant du gradient sodique transmembranaire. Ces deux systèmes sont en effet sensibles à l'hypoxie (déplétion en ATP, déplacement des courants ioniques avec perturbation des gradients transmembranaires), et il a été rapporté une inversion de l'échange sodium/calcium pendant l'hypoxie concourant ainsi à l'influx calcique général (Waxman *et al*, 1991)

L'hypothèse calcique dans la toxicité cellulaire consécutive à l'hypoxie/ischémie est confortée par diverses observations, en particulier l'accumulation de calcium intracellulaire pendant l'hypoxie (Choi, 1988; Marcoux *et al*, 1990; Goldberg & Choi, 1990), le rôle protecteur des bloqueurs des canaux calciques et des chélateurs du calcium extracellulaire et l'effet bénéfique de faibles taux de calcium extracellulaire dans les modèles d'hypoxie *in vitro* (Goldberg *et al*, 1986).

Par ailleurs, le calcium est un important médiateur des effets néfastes d'une exposition à des doses élevées du glutamate, lequel provoque l'entrée de cet ion dans la cellule (Frandsen & Schousboe, 1993). Or, l'augmentation du glutamate extracellulaire est un trait essentiel de l'agression hypoxique/ischémique, comme nous le verrons ci-après.

4.3.rôle des acides aminés excitateurs: hypothèse excitotoxique

Le rôle critique du glutamate dans la médiation de la mort neuronale hypoxique/ischémique a été établi par de nombreuses données expérimentales; la description détaillée des mécanismes impliqués ne sera abordée que dans le chapitre III. Dans cette partie, nous nous bornerons à présenter les observations initiales à l'origine de l'hypothèse excitotoxique, indépendamment des processus en cause.

4.3.1.nécessité d'une structure synaptique

Une observation cruciale a été faite dans des neurones d'hippocampe en culture, lesquels étaient résistants à une anoxie prolongée avant la formation des synapses, mais devenaient très sensibles au même type d'agression après la synaptogenèse, les neurones matures se détériorant en l'absence d'oxygène (Rothman, 1983). D'autre part, en bloquant l'activité synaptique de ces neurones par addition de fortes concentrations de magnésium, les effets délétères de l'anoxie étaient supprimés (Clark & Rothman, 1987). L'activité synaptique serait donc nécessaire pour que l'hypoxie conduise à une mort neuronale. Le rôle particulier du glutamate, neurotransmetteur important des neurones de l'hippocampe, a été démontré par le fait que la section *in vivo* des voies glutamatergiques afférentes aux régions CA1 de l'hippocampe s'opposait à la neurodégénérescence provoquée par l'hypoxie/ischémie (Pulsinelli, 1985; Benveniste *et al*, 1988).

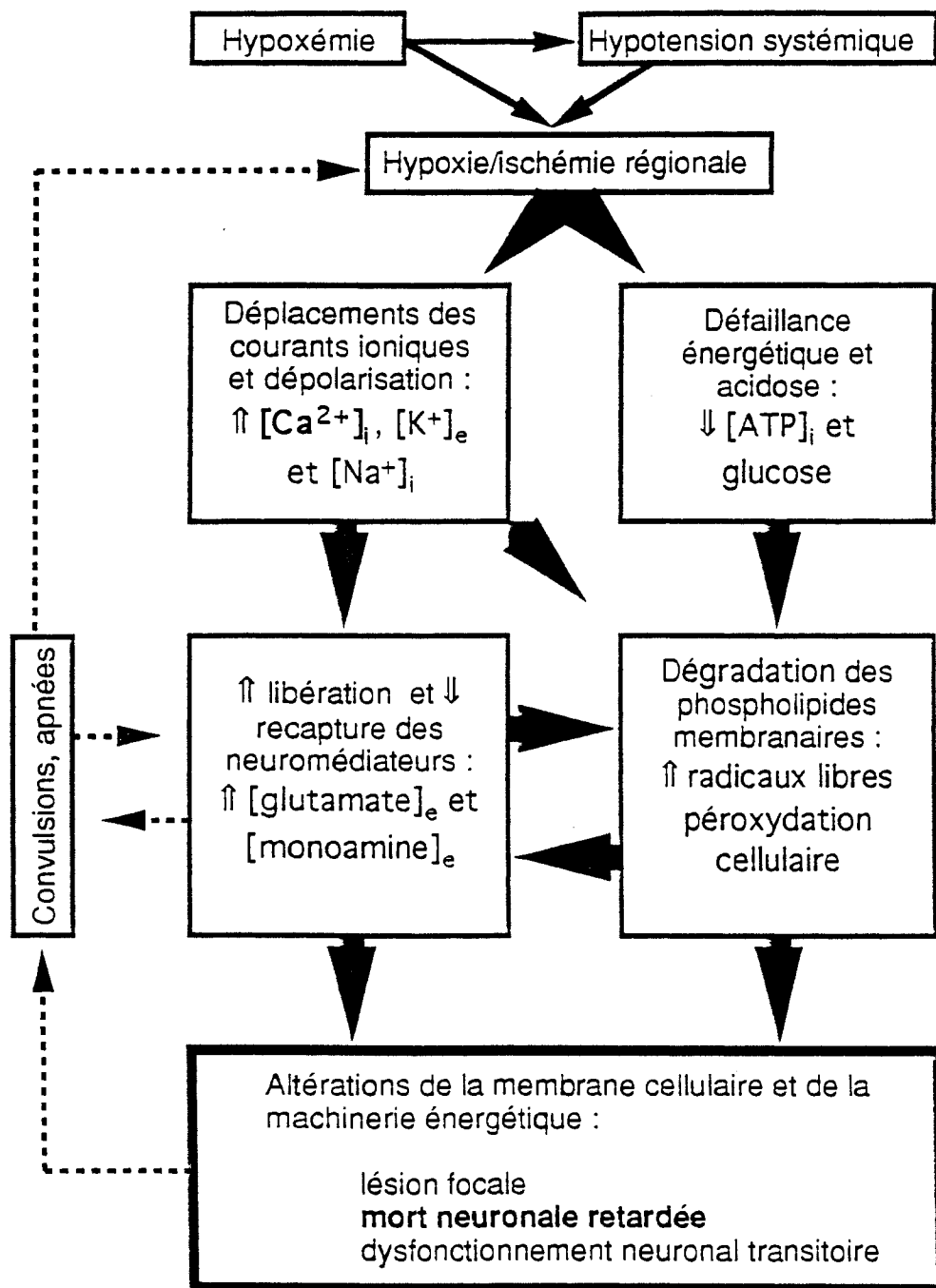


Figure 2:

Evénements cellulaires et moléculaires à l'origine de la mort neuronale retardée périnatale d'origine hypoxique/ischémique. Modifiée d'après Johnston (1993). e : extracellulaire; i : intracellulaire.

4.3.2 accumulation du glutamate extracellulaire

Durant la phase aiguë d'une ischémie cérébrale focale produite par l'occlusion unilatérale d'une artère cérébrale moyenne, diverses substances tant neurotoxiques (aspartate, glutamate, dopamine) que neuroprotectrices (taurine, GABA, adénosine) sont libérées dans le liquide extracellulaire (Hillered *et al*, 1989).

L'élévation des taux d'acides aminés excitateurs à la suite de l'ischémie/hypoxie a été observée aussi bien dans les modèles *in vivo*, par les techniques de microdialyse (Shimada *et al*, 1993; Wahl *et al*, 1994; Benveniste *et al*, 1984), que dans les modèles *in vitro*, par le dosage du glutamate dans les milieux de culture (Drejer *et al*, 1985; Uchiyama-Tsuyuki *et al*, 1995).

La libération de glutamate dans le milieu extracellulaire apparaît donc comme une conséquence de l'ischémie, tant sur le neurone (Rothman & Olney, 1986; Sochocka *et al*, 1994) que sur l'environnement glial (Ogata *et al*, 1995; Drejer *et al*, 1985). Cet effet est parallèle à l'inhibition de la recapture du glutamate pendant l'hypoxie/ischémie (O'Neill *et al*, 1994), tandis que les neurones survivant à une hypoxie (Sher & Hu, 1990) ou à une ischémie (Koyama *et al*, 1995) présentent une activité accrue de ces systèmes de recapture.

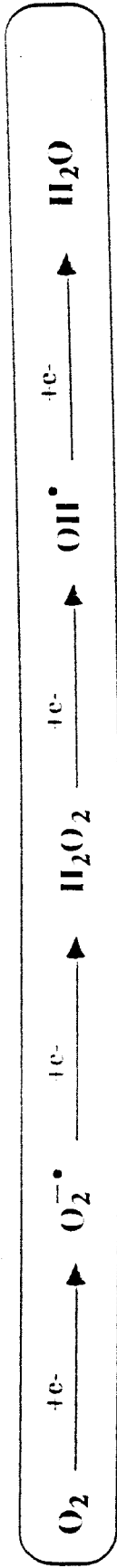
4.4. production de radicaux libres: le stress oxydatif

Le rôle crucial des radicaux libres issus de l'oxygène dans la médiation de la mort cellulaire suivant l'exposition à l'hypoxie/ischémie a été établi lors d'études de différents modèles tant *in vivo* que *in vitro*. Il a en effet été montré une augmentation significative de la production de radicaux libres dans le système nerveux central, que ce soit pendant la phase anoxique, pendant la reperfusion/réoxygénation, ou même plus tardivement lorsque les conditions initiales sont restaurées.

La nature, l'origine, les effets cytotoxiques ainsi que les mécanismes d'action de ces radicaux libres seront passés en revue dans le chapitre suivant.

4.5. schéma récapitulatif

Les événements moléculaires et cellulaires à l'origine de la mort neuronale retardée à la suite de l'hypoxie/ischémie sont résumés ci-contre (fig.2).



1^{ère} Étape : Formation des anions Superoxyde :

2^{ème} Étape : La transformation des anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

- 3^{ème} Étape : La transformation du H₂O₂ en H₂O :
- Voie principale (1)
 - Voie du Catalase (2)
 - Voie Fe⁺⁺/Fe⁺⁺⁺ (3)
- } Formation de radical hydroxyl

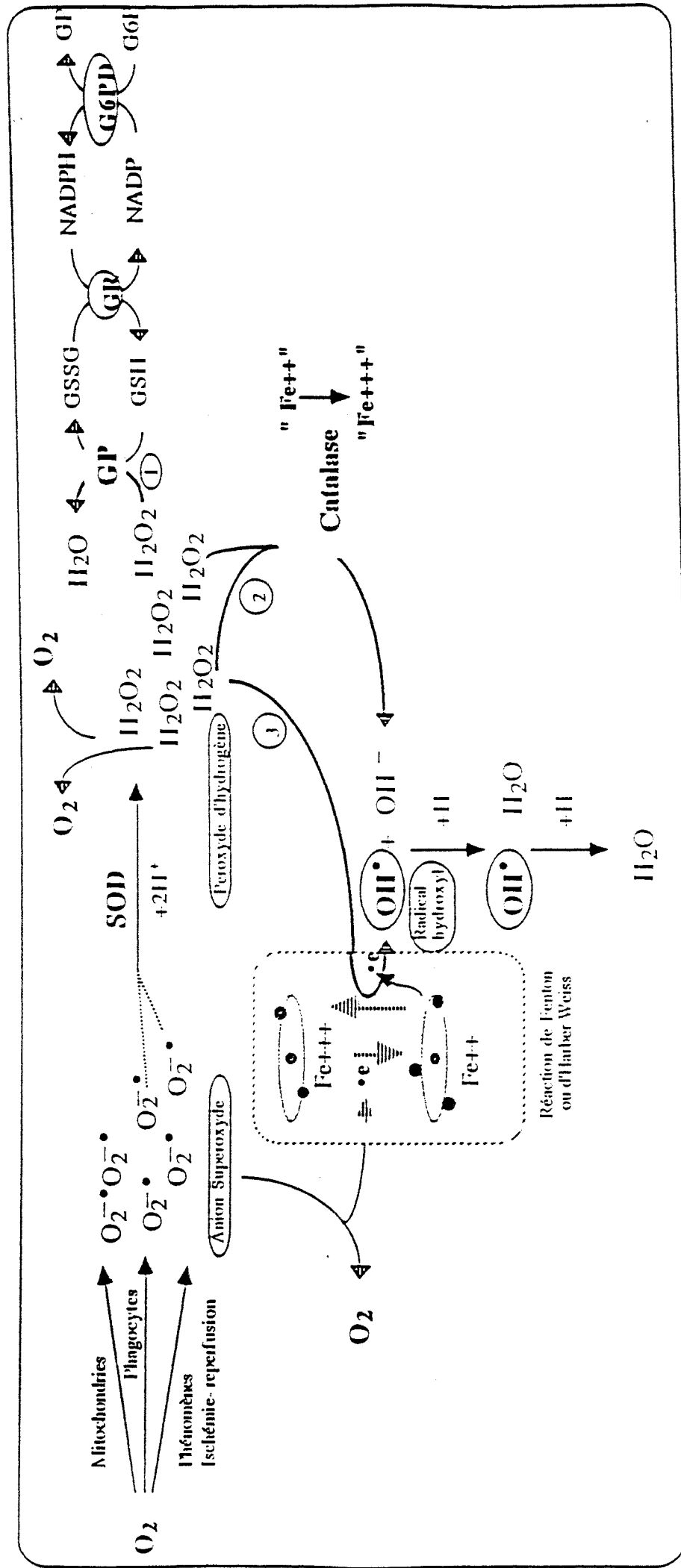


Figure 3: Production des radicaux libres issus de l'oxygène

II. LES RADICAUX LIBRES DERIVES DE L'OXYGENE

1) Définition

Un radical libre est un atome ou une molécule comportant un électron non apparié sur une orbitale externe. Ainsi, plusieurs espèces de dérivés réactifs de l'oxygène tels que l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$ sont produits dans des systèmes biologiques par le biais de mouvements d'électrons (fig.3).

2) Cytotoxicité

De par leur configuration spéciale, les radicaux libres sont extrêmement réactifs et sont capables de transformer ou de convertir nombre de molécules ou de composés cellulaires comme les acides gras des lipides membranaires, les protéines, l'ADN, pouvant alors générer de nouveaux radicaux libres par une réaction en chaîne, ce qui va résulter en des lésions irréversibles de la cellule.

Dans les conditions physiologiques normales, la cellule produit des radicaux libres (production basale) sans qu'une accumulation de ceux-ci n'atteigne un seuil critique où ils deviennent toxiques, cela grâce à des mécanismes de défense par l'action combinée d'enzymes détoxifiantes (superoxyde dismutase, catalase) et d'antioxydants biologiques (glutathion, vitamine C, vitamine E, composés thiol, stérols). L'affaiblissement de ces mécanismes de défense à la suite d'une perturbation du métabolisme cellulaire, de nature exogène (facteurs du milieu) ou endogène (expression génique, synthèse protéique), va conduire à la surproduction et à la surcharge de ces radicaux libres, entraînant une cytotoxicité.

3) Implication dans l'hypoxie/ischémie

3.1. origine des radicaux libres produits par les cellules soumises à l'hypoxie

Dans le chapitre précédent, nous avons évoqué un possible mécanisme associé aux effets délétères de l'hypoxie: la production par la cellule d'espèces réactives, à savoir les radicaux

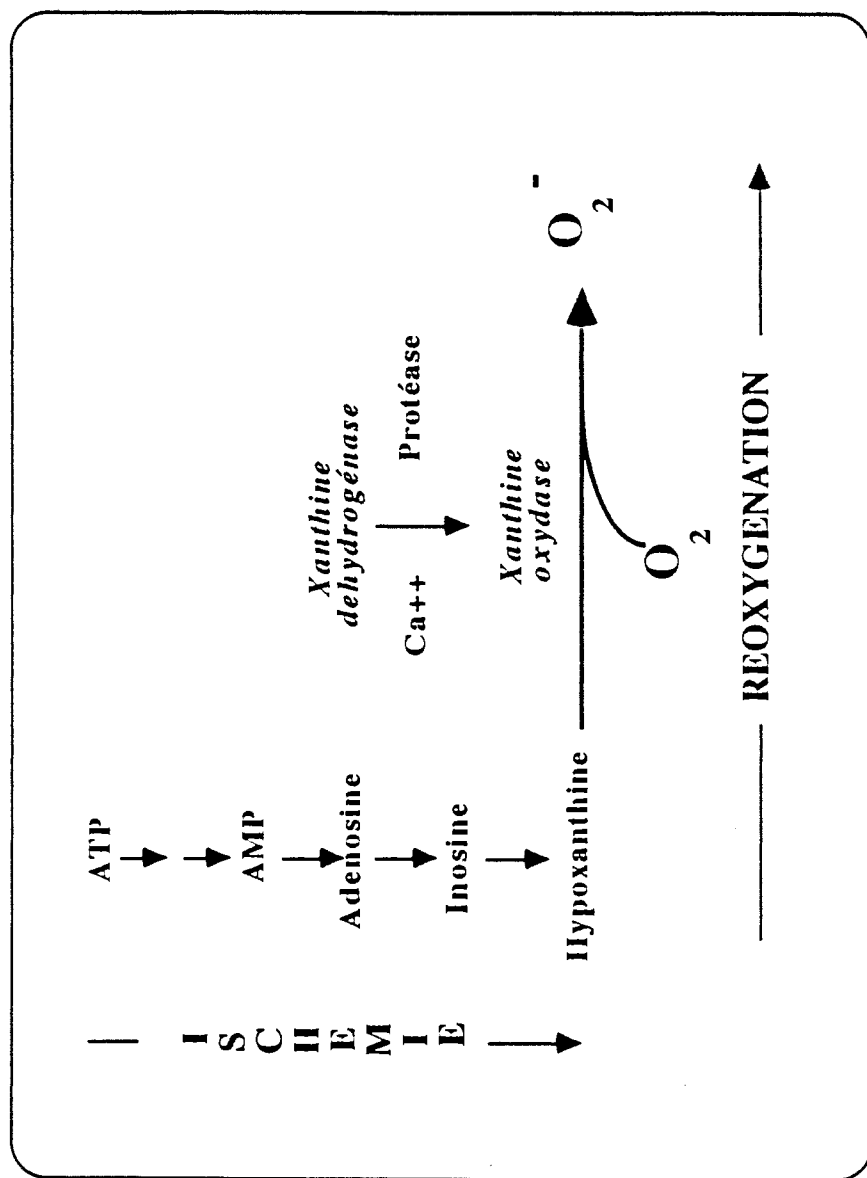


Figure 4:

Production du radical libre superoxyde au cours de l'ischémie/réoxygénation à travers le système hypoxanthine/xanthine oxydase.

libres dérivés de l'oxygène. Parmi les sources possibles des radicaux ainsi générés, le système de transporteurs d'électrons mitochondrial est au premier rang, la privation d'oxygène empêchant le transit complet des électrons vers la cytochrome c oxydase. Les radicaux libres sont alors produits à proximité de cette enzyme terminale du système de transport d'électrons.

Par ailleurs, l'augmentation du calcium libre cytosolique pendant l'hypoxie active diverses oxydases intracellulaires au nombre desquelles la xanthine oxydase, considérée comme la source majeure des anions superoxydes dans les lésions tissulaires post-ischémiques. Ainsi, cette enzyme est initialement sous forme de xanthine déshydrogénase, forme sous laquelle elle ne possède pas le pouvoir de transfert d'électrons au niveau de la molécule d'oxygène et est donc incapable de former des radicaux libres dans le tissu sain. Dans une cellule en état de stress hypoxique, suite à l'accumulation du calcium cytosolique et sous l'effet d'une protéase, l'enzyme déshydrogénase est rapidement transformée en oxydase. La xanthine oxydase ainsi formée va oxyder l'hypoxanthine accumulée au niveau cytosolique sous l'effet de l'anoxie-ischémie et produire des radicaux libres oxydants (fig.4).

3.2.lésions cellulaires produites par les radicaux libres lors de l'hypoxie

3.2.1.peroxydation des lipides membranaires

L'interaction des espèces réactives dérivées de l'oxygène avec les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires induit la formation de radicaux lipoperoxydes et d'hydrolipoperoxydes, la lipoperoxydation étant par ailleurs auto-entretenu par l'effet des radicaux peroxy issus des lipides sur ces mêmes lipides. La propagation de ces réactions provoque une altération de la structure et de la perméabilité membranaires. De plus, la disparition des acides gras insaturés diminue la fluidité de la bicouche lipidique.

Des mesures directes dans le cerveau de rat soumis au cycle ischémie-reperfusion ont ainsi montré l'apparition de produits issus de la lipoperoxydation en liaison avec la production de radicaux libres (Sakamono *et al*, 1991).

Par ailleurs, l'acidose cellulaire en conditions hypoxiques provoque la dissociation du fer de ses protéines de liaison (ferritine, transferrine), la présence de fer libre associé aux radicaux libres participant alors à la propagation de la lipoperoxydation (Siesjö *et al*, 1985).

3.2.2.inhibition de fonctions cellulaires

Les radicaux libres concourent à l'inhibition par l'hypoxie des enzymes mitochondriales de la chaîne de transporteurs d'électrons et des enzymes antioxydantes détoxifiantes (glutathion peroxydase, superoxydes dismutases et catalase), ils s'autogénèrent ainsi en une réaction en chaîne qui exacerbe les effets délétères de l'hypoxie (Dunford, 1989; Rosenberg & Paller, 1991).

Ils participent également à la dérégulation des fonctions cellulaires en perturbant l'homéostasie ionique par leurs effets inhibiteurs sur divers pompes et canaux ioniques membranaires, par exemple en abaissant la sensibilité des canaux potassiques à l'ATP (Goldhaber *et al*, 1989) ou en réduisant l'activité des échangeurs d'ions Na/K-ATPase déjà affectés par la déplétion énergétique (Robert *et al*, 1991).

3.2.3.dommages subis par l'ADN

Le processus de réparation de l'ADN dépend de mécanismes cellulaires actifs liés à l'ATP. L'apparition des radicaux libres pendant l'hypoxie provoque des dommages accrus de l'ADN en réagissant avec les bases ou les parties osidiques, perturbant la complémentarité des brins et la structure de la double hélice (Brawn & Fridovich, 1981; Aruoma *et al*, 1989). Ces dommages s'aggravent car la diminution de l'ATP cellulaire en hypoxie ne permet plus la réparation.

3.2.4.dommages cellulaires provoqués par le monoxyde d'azote NO

L'accumulation de calcium intracellulaire provoque l'activation d'une enzyme, la nitric-oxyde synthase, laquelle est à l'origine de la production de monoxyde d'azote. Ce dernier est un radical libre qui, en réagissant sur l'ion superoxyde, produit du peroxynitrite, un radical particulièrement réactif et donc nocif (Haddad & Jiang, 1993; Johnston, 1993).

Le monoxyde d'azote et ses dérivés inhibent l'activité d'enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale et réduisent la capacité de la cellule à répondre au stress oxydatif lors de l'hypoxie/reperfusion, entre autre en inhibant la NAD(P)H réductase.

III. LE GLUTAMATE ET SES RECEPTEURS

1) Généralités

Le glutamate est un acide aminé dicarboxylique très répandu dans les systèmes biologiques. Les premières études menées en électrophysiologie ont fondé le rôle excitateur du glutamate au niveau du système nerveux central des vertébrés (Collingridge & Lester, 1989; Foster & Fagg, 1984). Il est apparu comme constituant d'un système ubiquitaire avec des systèmes de libération et de recapture et des sites synaptiques propres caractérisés par la liaison d'agonistes et d'antagonistes spécifiques. Ces caractères l'ont désigné comme un neurotransmetteur.

Le glutamate a été proposé comme support de signaux de développement durant l'histogénèse neuronale. Cet aspect fonctionnel du glutamate ressort des études de mort neuronale secondaire à une surexposition aux agonistes des récepteurs du glutamate, ce dernier paraissant activer le processus nécrotique. Il a alors été suggéré que le glutamate agirait comme le signal "stop" du développement cérébral en complément d'un autre acide aminé, le GABA (acide gamma-amino butyrique, neurotransmetteur inhibiteur), qui constituerait le signal "start". Ce système permettrait ainsi la création et l'adaptation continue des circuits neuronaux dans le cerveau des mammifères en développement, agissant au niveau de la croissance neuronale et de la synaptogénèse (Meier, 1988; Mattson *et al*, 1988).

Plus récemment, il a été avancé que le glutamate jouerait un rôle dans le phénomène de plasticité neuronale et plus particulièrement dans les processus de mémorisation tels que la potentialisation à long terme (Collingridge & Singer, 1990).

Par ailleurs, les acides aminés excitateurs tels que le glutamate et l'aspartate interviennent dans l'activité neuronale anormale observée dans diverses neuropathologies telles la migraine, l'épilepsie (Dingledine *et al*, 1990), et plus généralement dans les pathologies de type neurodégénératif (Meldrum & Garthwaite, 1990; Zorumski & Olney, 1993; Beal, 1992; Doble, 1995) telles que les maladies d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson ainsi que les encéphalopathies infectieuses ou consécutives à un accident vasculaire cérébral ou à une asphyxie.

2) Caractérisation des récepteurs du glutamate. Ligands spécifiques

A la suite des premières études de la liaison du glutamate à ses récepteurs dans divers environnements ioniques (Baudry & Lynch, 1981; Mena *et al*, 1982; Fagg *et al*, 1983; Nadler *et al*, 1985), il est apparu dans un premier temps qu'il existait trois types de sites:

- des sites Na⁺-dépendants
- des sites Na⁺-indépendants et Cl⁻/Ca²⁺-dépendants
- des sites Na⁺-indépendants et Cl⁻/Ca²⁺-indépendants

Les sites dépendant du sodium correspondent au système de recapture à haute affinité du glutamate, impliqué dans l'homéostasie de cet acide aminé excitateur en permettant sa recapture depuis le milieu extracellulaire vers les neurones ou les cellules gliales (Danbolt, 1994; Garlin *et al*, 1995). Les sites indépendant du sodium désignent les récepteurs du glutamate (Baudry & Lynch, 1981; Fagg *et al*, 1983; Nadler *et al*, 1985).

Par la suite, la découverte et l'emploi de différents ligands spécifiques (agonistes ou antagonistes) ont permis de mieux définir la pharmacologie des récepteurs du glutamate et d'établir une classification qui, bien que certainement pas définitive, est reconnue par tous.

2.1. propriétés générales des agonistes

A la suite de la découverte des propriétés excitatrices du glutamate, des études concernant les relations structure-activité de la molécule ont rapidement établi que, pour être optimale, une telle activité nécessitait la présence d'un groupement basique (aminé) et de deux groupements acides sur la molécule. Le groupement aminé doit être situé de préférence sur le groupement carboxyle alpha (le premier groupement acide), tandis que le second groupement acide doit être situé à la fin d'une chaîne (en position oméga) de trois à six atomes séparant les groupements acides chargés négativement. Le groupement acide oméga peut présenter une variation structurale très importante.

2.2. classification des récepteurs du glutamate

Les observations effectuées par Haldeman et coll. ont suggéré l'existence de plus d'un type de récepteurs. Ces auteurs ont en effet montré, dans la moelle épinière et dans d'autres régions du

système nerveux central, qu'il y avait des différences entre l'excitation provoquée par le glutamate et celle provoquée par l'aspartate ou par l'acide aminé souffré, le DL-homocystéate. Les excitations induites par le glutamate étaient très fortement atténuées par le L-glutamate diéthylester (GDEE) tandis que les autres n'étaient pas affectées (Haldeman & MacLennan, 1972).

De nombreux autres travaux ont suivi et ont révélé que les récepteurs des acides aminés excitateurs pouvaient être classés en fonction de leur susceptibilité au GDEE, au D-alpha-amino adipate (DAA) de même qu'à d'autres substances comme le D-2-amino-5-phosphonovalérate (D-APV).

Ces données ont permis une première classification des agonistes des récepteurs du glutamate en plusieurs groupes fonctionnels, à savoir:

- ceux qui sont très sensibles au GDEE et essentiellement non affectés par les autres antagonistes
- ceux qui sont bloqués par le DAA et le D-APV et insensibles au GDEE
- ceux qui sont affectés de manière intermédiaire par les deux classes d'antagonistes
- ceux qui sont peu affectés par l'un ou l'autre type.

Il est maintenant généralement admis sur la base de critères pharmacologiques qu'il existe trois types principaux de récepteurs, chacun réagissant avec un type donné d'agoniste:

(1) les récepteurs activés par l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) et dont les actions sont spécifiquement bloquées par le D-APV: récepteurs de type NMDA

(2) les récepteurs qui réagissent avec l'acide quisqualique et qui sont bloqués par le GDEE: récepteurs quisqualate, appelés dernièrement récepteurs de type AMPA (acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4-propionique) car la sélectivité de l'AMPA est plus importante que celle du quisqualate

(3) les récepteurs qui réagissent avec l'acide kaïnique et dont les actions sont largement épargnées par les deux antagonistes: récepteurs de type kaïnate

Il s'ajoute à cette première liste deux autres types de récepteurs de découverte plus récente:

	NMDA	AMPA	kainate	L-AP4	métabotropique	sites de transport
ancienne dénomination	--	quisqualate	--	L-APB	--	Glu
agoniste(s) spécifique(s)	NMDA	AMPA	--	L-AP4	--	
autres agonistes	Glu, Asp, ibotenate	Glu, kainate, quisqualate	Glu, kainate	Glu	quisqualate, ibotenate, Glu	
antagonistes spécifiques	CGP39653		kynurenate	--	--	
voies impliquées, caractéristiques	Na ⁺ /Ca ⁺⁺ /K ⁺ ion indépendant	Na ⁺ /K ⁺ 1 site haute affinité 1 site basse affinité	Na ⁺ /K ⁺ supposé en partie présynaptique 1 site faible affinité = site AMPA haute affinité 1 site haute affinité en régions pauvres en NMDA et AMPA	présynaptique Ca ⁺⁺ /Cl dépendant	métabolisme des inositol phosphates mobilité du Ca ⁺⁺ pendant le développement	Na ⁺ dépendants
rôles et fonctions	plasticité, transmission synaptique lente neurotoxicité	transmission synaptique rapide, neurotoxicité	neurotoxicité pour les kainate/AMPA	module l'excitation synaptique	haute activité durant la synaptogénèse, implication possible en neurotoxicité	recapture, stockage du Glu

Tableau : Classification des récepteurs du glutamate (d'après WATKINS, 1991)

(4) les récepteurs sensibles aux propriétés antagonistes puissantes de l'AP4 (2-amino-4-phosphonobutanoate) au niveau de sous-populations identifiées de synapses excitatrices de la moëlle ou du cerveau: récepteurs L-AP4, qui correspondent à des sites présynaptiques contrairement aux précédents qui sont tous postsynaptiques

(5) les récepteurs initialement décrits comme étant associés au métabolisme des phosphoinositols: récepteurs métabotropes

D'un point de vue fonctionnel, ces différents récepteurs peuvent être regroupés en deux grandes classes: les récepteurs ionotropes, c'est à dire couplés à un canal ionique, catégorie à laquelle appartiennent le récepteurs NMDA et les récepteurs dits "non-NMDA" (AMPA, kaïnate et L-AP4), l'autre catégorie étant constituée par les récepteurs métabotropes (tableau ci-contre).

3) Les différentes classes de récepteurs: structure, ligands et fonctions

• 3.1.les récepteurs ionotropes

3.1.1.*le récepteur NMDA*

Le récepteur NMDA est le mieux caractérisé des récepteurs des acides aminés excitateurs. Il est formé d'au moins trois entités: la région de reconnaissance du transmetteur, le canal ionique et une unité modulatrice (fig.5).

1) agonistes du récepteur NMDA

Les agonistes de ce récepteur ont une activité qui varie selon la fonction acide de la chaîne latérale. Leur affinité décroît comme suit: $\text{COOH} > \text{SO}_2\text{H} > \text{PO}_3\text{H}_2$ (Watkins & Olverman, 1987). Cependant d'autres types de fonction acide peuvent également être agonistes du récepteur NMDA, comme l'acide iboténique, contenant un radical isoxazole.

Les acides dicarboxyliques monoaminés avec une chaîne latérale de un à six atomes de carbone ont des propriétés agonistes avec l'activité maximale pour les acides aspartique et glutamique.

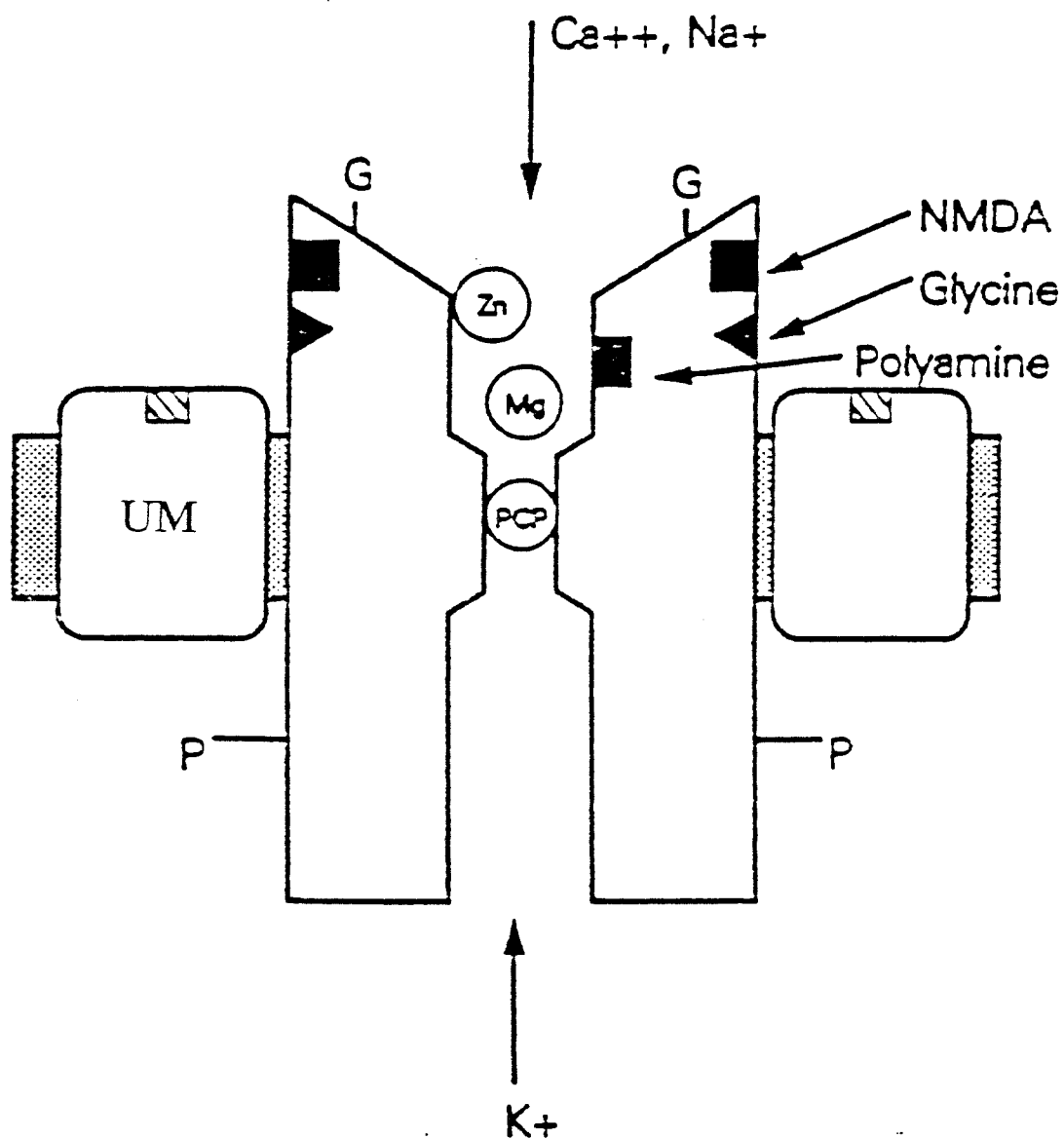


Figure 5:

Représentation schématique d'un récepteur NMDA (d'après Barnes et Henley, 1992).

UM: unité modulatrice G: site de glycosylation P: site de phosphorylation NMDA, glycine, polyamine: sites de liaison du NMDA, de la glycine et des polyamines PCP: site de liaison de la phencyclidine, antagoniste non compétitif (site PCP)

D'autres analogues de l'acide glutamique, comme l'acide trans-2,3-piperidinedicarboxylique et le cis-1(R)-amino-1,3(R)-dicarboxy-cyclopentane suggèrent que la conformation active de l'acide glutamique au niveau du récepteur NMDA pourrait être non pas linéaire, mais pliée.

L'acide quinolinique, métabolite hétéroaromatique du tryptophane, est également un agoniste des récepteurs NMDA.

2) antagonistes du récepteur NMDA

2.1. antagonistes compétitifs

Depuis une dizaine d'années, de nombreux antagonistes sélectifs de plus en plus puissants ont été découverts, les derniers agissant à concentration micromolaire.

Ces antagonistes sélectifs ont reçu la dénomination commune d'antagonistes NMDA "compétitifs" car ces molécules se fixent directement sur le site récepteur, entrant en compétition avec le ligand naturel et les divers agonistes du récepteur pour la liaison au site et empêchant ainsi la réponse cellulaire.

Ils peuvent être caractérisés par les particularités structurales suivantes:

- ce sont des acides aminés alpha possédant la configuration D
- la longueur de la chaîne qui sépare la fonction alpha-acide et la chaîne latérale acide est de quatre ou six atomes de carbone
- la puissance de l'antagoniste varie selon la nature de la fonction de la chaîne latérale de la manière suivante: $\text{PO}_3\text{H}_2 > \text{COOH} > \text{SO}_2\text{H}$ (Watkins & Olverman, 1987)

Des exemples de ces antagonistes sélectifs, parmi les plus puissants, sont:

- le DL-2-amino-5-phosphonovalérate (APV), encore appelé DL-2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5), et dans la même série, à puissance et sélectivité égales, le DL-2-amino-7-phosphonoheptanoate (AP7), tandis que d'autres composés de la même famille: le AP4, le AP6 et le AP8 sont moins puissants

- deux dipeptides avec des profils proches de l'APV: l'acide β -D-aspartylaminométhyl phosphonique (ASP-AMP) et l'acide γ -D-glutamylaminométhyl phosphonique (GLU-AMP)
- le plus puissant de tous: un analogue de l'APV, à structure plus rigide et approximativement trois fois plus puissant que l'APV: l'acide 3-[($\pm$)-2-carboxypiperazine-4-yl]-propyl-1-phosphonique (CPP), sous sa forme D
- deux composés et leurs dérivés, basés sur les structures de l'APV et du CPP: l'acide 1-(cis-2-carboxypiperidine-4-yl) méthyl-1-phosphonique (CGS 19755, équivalent CPP de l'APV) et l'acide DL-(E)-2-amino-4-méthyl-5-phosphono-3-penténoïque (CGP 37849 et un ester carboxyéthyl dérivé, le CGP 39551, qui sont de puissants anticonvulsivants après administration orale.

2.2. antagonistes non compétitifs

Un grand nombre de substances de structures chimiques variées ont également montré une capacité à bloquer la réponse au NMDA mais pas au kaïnate ni au quisqualate. Elles ont souvent des effets sur d'autres systèmes neuromédiateurs ou sur des canaux ioniques et sont ainsi sélectives seulement dans les termes de leur action sur les acides aminés excitateurs.

Ces substances produisent le blocage de la réponse NMDA par un mécanisme distinct de celui des antagonistes compétitifs et sont donc considérées dans leur ensemble comme antagonistes "non compétitifs".

Les résultats des études électrophysiologiques et pharmacologiques montrent que ces antagonistes non compétitifs interagissent avec le canal ionique associé au récepteur NMDA et que l'effet de ces antagonistes dépend de l'occupation du site récepteur puisque leur antagonisme vis à vis du récepteur est accru en présence d'agonistes NMDA.

Parmi ces composés, la phencyclidine (PCP, N-(1-phénylcyclohexyl)piperidine) et la kétamine bloquent la dépolarisation induite par le NMDA d'une manière non compétitive. Ainsi, les effets d'une combinaison de la kétamine et de l'APV sont plus grands que la somme de leur effet respectif, suggérant une action de la kétamine à un site distinct de celui emprunté par les antagonistes compétitifs: le site PCP.

Diverses substances exercent ainsi leur action d'antagoniste au niveau de ce site PCP, comme la (+)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]-cycloheptène-5,10-imine ou MK-801, un anticonvulsivant à propriétés neuroprotectrices, des σ -opiacées comme la cyclazocine et la N-

allylnormétazocine (SKF 10,047), des dérivés morphiniques (dextrophan), des substances psychotropes comme la chlorpromazine, l'halopéridol, des anesthésiques dissociatifs (dioxolanes).

L'ordre de puissance de l'action au site PCP est MK-801>PCP>SKF 10,047>halopéridol.

3) modulation allostérique du site récepteur NMDA

La glycine, neurotransmetteur inhibiteur principal de la moëlle épinière, est capable de potentialiser les réponses au NMDA et aux agonistes du récepteur en augmentant la fréquence d'ouverture du canal associé (Johnson & Ascher, 1987). De plus, la liaison du MK-801, antagoniste non compétitif, peut être accrue par la présence de glycine (Reynolds *et al*, 1987). Cet acide aminé est donc capable de moduler les récepteurs NMDA en interagissant au niveau d'un site allostérique (ou unité de modulation, encore appelée "site glycine").

La découverte du site glycine a permis par la suite de mettre en évidence des substances capables de bloquer la liaison et l'action de la glycine sur son site: les antagonistes de la glycine, avec en premier lieu l'acide kynurénique, plus puissant comme antagoniste de la glycine que comme antagoniste non-NMDA; également d'autres antagonistes à action mixte comme les quinoxalinediones CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) et DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione).

Les ions zinc antagonisent également de façon allostérique la réponse NMDA, et pourraient avoir un rôle régulateur au niveau des canaux ioniques des récepteurs NMDA, en modulant l'activité de ces sites couplée aux courants ioniques (Christine & Choi, 1990).

4) réponses NMDA et rôles physiologiques

Le canal ionique du récepteur NMDA est essentiellement perméable au calcium. Toutefois, des travaux en électrophysiologie ont montré que les courants ioniques activés par le NMDA concernent également le sodium et le potassium.

En absence de magnésium, les canaux NMDA sont indépendants du voltage. En présence de magnésium par contre, un blocage des courants ioniques caractéristique et dépendant du voltage peut être mis en évidence. L'effet du magnésium est maximal dans des conditions d'hyperpolarisation et virtuellement absent pour des différences de potentiel de -20mV et au-delà. Au niveau du potentiel de repos, le canal ionique activé par le NMDA est pratiquement totalement bloqué par les concentrations physiologiques de magnésium. Cependant, quand les

membranes sont dépolarisées, ce blocage par le magnésium disparaît. Un tel mécanisme pourrait être lié à la neurotoxicité du glutamate médiée par le récepteur NMDA (Cox *et al*, 1989), une dépolarisation ayant le même effet (Takahashi *et al*, 1995).

Il a également été montré que la liaison du L-glutamate au récepteur NMDA est réduite par les guanine nucléotides comme le GTP, suggérant l'implication possible d'une protéine G dans les événements médiés par le récepteur NMDA.

Le récepteur NMDA est localisé au niveau postsynaptique, en accord avec sa fonction synaptique (Monahan & Michel, 1987). Il est présent à des densités élevées dans le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe, le striatum, le septum et l'amygdale (Mori-Okamoto *et al*, 1989; Holopainen *et al*, 1990; Jones & Baughman, 1991).

Il joue un rôle important dans le phénomène de potentialisation à long terme, qui est un accroissement soutenu de l'activité synaptique après une stimulation tétanique brève de certaines voies excitatrices (Collingridge & Bliss, 1987). Ce phénomène aurait des implications importantes dans l'apprentissage, la mémoire et la plasticité neuronale (Collingridge & Singer, 1990).

3.1.2. le récepteur AMPA

Le récepteur AMPA a d'abord été appelé récepteur quisqualate, mais il s'est avéré par la suite que le quisqualate, bien qu'étant un neuroexcitant puissant agissant à faible concentration au niveau de récepteurs insensibles aux antagonistes NMDA, était peu spécifique du récepteur AMPA car il possède également une affinité élevée pour les récepteurs kaïnate et métabotropes. La découverte de l'AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate) a permis de caractériser sélectivement le récepteur quisqualate "à action rapide" et de le distinguer des autres sites auxquels le quisqualate se lie: il est donc devenu le "récepteur AMPA" (Honoré & Laurisden, 1982).

1) agonistes du récepteur AMPA

Avant la découverte de l'AMPA, les agonistes disponibles de ce récepteur étaient essentiellement le quisqualate et le L-glutamate, peu spécifiques mais possédant une bonne affinité de liaison, également un dérivé de l'acide iboténique, le 4-bromohomoiboténate, la willardiine (1-[2-amino-2-carboxyéthyl]uracile) et le β -L-ODAP (acide β -N-oxalyl- α , β -

diaminopropionique, extrait d'une plante indienne). Il est intéressant de noter que l'ordre de puissance des agonistes est exactement l'inverse de celui décrit pour le récepteur NMDA (en ce qui concerne les agonistes mixtes, peu sélectifs).

Il a été avancé que le glutamate interagirait avec le récepteur AMPA dans une conformation repliée, comme dans le cas du récepteur NMDA.

2) antagonistes du récepteur AMPA

Les premiers travaux ont utilisé le glutamate diéthylester (GDEE) mais il s'est révélé comme étant un antagoniste peu puissant et facilement hydrolysable. Beaucoup des antagonistes actuels des récepteurs AMPA sont peu sélectifs, bloquant également les récepteurs NMDA et kaïnate, comme par exemple l'acide kynurénique, le CNQX et le DNQX (déjà évoqués comme antagonistes du site glycine du récepteur NMDA), les piperazines 2,3-dicarboxylates, l'acide (α -glutamylamino)methanesulfonique (antagoniste kaïnate également).

En l'absence de glycine, le CNQX et le DNQX bloquent l'excitation induite par l'AMPA et le quisqualate avec une certaine sélectivité (pas d'effet sur la réponse NMDA) et une affinité relativement élevée, ce sont des antagonistes assez couramment utilisés.

3) réponse et rôles physiologiques du récepteur AMPA

Le récepteur AMPA est de type ionotrope, il est constitué du site récepteur proprement dit couplé à un canal ionique perméable aux ions sodium et potassium et associé à une protéine modulatrice.

Les récepteurs AMPA sont localisés préférentiellement dans les régions télencéphaliques, avec des densités élevées dans l'hippocampe (Craig *et al*, 1993), le cortex, le septum latéral, le striatum et le thalamus. Cette distribution correspond très étroitement à celle des récepteurs NMDA (Jones & Baughman, 1991), suggérant que les deux types de récepteurs pourraient agir de concert pour activer le neurone postsynaptique. Les travaux réalisés en électrophysiologie ont montré en effet que les réponses synaptiques rapides sont souvent bloquées par les antagonistes des récepteurs non-NMDA et que les réponses des récepteurs NMDA ne sont apparentes que dans certaines conditions comme par exemple l'activation haute fréquence. Ainsi, les récepteurs AMPA pourraient être des récepteurs dépolarisants à visée générale au niveau de nombreuses synapses excitatrices cérébrales.

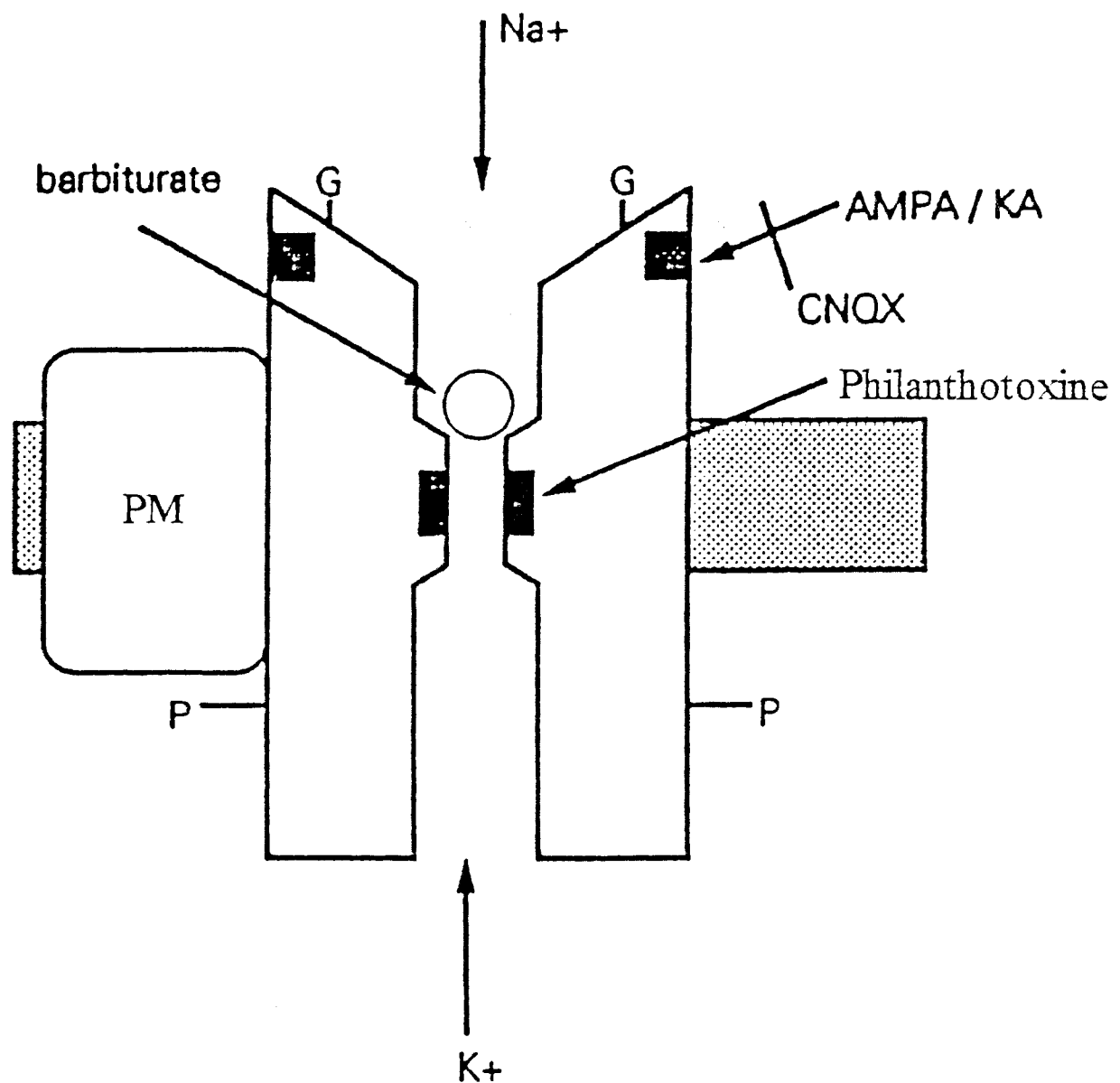


Figure 6:

Représentation schématique d'un récepteur de type non-NMDA (d'après Barnes et Henley, 1992). PM: protéine modulatrice G: site de glycosylation P: site de phosphorylation Philanthotoxine: site de liaison et de blocage de la toxine de guêpe

L'affinité de l'AMPA pour son site de liaison est fortement augmentée par des ions chaotropes comme l'ion thiocyanate SCN^- (Murphy *et al*, 1987). La présence de cet ion multiplie par quatre la liaison de l'AMPA à son site récepteur. Il semble que le site de liaison AMPA existerait sous deux formes interconvertibles et que l'effet des ions SCN^- serait de promouvoir la formation d'un état moléculaire pour lequel l'AMPA a davantage d'affinité.

3.1.3. le récepteur kaïnate

Le kaïnate et l'AMPA se lient à des sites récepteurs de structure similaire, en référence à un type général de récepteur appelé "non-NMDA" (fig.6). Diverses observations suggèrent cependant que le kaïnate (acide α -kaïnique, isolé de l'algue *Digenea simplex*) et l'AMPA activent séparément deux types distincts de récepteurs non-NMDA (Barnes & Henley, 1992). En effet, il existe dans les membranes des cerveaux de mammifères des sites de liaison à haute affinité pour le kaïnate qui sont peu sensibles à l'AMPA. Par ailleurs, la puissance relative d'agonistes de nombreux sites activés par le kaïnate, par exemple dans la moëlle épinière ou l'hippocampe de rat, est très différente de celle observée pour des réponses au quisqualate ou à l'AMPA. Les récepteurs sensibles au kaïnate se désensibilisent lentement, voire pas du tout, tandis que les récepteurs sensibles à l'AMPA se désensibilisent généralement très rapidement de façon concentration-dépendante. Enfin, les distributions en autoradiographie des sites de liaison de l'AMPA et du kaïnate dans le système nerveux central des mammifères présentent des différences régionales marquées.

Cependant, d'autres données expérimentales sont en faveur d'un site d'action commun additionnel pour le kaïnate et l'AMPA (Barnard & Henley, 1990): ainsi, les canaux ioniques activés par le kaïnate et par l'AMPA sont affectés d'une manière similaire par tous les bloqueurs de canal connus. Les barbiturates bloquent les canaux activés par chacun des agonistes avec une affinité semblable, tandis que la philanthoxine, une toxine de guêpe, bloque les réponses évoquées tant par le kaïnate que par l'AMPA alors qu'elle n'affecte pas le canal couplé au récepteur NMDA. Dans des oocytes de *Xenopus* où l'ARN messager total de cerveau de rat a été injecté, les conductances évoquées par l'AMPA sont compétitives et non additives avec celles évoquées par le kaïnate, ce qui implique que l'AMPA activerait au moins dans certains cas le même canal que le kaïnate (les réponses AMPA et kaïnate montrent alors une désensibilisation croisée). Enfin, les sites de liaison du kaïnate à faible affinité seraient équivalents aux sites de liaison du quisqualate à haute affinité.

1) agonistes du récepteur kaïnate

La chaîne latérale isopropyle insaturée de l'acide kaïnique, agoniste prototype de ce récepteur, apparaît essentielle pour une activité élevée puisque l'acide dihydroxykaïnique a moins d'activité que le glutamate qui est lui-même un agoniste très peu puissant. De nombreux stéréoisomères de l'acide kaïnique ont été évalués en tant qu'agonistes, incluant l'acide α -allokaïnique et β -kaïnique qui n'ont cependant qu'une très faible activité. Les analogues cis- et trans-4-méthylcétone ont une activité neuroexcitatrice similaire à celle de l'acide kaïnique. L'acide domoïque, provenant d'une autre algue *Condria armata* est un agent encore plus puissant que l'acide kaïnique à son site récepteur.

2) antagonistes du récepteur kaïnate

Les antagonistes connus du récepteur kaïnate sont peu puissants et peu spécifiques, parmi eux des agents anticonvulsivants déjà évoqués en tant qu'antagonistes AMPA comme l'acide méthanesulfonique(α -glutamylamino), les piperazines-2,3-dicarboxylates, le CNQX et le DNQX (antagonistes généraux "non-NMDA").

3) réponses et rôles physiologiques du récepteur kaïnate

Les antagonistes non-NMDA ont les mêmes effets inhibiteurs sur les augmentations des décharges neuronales induites par le kaïnate, l'AMPA et le quisqualate, suggérant un mécanisme d'action commun aux récepteurs AMPA et kaïnate, par exemple un même type de canal ionique (Barnard & Henley, 1990).

Le kaïnate est cependant capable d'induire un certain nombre de réponses neuronales indépendantes de celles des récepteurs AMPA. Dans des neurones en culture, kaïnate et quisqualate activent des canaux qui ont des propriétés de conductance et de désensibilisation différentes. La localisation des sites de liaison du kaïnate est différente des récepteurs AMPA ou NMDA, mais correspond bien à des régions cérébrales très vulnérables aux effets neuroexcitateurs et neurotoxiques des analogues de l'acide kaïnique, telles que l'aire CA3 de l'hippocampe, le cortex et le septum latéral (Collingridge & Lester, 1989).

3.1.4. le récepteur L-AP4

Contrairement aux récepteurs précédents qui sont définis par la liaison d'agonistes spécifiques à action excitatrice, le récepteur L-AP4 a été mis en évidence par l'action inhibitrice d'un analogue du glutamate, l'acide L-2-amino-4-phosphobutanoïque (L-APB ou L-AP4). En effet, ce composé s'est révélé un puissant antagoniste des réponses synaptiques dans des régions du système nerveux central comportant une neurotransmission excitatrice comme la moëlle épinière, l'hippocampe et le cortex olfactif.

1) identification

Divers travaux ont permis l'identification d'une classe de récepteurs distincte de celles précédemment caractérisées (Foster & Fagg, 1984). Ainsi, il a été montré que, dans les régions synaptiques sensibles à l'inhibition par le L-AP4, les antagonistes du récepteur NMDA sont des inhibiteurs peu puissants. D'autre part, les réponses excitatrices au quisqualate et au kaïnate sont insensibles à des doses de L-AP4 qui provoquent une inhibition maximale des réponses synaptiques. Ces données suggèrent l'existence d'une quatrième classe de récepteur.

2) localisation et fonctions

A l'exception des cellules bipolaires de la rétine, dans lesquelles le L-AP4 active sélectivement des récepteurs polysynaptiques, les récepteurs L-AP4 sont principalement localisés sur des terminaisons nerveuses présynaptiques, suggérant une fonction d'autorécepteurs contrôlant la libération de glutamate.

Dans la rétine, le L-AP4 agit en affectant l'hyperpolarisation de manière analogue à un transmetteur naturel par un mécanisme impliquant la fermeture de canaux ioniques.

Dans l'hippocampe, le cortex olfactif et la moëlle épinière, des études en électrophysiologie ont montré que le L-AP4 inhibe les potentiels postsynaptiques excitateurs (EPSP) induits par le glutamate.

La sensibilité des voies synaptiques au L-AP4 est variable selon les régions, la voie perforante latérale du gyrus dentelé de l'hippocampe et le faisceau latéral olfactif, principale voie efférente du bulbe olfactif chez le rat, sont parmi les plus affectées par l'inhibition au L-AP4.

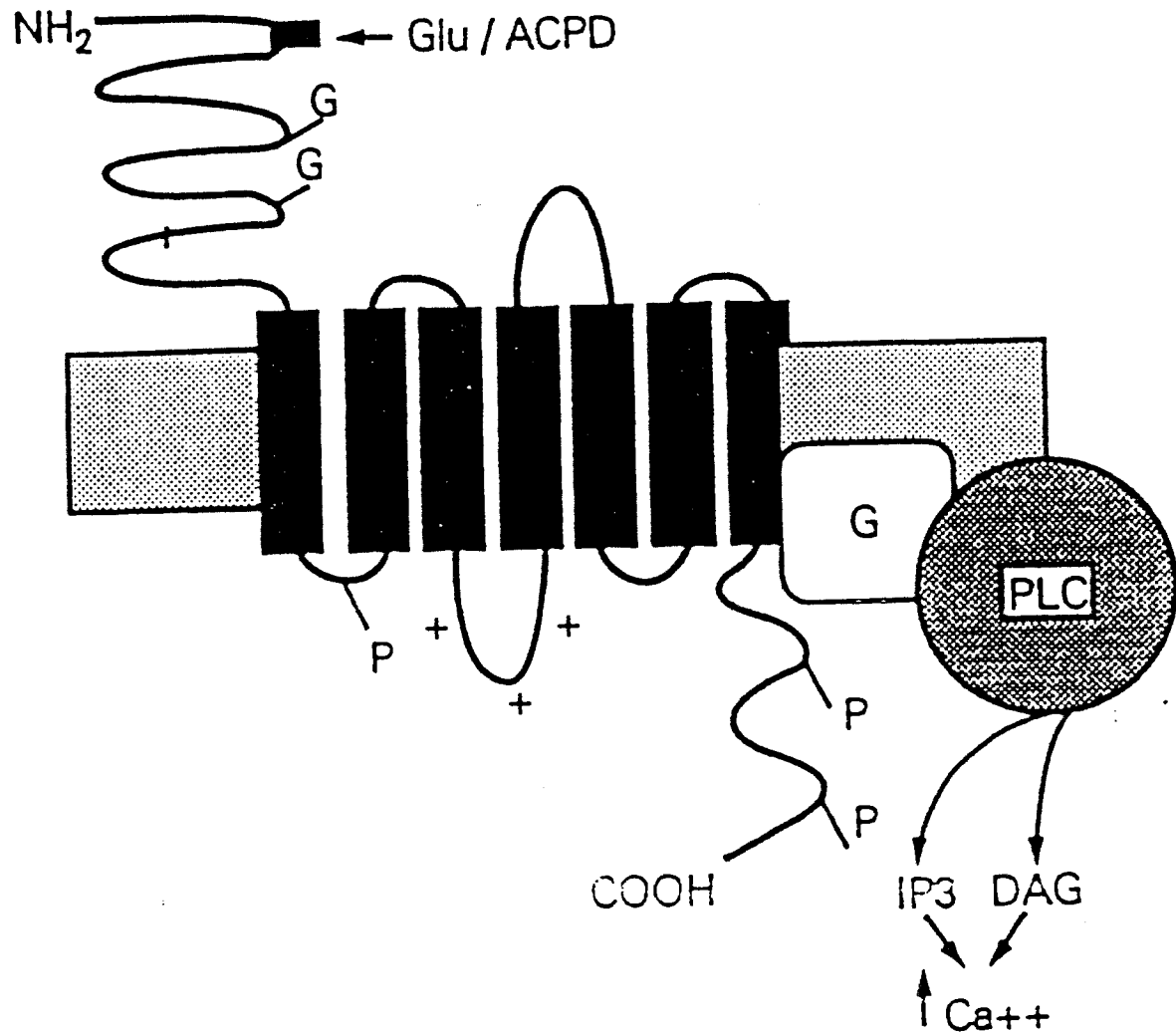


Figure 7:

Représentation schématique d'un récepteur métabotrope couplé à une protéine G (d'après Barnes et Henley, 1992). PG: protéine G PLC: phospholipase C IP₃: D-inositol-1,4,5-trisphosphate DAG: diacylglycérol G: site de glycosylation P: site de phosphorylation

Les mécanismes précis par lesquels le L-AP4 exerce son action antagoniste ont été évalués lors d'une étude sur des neurones de bulbe olfactif en culture, par la mesure de l'inhibition exercée par le L-AP4 sur les EPSP monosynaptiques et les courants calciques voltage-dépendants à haut seuil (Trombley & Westbrook, 1992). Cette inhibition étant bloquée par la toxine pertussis, il a été suggéré que les récepteurs présynaptiques L-AP4 sont couplés à une protéine G de façon similaire à d'autres types de récepteurs présynaptiques, comme les récepteurs GABA_B, adénosinergiques A₁ et α 2-adrénergiques, et agissent au niveau membranaire en bloquant l'influx calcique.

• 3.2.les récepteurs métabotropes

3.2.1.caractérisation

La plupart des effets des acides aminés excitateurs ont été attribués à leur interaction avec des récepteurs couplés à des canaux ioniques. Des travaux plus récents ont cependant mis en évidence un autre mécanisme d'action du glutamate: l'hydrolyse des phosphoinositides, suggérant une nouvelle classe de récepteurs différant radicalement des précédentes, regroupés sous le terme générique de "récepteurs métabotropes", par opposition au type ionotrope (Sladeczek *et al*, 1988). Ces récepteurs joueraient un rôle dans les fonctions cérébrales et seraient impliqués dans leur pathologie (Schoepp & Conn, 1993; Schoepp *et al*, 1990).

Il est maintenant bien établi que lorsque certains signaux externes incluant des hormones, des neurotransmetteurs ou des facteurs de croissance se lient à leur récepteur, ils stimulent l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5,-trisphosphate (IP₃), chacun d'eux tenant lieu de second messenger. Le DAG est le second messenger opérant au niveau de la membrane en stimulant la protéine kinase C, tandis que l'IP₃ est libéré dans le cytosol afin de mobiliser le calcium du reticulum endoplasmique. Dans la plupart des cas, le PIP₂ est hydrolysé par une phosphodiesterase, la phospholipase C, couplée au récepteur de surface au moyen d'une protéine G. Dans certains systèmes, la phospholipase C peut être directement stimulée par l'élévation des concentrations en calcium intracellulaire.

Le glutamate partagerait avec ces substances le système de transduction de la voie des phosphoinositides. En effet, il stimule également la production des inositols phosphates par l'intermédiaire de récepteurs métabotropes couplés à des protéines G (fig. 7).

Il existe également des récepteurs de type métabotrope couplés à d'autres systèmes de transduction comme l'enzyme adénylate cyclase, qui aboutit à la production d'AMP cyclique (Winder & Conn, 1995), ou la phospholipase A2, à l'origine de la libération d'acide arachidonique (Johnston, 1993), mais ceux-ci ont encore été peu étudiés.

3.2.2.pharmacologie des récepteurs métabotropes

Le quisqualate, l'iboténate et le glutamate sont des agonistes puissants de ces récepteurs, tandis que le NMDA, l'AMPA et le kaïnate n'en sont pas, indiquant bien une classe distincte de récepteurs du glutamate. Le trans-ACPD (trans-(±)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate) stimule également le métabolisme des phosphoinositides, mais cet effet est inhibé par le LAβH (L-aspartate-β-hydroxamate) et par l'AP3 (2-amino-3-phosphono-propionate), qui sont des antagonistes non compétitifs des récepteurs métabotropes et interagiraient avec un site modulateur allostérique. De fait, la sensibilité variable de la réponse métabotrope aux agonistes et antagonistes suppose l'existence probable de trois sous-types distincts de récepteurs couplés à l'hydrolyse des phosphoinositides (Littman *et al*, 1993):

- un premier sous-type stimulé par le D-aspartate (D-Asp, par ailleurs un agoniste du récepteur NMDA) et insensible à l'action antagoniste du L-AβHA et du L-AP3, qui serait impliqué dans le développement (l'effet du D-Asp étant plus marqué chez le nouveau-né que chez l'adulte)
- un second stimulé par le trans-ACPD, le quisqualate et l'iboténate et bloqué par le L-AβAH et le L-AP3, présent à la fois dans l'hippocampe et le cortex cérébral
- enfin un troisième sous-type stimulé également par le trans-ACDP, le quisqualate et l'iboténate mais insensible au L-AβAH et au L-AP3, présent dans le cervelet.

3.2.3.localisation et fonctions

La localisation préférentielle de ces récepteurs dans les aires cérébrales télencéphaliques comme l'hippocampe, le cortex et le striatum suggère un rôle dans la fonction synaptique des centres nerveux supérieurs. Ils sont également présents dans le cervelet, associés aux cellules de Purkinje et aux cellules granulaires.

• 3.3. Apports de la biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de mieux cerner l'évolution des récepteurs du glutamate au cours de l'ontogenèse, et ont apporté des précisions quant à l'existence de différents sites au sein d'un type donné de récepteur, soulignant leur hétérogénéité spatiale ou temporelle et leur diversité par l'étude de l'expression de gènes spécifiques codant pour des sous-unités de récepteurs ionotropes (Wisden & Seeburg, 1993) ou métabotropes (Schoepp & Conn, 1993). L'expression différentielle de ces gènes au cours du développement est en relation directe avec les caractéristiques fonctionnelles des récepteurs, de type NMDA (MacBain & Mayer, 1994) ou non-NMDA (Pellegrini-Giampietro *et al*, 1992), en déterminant leur degré de perméabilité au calcium. La conductance du calcium dans les neurones aux stades précoces de développement serait plus faible, et donc le seuil d'activation des récepteurs plus élevé.

4) Toxicité du glutamate vis-à-vis du neurone: l'excitotoxicité

4.1. Définition de l'excitotoxicité

La neurotoxicité potentielle du glutamate vis-à-vis du système nerveux central a été mise en évidence pour la première fois dans les neurones de rétine de souris (Lucas & Newhouse, 1957). Les observations de dégénérescence neuronale induite par les acides aminés excitateurs ont conduit Olney à proposer en 1971 l'hypothèse excitotoxique. Il a postulé que la neurotoxicité du glutamate était le résultat de la dépolarisation par cet acide aminé des membranes post-synaptiques à la suite de la liaison à ses récepteurs, induisant ainsi des modifications de l'homéostasie ionique de la cellule et des effets délétères à long terme. L'ensemble du processus a été désigné sous le terme d'excitotoxicité.

4.2. Mécanismes de l'excitotoxicité

4.2.1. généralités

Deux processus différents de la mort neuronale induite par le glutamate ont été identifiés, grâce essentiellement aux travaux réalisés sur des neurones en culture (Dessi *et al*, 1994; Choi, 1987).

Le premier se traduit par une mort cellulaire rapide, en quelques minutes, initiée par l'activation de récepteurs du glutamate, l'influx de sodium à travers les canaux couplés à ces récepteurs, l'entrée passive de chlorure dans le sens de son gradient électrochimique suivie d'une entrée d'eau, d'un gonflement et finalement de la lyse de la cellule. Ce processus fait suite à une exposition massive au glutamate, ce qui correspond à des conditions expérimentales assez éloignées des réalités physiopathologiques où l'accumulation du glutamate est progressive .

Le second, appelé mort cellulaire retardée, se caractérise par un décours temporel beaucoup plus long, initié principalement par les récepteurs NMDA (Rothman & Olney, 1987) et impliquant par la suite l'ensemble des récepteurs du glutamate, avec un important influx calcique et une série d'événements secondaires à l'accumulation de calcium cytosolique conduisant à la mort cellulaire au bout de plusieurs heures, voire de plusieurs jours. Cette mort cellulaire retardée correspond au processus induit par les perturbations des fonctions cellulaires neuronales à la suite de diverses pathologies, parmi lesquelles l'hypoxie/ischémie (Beilharz *et al*, 1995).

Le premier processus serait de type nécrotique, tandis que le second, par la durée de son déroulement, pourrait être de type apoptotique.

4.2.2. récepteurs impliqués

Les études effectuées *in vitro* ont montré que les divers agonistes des récepteurs du glutamate sont potentiellement toxiques (Frandsen *et al*, 1989; Frandsen & Schousboe, 1987; Frandsen & Schousboe, 1990), et donc que l'activation des différentes classes de récepteurs NMDA, AMPA, kaïnate, ou métabotropes peut provoquer la mort neuronale (Doble, 1995). Cependant, l'effet protecteur de divers antagonistes de ces récepteurs sur des neurones en culture a montré que la neurotoxicité du glutamate repose essentiellement sur l'activation du récepteur NMDA, les antagonistes pour les récepteurs quisqualate et kaïnate n'affectant pas cette neurotoxicité alors que les antagonistes NMDA la bloquent (Lysko *et al*, 1989; Choi *et al*, 1988; Hartley & Choi, 1989). Le rôle prépondérant du récepteur NMDA dans l'excitotoxicité serait lié à l'efflux calcique à travers le canal ionique du récepteur (Mody & MacDonald, 1995; Takahashi *et al*, 1995), et il a été montré que son activation spécifique par le NMDA provoquait la libération d'acides aminés excitateurs *in vivo* (Young & Bradford, 1991). Le glutamate induit par ailleurs la production de radicaux libres issus de l'oxygène, cet effet cytotoxique étant également provoqué par l'activation des récepteurs NMDA (Reynolds & Hastings, 1995). Enfin, la dépolarisation du neurone et l'inhibition de l'activité de la protéine

kinase II calcium/calmoduline-dépendante, deux phénomènes impliqués dans l'excitotoxicité et précédant la mort neuronale retardée, seraient médiées par le récepteur NMDA (Churn *et al.*, 1993; Churn *et al.*, 1995).

4.2.3. rôle du calcium

L'activation des récepteurs du glutamate résulte en l'élévation des taux de calcium cytoplasmique, ce qui induirait le processus conduisant finalement à la mort neuronale par une neurotoxicité de type NMDA (Michaels & Rothman, 1990). Deux mécanismes sont responsables de l'augmentation du calcium intracellulaire: une entrée de calcium depuis le milieu extracellulaire, consécutive à l'ouverture des canaux calciques liés aux récepteurs NMDA activés par la dépolarisation du neurone, qui lève le blocage de ces canaux par le magnésium (Hartley *et al.*, 1993); et une libération de calcium à partir de stocks intracellulaires tels que les mitochondries et le reticulum endoplasmique (Simpson *et al.*, 1993). En considération de l'inactivation et de la désensibilisation rapide des canaux calciques membranaires, il est probable que cette seconde voie soit essentielle pour aboutir à des taux intracellulaires de calcium toxiques pour le neurone (Mody & MacDonald, 1995).

L'augmentation du calcium intracellulaire va stimuler l'activité de nombreuses enzymes, protéases, lipases et nucléases, provoquant la destruction des membranes et du cytosquelette (Doble, 1995). Elle va également stimuler l'exocytose de vésicules de neurotransmetteur dans les terminaisons nerveuses, participant à la libération du glutamate (Sanchez-Prieto & Gonzalez, 1988).

4.2.4. voie de l'acide arachidonique

Le glutamate stimule la libération d'acide arachidonique dans les neurones, par le biais d'une activation des récepteurs NMDA et secondairement AMPA et métabotropes, provoquant la stimulation de lipases et de phospholipases à l'origine de la production d'arachidonate (Patel *et al.*, 1990). Ce dernier serait impliqué dans un processus physiologique, la potentialisation à long terme, mais également dans les dommages neuronaux associés à diverses pathologies neurodégénératives et à l'ischémie (Farooqui & Horrocks, 1994). De plus, la libération d'aspartate et de glutamate est réduite sous l'action d'inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique, suggérant un effet en retour de l'acide arachidonique sur les acides aminés excitateurs (Peterson *et al.*, 1995).

La privation de glucose pendant l'ischémie augmente cette libération d'acide arachidonique, impliquant une libération de glutamate pour la réponse médiée par les récepteurs NMDA, mais indépendamment du taux de glutamate extracellulaire et de l'augmentation de concentration du calcium cytosolique pour les réponses médiées par les récepteurs AMPA et métabotropes (Williams *et al*, 1995).

Enfin, l'élévation de la concentration en acide arachidonique inhibe la recapture du glutamate à haute affinité dépendante du sodium (déjà perturbée par la dérégulation de l'homéostasie ionique), contribuant à l'augmentation de la concentration extracellulaire du glutamate et donc à sa neurotoxicité.

4.3.L'excitotoxicité dans l'hypoxie/ischémie

Dans un chapitre précédent, nous avons établi un lien entre l'hypoxie/ischémie et le système glutamatergique, la vulnérabilité des neurones à l'hypoxie dépendant de la mise en place de synapses impliquant le glutamate, et ce dernier étant libéré pendant l'hypoxie/ischémie.

4.3.1.mécanismes d'action

L'accumulation du glutamate dans le milieu extracellulaire, observée pendant l'hypoxie/ischémie, conduit le neurone à une exposition prolongée à des doses toxiques de cet acide aminé excitateur, ce qui va suractiver ses récepteurs et entraîner une cascade d'évènements aboutissant à la mort cellulaire.

Il existerait plusieurs mécanismes possibles à l'origine de l'apparition d'un seuil toxique de concentration de glutamate extracellulaire au cours de l'hypoxie/ischémie:

- une libération du glutamate par exocytose à partir de stocks intracellulaires, dépendant du calcium et se produisant dès le début de l'ischémie (Drejer *et al*, 1985; Wahl *et al*, 1994)
- un déséquilibre dans les échanges transmembranaires du glutamate, entre la libération et le système de transport dépendant de l'énergie, avec une inhibition de la recapture pendant l'anoxie (Drejer *et al*, 1985). Ainsi, bien que le blocage *in vivo* du prélèvement du glutamate par l'administration d'un inhibiteur spécifique n'induit pas une accumulation suffisante pour provoquer une neurotoxicité dans le striatum de rat (Massieu *et al*, 1995), il a été montré *in*

vitro qu'une telle inhibition potentialise la toxicité du glutamate sur des neurones d'hippocampe (Robinson *et al*, 1993).

- l'inversion du système de transport intracellulaire électrogène
- la lyse des populations cellulaires les plus vulnérables, qui relarguent ainsi leur contenu en glutamate dans le milieu extracellulaire

Le glutamate libéré dans le milieu extracellulaire va se fixer et activer divers types de récepteurs. La protection des antagonistes du récepteur NMDA contre l'hypoxie, pour des neurones *in vitro* ou *in vivo*, souligne le rôle de ce récepteur dans la survenue des dommages suivant l'hypoxie/ischémie (Schurr *et al*, 1995; Maier *et al*, 1995).

L'hypoglycémie qui accompagne l'ischémie est également un médiateur de l'excitotoxicité. En effet, il semble qu'une courte période de privation en glucose changerait la sensibilité des neurones au glutamate, et donc impliquerait un changement dans la neurotoxicité du glutamate. Ainsi, il a été montré que des concentrations de glutamate ou de NMDA en-dessous du seuil de toxicité deviennent toxiques pour des neurones corticaux en insuffisance métabolique (Rajdev & Reynolds, 1994). L'inhibition métabolique pendant l'ischémie provoquerait une activation des récepteurs NMDA à caractère toxique après retour en conditions normales (Vornov, 1995), ce qui pourrait expliquer le délai entre la fin de l'exposition et l'apparition des effets neurotoxiques et donc le phénomène de mort neuronale retardée.

Par ailleurs, une réduction prolongée de l'apport en glucose pourrait contribuer dans le temps à augmenter les taux du glutamate extracellulaire apparu pendant l'ischémie, à l'origine finalement d'un cercle vicieux avec libération de glutamate induite par le glutamate.

4.3.2. ontogenèse

Dans les modèles d'hypoxie/ischémie périnatale *in vivo*, le glutamate est neurotoxique et cette toxicité est particulièrement marquée chez l'animal immature, l'ordre de toxicité des analogues du glutamate étant NMDA>AMPA>kainate (MacDonald & Johnston, 1990). Le pic de sensibilité maximale au NMDA chez le rat est observé à l'âge de six jours, celui au AMPA à dix jours, ces résultats étant corroborés par ceux d'études menées *in vitro* (Frandsen & Schousboe, 1990).

Or, le profil développemental de la mort neuronale hypoxique/ischémique est similaire à celui de la mort neuronale médiée par le NMDA. La vulnérabilité particulière du cerveau de l'animal immature vis-à-vis de l'hypoxie/ischémie pourrait s'expliquer par l'expression transitoire d'une forte densité de récepteurs NMDA pendant le développement cérébral (Johnston, 1993). De plus, il a été montré chez le cobaye *in vivo* qu'une hypoxie maternelle provoquait la modification de sites modulateurs des récepteurs NMDA de membranes du cerveau fœtal, cette modification pouvant être un mécanisme potentiel de neuroexcitotoxicité (Mishra & Delivoria-Papadopoulos, 1992).

Cependant, des études de l'effet des différents agonistes des récepteurs glutamatergiques, effectuées sur des neurones corticaux de souris en culture à divers stades de développement, ont montré qu'il n'existait pas de corrélation simple entre l'expression des sites de liaison des acides aminés excitateurs et leur capacité à induire une cytotoxicité, l'apparition des sites de liaison précédant en général celle de l'excitotoxicité (Wahl *et al*, 1991).

4.3.3. topographie

La distribution anatomique des récepteurs du glutamate, du récepteur NMDA en particulier, correspond étroitement à la localisation des lésions observées dans les modèles d'hypoxie/ischémie *in vivo*. L'exemple type est la région CA1 de l'hippocampe, très vulnérable à l'agression hypoxique et par ailleurs très riche en neurones glutamatergiques (Newell *et al*, 1990).

4.3.4. limites de l'hypothèse excitotoxique

Si le glutamate et ses récepteurs semblent souvent jouer un rôle prépondérant dans la survenue des dommages neuronaux après l'hypoxie/ischémie, il n'en demeure pas moins que l'excitotoxicité n'est pas la seule cause en jeu et peut même s'avérer d'importance mineure dans certains cas d'ischémie sévère, où la présence d'antagonistes NMDA n'empêche pas la mort neuronale à long terme (Goldberg *et al*, 1987).

L'effet de l'hypoxie est certes médié (au moins en partie) par les effets du glutamate, mais ils ne se superposent pas exactement, comme cela est apparu dans des coupes de motoneurones des nerfs vague et hypoglosse exposées à l'anoxie, où la dépolarisation n'est pas affectée par des antagonistes NMDA ou non NMDA, quoique le glutamate soit bien libéré dans le milieu extracellulaire; ou encore dans des neurones hippocampaux en culture exposés au glutamate,

où l'élévation des taux calciques intracellulaires est différente de celle provoquée par l'anoxie (Haddad & Jiang, 1993). Le rôle de la neurotoxicité du glutamate dans la mort neuronale suivant l'hypoxie/ischémie a été largement démontré dans de nombreux cas expérimentaux, mais il demeure des réserves sur cette hypothèse (Choi & Rothman, 1990).

Enfin, l'hypothèse excitotoxique repose largement sur les résultats de travaux effectués *in vitro*. La comparaison de ces études avec les observations *in vivo* a conduit à réévaluer le rôle du glutamate, notamment dans le cas de l'ischémie focale (Hossmann, 1994).

5) Implication des radicaux libres dans l'excitotoxicité

L'excitotoxicité est également associée à une production de radicaux libres. L'activation du récepteur NMDA secondaire à l'hypoxie conduit à la production simultanée d'espèces réactives dérivées de l'oxygène et d'oxyde nitrique, générant le radical libre peroxynitrite à l'origine de dommages cellulaires (Reynolds & Hastings, 1995; Gunasekar *et al*, 1995). La voie de dégradation de l'acide arachidonique conduit également à la formation de radicaux libres, par action sur les lipides membranaires, cet effet étant également médié par une excitotoxicité de type NMDA. En retour, ces derniers agissent sur les mécanismes de l'excitotoxicité, exacerbant les effets neurotoxiques du glutamate. Deux mécanismes possibles de cette action ont été mis en évidence lors d'études *in vitro*: la stimulation de la libération des acides aminés excitateurs et l'inhibition de leur recapture. Tous deux concourent à l'élévation des taux de glutamate extracellulaire et donc participent à ses effets délétères.

5.1. stimulation de la libération d'acides aminés excitateurs

Lors de l'hypoxie/ischémie, les neurones centraux libèrent du glutamate et de l'aspartate dans le milieu extracellulaire parallèlement à la production de radicaux libres (Cazeville *et al*, 1993). Or, il a été établi lors de travaux effectués sur des coupes d'hippocampe que ces radicaux libres provoquent une libération accrue d'acides aminés excitateurs (Pellegrini-Giampietro *et al*, 1990). Ce résultat est par ailleurs corroboré par d'autres observations expérimentales selon lesquelles les systèmes antioxydants protègent les neurones d'une dégénérescence de type excitotoxique, tandis que l'action d'enzymes connues pour générer les radicaux libres aggravent cette dégénérescence (Buisson *et al*, 1993; Manzoni & Bockaert, 1993).

5.2.inhibition de la recapture du glutamate

Dans les conditions physiologiques, le maintien de taux extracellulaires de glutamate faibles est assuré par des systèmes de transport du glutamate à grande capacité, fonctionnant pour une grande part au niveau des cellules gliales. Pendant l'ischémie, le glutamate est libéré et s'accumule dans l'espace extracellulaire du fait de l'inhibition de ces systèmes de transport. Les radicaux libres pourraient participer à un tel blocage de la recapture du glutamate: ceci a été montré sur des astrocytes corticaux en culture exposés au système générateur de radicaux libres xanthine et xanthine oxydase, ou directement au peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Volterra *et al*, 1994). Cette action inhibitrice serait liée d'une part à l'oxydation durable de groupements sulfhydryles des protéines du transport du glutamate, d'autre part à l'inactivation des pompes sodiques Na^+/K^+ -ATPase, la recapture dépendant des gradients sodiques transmembranaires (Danbolt, 1994; Garlin *et al*, 1995).

IV. BUT DE L'ETUDE

1) Cadre de l'étude et objectifs

Il est établi que le cerveau du nouveau-né résiste mieux à une privation en oxygène que celui de l'adulte, sa moindre vulnérabilité à l'hypoxie/ischémie ayant été corrélée à un métabolisme énergétique particulier et à de meilleures capacités d'adaptation. Toutefois, l'encéphalopathie hypoxique/ischémique demeure une cause majeure de morbidité périnatale. Elle entraîne divers types de déficits neurologiques, caractérisés cliniquement selon la région cérébrale atteinte, le degré d'agression tissulaire, et selon l'âge auquel survient la pathologie (prématuré, nouveau-né à terme ou stades ultérieurs de développement). Le traitement de l'asphyxie périnatale par l'oxygénothérapie, qui consiste à enrichir l'apport d'oxygène dans l'air inspiré, a également été impliqué dans la survenue de certaines pathologies consécutives à un stress oxydatif.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à la mort neuronale d'origine hypoxique/ischémique au cours de la période périnatale sont encore hypothétiques. En effet, l'interprétation des observations effectuées *in vivo* est rendue difficile par la complexité du cerveau, en raison de la présence de nombreux types cellulaires présentant des sensibilités différentes vis-à-vis de l'agression. De plus, des systèmes régulateurs périphériques, au niveau par exemple de la fonction cardiovasculaire, interfèrent dans la réponse cérébrale et les effets d'un mécanisme particulier sont difficile à appréhender, d'autant plus lorsqu'ils sont étudiés à long terme. Cependant, les observations effectuées sur les modèles *in vivo* ont fourni des informations qui ont permis d'avancer plusieurs hypothèses quant aux processus impliqués.

La perturbation du métabolisme énergétique pendant l'hypoxie/ischémie serait à l'origine d'une dérégulation des fonctions cellulaires, aboutissant à la perte de l'homéostasie ionique et à une surcharge cellulaire en calcium précédant la mort neuronale retardée. Consécutivement à l'accumulation extracellulaire de glutamate libéré par les cellules nerveuses, la stimulation des récepteurs des acides aminés excitateurs participerait à l'influx calcique et contribuerait à l'activation de systèmes enzymatiques aux effets délétères. Par ailleurs, des événements se produisant pendant la période de réoxygénation peuvent également être impliqués dans la survenue des dommages. En particulier, une production accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène serait responsable d'altérations membranaires à l'origine de lésions irréversibles.

Contrairement aux effets immédiats de l'ischémie cérébrale, les conséquences cellulaires de l'hypoxie-réoxygénation et leur déroulement temporel ont été très peu étudiés. Il a été mis au point au laboratoire un modèle reproductible *in vitro*, permettant d'évaluer le degré d'implication de facteurs particuliers dans la survenue à moyen terme des lésions post-hypoxiques dans des neurones centraux en culture pure, et d'analyser les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu (Daval *et al*, 1991). Les travaux réalisés au cours de cette étude se proposaient d'atteindre les objectifs suivants:

(1) mesurer la production neuronale de radicaux libres dérivés de l'oxygène, ces radicaux étant suspectés d'occuper une place prépondérante dans la cascade des événements qui contribuent au processus de mort cellulaire à la suite de l'asphyxie cérébrale, notamment en période néonatale. Nous avons focalisé l'étude sur l'anion superoxyde, car ce dernier, qui est formé par l'acquisition d'un électron sur la molécule d'oxygène, joue un rôle déterminant de par son caractère toxique propre et du fait qu'il est à l'origine de la formation du radical hydroxyle, particulièrement réactif et délétère. Il a été montré que les radicaux superoxydes sont présents dans le milieu extracellulaire cérébral lors d'une reperfusion post-ischémique, les radicaux formés dans la cellule diffusant à l'extérieur au travers d'un canal anionique. Etant donné la nature très réactive de ce composé, nous avons choisi de développer une méthode spectrophotométrique pour sa détection puis sa quantification dans le milieu de culture, en mesurant la réduction spécifique de l'acétyl-cytochrome c. Cette technique a été ensuite appliquée à l'hypoxie pour, dans un premier temps, établir l'évolution des taux de radicaux à l'issue d'un épisode hypoxique et au cours de la phase de réoxygénation. Nous avons évalué en parallèle l'influence de la présence de sérum dans le milieu de culture sur la production basale et post-hypoxique de superoxyde, afin de souligner le rôle que peuvent jouer les facteurs trophiques dans la réponse cellulaire. Dans un second temps, nous avons analysé l'impact de l'hypoxie sur le métabolisme énergétique et la production de radicaux libres en relation avec les conditions de réoxygénation, en normoxie ou avec une hyperoxie transitoire, afin d'évaluer l'effet potentiel d'un excès d'oxygène sur l'amplitude des phénomènes impliqués dans la survenue des lésions cellulaires post-hypoxiques

(2) analyser le degré de maturation des voies glutamatergiques dans notre modèle de neurones en culture, afin d'évaluer l'importance des processus excitotoxiques dans les conséquences de l'hypoxie/réoxygénation. Pour ce faire, l'expression des récepteurs des acides aminés excitateurs a été étudiée par l'analyse de la liaison du glutamate et son déplacement par des agonistes spécifiques des différentes classes de récepteurs du glutamate: NMDA, AMPA, kainate et métabotropes. Nous avons également évalué les propriétés fonctionnelles de ces récepteurs par l'étude de l'effet dépolarisant du glutamate sur les neurones

(3) déterminer la sensibilité des neurones en culture au glutamate et à ses analogues, afin de comparer les conséquences d'une exposition transitoire au glutamate à celles de l'hypoxie/réoxygénation. En vue de souligner la spécificité du neurone immature, nous avons effectué cette dernière étude à deux stades différents de maturation, à savoir sur des neurones après 6 jours et après 13 jours de culture

2) Présentation des résultats

La démarche adoptée pour la présentation des résultats suit un plan qui s'articule autour des principales publications issues du travail rapporté. Chacune d'entre elles est précédée d'un bref rappel des objectifs, puis un paragraphe décrit succinctement les techniques utilisées, les principaux résultats obtenus sont résumés, enfin les conclusions sont brièvement énoncées et replacées dans le contexte général.

V. SECTION EXPERIMENTALE

1) Mise au point d'une méthode d'évaluation de la production du radical superoxyde dans des cellules nerveuses soumises à diverses conditions de culture et application à l'hypoxie

1.1. objectif de l'étude

Afin de mesurer la production cellulaire de radicaux libres dérivés de l'oxygène à la suite de l'hypoxie/réoxygénation dans notre modèle, nous avons choisi de mettre au point une technique spectrophotométrique pour détecter et quantifier dans le milieu extracellulaire les radicaux superoxydes qui occupent une place importante parmi les espèces réactives. Nous avons ensuite appliqué cette méthode après hypoxie puis au cours de la période de réoxygénation dans les neurones en culture primaire. Nous avons également évalué l'influence de la composition du milieu de culture, avec ou sans sérum de veau fœtal, sur la production basale et post-hypoxique de radicaux superoxydes, afin de souligner le rôle que peuvent jouer les facteurs trophiques dans la réponse cellulaire à la privation d'oxygène.

1.2. approche expérimentale

Les cultures pures de neurones ont été obtenues par la méthode mise au point au laboratoire et décrite en détail dans l'annexe technique. Le milieu a été additionné de sérum de veau fœtal à 5% au cours du premier jour de culture, puis les neurones ont été placés dans un milieu sans sérum mais transitoirement enrichi en facteurs de croissance (pendant 48 heures). Un lot supplémentaire de neurones a été cultivé jusqu'au jour de l'expérimentation dans un milieu comportant du sérum à 2,5%.

Après 8 jours *in vitro*, les neurones ont été soumis à une privation d'oxygène par incubation pendant 6 heures dans un mélange gazeux constitué de 95%N₂ et 5%CO₂, un groupe témoin étant maintenu en normoxie (95% air et 5%CO₂). L'ensemble des cultures a été ensuite remplacé dans les conditions normoxiques standard pendant 3 heures. Des échantillons de milieu ont été prélevés à T₀, T_{6h} et T_{9h}, pour analyser leur teneur en O₂, CO₂, leur pH et la présence de radicaux superoxydes.

La technique que nous avons développée pour mesurer les radicaux superoxydes a pour principe de piéger ces derniers après leur diffusion dans le milieu extracellulaire par la présence d'acétyl-cytochrome c qui est alors réduit de façon spécifique et irréversible. Après rinçage des cellules, le milieu d'incubation a été remplacé par une solution tampon Krebs-Ringer contenant l'acétyl-cytochrome c, et la mesure des radicaux superoxydes a été réalisée sur des échantillons du milieu extracellulaire. Le spectre d'absorption de ces échantillons puis leur dérivée seconde ont été enregistrés entre 500 et 600 nm afin de mesurer l'acétyl-cytochrome c réduit. Un second spectre en dérivée seconde a ensuite été enregistré après complète réduction de l'acétyl-cytochrome c présent par addition de dithionite de sodium, le rapport des 2 pics obtenus permettant alors un calcul précis et reproductible de la quantité d'acétyl-cytochrome c réduit, et donc de la quantité de radicaux superoxydes présents dans le milieu baignant les cellules. La spécificité de la méthode a pu être démontrée par addition préalable de superoxyde dismutase dans le milieu d'incubation des cellules. Cette enzyme qui transforme les anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène a complètement aboli la détection du pic de réduction de l'acétyl-cytochrome c.

L'aspect morphologique des cellules a été analysé en fonction du temps par microscopie optique en contraste de phase.

1.3.principaux résultats

L'exposition des neurones en atmosphère anaérobie n'a induit aucune altération morphologique notable à l'issue de l'agression hypoxique comme après 3 heures de réoxygénation. En effet, les dommages cellulaires n'ont été observés que 72 heures après réoxygénation. La PO_2 mesurée dans le milieu de culture a été significativement réduite de 78% après 6 heures d'hypoxie. La PCO_2 est demeurée inchangée, tandis que le pH était diminué à T_{6h} et à T_{9h}.

Dans les cultures témoins, il a été mis en évidence une production basale de superoxydes (de 3,87 puis 5,58 nmol/100 µg prot. respectivement à T_{6h} et à T_{9h}) qui était significativement réduite lorsque les neurones étaient cultivés en présence de 2,5% de sérum de veau fœtal (de 0,86 puis 1,24 nmol/100 µg prot. respectivement à T_{6h} et à T_{9h}).

Après exposition à l'hypoxie (à T_{6h}), la production de superoxydes a été évaluée à 5,92 nmol/100 µg prot., puis s'est encore accrue après 3 heures de réoxygénation pour atteindre 9,26 nmol/100 µg prot.. En présence de sérum, la production de superoxydes a également été stimulée par l'hypoxie/réoxygénation, mais les taux sont demeurés inférieurs à ceux des témoins sans sérum (2,87 nmol/100 µg prot. à T_{9h}).

1.4.conclusion de l'étude

La méthode spectrophotométrique basée sur la réduction spécifique d'acétyl-cytochrome c apparaît comme un moyen adapté et reproductible pour évaluer la présence de radicaux superoxydes, et déterminer ainsi leur production par des cellules *in vitro*. Une formation basale de superoxydes qui augmente en fonction du temps a été mise en évidence dans les neurones cultivés en milieu chimiquement défini, alors que la présence de sérum a réduit la quantité de radicaux produits.

L'hypoxie a accru la production de radicaux, en particulier pendant la période de réoxygénation, ce phénomène pouvant être à l'origine de lésions cellulaires. En présence de sérum, les taux de superoxydes dans le milieu sont demeurés faibles.

Ainsi, l'augmentation de la longévité des cellules neuronales cultivées en présence de sérum pourrait en partie s'expliquer par une production moindre de radicaux libres par comparaison avec les neurones maintenus en milieu chimiquement défini dont la capacité à survivre est plus limitée dans le temps.

1.5.publication

A Simple Method for Evaluation of Superoxide Radical Production in Neural Cells Under Various Culture Conditions: Application to Hypoxia

Jean-Luc Daval, *Jean-François Gherzi-Egea, Jean Oillet, and Violette Koziel

INSERM U.272, Université de Nancy I, Nancy, and *INSERM U.325, Lille, France

Summary: To evaluate the potential deleterious influence of oxygen-derived free radicals following hypoxia in a model of primary culture of neurons obtained from the fetal rat brain, superoxide radicals were measured as a function of time in the extracellular medium. Neuronal cells were grown for 8 days in the presence or absence of serum, then incubated in a buffered Krebs-Ringer solution containing 60 μ M acetyl-cytochrome *c*. The rate of superoxide radical formation was quantified spectrophotometrically by measuring the specific reduction of acetyl-cytochrome *c*. Under normoxic conditions (95% air-5% CO₂), basal production of superoxide that increased with time was recorded. It was significantly more

pronounced in cells grown in serum-free medium. Under both culture conditions, acute hypoxia (95% N₂-5% CO₂) for 6 h increased superoxide radical amounts in the extracellular medium, and they were still enhanced 3 h after reoxygenation. The addition of superoxide dismutase to the incubating medium abolished the detection of superoxide radicals. The present study describes a new reliable method for superoxide radical measurement in cells in vitro and demonstrates hypoxia/reoxygenation-induced overproduction of superoxide in cultured neurons that may account for cell injury. **Key Words:** Acetyl-cytochrome *c*—Hypoxia—Influence of serum—Neuron-enriched culture—Reoxygenation—Superoxide radicals.

An increasing number of studies has outlined the importance of the formation of oxygen-derived free radicals in biological tissues. Such compounds may lead to lipid peroxidation and contribute to hypoxia-ischemia brain damage (Siesjö et al., 1989), including during the perinatal period (Pitkänen et al., 1990). Among the reactive oxygen species involved in brain damage, superoxide anion radicals may be generated from different sources such as mitochondria, xanthine oxidase, metabolism of arachidonic acid, autoxidation of various compounds, and the respiratory burst of polymorphonuclear leukocytes (Chambers et al., 1985; Jewett et al., 1989; Turrens et al., 1991). Superoxide radicals are then converted to hydrogen peroxide, either spontaneously or by

the enzyme superoxide dismutase (SOD), and secondarily produce hydroxyl radicals. Such a production of superoxide radicals occurs mainly during reoxygenation following hypoxia-ischemia, but also under basal conditions as well as during hypoxic-ischemic insults, when tissues are exposed to very low oxygen concentrations (Demopoulos et al., 1980). Superoxide has been detected in the extracellular fluid of the newborn pig brain during postischemic reperfusion (Armstead et al., 1988), and it has been shown that superoxide radicals formed within the cell may reach the extracellular fluid via a diisothiocyano-2, 2-stilbene disulfonate (DIDS)-sensitive anion channel (Kontos et al., 1985).

Since oxygen-derived free radicals are highly reactive compounds, and thus are very difficult to detect, we have developed a spectrophotometric method for the analysis of superoxide anion radical production in the surrounding medium of cultured neurons under basal conditions as well as following acute hypoxia, by measuring the specific reduction of acetyl-cytochrome *c*.

Received February 18, 1994; final revision received June 15, 1994; accepted June 20, 1994.

Address correspondence and reprint requests to Dr. J.-L. Daval at INSERM U.272, B.P. 3069, 30 rue Lionnois, 54013 Nancy Cédex, France.

Abbreviations used: DIDS, diisothiocyano-2, 2-stilbene disulfonate; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; Pco₂ and Po₂, partial pressure of carbon dioxide and oxygen, respectively; SOD, superoxide dismutase.

MATERIALS AND METHODS

Animals

When they were in the proestrus period, as shown by the observation of daily vaginal smears, Sprague-Dawley female rats (Iffa-Credo, L'Arbresle, France) were housed together with males for 24 h. They were then maintained in separate cages, under standard laboratory conditions, on a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 0600) with food and water available ad libitum. All animal experimentation was carried out using the highest standards of animal care, according to the *NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

Neuronal cell cultures

Neuronal cell cultures were obtained from 14-day-old rat embryo forebrain. Pregnant female rats were anesthetized with halothane and living embryos were excised by cesarean section under sterile conditions. Whole embryos were placed in culture medium previously equilibrated at 37°C, and forebrains were carefully collected. Neuronal cell suspensions were then obtained as described previously (Daval et al., 1991; Nicolas et al., 1994). Brain tissues were dissected free of meninges and gently dispersed in a mixture of Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) and Ham's F12 medium (50:50) supplemented with 5% inactivated fetal calf serum. After centrifugation at 700 *g* for 10 min, the pellet was redispersed in the same medium and passed through a 46- μ m-pore size nylon mesh. The density of the cell suspension was measured, and aliquots were transferred into 35-mm petri dishes (Falcon) precoated with poly-L-lysine to obtain a final density of 10^6 cells/dish. Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air–5% CO₂ for 24 h, and the medium was then replaced with a fresh hormonally defined serum-free medium consisting of the DMEM/Ham's F12 mixture enriched with human transferrin (1 mM), insulin (1 mM), putrescine (0.1 mM), progesterone (10 nM), estradiol (1 pM), and Na selenite (30 nM) (Bottenstein and Sato, 1979). Subsequent medium changes with serum-free medium were performed twice a week. In separate experiments, cultured neurons were maintained in 2.5% fetal calf serum-supplemented medium until the day of the experiment.

Hypoxia–reoxygenation exposure

After 8 days in vitro, a first set of culture dishes ($n = 42$) was incubated for 6 h under normoxic conditions with a standard gas mixture of 95% air–5% CO₂, whereas a second set ($n = 42$) was deprived of oxygen by incubation for 6 h in a gas mixture consisting of 95% N₂–5% CO₂. All cultures

were finally returned to standard normoxic atmosphere for 3 h.

Just prior to the beginning of the experiment ($T = 0$), and then immediately at the end of the hypoxic insult ($T = 6$ h) as well as at the end of the final exposure time ($T = 9$ h), aliquots of the cell incubation medium were rapidly collected from representative dishes using a sterile syringe and analyzed for their O₂ and CO₂ contents and pH by means of a gas analyzer (Corning, Halstead, UK), as described by Sher (1990).

At the end of the incubation period, cell morphology was assessed by phase-contrast microscopic observations. Cultured cells were rinsed twice with 2 ml of 0.9% NaCl and finally scrapped off with 1 ml of 1 N NaOH for the determination of protein concentrations according to Bradford (1976).

Superoxide radical measurement

The presence of superoxide radicals in the cell incubation medium was detected and then quantified by a second derivative spectrophotometric method based on a modification of the procedure described previously by Gherzi-Egea et al. (1991), using acetyl-cytochrome *c*. Acetyl-cytochrome *c* was synthesized from acetic anhydride in half-saturated sodium acetate, followed by four dialysis steps according to Azzi et al. (1975). The concentration of the acetyl-cytochrome *c* obtained was calculated from its reduction spectrum, using an extinction coefficient of $19,000\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, at 550 nm. The efficiency of the acetylation was checked by the inability of acetyl-cytochrome *c* to be reduced by a NADPH–cytochrome P-450 reductase-containing preparation in the presence of NADPH.

Due to interference of the original culture medium containing phenol red with the spectrophotometric signal resulting from the reduction of acetyl-cytochrome *c*, cultured neurons were rinsed twice, immediately before cell exposure experiments, with 2 ml of a sterile Krebs–Ringer solution (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 5.6 mM glucose) buffered with HEPES (25 mM). Then, 1.5 ml of the buffer solution containing 60 μ M acetyl-cytochrome *c* was added to each culture dish. Aliquots of culture incubating medium were sampled at various time intervals and analyzed for the amount of acetyl-cytochrome *c* reduced. The simple measurement of the absorbance at 550 nm resulted in a lack of precision due to (i) changes in the volume of the medium linked to potential evaporation and, therefore, in the acetyl-cytochrome *c* concentration in the cell dishes during the time course of the experiment and (ii) the overlapping of the absorption bands at 550

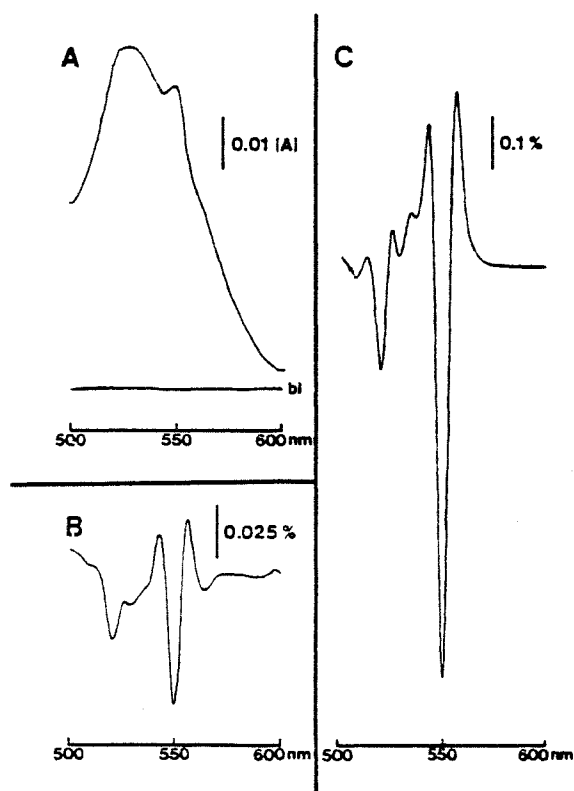


FIG. 1. Typical absorption spectra of an acetyl-cytochrome *c*-containing culture incubation medium. A: Baseline (*bl*) and standard spectrum. B: Second derivative spectrum. C: Second derivative spectrum of the solution fully reduced by sodium dithionite. Note the different scales. The amplitudes of the second derivative spectra are expressed as a percentage of 1 Abs/nm². In this assay, a 7.8% reduction of acetyl-cytochrome *c* can be measured, and this corresponds to the appearance of 7.02 nmol of superoxide in the surrounding medium of the neuronal cell culture during the incubation period with acetyl-cytochrome *c*.

nm at a low reduced/oxidized acetyl-cytochrome *c* ratio (Fig. 1A). Therefore, the following procedure was adopted. The sample was diluted in degassed distilled water. The absorption and the second derivative spectra were then recorded between 500 and 600 nm against distilled water in a double-beam spectrophotometer (Uvikon 820, Kontron). With respect to the assay conditions (i.e., scan speed, 100 nm/min; datum point interval, 4 nm; time constant, 2 s), recording the second derivative spectrum allowed complete separation, at 550 nm, of the signal from the other signals issued from the Soret band absorption (Fig. 1B). The solution was then fully reduced by the addition of a few grains of sodium dithionite, and the second-order derivative was recorded again (Fig. 1C). The amplitude variations $d^2\text{Abs}/d\lambda^2$ were measured between the valley at 550 nm and the peak at 556 nm in both cases, and the amount of acetyl-cytochrome *c* reduced was expressed as the ratio of the amplitudes measured be-

fore and after the reduction of the preparation by sodium dithionite.

The linearity of the second derivative signal as a function of the percentage of acetyl-cytochrome *c* reduced was assessed using double-compartment cuvettes (optical path, 0.5 cm/compartment). One compartment contained a solution of oxidized acetyl-cytochrome *c*, while the other one contained a solution of fully reduced acetyl-cytochrome *c* (48 μM). Different dilutions of these solutions were used to obtain various "virtual" ratios of reduced-to-oxidized acetyl-cytochrome *c*, the total concentration being constant. For each assay, the second derivative spectra were recorded. As shown in Fig. 2, the relation between the reduced/oxidized acetyl-cytochrome *c* ratio and the second derivative signal was linear ($r = 0.999$ up to 40% of reduced acetyl-cytochrome *c*, and $r = 0.997$ through the whole range of detection of acetyl-cytochrome *c* reduction). In addition, the detection threshold allowed accurate measurement of the reduction of 1% of the total acetyl-cytochrome *c* present in the surrounding medium. This corresponds to the reduction of 0.9 nmol of acetyl-cytochrome *c* in a culture dish.

RESULTS

Neuronal cultured cells

Eight-day-old cultures grown in serum-free medium on a poly-L-lysine substratum showed a very high percentage (>97%) of living cells, as demonstrated by Trypan blue exclusion, with very few (<7%) nonneuronal elements, i.e., glioblasts and fibroblasts, as shown previously in preliminary immunocytochemical characterization (data not

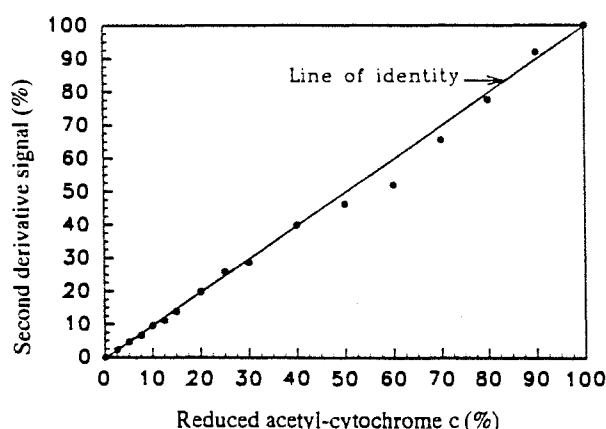


FIG. 2. Second derivative signal as a function of the reduced/oxidized acetyl-cytochrome *c* ratio. The various reduced/oxidized acetyl-cytochrome *c* ratios were obtained using double-compartment cuvettes (see Materials and Methods). Results are expressed as a percentage of the amplitude measured with the fully reduced solution. Each measurement was repeated two or three times.

TABLE 1. Evolution of pH, PO_2 and PCO_2 in the incubation medium of cultured neurons

	pH	PO_2 (mm Hg)	PCO_2 (mm Hg)
Control			
0 h	7.27 $\pm$ 0.02	139.2 $\pm$ 0.2	29.8 $\pm$ 2.2
6 h	7.23 $\pm$ 0.03	140.0 $\pm$ 0.3	33.1 $\pm$ 3.0
9 h	7.24 $\pm$ 0.02	143.4 $\pm$ 0.2	32.9 $\pm$ 1.8
Hypoxia			
0 h	7.25 $\pm$ 0.02	140.1 $\pm$ 0.4	30.6 $\pm$ 2.9
6 h	7.15 $\pm$ 0.01*	31.7 $\pm$ 3.3*	32.8 $\pm$ 3.1
9 h	7.14 $\pm$ 0.02*	131.3 $\pm$ 4.9	34.0 $\pm$ 2.8

Data are expressed as mean values $\pm$ SD from 12 representative samples. Control corresponds to the normoxia–normoxia group, and hypoxia to the hypoxia–normoxia group. Statistically significant difference from control: * $p < 0.01$ (Dunnett's t test for multiple comparisons).

shown). The cultures exhibited polygonal perikarya, with some cellular clumps, interconnected by a dense fiber network. In the presence of serum-supplemented medium, similar development of cultured cells was observed, but the total percentage of nonneuronal elements, especially glial cells, tended to increase as a function of time.

Cell exposure to an anaerobic atmosphere for 6 h did not induce noticeable morphological alterations in cultured neurons observed 3 h after the end of the hypoxic insult. Likewise, protein levels (170 ± 14 μ g/dish, under serum-free medium conditions) did not differ significantly from controls (177 ± 11 μ g/dish). Similar observations were made when cultures were grown in serum-containing medium.

Characteristics of the extracellular fluid

As shown in Table 1, exposure of the cultured neurons to an anaerobic environment for 6 h reduced the partial pressure of oxygen (PO_2) in the incubation medium by 78%. Three hours after returning to normoxic conditions, the PO_2 tended to remain lower than in control cultures. Whereas the PCO_2 was not altered by hypoxia, the pH of the extracellular medium decreased compared to control values and was still low 3 h after the end of exposure to hypoxia (Table 1).

Superoxide radical formation

The acetyl-cytochrome c incubated in the absence of cultured cells did not undergo detectable reduction for at least 24 h. The ratio of reduced-to-oxidized acetyl-cytochrome c in aliquots of the surrounding medium of the cultured cells was stable for 24 h at 4°C, and remained constant when the samples were diluted in distilled water, during the spectrophotometric recordings.

In control cultures grown in the absence of serum, 4.3 and 6.2% acetyl-cytochrome c /100 μ g of protein were specifically reduced after 6 and 9 h,

respectively (Fig. 3). This corresponds to 3.87 and 5.58 nmol of superoxide detected/100 μ g of protein. The presence of 2.5% fetal calf serum in the culture medium for 8 days significantly reduced the production of superoxide radicals.

Following hypoxia, a significant increase in the reduction of acetyl-cytochrome c could be measured in the medium of cultures grown in the absence of serum. It reached 53% at the end of exposure to hypoxia and 66% 3 h later. When cells were cultured in the presence of serum, the reduction of acetyl-cytochrome c also increased during and after acute hypoxia but remained quite low compared to that of cultures maintained in serum-free medium (Fig. 3). In all cases, the additional presence of SOD (1,330 U/ml) in the Krebs–Ringer solution during cell incubation totally abolished the reduction of acetyl-cytochrome c .

DISCUSSION

The present study reports a simple and easy spectrophotometric method for the evaluation of superoxide radical production in brain cells grown *in vitro* under various culture conditions and provides the first data on superoxide formation in cultured neurons exposed to hypoxia.

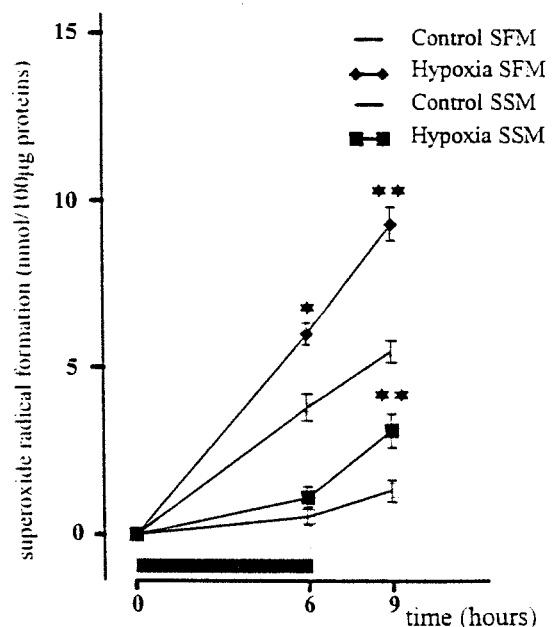


FIG. 3. Effects of culture conditions and hypoxia on the rate of superoxide radical formation in cultured neurons. Data were obtained from five experiments ($n = 18$) for cells grown in serum-free medium (SFM) and from two separate experiments ($n = 10$) for cells grown in serum-supplemented medium (SSM). When exposed to hypoxia, culture dishes were incubated for 6 h in 95% N_2 –5% CO_2 . Statistically significant difference from controls: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ (Dunnett's t test for multiple comparisons).

Oxygen-derived free radicals are known to be generated in brain, kidneys, heart, lungs, intestines, and other organ systems during a variety of insults (Ganduel and Duvellerory, 1984; Granger et al., 1986; Kontos, 1989). Aerobic metabolism entails the production of oxygen species, even under basal conditions, and there is a continuous need for inactivation of these derivatives, which are known to have deleterious effects by altering all types of biological molecules, including DNA, lipids, proteins, and carbohydrates. Thus, oxidative stress may be involved in processes such as mutagenesis, carcinogenesis, lipid peroxidation, membrane damage, and protein oxidation and fragmentation, as well as carbohydrate damage (Sies, 1993).

The role of the superoxide radical produced by the one-electron reduction of dioxygen has been well documented, particularly in hypoxic-ischemic brain tissue injury and edema (Ikeda and Long, 1990). However, the exact mechanism by which the excess of superoxide generation would exert toxic effects remains unclear. It has been demonstrated that during ischemic states, brain production of free radicals such as superoxide causes increased release of excitatory amino acids which are endowed with neurotoxic effects (Pellegrini-Giampietro et al., 1990). Also, the free radical hypothesis in hypoxic-ischemic cell injury shares a common path with the excitotoxic hypothesis, i.e., its dependence on calcium (Orrenius et al., 1989), and it has been proposed that free radicals, either alone or in combination with excitatory amino acids, may enhance calcium influx and overload to exacerbate neuronal damage (Halliwell, 1992; Schurr and Rigo, 1992).

Beside in vivo models, the in vitro approach appears more advantageous for answering cellular and molecular mechanistic questions. In particular, cell cultures are useful tools for studying the mechanisms involved in cell death following hypoxia or ischemia. By manipulating the extracellular environment, conditions that closely mimic what is thought to occur in vivo can be produced (Daval et al., 1991; Murphy and Horrocks, 1993).

Cell cultures, especially primary cultures of neurons, have been used to examine in detail the effects of hypoxia (Goldberg et al., 1987a; Daval et al., 1991), hypoglycemia (Monyer et al., 1989), ischemia (Goldberg et al., 1986), or exposure to glutamate (Choi et al., 1987; Frandsen and Schousboe, 1991). Although numerous parameters have been analyzed, very few studies, to our knowledge, have focused on the production of free radicals.

Detection of radical production has been difficult because of their short half-lives. Several investiga-

tors have used indirect methods, e.g., effects of administration of radical scavengers or changes occurring in endogenous scavengers (Flamm et al., 1978; Yamamoto et al., 1983). More recently, in an attempt to measure production of radicals in brain more directly, several techniques have been described, including nitroblue tetrazolium (NBT) reduction (Armstead et al., 1989), chemiluminescence (Imaizumi et al., 1984), electron spin resonance (ESR) spectroscopy (Lai et al., 1986; Zini et al., 1992), and salicylate trapping (Cao et al., 1988).

In cerebral preparations, the rate of enzyme-mediated superoxide radical formation could be quantified by a spectrophotometric method measuring the reduction of acetyl-cytochrome *c* with good specificity of the molecule reduction by superoxide anion (Gherzi-Egea et al., 1991). Based on this method, acetyl-cytochrome *c* was used in the present study to counteract radical shortcoming by "trapping" superoxide that has diffused through cell membranes to reach the extracellular medium, and the presence of superoxide was measured in the incubating medium of cultured neurons using a second derivative spectrophotometric procedure. In the experiments described here, acetyl-cytochrome *c* is specifically reduced by superoxide radicals generated by the cells, as shown by the addition of SOD to the incubating medium, the enzyme being known to convert superoxide to hydrogen peroxide. In addition, the second derivative analysis of acetyl-cytochrome *c* reduction allows accurate measurement of superoxide radicals, since very low levels of superoxide can be repeatedly detected and quantified. However, it should be stressed that reduction of acetyl-cytochrome *c* reflects only the presence of superoxide anions that have reached the extracellular medium. Thus, only part of the superoxide generated by the cells can be detected. Therefore, such a technique does not allow determination of the total radical production.

Different techniques have been used to obtain cultured neurons from dispersed cells from mammalian brain. Several investigators have used culture media containing serum (Goldberg et al., 1987b; Priestley et al., 1990; Sher, 1990), whereas others have preferred chemically defined media (Borg et al., 1985; Weiss et al., 1986; Daval et al., 1991). Both conditions allow development of cells in vitro with fidelity to normal electrophysiological, neurochemical, and morphological differentiation in the intact animal. The presence of various concentrations of serum improves cell survival for several weeks, but nonneuronal cells are also able to survive and proliferate. On the other hand, chemically defined, serum-free media permit selective growth

and maturation of neurons but impair long-term cell survival.

In control cultures grown in serum-supplemented medium, very low, but detectable, production of superoxide radicals, which increased as a function of time, was measured in the present study. Basal superoxide production was more than fourfold higher in the incubating medium of neurons cultured without serum. Although the additional presence of serum may lead, after 1 week in vitro, to slightly different cell populations, such a difference in the radical production might account for the reduced lifetime of cultures grown in serum-free medium compared to cultures maintained in the presence of serum.

Immediately after a 6-h exposure to hypoxia, the amount of superoxide measured in the incubating medium increased significantly, and was higher even 3 h after the onset of reoxygenation. The reduction of acetyl-cytochrome *c* was significantly enhanced compared to that under control normoxic conditions, whether cells were cultured in the presence or in the absence of serum. Although the total production of superoxide was more important in cultures kept in serum-free medium, the increased reduction of acetyl-cytochrome *c* over basal values tended to be higher in cultures grown with serum.

The increase in superoxide generation following hypoxia and reoxygenation was not accompanied by significant morphological alterations of the cultured cells. Accordingly, it is known that hypoxic cell damage appears later, i.e., 3 days after the insult (Daval et al., 1991).

The evolution of physiological variables in the incubation medium of cultured neurons shows a significant hypoxia-induced reduction of pH values, which remain low during the reoxygenation period. Several reports have emphasized the role of acidosis in hypoxic neuronal cell injury, and it has been shown that tissue acidosis may promote the iron-catalyzed formation of free radicals (Pulsinelli et al., 1985; Rhencrona et al., 1989). However, recent data have suggested that moderate acidosis may actually play a neuroprotective role during hypoxia-ischemia (Tombaugh and Sapolsky, 1993). The main route of superoxide production in our model possibly involves mitochondria. Indeed, reoxygenation following hypoxia-ischemia was shown to convert xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, which catalyzes the generation of superoxide radicals (Parks et al., 1988). In our experiments, the measurement of superoxide indicates an important production of radicals during exposure to hypoxia, as reflected by the radical amounts found in the incubation medium immediately at the end of the

exposure period, and not just following reoxygenation. In addition, xanthine oxidase activities do not exist in hearts of many animal species, including humans, while ischemia-reperfusion heart tissue damage also exists in these individuals (Werns and Lucchesi, 1990). Very recently, Nohl et al. (1993) provided data that clearly demonstrated that hypoxia-ischemia impairs mitochondrial energy conservation and triggers superoxide release as a by-product of respiration.

In conclusion, second derivative spectrophotometric measurement of the specific reduction of acetyl-cytochrome *c* added to the extracellular medium of cultured neurons appears to be a convenient and reliable means for quantifying the presence of superoxide radicals and, thus, evaluating radical generation by the cells in vitro. A basal superoxide formation that increases with time, and is significantly higher in neuronal cells cultured in the absence of serum, was shown. Acute hypoxia enhances radical production, especially during the reoxygenation period, and this phenomenon may account for cell injury. Such a technique may be used to analyze superoxide production by different cell types under various conditions and should be useful in pathological, pharmacological, or toxicological studies.

Acknowledgment: Part of this work was performed with the help of the Centre du Médicament. The authors are grateful to M. C. Grassiot (Centre du Médicament, Nancy) and W. Finnegan (SUNY at Stony Brook) for technical assistance. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by a grant from the European Economic Community, Biotechnology Programme, Contract BIO2-CT93-0108.

REFERENCES

- Armstead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CW (1988) Post-ischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am J Physiol* 255:H401-H403
- Armstead WM, Mirro R, Leffler CW, Busija DW (1989) Cerebral superoxide anion generation during seizures in newborn pigs. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:175-179
- Azzi A, Montecucco C, Richter C (1975) The use of acetylated cytochrome *c* for the detection of superoxide radicals produced in biological membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 65:597-607
- Borg J, Spitz B, Hamel G, Mark J (1985) Selective culture of neurons from rat cerebral cortex: morphological characterization, glutamate uptake and related enzymes during maturation in various culture media. *Dev Brain Res* 18:37-49
- Bottenstein JF, Sato G (1979) Growth of a neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:514-517
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Cao W, Carney JM, Duchon A, Floyd RA, Chevion M (1988) Oxygen radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci Lett* 88:233-238
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM,

- Yoshida S, Parmley LF, Downey JM (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 17:145-152
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357-368
- Daval JL, Koziel V, Nicolas F (1991) Functional changes in cultured neurons following transient asphyxia. *NeuroReport* 2:97-100
- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML (1980) The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:91-119
- Flamm ES, Demopoulos HB, Seligman ML, Posner RG, Ransohoff J (1978) Radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 9:445-447
- Frandsen A, Schousboe A (1991) Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and Ca^{2+} release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 56:1075-1078
- Ganduel Y, Duvellery MA (1984) Role of oxygen radicals in cardiac injury due to reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* 16:459-470
- Gherzi-Egea JF, Livertoux MH, Minn A, Perrin R, Siest G (1991) Enzyme mediated superoxide radical formation initiated by exogenous molecules in rat brain preparations. *Toxicol Appl Pharmacol* 110:107-117
- Goldberg MP, Pham PC, Choi DW (1987a) Dextrorphan and dextrometorphan attenuate hypoxic injury in neuronal culture. *Neurosci Lett* 80:11-15
- Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW (1987b) N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 243:784-791
- Goldberg WJ, Kadingo RM, Barrett JN (1986) Effects of ischemia-like conditions on cultured neurons: protection by low Na^+ , low Ca^{2+} solutions. *J Neurosci* 6:3144-3151
- Granger DN, Hollwarth ME, Park DA (1986) Ischemia reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl* 548:47-63
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623
- Ikeda Y, Long DM (1990) The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27:1-11
- Imaizumi S, Kayama T, Suzuki J (1984) Chemiluminescence in hypoxic brain—the first report. Correlation between energy metabolism and radical reaction. *Stroke* 15:1061-1065
- Jewett SL, Eddy LJ, Hochstein P (1989) Is the autoxidation of catecholamines involved in ischemia-reperfusion injury? *Free Radic Biol Med* 6:185-188
- Kontos HA (1989) Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 57:508-516
- Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins IW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML (1985) Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 57:142-151
- Lai EK, Crossley R, Sridhar R, Misra HP, Janzen EG, McKay PB (1986) In vivo spin trapping of radicals generated in brain, spleen, and liver during gamma radiation of mice. *Arch Biochem Biophys* 244:156-160
- Monyer H, Goldberg MP, Choi DW (1989) Glucose deprivation neuronal injury in cortical culture. *Brain Res* 483:347-354
- Murphy EJ, Horrocks LA (1993) Mechanisms of hypoxic and ischemic injury. Use of cell culture models. *Mol Chem Neurobiol* 19:95-106
- Nicolas F, Oillet J, Koziel V, Daval JL (1994) Characterization of adenosine receptors in a model of cultured neurons from rat forebrain. *Neurochem Res* 19:507-515
- Nohl H, Koltover V, Stolze K (1993) Ischemia/reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers superoxide release as a byproduct of respiration. *Free Rad Res Commun* 18:127-137
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P (1989) Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 10:281-285
- Parks DA, Williams TK, Beckman JS (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a re-evaluation. *Am J Physiol* 17:G768-G774
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F (1990) Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-1041
- Pitkänen OM, Hallman M, Andersson SM (1990) Correlation of free oxygen radical-induced lipid peroxidation with outcome in very low birth weight infants. *J Pediatr* 116:760-764
- Priestley T, Horne AL, McKernan RM, Kemp JA (1990) The effect of NMDA receptor glycine site antagonists on hypoxia-induced neurodegeneration of rat cortical cell cultures. *Brain Res* 531:183-188
- Pulsinelli WA, Kraig RP, Plum F (1985) Hyperglycemia, cerebral acidosis, and ischemic brain damage. In: *Cerebrovascular Diseases* (Plum F, Pulsinelli WA, eds), New York, Raven Press, pp 201-210
- Rhencrona S, Hauge HN, Siesjö BK (1989) Enhancement of iron-catalyzed free radical formation by acidosis in brain homogenate: difference in effect by lactic acid and CO_2 . *J Cereb Blood Flow Metab* 9:65-70
- Schurr A, Rigor BM (1992) The mechanism of cerebral hypoxic-ischemic damage. *Hippocampus* 2:221-228
- Sher PK (1990) Chronic hypoxia in neuronal cell culture: metabolic consequences. *Brain Dev* 12:293-300
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219
- Siesjö BK, Agardh CD, Bentsson F (1989) Free radicals and brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1:165-211
- Tombaugh GC, Sapolsky RM (1993) Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology. *J Neurochem* 61:793-803
- Turrens JF, Beconi M, Barilla J, Chavez UB, McCord JM (1991) Mitochondrial generation of oxygen radicals during reoxygenation of ischemic tissues. *Free Radic Res Commun* 12-13:681-689
- Weiss S, Pin JP, Sebben M, Kemp DE, Sladeczek F, Gabrion J, Bockaert J (1986) Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2238-2242
- Werns SW, Lucchesi BR (1990) Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci* 11:161-166
- Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T (1983) A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and the protective effect of alpha-tocopherol administration. *Stroke* 14:977-982
- Zini I, Tomasi A, Grimaldi R, Vannini V, Agnati LF (1992) Detection of free radicals during brain ischemia and reperfusion by spin trapping and microdialysis. *Neurosci Lett* 138:279-282

2) Influence des conditions de réoxygénation post-hypoxique sur le métabolisme énergétique et la production de superoxyde dans des neurones centraux en culture

2.1. objectif de l'étude

Il est établi que la phase de réoxygénation après un épisode hypoxique cérébral est une étape cruciale pouvant être à l'origine d'une potentialisation des dommages liés à l'asphyxie elle-même. Aussi, après avoir mis en évidence l'augmentation de la production neuronale de radicaux superoxydes, pendant et après hypoxie, nous avons analysé l'importance des conditions de réoxygénation sur l'intégrité morphologique et fonctionnelle des neurones en culture. Pour cela, nous avons étudié les conséquences d'une hyperoxie transitoire à l'issue de l'agression hypoxique et les résultats ont été comparés à ceux obtenus dans le cas d'une réoxygénation en conditions normoxiques.

2.2. approche expérimentale

L'activité fonctionnelle des cellules a été évaluée par la mesure de l'incorporation du 2-D-désoxyglucose [^3H] précisément décrite dans l'annexe technique et les radicaux superoxydes ont été quantifiés dans le milieu extracellulaire par la technique spectrophotométrique utilisant l'acétyl-cytochrome c et évoquée précédemment. L'évolution morphologique a été analysée par microscopie en contraste de phase, tandis que la souffrance cellulaire a été mesurée par la libération de lactate déshydrogénase dans le milieu selon la méthode détaillée dans l'annexe technique.

Les neurones ont été exposés pendant 6 heures à une hypoxie (95% N_2 -5% CO_2) ou maintenus dans les conditions normales. La moitié de chaque lot a ensuite été placée pendant 3 heures soit en normoxie, soit en hyperoxie (95% O_2 -5% CO_2), puis l'ensemble a été replacé en normoxie pour 15 heures ($\text{T}_{24\text{h}}$) ou 3 jours ($\text{T}_{72\text{h}}$). L'étude des différents paramètres morphologiques et fonctionnels a été réalisée en fonction du temps, soit à 6, 9, 24, 48 et 72 heures. Aux temps T_0 , $\text{T}_{6\text{h}}$, $\text{T}_{9\text{h}}$ et $\text{T}_{24\text{h}}$, le milieu a été prélevé afin de déterminer l'évolution de la PO_2 , du pH et des taux de radicaux superoxydes, ces derniers n'étant pas analysables à $\text{T}_{72\text{h}}$ car la viabilité des neurones en culture se trouve altérée au-delà de 24 heures dans le tampon Krebs-Ringer dont l'utilisation est nécessaire à la mesure de la réduction de l'acétyl-cytochrome c.

2.3.principaux résultats

La PO₂ dans le milieu d'incubation a été réduite de 78% par l'hypoxie; elle a été au contraire accrue de 222% par l'hyperoxie. Aucune altération morphologique des cellules n'a été observée à l'issue de la période expérimentale, mais 72 heures plus tard les neurones ont présenté des signes évidents de dégénérescence, quelles que soient les conditions de réoxygénation. La libération de LDH dans le milieu a augmenté de 106% à la fin de l'hypoxie, pour atteindre 223% à T_{72h} dans le groupe hypoxie-normoxie, le groupe hypoxie-hyperoxie présentant une évolution similaire mais de moindre amplitude. Le prélèvement de 2DG par les neurones, évalué à 89,6±2,3 nmol/mg prot/30 mn dans les conditions normales, a augmenté de 21% à la fin de l'hypoxie (T_{6h}), évoquant un hypermétabolisme cellulaire. Après réoxygénation des cellules (T_{9h}), l'augmentation du transport de 2DG a atteint 26% et 31%, respectivement en normoxie et en hyperoxie. Cette stimulation fonctionnelle était encore plus accentuée à T_{24h} (36% et 43%). Parallèlement, l'hypoxie a augmenté de 53% les radicaux superoxydes, la production basale étant de 3,8±0,4 nmol/100 µg prot. La réoxygénation en hyperoxie n'a pas modifié significativement la formation de radicaux par rapport à la réoxygénation normale (49% et 63% à T_{9h}, 91 et 108% à T_{24h}).

2.4.conclusion de l'étude

En résumé, la réoxygénation post-hypoxique induit un hypermétabolisme cellulaire et une augmentation de la production de radicaux libres, mais une hyperoxie transitoire n'accentue pas ces phénomènes qui sont impliqués dans les lésions cellulaires observées après une période d'hypoxie. Ces résultats suggèrent qu'une exposition aiguë à un excès d'oxygène en période post-hypoxique n'est pas plus délétère pour les neurones cérébraux que la réoxygénation normoxique. De telles observations pourraient s'expliquer par une induction des systèmes antioxydants en réponse à l'hyperoxie.

2.5.publication

Influence of Post-Hypoxia Reoxygenation Conditions on Energy Metabolism and Superoxide Production in Cultured Neurons from the Rat Forebrain

JEAN OILLET, VIOLETTE KOZIEL, PAUL VERT, AND JEAN-LUC DAVAL

INSERM U.272, 54013 Nancy, France

ABSTRACT

Brain reperfusion and/or reoxygenation may be of particular importance in the etiology of neuronal damage after hypoxic-ischemic insult in neonates, especially with reference to the generation of free radicals. To investigate this issue, the influence of either standard reoxygenation or transient hyperoxia was studied on the consequences of severe hypoxia in a model of cultured neurons isolated from the fetal rat brain. Culture dishes were exposed for 6 h to hypoxia (95% N₂/5% CO₂). They were then placed under normoxia (95% air/5% CO₂) or hyperoxia (95% O₂/5% CO₂) for 3 h, and finally returned to normoxia. Control cultures were kept under normoxic conditions. Cell morphology, protein concentrations, lactate dehydrogenase leakage, energy metabolism, as reflected by specific transport and incorporation of 2-D-[³H]deoxyglucose, as well as superoxide radical formation were analyzed as a function of time. Po₂ values in the cell incubating medium were decreased by 78% by hypoxia and increased by 221% by hyperoxia. No morphologic

alteration could be noticed before 72 h posthypoxia, when cell degeneration became apparent, with a concomitant reduction in protein contents. Hypoxia-reoxygenation induced a transient cellular hypermetabolism, as shown by a 36% increase in 2-D-[³H]deoxyglucose uptake 24 h after hypoxia, and then a 23% decrease below control values at 72 h. It also led to a sharp increase in the formation of superoxide radicals (+108%). Transient hyperoxia during reoxygenation did not exacerbate these events, and thus would not enhance their detrimental effects on cell integrity. (*Pediatr Res* 39: 598–603, 1996)

Abbreviations

D-DG, D-deoxyglucose
LDH, lactate dehydrogenase
HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid

Despite advances in perinatal and obstetric care, perinatal hypoxic-ischemic brain injury remains a significant health problem and a major cause of mortality and cerebral disabilities in newborn infants (1, 2). Even relatively mild asphyxia may be associated with impaired cerebrovascular autoregulation which may result in major fluctuations in cerebral perfusion. In the past years, efforts have been directed toward understanding the pathophysiology of hypoxic-ischemic injury in the newborn. Using various experimental models, numerous neurochemical processes, including reoxygenation-associated generation of free radicals, have been shown to be involved in the cascade of events that culminate in brain damage (3). During resuscitation of asphyxiated babies, oxygen itself would have both benefits and risks. Clearly, neonates suffering

perinatal asphyxia, apnea, bronchopulmonary dysplasia, or other respiratory complications often fluctuate during therapy between low and high Pao₂. In clinical emergencies such as neonatal resuscitation, assisted ventilation begins classically with high oxygen concentrations until cyanosis disappears (4), and Pao₂ is often difficult to measure under such hectic conditions. The side effects of relative brief periods of hyperoxemia, or at least fluctuating changes in Pao₂, are difficult to evaluate and are still unknown; however, it has been shown that they cause a significant decrease in cerebral blood flow (5) and increase the frequency of retinopathy (6).

Although neuronal cells in primary culture serve only as a simplified model, the situation *in vivo* being much more complex, they appear to be useful in elucidating cellular and molecular mechanisms in various diseases, including cerebral hypoxia. The present study was designed to test the importance of the restoration of oxygen delivery on neuronal cell integrity and functional activity. The influence of two levels of reoxygenation conditions, *i.e.* normoxia and transient hyperoxia, has been investigated on the consequences of a severe episode of

Received March 15, 1995; accepted October 2, 1995.

Correspondence: Dr. Jean-Luc Daval, INSERM U.272, 24–30 rue Lionnois, B.P. 3069, 54013 Nancy Cedex, France.

Supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by a grant from the European Economic Community, Biotechnology Programme, Contract No. 3102-CT93-0108.

asphyxia in a model of cultured neurons from the embryonic rat brain, by analyzing cell morphology, LDH (a marker of cell injury) release, energy metabolism, and superoxide radical production.

METHODS

Animals. When they were in the proestrus period, as shown by the observation of daily vaginal smears, Sprague-Dawley female rats (R. Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were housed together with males for 24 h. They were then maintained in separate cages, under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 0600 h) with food and water available *ad libitum*. All animal experimentation was carried out with the highest standards of animal care, according to the *NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

Neuronal cell cultures. Neuronal cell cultures were obtained from 14-d-old rat embryo forebrain. Pregnant female rats were anesthetized with halothane, and living embryos were excised by cesarian section under sterile conditions. Whole embryos were placed in culture medium previously equilibrated at 37°C, and forebrains were carefully collected. Neuronal cell suspensions were then obtained as previously described (7). Brain tissues were dissected free of meninges and gently dispersed in a mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 medium (50/50) supplemented with 5% inactivated FCS. After centrifugation at $700 \times g$ for 10 min, the pellet was redispersed in the same medium and passed through a 46- μ m pore size nylon mesh. Density of the cell suspension was measured, and aliquots were transferred into 35-mm Petri dishes (Falcon) precoated with poly-L-lysine to obtain a final density of 10^6 cells/dish. Cultures were then placed at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air/5% CO₂. The following day, the culture medium was removed by aspiration and then replaced with a fresh hormonally defined serum-free medium consisting of the Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 mixture enriched with human transferrin (1 mM), insulin (1 mM), putrescine (0.1 mM), progesterone (10 nM), estradiol (1 pM), and sodium selenite (30 nM). Subsequent medium changes with serum-free medium were performed twice a week. Neuronal cell cultures were kept for 6 d under a standard normoxic gas mixture.

Hypoxia-reoxygenation procedure. After 6 d *in vitro* ($T = 0$), a first set of culture dishes was maintained for 6 h under normoxic conditions (95% air/5% CO₂), whereas a second set was deprived of oxygen by incubation for 6 h in a gas mixture consisting of 95% N₂/5% CO₂. Half of each set of culture dishes was then placed for 3 h in normoxic atmosphere, whereas the remaining dishes were incubated under hyperoxia (95% O₂/5% CO₂) for the same period. All cultures were finally returned to standard normoxic atmosphere for 15 additional hours ($T = 24$ h) or 3 d ($T = 72$ h).

Just before the beginning of the experiment ($T = 0$), then immediately at the end of the hypoxic insult ($T = 6$ h), and finally as a function of time after reoxygenation, aliquots of the cell incubating medium were rapidly collected from representative dishes using a sterile syringe and analyzed for their O₂

and CO₂ contents and pH by means of a gas analyzer (Corning, Halstead, UK), as described by Sher (8).

Cell morphology was routinely assessed by phase-contrast microscopic observations. At the end of the experimental period, cultured cells were finally rinsed twice with 2 mL of 0.9% NaCl and scrapped off with 1 mL of 1 M NaOH for the determination of their protein concentrations, according to Bradford (9).

LDH release. The release of LDH from the neuronal cells exposed to hypoxia-reoxygenation was monitored as a function of time in the extracellular medium, using the spectrophotometric method described by Amador *et al.* (10). LDH catalyzes the oxidation of lactate to pyruvate with simultaneous reduction of NAD. The formation of reduced NADH results in an increase in absorbance at 340 nm which is directly proportional to LDH activity in the sample.

Glucose transport and incorporation. Specific transport and incorporation of glucose into the cultured neurons was evaluated by the measurement of the specific uptake of 2-[³H]DG (11).

The culture dishes were washed twice in a HEPES-buffered Krebs-Ringer solution (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 25 mM HEPES, pH 7.40) and incubated in 2 mL of the Krebs-Ringer saline medium for 15 min, at 37°C. The medium was then discarded, and the assay was then initiated by adding 1.5 mL of the buffer solution containing 1 mM 2-[³H]DG (960 GBq/mmol, DuPont NEN, Boston, MA). After a 30-min incubation, the radioactive medium was quickly removed, and the cultures were rapidly washed three times with physiologic saline. After drying, the cells were solubilized in 1 mL of 1 M NaOH, and samples were taken for scintillation counting. Nonspecific uptake of 2-[³H]DG was assessed by measuring the residual radioactivity in the cultured cells by the same experimental procedure performed in the additional presence of 100 mM D-glucose.

Superoxide radical production. The presence of superoxide radicals was quantified in the cell incubating medium by a second derivative spectrophotometric method using acetylcytochrome *c* as previously described (7).

Due to interference of the original culture medium containing phenol red with the spectrophotometric signal resulting from the reduction of acetylcytochrome *c*, cultured neurons were rinsed twice, immediately before cell exposure experiments, with 2 mL of a sterile HEPES-buffered Krebs-Ringer saline solution. Then, 1.5 mL of the buffer solution containing 60 μ M acetylcytochrome *c* were added to each culture dish. Aliquots of culture incubating medium were sampled at various time intervals, diluted in degassed distilled water, and analyzed spectrophotometrically for the amount of acetylcytochrome *c* reduced. The absorption and the second derivative spectra were recorded between 500 and 600 nm against distilled water in a double-beam spectrophotometer (Uvikon 820, Kontron). The solution was then fully reduced by the addition of a few grains of sodium dithionite, and the second order derivative was recorded again. The amplitude variations were measured between the valley at 550 nm and the peak at 556 nm in both cases, and the amount of acetylcytochrome *c* reduced was expressed as a ratio of the amplitudes measured

before and after the reduction of the preparation by sodium dithionite. As previously reported, the additional presence of superoxide dismutase (1 330 U/mL) in the Krebs-Ringer solution during cell incubation totally abolished the reduction of acetyl-cytochrome c (7).

Statistical analysis. For each parameter studied, data obtained under the various gassing regimens were compared with those obtained under the respective control conditions. In this respect, normoxia-hyperoxia and hypoxia-normoxia groups were compared with the normoxia-normoxia group, whereas the hypoxia-hyperoxia group was compared with the normoxia-hyperoxia group. In addition, comparisons were made between hypoxia-hyperoxia and hypoxia-normoxia groups to evaluate significant changes related to transient hyperoxia during the reoxygenation period. Statistical analyses were performed by means of the Bonferroni test for multiple comparisons (12). Conservative multiple comparison procedures were chosen to reduce the likelihood of type II errors.

RESULTS

Characteristics of the extracellular fluid. As shown in Table 1, exposure of the cultured neurons to an anaerobic environment for 6 h reduced Po₂ by 78%. Three hours after return to normoxic conditions, Po₂ increased by 314% in the incubating medium, but reached a lower value than in control cultures. By contrast, Po₂ was significantly above control values 24 h later. Whereas Pco₂ was not modified by hypoxia, pH of the extracellular medium decreased compared with controls, and was still low 3 and 24 h after the end of exposure to hypoxia. Similar changes in pH values were recorded in the cell culture medium after hypoxia-hyperoxia, whereas extracellular Po₂ decreased by 78% after hypoxia, and then increased by 235% above normal values during hyperoxic reoxygenation. Finally, transient hyperoxia alone altered only Po₂ values, without significant changes in other parameters, i.e. pH and Pco₂.

Neuronal cultured cells. Six-day-old cultures grown in serum-free medium on a polylysine substratum showed a very high percent (more than 97%) of living cells, as demonstrated by Trypan blue exclusion, with very few (<7%) nonneuronal

elements, as previously shown in preliminary immunocytochemical characterization (data not shown). The cultures exhibited polygonal perikarya, with some cellular clumps, interconnected by a dense fiber network.

When not associated with preliminary hypoxia, hyperoxia for 3 h did not induce any changes in cell morphology over the whole experimental period, i.e. 72 h.

No significant morphologic alteration was noticeable after hypoxia-reoxygenation until cell examination at 72 h posthypoxia. Accordingly, protein levels in cultured neurons previously exposed to hypoxia-reoxygenation did not differ significantly from controls at T = 24 h (169.8 ± 18.4 versus 168.0 ± 10.6 µg/dish). Conversely, protein concentrations in the cells were reduced by 32% (p < 0.05) at 72 h posthypoxia. Cellular proteins exhibited a nonsignificant 18% reduction when transient hyperoxia occurred during reoxygenation. Concomitantly to the reduction of their protein contents, cultured neurons displayed marked morphologic alterations, i.e. neurite fragmentation associated with floating dead cells, reflecting cell degeneration. With the methodology used for the evaluation of cell morphology and viability, it was not possible to show any difference at this end point between hypoxia-normoxia and hypoxia-hyperoxia groups.

Lactate dehydrogenase release. Neurons in primary culture maintained under standard conditions released detectable levels of LDH that accumulated in the incubating medium. Although there was no significant differences between the successive medium samples taken at the various time intervals, extracellular levels of LDH tended to increase as a function of time (Table 2).

Whereas hyperoxia alone did not enhance the release of LDH by the neurons, hypoxia increased significantly the amount of LDH in the extracellular fluid. It increased by 106% immediately at the end of the hypoxic insult, and by 223% 3 d later. In the hypoxia-hyperoxia group, LDH efflux from the cells also increased, but it appeared to reach lower levels at T = 72 h than in the hypoxia-normoxia group (p < 0.01).

Glucose transport and incorporation. As shown in Table 3, specific uptake of 2-[³H]DG by the cultured neurons was significantly increased after hypoxia, and such changes in the cell energy metabolism lasted for at least 24 h after reoxygenation. By contrast, 2-[³H]DG uptake decreased by 23% below basal values 3 d posthypoxia, when morphologic alterations became apparent. A similar profile of glucose transport was recorded after hypoxia-hyperoxia, although the reduction of 2-[³H]DG uptake at T = 72 h was smaller than after hypoxia-normoxia. Finally, a transient exposure of the neuronal cells to hyperoxia enhanced glucose transport and incorporation (22% at T = 24 h).

Superoxide radical formation. In control neurons grown in our culture conditions, a basal level of superoxide radicals, as reflected by a specific reduction of acetyl-cytochrome c, was measured in the extracellular medium. It corresponds to 3.3 and 8.6 nmol of superoxide detected/100 µg of protein after 6 and 24 h, respectively (Table 4).

After hypoxia, a significant increase in the radical formation was measured. It reached 53% over basal values at the end of exposure to hypoxia, and 108% the day after reoxygenation.

Table 1. Evolution of pH and Po₂ in the incubating medium of cultured neurons

Group		pH	Po ₂
Normoxia-normoxia	T ₀	7.27 ± 0.02	139.2 ± 0.2
	T _{6 h}	7.23 ± 0.03	140.0 ± 0.3
	T _{9 h}	7.24 ± 0.02	143.4 ± 0.2
	T _{24 h}	7.26 ± 0.01	141.1 ± 0.3
Hypoxia-normoxia	T _{6 h}	7.15 ± 0.01**	31.7 ± 3.3**
	T _{9 h}	7.14 ± 0.02**	131.3 ± 4.9*
	T _{24 h}	7.14 ± 0.03**	146.7 ± 0.5**
Hypoxia-hyperoxia	T _{6 h}	7.10 ± 0.02**	29.6 ± 3.6**
	T _{9 h}	7.09 ± 0.01**	480.7 ± 15.1**
	T _{24 h}	7.14 ± 0.02**	145.0 ± 0.6**

Po₂ values are reported in mm Hg. Data are expressed as mean values ± SD from 12 representative samples. Statistically significant difference from the normoxia-normoxia group: * (p < 0.05), ** (p < 0.01) (Bonferroni multiple comparison test).

Table 2. Effects of hypoxia and reoxygenation on LDH release into the extracellular medium

Group	T _{0 h}	T _{9 h}	T _{24 h}	T _{72 h}
Normoxia-normoxia	0.69 ± 0.19	0.68 ± 0.30	0.78 ± 0.34	0.84 ± 0.22
Normoxia-hyperoxia	0.69 ± 0.19	0.63 ± 0.22	0.73 ± 0.38	0.82 ± 0.26
Hypoxia-normoxia	1.42 ± 0.30**	1.59 ± 0.41**	2.44 ± 0.30***	2.71 ± 0.41**
Hypoxia-hyperoxia	1.42 ± 0.30**	1.48 ± 0.30**	1.83 ± 0.26***	2.06 ± 0.30***

Data are expressed in international units/L/100 µg protein and are reported as mean values ± SD from 16 different samples: ° ($p < 0.05$) and °° ($p < 0.01$), statistically significant difference with the preceding time-point: ** ($p < 0.01$), statistically significant difference vs the control group; *** ($p < 0.01$), statistically significant difference between hypoxia-normoxia and hypoxia-hyperoxia groups (Bonferroni multiple comparison test).

Table 3. Effects of hypoxia and reoxygenation on specific transport and incorporation of 2-[³H]DG into cultured cells

Group	T _{0 h}	T _{9 h}	T _{24 h}	T _{72 h}
Normoxia-normoxia	89.6 ± 8.7	84.6 ± 6.4	83.5 ± 7.2	86.1 ± 7.9
Normoxia-hyperoxia	89.6 ± 8.7	91.2 ± 9.5	102.1 ± 9.8***	93.7 ± 8.3*
Hypoxia-normoxia	108.9 ± 17.6**	106.2 ± 13.3**	113.3 ± 7.9**	66.1 ± 10.2***
Hypoxia-hyperoxia	108.9 ± 17.6**	110.8 ± 17.1**	119.4 ± 10.6**	81.7 ± 9.5***

Data obtained during a 30-min incubation of the cells at 37°C with 2-[³H]DG, as described in the text, are expressed in nmol/mg protein and are reported as mean values ± SD from 16 to 42 different samples: ° ($p < 0.05$) and °° ($p < 0.01$), statistically significant difference with the preceding time point: * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$), statistically significant difference vs the control group; *** ($p < 0.01$), statistically significant difference between hypoxia-normoxia and hypoxia-hyperoxia groups (Bonferroni multiple comparison test).

Table 4. Effects of hypoxia and reoxygenation on superoxide radical production in the cell surrounding medium

Group	T _{0 h}	T _{9 h}	T _{24 h}
Normoxia-normoxia	3.8 ± 1.7	5.4 ± 1.1°°	8.6 ± 1.2°°
Normoxia-hyperoxia	3.8 ± 1.7	4.9 ± 1.9	8.2 ± 1.5°°
Hypoxia-normoxia	5.8 ± 2.1**	8.8 ± 3.0°°***	17.9 ± 3.4°°***
Hypoxia-hyperoxia	5.8 ± 2.1**	7.3 ± 2.6*	15.7 ± 3.4°°***

Data are expressed in nmol/100 µg protein and are reported as mean values ± SD from 28 to 56 different samples: °° ($p < 0.01$), statistically significant difference with the preceding time point: * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$), statistically significant difference vs the control group (Bonferroni multiple comparison test).

Whereas hyperoxia by itself did not alter the cellular formation of superoxide compared with normoxic conditions, transient hyperoxia after hypoxia did not seem to exacerbate the hypoxia-induced production of superoxide, because the final amounts of superoxide radicals detected at $T = 24$ h in the hypoxia-hyperoxia culture group were not significantly different from those in the hypoxia-normoxia group. Unfortunately, because of the inability to keep cultured neuronal cells for several days in Krebs-Ringer buffer such as the one necessary for the measurement of acetyl-cytochrome *c* reduction, it was not possible to analyze superoxide production at $T = 72$ h.

DISCUSSION

Several studies have focused on the effects of oxygen concentration in postasphyxia resuscitation using various animal models (13–15) and in clinical investigation (16). They were primarily devoted to report survival rates or responses of physiologic parameters after the use of either 21 or 100% oxygen. The data generally support the conclusion that room air is as effective as 100% oxygen during resuscitation at birth, and adequate ventilation appears to be more important than oxygen supplementation. A critical question is whether post-hypoxic oxygen supplementation has significant effects on brain damage when tissue is exposed to above normal oxygen pressures, because complex biochemical changes, especially

free radical generation, are known to occur in the CNS during hyperoxia (17–19). In this respect, Huang *et al.* (15) showed that, although increasing the fractional concentration of inspired oxygen (F_{iO_2}) to 100% after asphyxia can improve cortical oxygenation, it leads to greater disturbance of brain dopamine metabolism which may contribute to cerebral injury.

To investigate the influence of transient hyperoxia after hypoxia on cell energy metabolism and superoxide production, the use of neuron-enriched cultures is particularly appropriate, because neurons are the most vulnerable cells to hypoxia-ischemia (20), and glial cells have been reported to protect neurons against anoxia-induced injury (21). When used in this study, neurons in culture are fully differentiated, express functional synapses, and have reached a developmental stage theoretically comparable to that achieved in the newborn rat brain (22).

PO_2 values in the incubating medium of such monolayer cultures was reduced by 75–80% under anaerobic conditions (95% N_2 /5% CO_2) compared with controls. The decrease in PO_2 was accompanied by a significant reduction in pH values, which probably reflects the accumulation of lactate and H^+ , secondarily to the shift from oxidative to anaerobic metabolism. Although some experimental evidence suggests that acidosis can alter the brain cell integrity, including that of newborns (23), it has been shown that anaerobic energy metabolism produces smaller amounts of lactate in immature than in adult brain tissue (24), and that, in neurons *in vitro*, hypoxia-induced changes in pH, lactate, and bicarbonate are not neurotoxic by themselves (25). One day after standard reoxygenation (95% air/5% CO_2), the extracellular pH remained low, whereas PO_2 was significantly higher than control values. Similar data have been reported previously by Sher (8) who attributed late PO_2 changes to an increased tissue oxygen tension resulting from a posthypoxic decreased cerebral metabolic rate of O_2 .

The posthypoxic evolution of cell morphology and protein levels confirms the relative resistance of immature brain cells to asphyxia (26). Indeed, no cell alteration could be detected

with our method within 24 h after the hypoxic insult when neurons were kept in serum-free culture medium or even in Krebs-Ringer solution. By contrast, LDH efflux appears as a good and early marker in reflecting the adverse effects of the reduction in oxygen supply, because LDH levels in the extracellular medium increased as soon as the end of exposure to hypoxia, and such an increase lasted for the whole experimental period, *i.e.* 72 h. When neuronal cells were maintained for 24 h in Krebs-Ringer for the determination of superoxide radicals, LDH was shown to increase more sharply (20–22% over values measured in serum-free culture medium), undoubtedly because the incubation medium in these experiments was less optimal than usual. Marked morphologic alterations, including neurite fragmentation and cell lysis, that were concomitant with a significant loss in protein contents, were currently observed only 3 d posthypoxia, suggesting that neurons in primary culture can develop “delayed cell injury,” as already described in various animal models *in vivo* (27).

Under severe hypoxic conditions, there is a rapid failure in ATP generation, with a concomitant activation of anaerobic glycolysis. It has been demonstrated that glucose is the primary energy substrate for the brain in fetuses and newborns as well as in adults (28, 29). Although other substrates such as ketone bodies may provide alternate fuels in some pathologic conditions, their consumption requires oxygen and thus only glucose is capable of sustaining brain energy metabolism, via anaerobic glycolysis, in hypoxia-ischemia. Therefore, the increase in 2-[³H]DG incorporation into the cultured cells which was observed immediately at the end of the exposure to hypoxia probably reflects the activation of glycolysis, as previously reported *in vivo* (30). Several hours after cell reoxygenation, 2-[³H]DG-specific transport remained high above control values. Such an observation might be related to a cellular hypermetabolism, maybe consecutively to specific changes in neurotransmitter systems, especially excitatory amino acids that are known to participate to death of hypoxic neurons (31).

The role of the superoxide radical in hypoxic-ischemic brain tissue injury and edema has been well documented (32). Although there is only little information regarding the relationship between free radical formation and perinatal hypoxic-ischemic brain damage (3), superoxide radicals have been detected in the extracellular fluid of the newborn pig brain during postischemic reperfusion (33), and it has been shown that these compounds formed within the cells can reach the extracellular space (34). Whereas control neuronal cultures produced low levels of superoxide, a 6-h exposure to hypoxia increased significantly the free radical amounts measured in the incubation medium. Accordingly, it has been demonstrated that the formation of superoxide radicals does not occur only during tissue reoxygenation, but also under physiologic conditions as well as during hypoxia, when cells are exposed to very low oxygen concentrations (35). Three hours after the onset of reoxygenation and then on the following day, the production of superoxide increased sharply, and this phenomenon may account for final cell injury. The mechanisms that are known to be involved in the formation of free radicals include 1) activation by cytosolic calcium of intracellular oxidases, especially xanthine oxidase which converts hypoxanthine to xanthine

(36), 2) release of excitatory amino acids and subsequent stimulation of their receptors (37), and 3) impairment of mitochondrial energy conservation (38). In their study, Littauer and de Groot (39) reported that the release of reactive oxygen species, as reflected by the formation of hydrogen peroxide, during reoxygenation of cultured hepatocytes originates from the mitochondrial respiratory chain when the O₂ reintroduction increased from 0 to 2%, whereas other sources, *i.e.* nonenzymatic ones, contribute to a lesser extent to the generation of such compounds when O₂ content is further increased. In addition, free radical detoxifying enzymes, *e.g.* glutathione peroxidase and superoxide dismutases, are inhibited during and after hypoxia (40).

During reoxygenation of the cultured neurons with hyperoxic gas mixture (95% O₂/5% CO₂), the mean Po₂ in the incubating medium increased from 30 to 480 mm Hg. When compared with standard reoxygenation, there was no apparent difference in the morphologic outcome of the neurons. Under both reoxygenation conditions, cellular alteration became apparent only 3 d posthypoxia, and then neurons exhibited vacuolization and neurite fragmentation, concomitantly with decreased energy metabolism and enhanced LDH efflux. Moreover, final protein concentrations, glucose incorporation, and LDH leakage tended to be less altered when neurons were submitted to transient hyperoxia during reoxygenation.

A burst of reactive oxygen-derived radical production can be generated in the CNS as soon as reoxygenation occurs (41), and one may expect that such a process is amplified during posthypoxic hyperoxia. Surprisingly, superoxide amounts detected in the cell surrounding medium were not enhanced by hyperoxia, suggesting that “normal” reoxygenation is as effective as hyperoxia to generate these radicals. It should be noticed, however, that in all culture models, normoxia is classically achieved by incubating cells in 95% air/5% CO₂ gas mixture, leading to oxygen tension around 140 mm Hg. It is clear that this value is significantly higher than the oxygen tension in the brain of newborn animals, even when 100% oxygen was given previously (42). This may be important as it has been shown in liver and kidney *in vitro* that lipid peroxidation increased sharply at oxygen tension between 10 and 50 mm Hg (43). On the other hand, *in vivo* animal studies after brain ischemia have provided conflicting results, and it was postulated by Agardh *et al.* (44) that generation of free radicals during reoxygenation is critically dependent on the extent of ischemia, but not on the different oxygen tensions.

The data obtained in the present study indicate that transiently elevated oxygen concentrations during reoxygenation does not appear to be more deleterious for the cell integrity, at least in newborn brain neurons. Such observations are in accordance with the well known higher resistance of neonates to the lethal effects of exposure to high oxygen levels (45), and also correlate with the hypothesis that sudden normoxic reoxygenation results in near maximal oxygen radical production. However, in our work, only the direct effects of hypoxia/reoxygenation on the neurons were tested, and other cell types may also be important for the ultimate brain damage. For instance, microglial cells, forming a network of potential immunoeffector cells, have been shown as a cellular source of

oxygen free radicals (46). In addition, the enzyme system xanthine dehydrogenase/oxidase is enriched in brain capillaries, and it was assumed that endothelial cells and the microvasculature are especially prone to oxygen radical damage, although some studies indicated that xanthine oxidase is not the predominant source of radicals in the ischemic brain, and microvasculature is not the primary target of radical-mediated damage (47).

Recently, evidence has been provided that the overall amount of oxygen received by the newborn may be less detrimental than fluctuating changes in oxygen concentrations. Indeed, with respect to the pathogenesis of retinopathy of prematurity, it has been shown that excessive oxygen alone is not the single overriding factor, and that fluctuating changes in oxygen pressure play a critical role (48). Our data are in good agreement with such a hypothesis regarding hypoxia-induced neuronal cell damage. It is conceivable that alternating hypoxia and reoxygenation may cause more severe injury. Also, it may be hypothesized that our observations may be related to an hyperoxia-induced increase in antioxidant enzyme activities in the neonatal brain, as already shown in the lung (49), and further investigations are now required to answer this question.

REFERENCES

- Hill A 1991 Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. *Pediatr Neurol* 7:317-325
- Gray PH, Tudehope DI, Masei JP, Burns YR, Mohay HA, O'Callaghan MJ, Williams GM 1993 Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: prediction of outcome. *Dev Med Child Neurol* 35:965-973
- Vannucci RC 1990 Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. *Pediatr Res* 27:317-326
- American Heart Association 1992 Guidelines for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiac care. *JAMA* 268:2276-2291
- Leahy F, Sankaran K, Cates D, Mac Callum M, Rigatto H 1978 Changes in cerebral blood flow in preterm infants during inhalation of CO₂ and 100% O₂. *Clin Res* 26:879A
- Gunn TR, Eastdown J, Outerbridge EW, Aranda JV 1980 Risk factors in retrolental fibroplasia. *Pediatrics* 65:1096-1100
- Daval JL, Ghersi-Egea JF, Oillet J, Koziel V 1995 A simple method for evaluation of superoxide radical production in neural cells under various culture conditions: application to hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:71-77
- Sher PK 1990 Chronic hypoxia in neuronal cell culture: metabolic consequences. *Brain Dev* 12:293-300
- Bradford MM 1976 A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Amador E, Dorfman LE, Wacker WEC 1963 Serum lactic dehydrogenase: an analytical assessment of current assays. *Clin Chem* 9:391-398
- Daval JL, Anglard P, Gerard MJ, Vincendon G, Louis JC 1985 Regulation of deoxyglucose uptake by adrenocorticotrophic hormone in cultured neurons. *J Cell Physiol* 124:75-80
- Kirk RE 1968 Experimental Design: Procedures for the Behavioral Sciences. Brooks-Cole, Belmont, CA
- Campbell AGM, Cross KW, Dawes GS, Hyman AI 1966 A comparison of air and O₂ in a hyperbaric chamber or by positive pressure ventilation, in the resuscitation of newborn rabbits. *J Pediatr* 68:153-163
- Rootwelt T, Löberg EM, Moen A, Öyasaeter S, Saugstad OD 1992 Hypoxemia and reoxygenation with 21% or 100% oxygen in newborn pigs: changes in blood pressure, base deficit and hypoxanthine and brain morphology. *Pediatr Res* 32:107-113
- Huang CC, Yonetani M, Lajevardi N, Delivoria-Papadopoulos M, Wilson DF, Pastuszko A 1995 Comparison of postasphyxial resuscitation with 100% and 21% oxygen on cortical oxygen pressure and striatal dopamine metabolism in newborn piglets. *J Neurochem* 64:292-298
- Ramji S, Ahuja S, Thirupuram S, Rootwelt T, Rooth G, Saugstad OL 1993 Resuscitation of asphyxiated newborn infants with room air or 100% oxygen. *Pediatr Res* 34:809-812
- Kovachich GB, Mishra OP 1981 Partial inactivation of Na, K-ATPase in cortical brain slices incubated in normal Krebs-Ringer phosphate medium at 1 and 10 atm oxygen pressure. *J Neurochem* 36:333-335
- Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A 1986 The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48:703-719
- Zhang J, Su Y, Oury TD, Piantadosi CA 1993 Cerebral amino acid, norepinephrine and nitric oxide metabolism in CNS oxygen toxicity. *Brain Res* 606:56-62
- Puisinelli WA, Brierley J 1979 A new model of bilateral hemispheric ischemia in an anesthetized rat. *Stroke* 10:267-282
- Vibulstret S, Hefti F, Ginsberg MD, Dietrich WD, Busto R 1987 Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia. *Brain Res* 422:303-311
- Laerum OD, Steinsvag S, Bjerkvig R 1985 Cell and tissue culture of the central nervous system: recent developments and current applications. *Acta Neurol Scand* 72:529-549
- Stoik JA, Olsen JJ, Reeves PM, Chen M, Perry C, Alderman DW, Lee YC, Schweizer P 1989 *In vivo* [³¹P]NMR studies on the influence of age on rat brain hypoxia. *Brain Res* 482:1-11
- Vannucci RC, Duffy TE 1977 Cerebral metabolism in newborn dogs during reversible asphyxia. *Ann Neurol* 1:528-534
- Sher PK 1990 The effects of acidosis on chronically hypoxic neurons in culture. *Exp Neurol* 107:256-262
- Kabat H 1970 The greater resistance of very young animals to arrest of the brain circulation. *Am J Physiol* 130:588-599
- Kirino T 1982 Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239:57-69
- Jones MD, Burd LL, Makowski EI, Meschia G, Battaglia FC 1975 Cerebral metabolism in sheep: a comparative study in the adult, the lamb, and the fetus. *Am J Physiol* 229:235-239
- Settergren G, Lindblad BS, Persson B 1980 Cerebral blood flow and exchange of oxygen, glucose, ketone bodies, lactate, pyruvate and amino acids in anesthetized children. *Acta Paediatr Scand* 69:457-465
- Bömont L, Bilger A, Boyer S, Vert P, Nehlig A 1992 Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. *Dev Brain Res* 66:33-45
- Rothman SM 1983 Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* 220:536-537
- Ikeda Y, Long DM 1990 The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery* 27:1-11
- Armistead WM, Mirro R, Busija DW, Leffler CV 1988 Post-ischemic generation of superoxide anion by newborn pig brain. *Am J Physiol* 255:H401-H403
- Kontos HA, Wei EP, Ellis EF, Jenkins JW, Povlishock JT, Rowe GT, Hess ML 1985 Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cats. *Circ Res* 57:142-151
- Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD, Seligman ML 1980 The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand Suppl* 492:91-119
- Saugstad OD 1988 Hypoxanthine as an indicator of hypoxia: its role in health and disease through free radical production. *Pediatr Res* 23:143-150
- Pellegrini-Giamperio DE, Chenci G, Alesiani M, Caria V, Moroni F 1990 Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-1041
- Nohi H, Koltov V, Stoize K 1993 Ischemia/reperfusion impairs mitochondrial energy conservation and triggers superoxide release as a byproduct of respiration. *Free Radical Res Commun* 18:127-137
- Littauer A, de Groot H 1992 Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria. *Am J Physiol* 262:G1015-G1020
- Guarnieri C, Flamigni F, Caldarera CM 1980 Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 12:797-808
- Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC 1991 Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 71:1185-1195
- Lajevardi N, Huang CC, Tammela O, Pastuszko A, Wilson DF, Delivoria-Papadopoulos M 1992 The effect of apneic episodes on cerebral cortical oxygenation in newborn piglets. *Pediatr Res* 33:220A(abstr)
- Salaris SC, Babbs CF 1989 Effect of oxygen concentration on the formation of malondialdehyde-like material in a model of tissue ischemia and reoxygenation. *Free Radical Biol Med* 7:603-609
- Agarsh CD, Zhang H, Smith ML, Siesjö BK 1991 Free radical production and ischemic brain damage: influence of postischemic oxygen tension. *Int J Dev Neurosci* 9:127-138
- Frank L, Bucher JR, Roberts RJ 1978 Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol* 45:699-704
- Banati RB, Rothe G, Valet G, Kreuzberg GW 1991 Respiratory burst in brain macrophages: a flow cytometric study on cultured rat microglia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 17:223-230
- Betz AL 1990 Effect of the free radical scavenger dimethylthiourea in experimental cerebral ischemia. In: Kneglstein J, Oberpichler H (eds) *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Wiss Verlagsges. Stuttgart, pp 335-342
- Penn JS, Henry MM, Toiman BL 1994 Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat. *Pediatr Res* 36:724-731
- Keeney SE, Cress SE, Brown SE, Bidani A 1992 The effect of hyperoxic exposure on antioxidant enzyme activities of alveolar type II cells in neonatal and adult rats. *Pediatr Res* 31:441-444

3) Analyse des récepteurs du glutamate dans les neurones de cerveau de rat fœtal en culture primaire

3.1. objectif de l'étude

De nombreux travaux ont mis l'accent sur l'hyperexcitabilité engendrée par une libération massive d'acides aminés neuroexcitateurs, en particulier de glutamate, à la suite d'un épisode hypoxique/ischémique aigu. L'hypothèse de l'excitotoxicité incrimine une augmentation de la concentration extracellulaire en acides aminés excitateurs, provoquant une dépolarisation neuronale prolongée. Celle-ci conduirait à des modifications de la perméabilité membranaire avec des mouvements ioniques, en particulier des ions calcium dont la surcharge va activer des systèmes enzymatiques conduisant à des altérations des protéines de structure et à la peroxydation des lipides membranaires. Cependant, afin de pouvoir évaluer la participation excitotoxique du glutamate dans notre modèle, il s'est avéré indispensable d'étudier le degré de maturation fonctionnelle du système glutamatergique dans les neurones en culture.

Dans ce but, nous avons recherché la présence de récepteurs spécifiques du glutamate et tenté d'en caractériser les différents sous-types (NMDA, AMPA, kaïnate, L-AP4 et métabotropes). Les caractéristiques de ces sites récepteurs dans les neurones *in vitro* ont été comparées à celles des mêmes types présents dans le cerveau de rat nouveau-né, étant donné que, dans les conditions de culture utilisées, les neurones sont testés à un stade de maturation théoriquement comparable à celui du cerveau à la naissance. Leur capacité fonctionnelle a été évaluée en mesurant l'effet du glutamate sur le degré de polarisation membranaire des cellules.

3.2. approche expérimentale

Les cultures de neurones en milieu chimiquement défini ont été utilisées au stade de 8 jours. Les préparations membranaires ont été obtenues selon le même protocole que celui employé pour les cerveaux de nouveau-né, par homogénéisations et centrifugations successives. L'expérimentation a eu lieu soit dans un tampon Tris-acétate sans ion, soit dans un tampon Tris-HCl contenant des ions sodium, chlorure et calcium afin de distinguer les différents sites de liaison dépendants ou non de ces ions (comme cela a été spécifié dans le chapitre consacré au glutamate et à ses récepteurs).

La liaison spécifique du L-glutamate [^3H] a été mesurée en incubant les neurones ou les préparations membranaires à 30°C dans les différents milieux avec ou sans ions et en présence ou non d'un inhibiteur de recapture du glutamate, le L-aspartate- β -hydroxamate (LA β H). Les

temps d'incubation, déterminés au préalable par des études de cinétique de liaison, ont été fixés à 10 mn en tampon tris-acétate et à 30 mn en tampon Tris-HCl. Les différentes classes de récepteurs du glutamate ont été étudiées par déplacement de la liaison spécifique du L-glutamate[^3H] par des agonistes spécifiques: NMDA, AMPA, quisqualate, kaïnate et trans-ACPD.

Les propriétés fonctionnelles des récepteurs ont été évaluées par l'étude de l'effet dépolarisant du glutamate sur les neurones en mesurant la distribution transmembranaire d'un cation lipophile, le tétraphénylphosphonium (TPP[^3H]), dont l'accumulation intracellulaire diminue en fonction de l'intensité de la dépolarisation.

3.3.principaux résultats

En présence d'un puissant inhibiteur de sa recapture, le glutamate s'est lié à un nombre total de sites (B_{max}) de 36,7 pmol/mg de protéines pour des cellules intactes incubées dans un tampon Tris-HCl contenant Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- , avec un K_d proche de 2 μM . En l'absence de ces ions, la liaison spécifique a été réduite à 14,2 pmol/mg de protéines avec un K_d de 550 nM. Dans les mêmes conditions, des valeurs similaires de K_d ont été obtenues pour des membranes isolées de cultures ou de cerveaux de rats nouveau-nés. Par ailleurs, les valeurs de B_{max} ont été significativement plus faibles dans les membranes de cultures que dans les cellules intactes ou les cerveaux de nouveau-nés. Des études de déplacement ont montré que le NMDA était le composé le plus puissant vis-à-vis de l'inhibition de la liaison du glutamate dans les membranes issues des neurones en culture aussi bien que des cerveaux de nouveau-nés, tandis que le quisqualate, l'AMPA, le kaïnate et le trans-ACPD étaient équivalents.

3.4.conclusion de l'étude

En accord avec l'influence des ions sur la liaison du glutamate, il apparaît que les neurones cultivés à partir de cerveaux antérieurs d'embryons de rats expriment, après 8 jours *in vitro*, les divers sous-types de récepteurs du glutamate, principalement les récepteurs L-AP4 et NMDA, avec des caractéristiques proches de celles des récepteurs présents dans le cerveau des rats nouveau-nés. Ces récepteurs présentent des propriétés fonctionnelles comme en témoigne l'effet d'une exposition transitoire des cellules au glutamate conduisant à une inhibition de 70% du prélèvement du TPP[^3H].

3.5.publication

Analysis of Glutamate Receptors in Primary Cultured Neurons from Fetal Rat Forebrain

J. Oillet,¹ F. Nicolas,¹ V. Koziel,¹ and J. L. Daval^{1,2}

(Accepted February 27, 1995)

In order to further analyze the development of glutamatergic pathways in neuronal cells, the expression of excitatory amino acid receptors was studied in a model of neurons in primary culture by measuring the specific binding of L-[³H]glutamate under various incubation conditions in 8-day-old intact living neurons isolated from the embryonic rat forebrain, as well as in membrane preparations from these cultures and from newborn rat forebrain. In addition, the receptor responsiveness to glutamate was assessed by studying the uptake of tetraphenylphosphonium (TPP⁺) which reflects membrane polarization. In the presence of a potent inhibitor of glutamate uptake, the radioligand bound to a total number of sites of 36.7 pmol/mg protein in intact cells incubated in a Tris buffer containing Na⁺, Ca²⁺, and Cl⁻, with a K_d around 2 μM. In the absence of the above ions, [³H]glutamate specific binding diminished to 14.2 pmol/mg protein with a K_d-value of 550 nM. Under both of the above conditions, similar K_d were obtained in membranes isolated from cultures and from the newborn brain. However, B_{max}-values were significantly lower in culture membranes than in intact cells or newborn membranes. Displacement studies showed that NMDA was the most potent compound to inhibit [³H]glutamate binding in membranes obtained from cultured neurons as well as from the newborn brain, whereas quisqualate, AMPA, kainate and *trans*-ACPD were equally effective. According to these data and to the ionic dependence of glutamate binding, it was concluded that cultured neurons from the rat embryo forebrain express various glutamate receptor subtypes, mainly L-AP4 and NMDA receptors, with characteristics close to those in the newborn brain, and which display functional properties since a transient cell exposure to glutamate led to a 70% inhibition of [³H]TPP⁺ uptake.

KEY WORDS: Glutamate; receptor; binding; cultured neurons; rat forebrain.

INTRODUCTION

The excitatory amino acid (EAA) L-glutamate plays an important role in the mammalian central nervous system (1,2). In the developing brain, glutamate regulates the formation, modulation and degeneration of brain cytoarchitecture, by altering neuronal outgrowth and syn-

aptogenesis (3,4). Beyond its functions as a neurotransmitter in numerous regions of the central nervous system, glutamate has been specifically implicated in learning and memory processes (5), and its excitotoxic properties are thought to underlie several neurological pathologies, including those related to hypoglycemia, hypothermia, cerebral ischemia, stroke, epilepsy, Alzheimer's disease, Huntington's chorea, and AIDS encephalopathy (6). Glutamate exerts its effects as a mixed agonist at EAA receptors which include several forms in the central nervous system, although a definitive classification is not yet possible (for a recent review, see 7). At least, glutamate receptors may be classified on the

¹INSERM U.272, 24-30 rue Lionnois, B.P. 3069, 54013 Nancy Cédex, France.

²Address reprint requests to: Jean-Luc Daval, Ph.D., INSERM U.272, 24-30 rue Lionnois, B.P. 3069, 54013 NANCY Cédex, France.
Phone (33) 83.37.35.39
Fax (33) 83.32.43.40

basis of their effector systems. Whereas N-methyl-D-aspartate (NMDA), kainate, and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) receptors are coupled to cation-specific ion channels, and thus are called "ionotropic" the "metabotropic" receptors are linked to G-proteins, and are coupled to multiple second messenger systems. A fifth receptor category which is thought to be localized at the presynaptic level, i.e. the 2-amino-4-phosphobutyrate (L-AP4) receptor, seems to be associated with a G-protein, though its effector remains unknown (8). In addition, recent studies have suggested the existence of several types of L-AP4-sensitive receptors (9).

Due to the ubiquitous role of glutamate in the central nervous system, there is a growing interest in the development of model systems enabling a detailed analysis of the biochemical, physiological and morphological responses elicited by EAAs, and cell culture has become an increasingly useful tool for studying cellular processes related to glutamate central actions.

In the present study, in an attempt to characterize the development of the glutamate receptor system in neuronal cells grown *in vitro*, we used a binding assay strategy using L-[³H]glutamate to discriminate the different EAA receptor subtypes in a model of primary cultured neurons from the fetal rat forebrain as well as in membrane preparations from cultures and newborn rat forebrain. Indeed, it has been reported that glutamate binding to its various sites depends on the ionic environment, especially on the presence of Na⁺, Ca²⁺ and Cl⁻ (10-13). Accordingly, it has been shown that the amino acid can bind to three populations of sites which are (i) Na⁺-dependent, (ii) Na⁺-independent and Ca²⁺/Cl⁻-dependent, and (iii) Na⁺-independent and Ca²⁺/Cl⁻-independent. Physiologically and pharmacologically, these different sites correspond respectively to (i) recognition sites for transport system, (ii) L-AP4 presynaptic sites, and (iii) metabotropic and NMDA, AMPA/quisqualate, and kainate ionotropic receptors. Otherwise, as a functional approach, the uptake of the radiolabeled lipophilic cation tetraphenylphosphonium (TPP⁺), which reflects directly the membrane potential (14), was measured into intact living neuronal cells, and the influence of a transient exposure to glutamate was studied.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Animals. When they were in the proestrus period, as shown by the observation of daily vaginal smears, Sprague-Dawley female rats (R. Janvier, Le Genest-St-isle, France) were housed together with males for 24 h. They were then maintained in separate cages, under

standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 6:00) with food and water available *ad libitum*. All animal experimentation was carried out with the highest standards of animal care, according to the N.I.H. Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Cell Cultures. Neuronal cell cultures were obtained from 14-day-old rat embryo forebrain. Pregnant female rats were anaesthetized with halothane and living embryos were excised by caesarian under sterile conditions. Whole embryos were placed in culture medium previously equilibrated at 37°C, and forebrains were carefully collected. Neuronal cell suspensions were then obtained as previously described (15,16). Brain tissues were dissected free of meninges and gently dispersed in a mixture of Dulbecco-modified Eagle's medium (DMEM) and Ham's F12 medium (50:50) supplemented with 5% inactivated fetal calf serum. After centrifugation at 700 g for 10 min, the pellet was redispersed in the same medium and passed through a 46 µm-pore size nylon mesh. Density of the cell suspension was measured, and aliquots were transferred into 35 mm petri dishes (Falcon) precoated with poly-L-lysine in order to obtain a final density of 10⁶ cells/dish. Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ - 95% air for 24 h, and the medium was then replaced with a fresh hormonally defined serum-free medium consisting of the DMEM/Ham's F12 mixture enriched with human transferrin (1 mM), insulin (1 mM), putrescine (0.1 mM), progesterone (10 nM), estradiol (1 pM), and Na selenite (30 nM) (17). Subsequent medium changes with chemically defined serum-free medium were performed twice a week.

Membrane Preparations. Forebrain crude membrane preparations were obtained from newborn rats of both sexes. Tissues were homogenized at 2°C in 5 volumes of either 50 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM sodium acetate and 2.5 mM CaCl₂ (pH 7.1) or, when indicated, in 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.1), by means of an Ultra-Turrax apparatus (15 sec, medium speed). The homogenate was centrifuged at 30,000 g for 20 min at 2°C, and the pellet was resuspended in 5 volumes of ice-cold buffer. The homogenate was further centrifuged in the same conditions and the pellet resuspended in 5 volumes of buffer and stored at -20°C until used. The day of the experiment, the membrane suspension was thawed, homogenized, and centrifuged at 30,000 g for 20 min at 2°C. The resulting membrane suspension was then incubated for 30 min at room temperature to remove endogenous glutamate, and then centrifuged again for 20 min at 2°C. The pellet was finally resuspended in buffer to a protein concentration of approximately 2 mg/ml, and used for binding studies.

Crude neuronal membranes were also obtained from 8-day-old cell cultures. Neuronal cells were rinsed twice with 2 ml of 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.1) containing 100 mM NaCl, and then harvested in ice-cold NaCl-free Tris-acetate buffer solution. The cell suspension was homogenized and subsequently centrifuged as described above. The final pellet was homogenized in buffer.

Since it has been shown that freezing alters Ca²⁺/Cl⁻-dependent glutamate binding sites (18), membranes from both cultures or newborn rat brains were immediately used after isolation for glutamate binding assays under ionic-enriched Tris-HCl buffer conditions. By contrast, preliminary observations revealed that no change in binding activity for glutamate occurred for binding assays with Tris-acetate buffer when membrane preparations were kept frozen at -20°C for less than 3 weeks. In all cases, aliquots of the membrane suspensions were taken for protein determination (19), using bovine serum albumin as standard.

[³H]Glutamate Binding Assays. After 3 days *in vitro*, living neuronal cell cultures (0.22 ± 0.07 mg protein/dish) were rinsed twice with 2 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.1) containing 100 mM sodium acetate and 2.5 mM CaCl₂, and were then incubated for 30

Glutamate Receptors in Cultured Neurons

min at 30°C in 1 ml $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -containing Tris-HCl buffer with increasing concentrations (from 20 to 2000 nM) of $[\text{H}]\text{glutamate}$ (1813.0 GBq/mmol, New England Nuclear, Boston, MA), in the absence or in the presence of 500 μM L-aspartate- β -hydroxamate, a potent blocker of glutamate uptake (20). In separate experiments, neuronal cells were incubated with increasing concentrations of $[\text{H}]\text{glutamate}$ for 10 min at 30°C in 50 mM Tris-acetate buffer (pH 7.1). The incubation times for both assay conditions were chosen in preliminary kinetic studies, the equilibrium being reached earlier when samples were incubated in Tris-acetate buffer as compared to the Tris-HCl one.

At the end of the incubation, cultured cells were rapidly washed by 2×2 ml ice-cold buffer, and then solubilized in 1 N NaOH for protein measurement, and determination of radioactivity by liquid scintillation counting in LKB-Optiphase Hisafe II, as previously described (16). Non-specific binding was determined using the same procedure in the additional presence of 500 μM unlabeled glutamate (Sigma).

Membrane preparations from neuronal cell cultures or newborn rat forebrains (0.2–0.3 mg protein) were incubated in a final volume of 1 ml of either 50 mM Tris-HCl buffer containing 100 mM sodium acetate and 2.5 mM CaCl_2 at pH 7.1 for 30 min at 30°C or in 50 mM Tris-acetate, pH 7.1 for 10 min at 30°C, in the presence of various concentrations of $[\text{H}]\text{glutamate}$. Incubations were terminated by rapid centrifugation for 4 min at 13,000 g. The supernatant was aspirated, and the residual pellet was washed with buffer, and then dissolved overnight at room temperature with 300 μl tissue solubilizer (LKB Cossolvi). Tritium content was finally measured by liquid scintillation counting using LKB-Optiphase Hisafe II. Non-specific binding was determined in the presence of 500 μM glutamate, and routinely represented 24–35% of the total binding.

Additionally, glutamate receptor subtypes were studied by displacing $[\text{H}]\text{glutamate}$ specific binding in membrane preparations by various compounds (10^{-7} to 10^{-1} M) which interact selectively with different receptor categories, i.e. NMDA (NMDA receptors), kainic acid (kainate receptors), AMPA, quisquinate (AMPA/quisquinate receptors), and *trans*-1-amino-1,3-cyclohexanedicarboxylic acid (*trans*-ACPD, metabotropic receptors). For each compound tested, the concentration which inhibits by 50% the specific binding of the radioligand (IC_{50}) was determined graphically, and K_i values were calculated from the equation $\text{K}_i = \text{IC}_{50} / (1 - [\text{glutamate}]/\text{K}_d)$. In an attempt to further characterize NMDA receptors in cultured neurons and in the newborn rat brain, specific NMDA-sensitive $[\text{H}]\text{glutamate}$ binding to membrane samples was analyzed by the addition of 0.5 mM NMDA to the assay medium (21,22).

Within a given experiment and for all binding conditions tested, assays were performed in triplicate for both total and non-specific binding.

$[\text{H}]\text{Tetraphenylphosphonium Cellular Distribution.}$ The distribution ratio of TPP^+ between intra- and extracellular compartments was studied by measuring the uptake of $[\text{H}]\text{TPP}^+$ by a modification of the method described by Lichtstein et al. (14) and Friedman et al. (23). Cultured neurons were rinsed twice by 2 ml Hepes-buffered Krebs-Ringer solution (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 0.6 mM MgSO_4 , 6 mM glucose, 10 mM Hepes, pH 7.4). Cells were then preincubated for 25 min at 37°C in 1 ml of the buffer solution containing 6.75 nM $[\text{H}]\text{TPP}^+$ (1383.3 GBq/mmol, N.E.N.), and they were then incubated for 5 min in the additional presence of depolarizing concentrations of either K^+ (135 mM) or glutamate (100 μM). Control cultures were incubated in the same conditions with low K^+ concentrations (5 mM). Cultured cells were finally washed by 2×2 ml of the Krebs-Ringer solution, solubilized with 1 N NaOH, whereas aliquots were taken for subsequent radioactivity scintillation counting and protein determination.

Cellular depolarization was estimated as the percentage of reduction in intracellular/extracellular TPP^+ distribution.

Data Analysis. Specific binding values were plotted according to the Scatchard method. Kinetic parameters (K_d and B_{max}) were calculated using least squares linear regression analysis for culture and membrane preparations. Kinetic parameters were also compared within the different categories of preparations used (i.e., intact cultures, culture membranes, and newborn membranes) by means of Bonferroni multiple comparison procedures (24). Changes in the distribution of the lipophilic cation TPP^+ as compared to control cultures were analysed with a non-paired Student's *t*-test.

RESULTS

Neuronal Cultured Cells. Eight-day-old primary cultures of rat forebrain neurons grown in serum-free medium on a poly-lysine substratum showed a very high percent (more than 97%) of living cells, as demonstrated by Trypan blue exclusion, with very few (< 7%) non-neuronal elements, i.e. glioblasts and fibroblasts, as previously shown in preliminary immunocytochemical characterization (data not shown). The cultures exhibited polygonal perikarya, with some cellular clumps, interconnected by a dense fiber network (Fig. 1).

$[\text{H}]\text{Glutamate Binding.}$ When intact living neuronal cells were incubated with $[\text{H}]\text{glutamate}$ in the presence of Na^+ , Ca^{2+} and Cl^- , but in the absence of L-aspartate- β -hydroxamate, the radioactivity measured in solubilized cells reached 1015 pmol/mg protein ($n=4$). The addition of L-aspartate- β -hydroxamate, which inhibits glutamate uptake, led to a single population of binding sites for $[\text{H}]\text{glutamate}$ with a B_{max} of 36.7 ± 2.9 pmol/mg protein with a K_d value of 2.145 ± 207 nM, as shown by Scatchard analysis. Under the same binding assay conditions, the total number of binding sites for glutamate was reduced by 47% in membrane preparations obtained from cultured cells, whereas the affinity constant was not significantly modified (Fig. 2). In cerebral membranes isolated from the newborn rat fore-

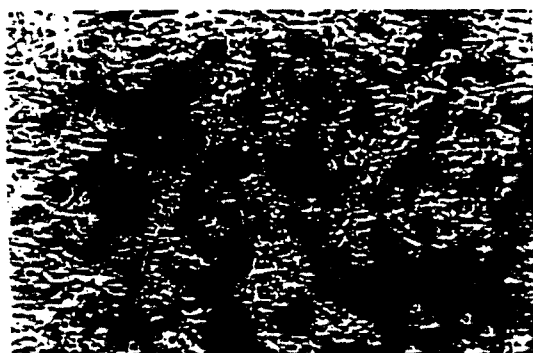


Fig. 1. Phase-contrast microphotograph of neurons isolated from fetal rat forebrain and cultured for 8 days in chemically-defined medium.

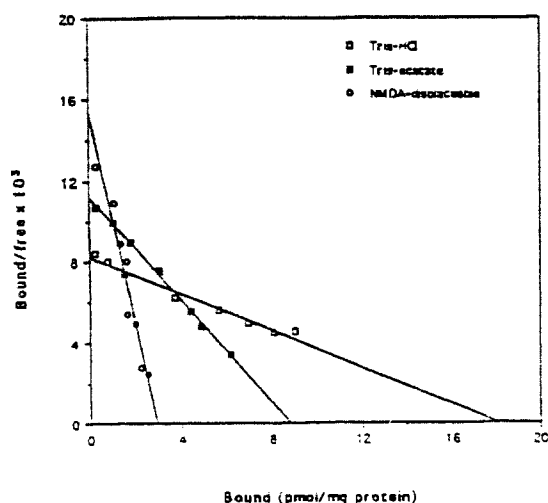


Fig. 2. Scatchard plots obtained from [3 H]glutamate specific binding measured in membranes isolated from 8-day-old cultured neurons. Binding assays with [3 H]glutamate (20 to 2000 nM) were carried out in various incubating media (Na^+ , Ca^{2+} -containing Tris-HCl buffer, Tris-acetate buffer, or 0.5 mM NMDA-containing Tris-acetate buffer) as described in the text. Each plot was generated from a representative experiment.

brain, however, [3 H]glutamate specific binding had almost the same characteristics as in intact cultures (Table I).

When incubated in a buffer solution without Na^+ , Ca^{2+} , and Cl^- (Tris-acetate buffer), intact neuronal cells bound [3 H]glutamate specifically, leading to B_{max} and K_d values of 14.2 ± 1.3 pmol/mg protein and 552 ± 46 nM, respectively. Again, B_{max} was significantly lower in culture membranes as compared to intact cells and newborn membranes, with no changes in K_d values within the different preparations studied (Table I). Following addition of 0.5 mM NMDA to the incubating Tris-acetate buffer, the specific NMDA-sensitive [3 H]glu-

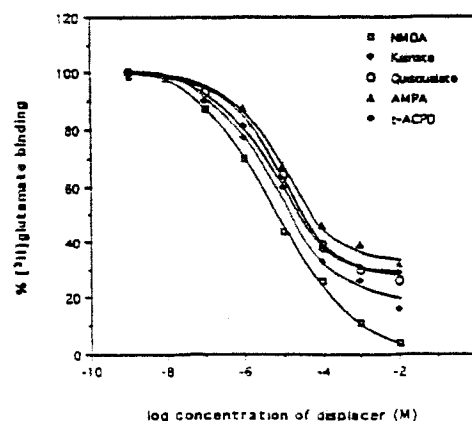


Fig. 3. Inhibition of [3 H]glutamate specific binding by various potent displacers in membranes isolated from 8-day-old cultured neurons. Binding assays were carried out as described in the text. Data are from representative experiments. Logit transformation of the curves yielded the IC_{50} values from which were calculated K_i constants.

tamate binding revealed higher affinity receptors for glutamate in culture membranes, with a K_d of 200 nM and a total number of binding sites around 3 pmol/mg protein. Although K_d was slightly increased, similar data were obtained in membranes isolated from the forebrain of newborn animals.

Among the various compounds tested, NMDA was the most potent to displace [3 H]glutamate specific binding in membranes from cultured neurons, with a K_i of 3.6 μM . Under the same experimental conditions, other derivatives were equally effective to displace glutamate from its binding sites. K_i values ranging from 25 to 50 μM . The different compounds exhibited similar ability to displace [3 H]glutamate binding in newborn membranes as compared to cultures, although K_i for NMDA was significantly lower in culture membranes (Fig. 3, Table II).

Table I. Kinetic Constants for [3 H]Glutamate Binding to Intact Cultured Neurons from Fetal Rat Forebrain, and Membrane Preparations from Cultures and Newborn Rat Forebrain: Influence of Binding Assay Conditions

	Intact Cultures		Cultures Membranes		Newborn Membranes	
	B_{max} (pmol/mg prot)	K_d (nM)	B_{max} (pmol/mg prot)	K_d (nM)	B_{max} (pmol/mg prot)	K_d (nM)
Tris-HCl buffer with Na^+ and Ca^{2+}	36.7 ± 2.9	2145 ± 207	19.4 ± 0.8^{a1}	2412 ± 193	50.1 ± 6.0^{a2}	2781 ± 106
Tris-acetate buffer	14.2 ± 1.3	552 ± 46	8.1 ± 0.6^{a1}	608 ± 32	15.4 ± 1.7^{a2}	520 ± 38
NMDA-displaceable	—	—	2.9 ± 0.2	200 ± 18	3.4 ± 0.6	276 ± 21^{a1}

Values are means $\pm$ SEM which were obtained from 4 to 6 separate experiments performed as described in the "Experimental Procedure" section, in the presence of L-aspartate- β -hydroxamate. NMDA-displaceable binding was defined as [3 H]glutamate binding displaced specifically by 0.5 mM NMDA. $^{a1}P < 0.01$, statistically significant difference between intact cultures and culture membranes; $^{a2}P < 0.05$, $^{a3}P < 0.01$, statistically significant difference between culture and newborn membranes (Bonferroni multiple comparison test).

Glutamate Receptors in Cultured Neurons

Table II. Displacement of [PH]Glutamate Specific Binding in Membranes Isolated from 8-Day-Old Cultured Neurons and from Newborn Rat Forebrain

Displacer	Culture Membranes Ki (μM)	Newborn Membranes Ki (μM)
NMDA	3.6 ± 0.9	9.5 ± 2.1*
Quisqualic acid	38.0 ± 3.2	44.6 ± 4.2
AMPA	48.3 ± 4.3	—
Kainic acid	26.5 ± 2.4	33.3 ± 2.3
trans-ACPD	35.6 ± 4.0	49.1 ± 6.6

Membrane aliquots were incubated in Tris-acetate buffer as described in the text in the presence of 400 nM [PH]glutamate in the absence or in the presence of increasing concentrations of the tested compound from 10⁻⁴ to 10⁻¹ M. Data were obtained from 3 separate experiments performed in triplicate at each concentration. *P<0.01, statistically significant difference between culture and newborn membranes (Student's *t*-test)

Table III. [PH]Tetraphenylphosphonium Incorporation into Cultured Neurons from Fetal Rat Forebrain: Effect of Depolarization by K⁺ and Glutamate

	TPP ⁺ incorporation (DPM/100 μg prot)	Percent of control
Control (5mM K ⁺)	23123 ± 1421	—
135 mM K ⁺	9989 ± 189*	43.2 ± 1.9
100 μM glutamate	7098 ± 148*	30.7 ± 2.1

Cultured cells were preincubated for 25 min in Krebs-Ringer saline buffer containing 6.75 nM [PH]TPP⁺, then incubated for 5 min in the additional presence of either 135 mM K⁺ or 100 μM glutamate, and finally processed as described in the text for the measurement of TPP⁺ uptake. Values are means ± SEM obtained from 3 separate experiments.

*P<0.01, statistically significant difference from control (Student's *t*-test).

[PH]Tetraphenylphosphonium Incorporation. As shown in Table III, a large uptake of [PH]TPP⁺ was measured in control cultured neurons after 3 days in vitro. Glutamate (100 μM) was able to reduce the incorporation of [PH]TPP⁺ into the cultured cells by 70% as compared to control neurons incubated in physiological saline, reflecting a high degree of cellular depolarization. Neuronal cells were also capable to respond to the application of K⁺, since the addition of 135 mM K⁺ to the extracellular medium induced a 57% decrease in the lipophilic cation incorporation.

DISCUSSION

The present study allowed the demonstration and characterization of specific binding sites for [PH]glutamate in a model of neurons isolated from the fetal rat forebrain, and cultured in a chemically-defined medium.

It could be shown that, after 8 days in vitro, such neurons express various types of glutamate receptors with characteristics close to those present in the forebrain of newborn rat. In addition, cultured cells appeared to be able to respond to the application of extracellular glutamate by membrane depolarization, suggesting that glutamate receptors in cultured neurons display functional properties.

In recent years, considerable improvements of the culture systems have led to a rapid increase in the applications of cell and tissue culture for the functional study of the central nervous system, especially to give new insights to cell interactions and biochemical events in the developing brain (25,26). It has been shown that many aspects of neural development occur in culture with time courses remarkably similar to those in situ, suggesting that neuronal cells obtained from fetal brain and then cultured in chemically-defined medium display developmental characteristics of their in vivo counterparts (25,27). Techniques for receptor studies include direct measurement of receptor binding sites by radioligand-binding assays in both intact or dissociated cells as well as determination of receptor-associated second messengers, i.e. measurement of cyclic AMP, cyclic GMP, and inositol phosphates (28). Thus, using simplified tissue preparations such as relatively homogeneous primary cultures of neurons or glial cells from the central nervous system, it has been possible to analyze many types of receptors, including GABA (29), muscarinic (30), adrenergic (31), opioid (32), adenosine (16) receptors, as well as receptor sites for peptide neurohormones (33-35) and benzodiazepine specific binding sites (36,37).

Several lines of evidence have suggested the existence of functional glutamatergic pathways in neural cells grown in culture (38-40). For instance, electrophysiological studies have shown the development of functionally active glutamate and GABA receptors in cultured neurons from rat hippocampus, septum and neocortex, with a retarded sensitivity to glutamate as compared to GABA in most brain regions (41). Although the expression of a putative NMDA receptor complex-associated glutamate binding protein has been reported in cultured rat hippocampal neurons using an immunochemical approach (42), only very few studies have focused on the expression of the various glutamate receptor subtypes, mainly by means of indirect methodological techniques.

In our model, and according to the ionic-dependence of glutamate specific binding to cell membranes, the incubation of intact living neurons in Tris-HCl buffer in the additional presence of Na⁺ and Ca²⁺ led to the

sitive receptors in our cultured neurons is physiologically relevant, because it has been shown that this category of binding sites for glutamate has a special role in the immature brain. Indeed, in some cerebral regions, ACPD receptors exert greater influences on neuronal activity in immature animals than in adults (53). Consistent with this, ACPD receptors may have important functions in developmental changes in the visual cortex by helping to define the critical period for ocular dominance changes (54). In addition, ACPD receptors participate to long-term potentiation in hippocampal slices prepared from immature (55) but not adult rats, while contributing to long-term depression in the hippocampus of adult animals (56).

Finally, the presence of glutamate specific binding sites in cultured neurons reflects the expression of functional receptors, since the application of exogenous glutamate results in significant depolarization of the cells, as shown by the reduced uptake of lipophilic cation $[^3H]TPP^+$. In this respect, if the cellular response to glutamate and its analogues may be deleterious for the neurons, due to the neurotoxic properties of these compounds, it may also contribute to neuronal development, differentiation and survival, in as much as it is well known that EAA exert a trophic action on cell outgrowth and plasticity (3,57).

In conclusion, cultured neurons from the rat embryo forebrain and grown in chemically-defined medium display, after 8 days in vitro, a functional glutamatergic system with characteristics close to those in the newborn rat brain. These cells express various glutamate receptor subtypes, mainly L-AP4-like and NMDA receptors, and such a model may be useful to further explore EAA-related mechanisms underlying neuronal cell development, plasticity or excitotoxic damage.

REFERENCES

- Sahai, S. 1990. Glutamate in the mammalian CNS. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 240:121-133.
- Zorumski, C. F., and Olney, J. W. 1993. Excitotoxic neuronal damage and neuropsychiatric disorders. *Pharmac. Ther.* 59:145-162.
- Balazs, R., Hack, N., and Jorgensen, O. S. 1988. Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptor as a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. *Neurosci. Lett.* 37:30-36.
- Martson, M. P., Lee, R. E., Adams, M. E., Guthrie, P. B., and Kater, S. B. 1988. Interactions between entorhinal axons and target hippocampal neurons: a role for glutamate in the development of hippocampal circuitry. *Neuron* 1:365-376.
- Van Harrevelde, A., and Fikova, E. 1974. Involvement of glutamate in memory formation. *Brain Res.* 31:455-467.
- Lipton, S. A., and Rosenberg, P. A. 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl. J. Med.* 330:613-622.
- Cunningham, M. D., Ferkany, J. W., and Enna, S. J. 1993. Excitatory amino acid receptors: a gallery of new targets for pharmacological intervention. *Life Sci.* 54:135-148.
- Trombley, P. Q., and Westbrook, G. L. 1992. L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *J. Neurosci.* 12:2043-2050.
- Saugstad, J. A., Kinzie, J. M., Mulvihill, E. R., Segerson, T. P., and Westbrook, G. L. 1994. Cloning and expression of a new member of the L-2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive class of metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 45:367-372.
- Mena, E. E., Fagg, G. E., and Cotman, C. W. 1982. Chloride ions enhance L-glutamate binding to rat brain synaptic membranes. *Brain Res.* 243:378-381.
- Foster, A., and Fagg, G. 1984. Acidic amino acid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Res. Rev.* 7:103-164.
- Nadler, J. V., Wang, A., and Wehring, L. L. 1985. Binding sites for L-[3H]glutamate on hippocampal synaptic membranes: three populations differentially affected by chloride and calcium ions. *J. Neurochem.* 44:1791-1798.
- Bridges, R. J., Niero-Sampedro, M., Kadri, M., and Cotman, C. W. 1987. A novel chloride-dependent L-[3H]glutamate binding site in astrocyte membranes. *J. Neurochem.* 48:1709-1715.
- Lichtstein, D., Kaback, H. R., and Blume, A. J. 1979. Use of a lipophilic cation for determination of membrane potential in neuroblastoma-glioma hybrid cell suspensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:650-654.
- Daval, J. L., Kozielec, V., and Nicolas, F. 1991. Functional changes in cultured neurons following transient asphyxia. *NeuroReport* 2: 97-100.
- Nicolas, F., Oillet, J., Kozielec, V., and Daval, J. L. 1994. Characterization of adenosine receptors in a model of cultured neurons from rat forebrain. *Neurochem. Res.* 19:507-515.
- Bottenstein, J. F., and Sato, G. 1979. Growth of a neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:514-517.
- Fagg, G. E., Mena, E. E., Monaghan, D. T., and Cotman, C. W. 1983. Freezing eliminates a specific population of L-glutamate receptors in synaptic membranes. *Neurosci. Lett.* 38:157-162.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Roberts, P. J., and Watkins, J. C. 1975. Structural requirements for the inhibition of glutamate uptake by glia and nerve endings. *Brain Res.* 35:120-125.
- Monahan, J. B., and Michel, J. 1987. Identification and characterization of an N-methyl-D-aspartate-specific L-[3H]glutamate recognition site in synaptic plasma membranes. *J. Neurochem.* 48: 1699-1708.
- Widdowson, P. S., Trainor, A., and Lock, E. A. 1995. NMDA receptors in rat cerebellum and forebrain: subtle differences in pharmacology and modulation. *J. Neurochem.* 64:651-661.
- Friedman, J. E., Leikes, P. I., Lavie, E., Rosenheck, K., Schneeweiss, F., and Schneider, A. S. 1985. Membrane potential and catecholamine secretion by bovine adrenal chromaffin cells: use of tetraphenylphosphonium distribution and carbocyanine dye fluorescence. *J. Neurochem.* 44:1391-1402.
- Kirk, R. E. 1968. Experimental design: procedures for the behavioral neurosciences. Brooks-Cole, Belmont, CA.
- Laerum, O. D., Steinsvag, S., and Bjerkvig, R. 1985. Cell and tissue culture of the central nervous system: recent developments and current applications. *Acta Neurol. Scand.* 72:529-549.
- Cestelli, A., Savatieri, G., Salemi, G., and Di Liegro, I. 1992. Neuronal cell cultures: a tool for investigations in developmental neurobiology. *Neurochem. Res.* 17:1163-1180.
- Dichter, M. A. 1978. Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology and synapse formation. *Brain Res.* 149:279-293.

28. Pfenning, M. A., and Richelson, E. 1990. Methods for studying receptors with cultured cells of nervous tissue origin. Pages 147-175, in Yamamura, H. I., Enna, S. J., and Kuhar, M. J. (eds), *Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis*, Raven Press, New-York.
29. Kardos, J., and Kovacs, I. 1991. Binding interaction of gamma-aminobutyric acid A and B receptors in cell culture. *NeuroReport* 2:541-543.
30. Ellis, J., Huyler, J. H., Kemp, D. E., and Weiss, S. 1990. Muscarinic receptors and second-messenger responses of neurons in primary culture. *Brain Res.* 511:234-240.
31. Hertz, L., Bender, A. S., and Richardson, J. S. 1983. Benzodiazepine and β -adrenergic binding to primary cultures of astrocytes and neurons. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.* 7: 681-686.
32. Vayssé, P. J. J., Zukin, R. S., Fields, K. L., and Kessler, J. A. 1990. Characterization of opioid receptors in cultured neurons. *J. Neurochem.* 55:624-631.
33. Ciaraldi, T., Robbins, R., Leidy, J. W., Thamm, P., and Berhanu, P. 1985. Insulin receptors on cultured hypothalamic cells: functional and structural differences from receptors on peripheral target cells. *Endocrinology* 116:2179-2185.
34. Kapcala, L. P., and De Souza, E. B. 1988. Characterization of corticotropin-releasing factor receptors in dissociated brain cultures. *Brain Res.* 456:159-167.
35. Di Scala-Guenot, D., Stroscher, M. T., Freund-Mercier, M. J., and Richard, P. 1990. Characterization of oxytocin-binding sites in primary rat brain cell cultures. *Brain Res.* 524:10-16.
36. Sher, P. K. 1985. Characteristics of benzodiazepine receptor binding in living cultures of mouse cerebral cortex at physiological temperature. *Dev. Brain Res.* 21:133-136.
37. Savatieri, G., Guarnieri, R., Salemi, G., La Bella, V., Ferraro, D., Scodotto, S., and Piccoli, F. 1990. Binding of flunitrazepam to differentiating neurons cultured in a chemically defined, hormone-supplemented medium. *Neurochem. Res.* 15:773-776.
38. Franklin, C. L., and Gruol, D. L. 1991. Developmental expression of excitatory amino acid responses in cerebellar Purkinje neurons in culture. *Brain Res.* 543:219-226.
39. Ozawa, S., Iino, M., and Tsuzuki, K. 1991. Two types of kainate response in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 66:2-11.
40. Brorson, J. R., Manzoni, P. A., and Miller, J. 1994. Ca^{2+} entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* 14:187-197.
41. Köllner, H., Siebier, M., Schmalenbach, C., and Müller, H. W. 1990. GABA and glutamate receptor development of cultured neurons from rat hippocampus, septal region, and neocortex. *Synapse* 5:59-64.
42. Mattson, M. P., Wang, H., and Michaelis, E. K. 1991. Developmental expression, compartmentalization, and possible role in excitotoxicity of a putative NMDA receptor protein in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 565:94-108.
43. Drejer, J., Larsson, O. M., and Schousboe, A. 1982. Characterization of L-glutamate uptake into and release from astrocytes and neurons cultured from different brain regions. *Exp. Brain Res.* 47: 259-269.
44. Forsythe, I. D., and Clements, J. D. 1990. Presynaptic glutamate receptors depress excitatory monosynaptic transmission between mouse hippocampal neurones. *J. Physiol. (London)* 429:1-16.
45. Teichberg, V. I. 1991. Glial glutamate receptors: likely actors in brain signaling. *FASEB J.* 5:3086-3091.
46. Bender, A. S., and Hertz, L. 1984. Flunitrazepam binding to intact and homogenized astrocytes and neurons in primary cultures. *J. Neurochem.* 43:1319-1327.
47. Jones, K. A., and Baughman, R. W. 1991. Both NMDA and non-NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. *Neuron* 7:593-603.
48. Seaton, B. 1993. The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 7:389-400.
49. Monaghan, D. T., Bridges, R. J., and Cotman, C. W. 1989. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29:365-402.
50. Murphy, S. N., and Miller, R. J. 1989. Regulation of Ca^{2+} influx into striatal neurons by kainic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249: 184-193.
51. Insel, T. R., Miller, L. P., and Gelhard, R. E. 1990. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain. I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35:31-43.
52. Petralia, R. S., and Wenthold, R. J. 1992. Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 318:329-354.
53. Nicoletti, F., Iadarola, M. J., Wroblewski, J. T., and Costa, E. 1986. Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with α -1-adrenoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:1931-1935.
54. Dudek, S. M., and Bear, M. F. 1989. A biochemical correlate of the critical period for synaptic modification in the visual cortex. *Science* 246:673-675.
55. Izumi, Y., Clifford, D. B., and Zorumski, C. F. 1991. 2-amino-3-phosphonopropionate blocks the induction and maintenance of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 122:187-190.
56. Stanton, P. K., Chattarji, S., and Sejnowski, T. J. 1991. 2-amino-3-phosphonopropionic acid, an inhibitor of glutamate-stimulated phosphoinositide turnover, blocks induction of homo-synaptic long-term depression, but not potentiation in rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 127:61-66.
57. Lipton, S. A., and Kater, S. B. 1989. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. *Trends Neurosci.* 7:265-270.

4) Evaluation de la neurotoxicité liée au glutamate dans l'hypoxie sur les neurones en culture. Influence du degré de maturation cellulaire.

4.1. objectif de l'étude

Après avoir montré l'expression des diverses classes de récepteurs du glutamate dans notre modèle *in vitro*, nous avons évalué la pertinence de l'hypothèse excitotoxique dans les mécanismes délétères impliqués lors de la neurodégénérescence observée à la suite d'une exposition à une hypoxie transitoire de 6 heures, laquelle induit une mort cellulaire retardée. La sensibilité des neurones à des concentrations toxiques d'acides aminés excitateurs a été analysée entre 6 et 9 jours de culture, parallèlement aux atteintes post-hypoxiques. Afin de souligner l'importance du degré de maturité des neurones dans la réponse au glutamate et à ses analogues, une étude similaire a été réalisée sur des neurones entre 13 et 16 jours.

4.2. approche expérimentale

Au sixième jour de culture, les neurones ont été exposés pendant 6h à des concentrations élevées en glutamate (100 μ M) avec ou sans inhibiteur de sa recapture, le L-aspartate- β -hydroxamate (LA β H, 500 μ M). Parallèlement, des cellules ont été exposées au NMDA (100 μ M) en présence d'une concentration dépolarisante de KCl (50 mM), à l'AMPA (100 μ M), au kainate (100 μ M) ou au trans-ACPD (100 μ M). Les cellules ont été replacées en milieu normal ou immédiatement utilisées. Les mêmes traitements ont été appliqués à des neurones au stade 13 jours. Par ailleurs, deux groupes témoins ont été constitués, l'un maintenu dans les conditions normales, l'autre en milieu dépolarisant (50 mM KCl).

La morphologie des cellules a été observée au microscope à contraste de phase dès l'issue de l'exposition des neurones, puis en fonction du temps jusqu'à 72h après traitement. Le transport du glucose, reflétant le métabolisme énergétique des cellules, et la libération de LDH dans le milieu, indice de souffrance cellulaire, ont été mesurés selon les méthodes décrites dans l'annexe technique. A la fin de la période expérimentale, les boîtes ont été rincées deux fois avec 2 ml de NaCl 0,9% et leur contenu récupéré dans 1 ml de NaOH 1N pour la détermination des concentrations en protéines.

4.3.principaux résultats

Aux doses utilisées et en l'absence d'inhibiteur de recapture du glutamate, les acides aminés excitateurs n'ont eu aucun effet toxique sur les neurones après 6 jours de culture. En présence de l'inhibiteur de recapture, le glutamate a induit un hypermétabolisme de 22,5% dès la fin de l'exposition. Cette augmentation métabolique s'est prolongée avec une moindre amplitude jusqu'à 24 heures après l'exposition (10,5%), tandis qu'à 72 heures le métabolisme était diminué de 9,6% par rapport aux témoins. Il n'est apparu de souffrance cellulaire qu'à partir de 24 heures, temps auquel l'efflux de LDH a été accru de 222,6% par rapport aux témoins, mais sans altération morphologique décelable. La dégénérescence des neurones n'a été visible en microscopie qu'à 72 heures, parallèlement à une chute du taux de protéines de 41,5% et à une libération de LDH accrue de 232,2%.

Après 13 jours de culture, le glutamate en absence de LA β H, et le NMDA en milieu dépolarisant, ont réduit le métabolisme de 20-25% à 24 heures post-traitement, cette diminution se maintenant jusqu'à 72 heures, temps auquel sont apparus les premiers signes de souffrance et de dégénérescence cellulaires. L'efflux de LDH a alors atteint un niveau accru de 200-250% par rapport aux témoins. La présence de l'inhibiteur de recapture a potentialisé l'effet toxique du glutamate, sans le déterminer comme à 6 jours de culture. Les agonistes AMPA, kaïnate et trans-ACPD n'ont eu qu'un effet dépresseur transitoire sur le métabolisme à 24 heures et n'ont pas provoqué de dégénérescence à 72 heures.

4.4.conclusion de l'étude

Après 6 jours en culture, les neurones sensibles à l'agression hypoxique résistent à des doses toxiques d'acides aminés excitateurs. Le seuil de toxicité du glutamate n'est atteint qu'en présence d'un inhibiteur de sa recapture. L'excitotoxicité ne semble donc pas participer au processus de neurodégénérescence observé à la suite d'une hypoxie au stade de 6 jours, le seuil toxique du glutamate paraissant alors trop élevé. Après 13 jours de culture, les neurones deviennent sensibles à l'action toxique du glutamate, par le biais d'une activation des récepteurs de type NMDA. Ces résultats suggèrent que les effets délétères de l'hypoxie pourraient être médiés par différents mécanismes selon le degré de maturité du neurone.

4.5.publication

**Evaluation de la neurotoxicité liée au
glutamate dans l'hypoxie sur les neurones en culture.
Influence du degré de maturation cellulaire.**

Jean OILLET et Jean-Luc DAVAL

INSERM U.272, 30 rue Lionnois, 54 000 Nancy

Mots-clés: rat, neurones centraux, culture cellulaire, développement, hypoxie, excitotoxicité,
glutamate, récepteur NMDA

INTRODUCTION

Il est établi que le glutamate est le neurotransmetteur exciteur principal du système nerveux central des vertébrés (Collingridge & Lester, 1989; Foster & Fagg, 1984). Cet acide aminé est impliqué lors du développement dans la synaptogénèse et la création de circuits neuronaux (Meier, 1988; Mattson *et al*, 1988), agissant tant au niveau de la croissance qu'au niveau de la plasticité des neurones. Il participe aux processus d'apprentissage et de mémorisation tels que la potentialisation à long terme (Collingridge & Singer, 1990).

Par ailleurs, il est apparu que les acides aminés excitateurs interviennent également dans la pathogénèse de divers troubles neurodégénératifs tels que les maladies d'Alzheimer, de Huntington et de Parkinson (Beal, 1992; Meldrum & Garthwaite, 1990; Maneuf *et al*, 1995), de même que dans l'activité nerveuse anormale observée dans les crises convulsives et l'épilepsie (Dingledine *et al*, 1990; Doriât *et al*, 1995). Ainsi, le glutamate présente dans certaines conditions des propriétés neurotoxiques et il a été montré que cette cytotoxicité s'étendait aux agonistes des différentes classes de récepteurs du glutamate, à savoir les récepteurs NMDA, AMPA/quisqualate et kaïnate. Des neurones cérébraux de souris en culture sont vulnérables à l'application du glutamate et des divers agonistes dérivés du glutamate en fonction de la durée d'exposition et de la concentration de l'acide aminé exciteur, le seuil de toxicité s'abaissant au fur et à mesure de la maturation des neurones (Frandsen & Schousboe, 1987; Frandsen & Schousboe, 1990).

Un modèle de culture pure de neurones de rat foetal a été développé au laboratoire en vue de son application à résoudre certains problèmes pathologiques associés à des perturbations précoces du développement cérébral. En particulier, il a été utilisé dans des conditions reproduisant l'hypoxie cérébrale néonatale par réduction de l'apport d'oxygène dans l'incubateur (Daval *et al*, 1991).

Ces travaux ont montré une dégénérescence progressive des neurones, entre 6 et 9 jours de culture, après une exposition de 6 heures à un milieu gazeux constitué de 95% N₂ et 5% CO₂. L'étude des propriétés fonctionnelles de ces neurones a mis en évidence une hyperactivité métabolique transitoire précédant l'apparition des signes de souffrance cellulaire et qui pourrait être le reflet d'une activation des processus excitateurs liés au glutamate. De nombreuses études étayaient une telle hypothèse excitotoxique quant aux mécanismes d'action neurotoxique de l'hypoxie/ischémie, mettant en avant la libération de glutamate par les neurones soumis à l'hypoxie tant *in vivo* (Drejer *et al*, 1985; Shimada *et al*, 1993; Wahl *et al*, 1994) que *in vitro* (Drejer *et al*, 1985; Sanchez-Prieto & Gonzalez, 1988). Par ailleurs, il a été montré un effet

protecteur des antagonistes des récepteurs NMDA pendant l'exposition à l'hypoxie ou lors de la période de réoxygénation (Schurr *et al*, 1995; Maier *et al*, 1995), mettant en évidence le rôle de cette catégorie de récepteurs dans la pathogenèse liée à une privation d'oxygène. Enfin, certaines aires cérébrales présentent une vulnérabilité tant à l'action toxique du glutamate qu'à une privation d'oxygène, les deux types d'agression présentant des effets neurotoxiques voisins.

Toutefois, cette hypothèse a été récemment remise en cause. Bien que le glutamate et ses récepteurs semblent jouer un rôle prépondérant dans la survenue des dommages neuronaux après hypoxie/ischémie, il n'en demeure pas moins que l'excitotoxicité n'est pas la seule cause et peut même s'avérer d'importance mineure dans certains cas d'ischémie sévère, où la présence d'antagonistes NMDA n'empêche pas la mort neuronale à long terme (Goldberg *et al*, 1987).

L'effet de l'hypoxie/ischémie est certes médié, au moins en partie, par les effets du glutamate, mais les effets ne se superposent pas exactement, comme cela est apparu dans des coupes de motoneurons des nerfs vague et hypoglosse exposées à l'anoxie, où la dépolarisation n'est pas affectée par des antagonistes NMDA ou non-NMDA, quoique le glutamate soit bien libéré dans le milieu extracellulaire. Dans des neurones hippocampaux en culture exposés au glutamate, l'élévation des taux calciques intracellulaires est différente de celle provoquée par l'anoxie (Haddad & Jiang, 1993). Enfin, l'hypothèse excitotoxique repose largement sur les résultats de travaux effectués *in vitro* et la comparaison de ces études avec les observations *in vivo* a conduit à réévaluer cette hypothèse (Hossmann, 1994).

Au cours d'une précédente étude réalisée sur des neurones centraux de rat foetal mis en culture pendant 8 jours, nous avons démontré la présence des différentes classes de récepteurs fonctionnels pour les acides aminés excitateurs (Oillet *et al*, 1995). A la suite de cette première approche, le présent travail se propose d'évaluer la sensibilité des cellules à des concentrations toxiques de glutamate et des agonistes spécifiques des divers types de récepteurs. Les agonistes utilisés sont le N-méthyl-D-aspartate pour le récepteur NMDA, l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4 propionique (AMPA) pour le récepteur AMPA, l'acide kaïnique pour le récepteur kaïnate, et l'acide trans($\pm$)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylique (trans-ACPD) pour les récepteurs métabotropes. Les effets d'une exposition de 6 heures à ces différentes substances ont été évalués à deux stades différents de maturation des neurones: d'une part à 6 jours de culture, afin de comparer les conséquences des traitements excitotoxique et hypoxique à ce même stade et d'autre part à 13 jours de culture afin de tester une possible évolution liée à la maturation des cellules nerveuses.

MATERIELS ET METHODES

Les animaux utilisés sont des rats Sprague-Dawley. Un groupe de 20 femelles a été constitué, maintenu en conditions d'élevage standard (alternance jour/nuit de 12 heures, lumière allumée à 6h00, la nourriture et la boisson étant fournies *ad libitum*). L'ensemble des expérimentations portant sur les animaux a été effectuée selon les recommandations décrites dans le "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, Bethesda, MD, 1985).

Après identification histologique du cycle oestral des rates par coloration au bleu de Giemsa, des animaux en prooestrus ont été mis en accouplement pendant 24 heures. Les femelles ont ensuite été isolées jusqu'au 14ème jour de gestation. Les manipulations suivantes ont toutes été effectuées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire et avec du matériel à usage unique ou stérilisé à l'étuve ou en autoclave avant leur utilisation.

Mise en culture

Le milieu de culture utilisé est à base d'un mélange DMEM/HamF12 pour les cultures à court terme, et de DMEM simple pour les cultures à plus long terme, ce milieu étant dépourvu de glutamate mais enrichi en glutamine.

La veille de la mise en culture, les boîtes de Pétri pour culture de tissus (35x10 mm, Falcon) ont été recouvertes de 2 ml d'une solution stérile de poly-L-lysine (1 mg/100 ml) et placées dans un incubateur en conditions contrôlées (37°C, atmosphère humide et mélange gazeux 95% air et 5% CO₂). Le jour de la culture, cette solution a été éliminée et les boîtes ont été rincées par 2x2 ml de milieu, pour être ensuite remplacées dans l'incubateur avec 2 ml du milieu enrichi de sérum de veau foetal à 5% (Gibco).

La poly-L-lysine se dépose au fond des boîtes et forme en 24 heures un réseau polymérisé homogène auquel les cellules adhèrent et restent accrochées tout au long de la culture (Yavin & Yavin, 1974).

Le jour de la culture, une rate gestante est anesthésiée à l'halothane, son abdomen incisé et l'utérus gravide prélevé. Les embryons sont libérés de leur placenta et placés dans du milieu enrichi en sérum chauffé à 37°C. La partie supérieure de l'encéphale est sectionnée, les méninges et les microvaisseaux sanguins sont dégagés et les amas cellulaires isolés sont transférés dans un tube conique contenant 10 ml de milieu enrichi en sérum, et conservés à 37°C. Une suspension cellulaire est réalisée par dissociation mécanique douce à la seringue, pour être ensuite centrifugée à 700g pendant 10 minutes. Le surnageant est remplacé par 10 ml de milieu frais et une seconde homogénéisation est effectuée. Enfin, la suspension est passée au

travers d'un tamis de nylon stérile (taille des mailles 0,46 μm) afin d'éliminer les impuretés et les amas cellulaires résiduels.

La densité des cellules dans la suspension est évaluée à l'aide d'un hématocytomètre et ajustée à 10^6 cellules par ml par une dilution appropriée, pour finalement ensemercer chaque boîte par 10^6 cellules. Les boîtes sont ensuite replacées dans l'incubateur en conditions standard. La croissance initiale des neurones se fait ainsi en présence de sérum, qui ne sera utilisé que pendant les premières 24 heures.

Le lendemain, le milieu de culture est intégralement remplacé par un milieu sans sérum enrichi en hormones et microéléments, lequel sera renouvelé tous les 3 ou 4 jours jusqu'au stade désiré. Au cours du premier changement qui a lieu après 24 heures de culture, le milieu contient également des facteurs de croissance pour les 2 jours suivants (basic Fibroblast Growth Factor ou bFGF à 2 ng/ml, et Epidermal Growth Factor ou EGF à 10 ng/ml). Ces derniers stimulent la croissance et la multiplication des neurones au cours des premiers jours de culture et améliorent leur survie à long terme en absence de sérum.

Exposition aux acides aminés excitateurs

Au sixième jour de culture des neurones, les boîtes ont subi un nouveau changement du milieu additionné cette fois de glutamate (100 μM) avec ou sans L-aspartate- β -hydroxamate (LA β H, 500 μM), un inhibiteur de la recapture du glutamate. La présence de ce dernier composé assure le maintien de la concentration initiale de l'acide aminé dans le milieu extracellulaire. Des neurones ont également été exposés au NMDA (100 μM), en présence d'une concentration dépolarisante de KCl (50 mM), laquelle permet de lever le blocage par le magnésium du canal ionique associé au récepteur; enfin à l'AMPA, au kainate ou au trans-ACPD (100 μM). Au bout de 6 heures d'exposition des cultures, les cellules ont été replacées en milieu normal ou immédiatement utilisées.

Les mêmes traitements ont été effectués sur des neurones au stade 13 jours. Par ailleurs, deux groupes témoins ont été constitués, l'un par un changement en milieu normal et l'autre en milieu dépolarisant (50 mM KCl), sans addition de glutamate ou de ses analogues.

La morphologie des cellules a été observée au microscope à contraste de phase dès l'issue des traitements puis 24 heures et 72 heures après. A la fin de la période expérimentale, les boîtes ont été rincées deux fois avec 2 ml de NaCl 0,9% et leur contenu récupéré dans 1 ml de NaOH 1N pour la détermination des concentrations en protéines, selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Libération de LDH, marqueur de souffrance cellulaire

La présence de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture a été recherchée 24h et 72h après traitement des neurones et dans les boîtes témoins, les valeurs étant rapportées en pourcentage de variation par rapport aux témoins. L'activité de la LDH, sans distinction des différentes formes isoenzymatiques, a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic 2000, Bausch et Lomb) selon le protocole décrit par Amador et coll. (1963) et basé sur l'oxydation du lactate en pyruvate et la mesure à 340 nm de la réduction simultanée du NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$. La quantification de l'enzyme a été validée à l'aide d'un sérum de contrôle (Accutrol, Sigma Diagnostics).

Mesure du transport spécifique du glucose, reflet du métabolisme énergétique

Le transport de glucose a été déterminé par la mesure du prélèvement spécifique de 2-désoxyglucose $2\text{DG}(^3\text{H})$ par les cellules en culture. A la fin du traitement (6h), puis à 24h et enfin à 72h, les boîtes ont été rincées deux fois par 2 ml d'une solution Krebs-Ringer (NaCl 125 mM, KCl 4,8 mM, MgSO_2 1,2 mM, CaCl_2 1,3 mM, KH_2PO_4 1,2 mM) tamponnée par de l'HEPES (pH 7,4), et les cellules ont été préincubées pendant 15 mn à 37°C dans cette solution saline. Après élimination du milieu, les neurones ont été incubés dans 1,5 ml de la solution tampon contenant 1 mM de $2\text{DG}(^3\text{H})$. Après incubation de 30 mn, les cultures ont été rapidement lavées trois fois par 2 ml de tampon, puis séchées. Les neurones ont ensuite été solubilisés dans 1 ml de NaOH 1N et des échantillons (100 μl) ont été prélevés pour le comptage de la radioactivité par scintillation liquide (compteur Beckmann, modèle LS 1801). Le prélèvement non spécifique de 2DG par les cellules en culture a été estimé par incubation des neurones dans des conditions similaires en présence d'un excès de D-glucose (100 mM). Dans nos conditions expérimentales, le transport spécifique de $2\text{DG}(^3\text{H})$ a été établi à 92-95% du transport total.

RESULTATS

Dans les conditions utilisées au cours de cette étude, les cellules en culture se sont rapidement développées pour conduire à une population cellulaire d'aspect homogène et constituée essentiellement de neurones. Au stade de 6 jours *in vitro*, les cultures ont formé un réseau dense à la surface du substrat de poly-lysine, avec de très nombreuses ramifications intercellulaires. La présence de quelques agrégats cellulaires a pu être mise en évidence. Par la technique d'exclusion au bleu trypan, le pourcentage de neurones vivants a été évalué à plus de 95%. Au stade de 13 jours, les neurones se sont maintenus en un réseau encore plus dense et enchevêtré, les agrégats de cellules étant plus nombreux et plus gros.

Le métabolisme énergétique des neurones, reflété par le transport et l'incorporation du 2-désoxyglucose, demeure stable quel que soit le stade de culture, avec des moyennes de $121,7 \pm 7,0$ nmol/mg de protéine de 6 à 9 jours (fig.1, fig.5 et fig.7) et de $127,1 \pm 5,4$ nmol/mg de protéine de 13 à 16 jours (fig.3, fig.9 et fig.11).

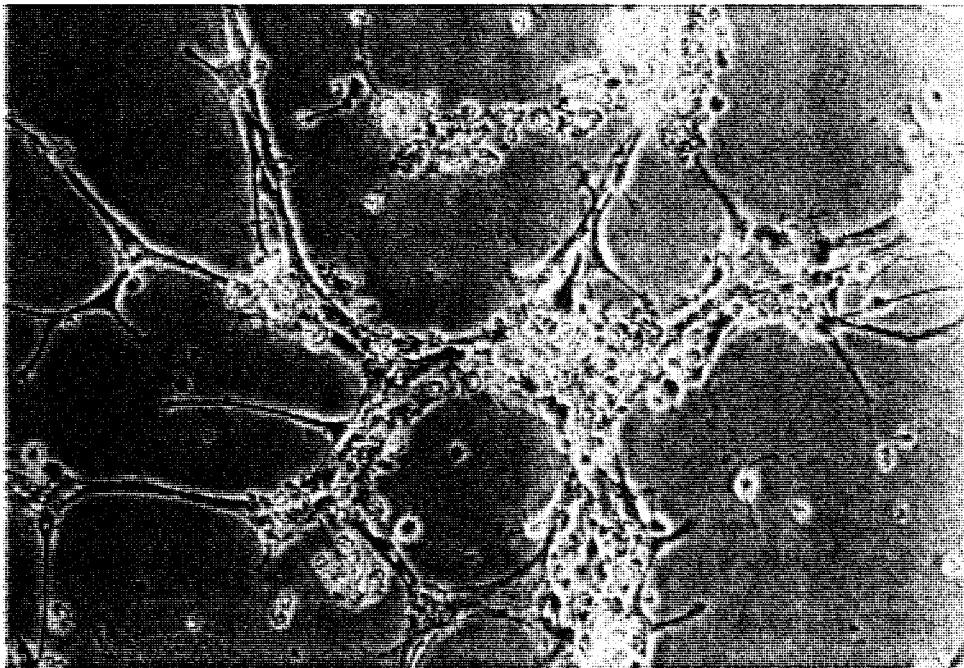
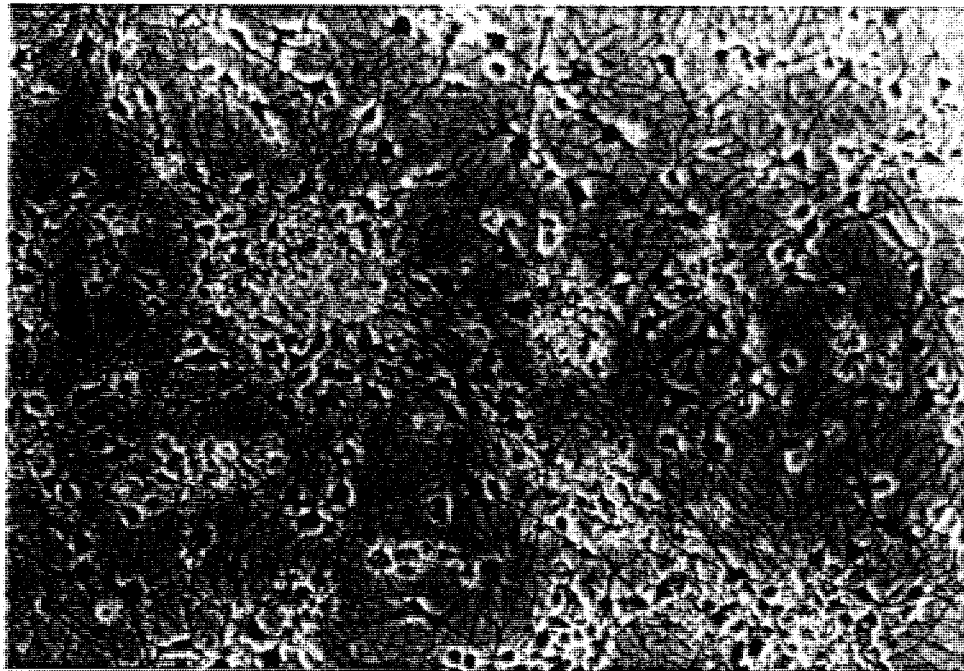
1) Neurones à 6 jours de culture

1.1. effets du glutamate

Il y a lieu de distinguer l'action du glutamate de celle associée à la présence de l'inhibiteur de recapture (LA β H). Dans le second cas, l'effet du glutamate est plus marqué. Ainsi, au stade 6 jours de culture, on observe un hypermétabolisme de 22,5% dès l'issue des 6 heures d'exposition à 100 μ M de glutamate en présence de LA β H (fig.1). Cette activation métabolique se poursuit 24 heures plus tard de façon moins marquée (+10,5%) pour mener finalement à une baisse de 9,6% du métabolisme 72 heures après l'exposition, avec apparition de signes de dégénérescence, tandis que la souffrance cellulaire apparaît dès 24 heures pour culminer à 72 heures (+222,6% puis +232,2% de variation de l'efflux de LDH par rapport aux témoins), parallèlement à la chute du taux de protéines de 41,5% entre 6 et 9 jours (fig.2). En l'absence de LA β H, l'exposition au glutamate ne produit par contre aucun effet au stade 6 jours (fig.5 et fig.6).

1.2. effets des agonistes spécifiques et de la dépolarisation

Les cultures semblent résister à une exposition de 6 heures aux différents agonistes spécifiques: NMDA (en milieu dépolarisant à 50 mM de KCl), AMPA, kaïnate et trans-ACPD. A ce stade de maturation, les neurones ne présentent pas de signes apparents de dégénérescence ou de



Photos:

Aspect morphologique des neurones traités à 13 jours de culture par 100 μ M de glutamate, pendant 6 heures:

-photo du haut, neurones témoins à 16 jours de culture

-photo du bas, neurones traités 72 heures après exposition au glutamate

souffrance cellulaire à la suite des traitements, conservant des taux de protéines (fig.6 et fig.8) et des niveaux de métabolisme (fig.5 et fig.7) voisins de ceux des témoins. La dépolarisation par 50mM de KCL n'a également aucun effet.

2) Neurones à 13 jours de culture

2.1. effets du glutamate

Au stade 13 jours de culture, il se produit une baisse du métabolisme de 26,7% dès la fin de l'exposition de 6 heures au glutamate en présence de LA β H, baisse qui s'accroît après 24 heures (29,3%), tandis qu'à 72 heures l'écart par rapport aux témoins se réduit à 7,3% (fig.3). Parallèlement, le taux de protéines est réduit à 6 heures et à 24 heures (de 23,5 à 27,8%) pour finalement chuter à 72 heures de 65,4% (fig.4), alors que les neurones sont très dégradés en morphologie (photos ci-contre) et que la souffrance cellulaire, apparue dès 24 heures avec une augmentation de 175% de l'efflux de LDH, atteint son maximum (233%). En absence de LA β H, le glutamate provoque également une baisse du métabolisme à l'issue de l'exposition et jusqu'à 72 heures (fig.9) tout en diminuant les taux de protéines (fig.10), ces effets étant légèrement inférieurs à ceux produits en présence de l'inhibiteur de recapture.

2.2. effets de la dépolarisation et du NMDA

A ce stade de développement, la dépolarisation par elle-même affecte le métabolisme avec une baisse de 13,2% dès 6 heures, effet accentué par l'action du NMDA (baisse de 18,8%). Puis, que ce soit après l'exposition au glutamate, au milieu dépolarisant ou au NMDA, l'hypométabolisme atteint à 24 heures des valeurs comparables entre elles et qui se maintiennent où s'accroissent à 72 heures, avec respectivement 24,5%, 23,1% et 24,6% à 24 heures pour 20,0%, 27,6% et 29,6% à 72 heures, par rapport aux témoins (fig.9). Le taux de protéines après exposition au NMDA chute régulièrement, de 24,7% à 6 heures alors que la dépolarisation seule n'a pas d'effet significatif, de 35,4% à 24 heures contre 22,1% pour la dépolarisation et de 43,0% à 72 heures contre 31,2% en milieu dépolarisant (fig.10). Les signes de dégénérescence et de souffrance cellulaires n'apparaissent qu'à 72 heures avec une augmentation de 244% de l'efflux de LDH par rapport aux témoins.

2.3. effets des autres agonistes

Après une exposition de 6 heures, les agonistes AMPA, kaïnate et trans-ACPD ont un effet similaire sur le métabolisme des neurones de 13 jours, provoquant une baisse transitoire à 24 heures (respectivement de 15,3%, 14,9% et 12,0%) alors qu'à 72 heures le niveau est

comparable à celui des témoins (fig.11). Le taux de protéines est diversement affecté (fig.12). A l'issue immédiate des 6 heures d'exposition, seul le kaïnate affecte le taux de protéines avec une baisse de 11,2%, cet effet se maintenant jusque 24 heures après (12,3%). L'AMPA provoque une baisse semblable à ce stade (12,6%). Ces effets ne sont que transitoires puisqu'à 72 heures les taux se stabilisent au niveau des témoins, suivant en cela l'évolution du métabolisme. Le trans-ACPD n'affecte pas les taux de protéines jusqu'à 72 heures où l'on observe une hausse paradoxale de 18,7%. Il n'y a pas de souffrance cellulaire notable après exposition à ces agonistes, les variations d'efflux de LDH n'étant pas significatives alors que l'aspect morphologique des neurones est voisin de celui des témoins.

Figures:

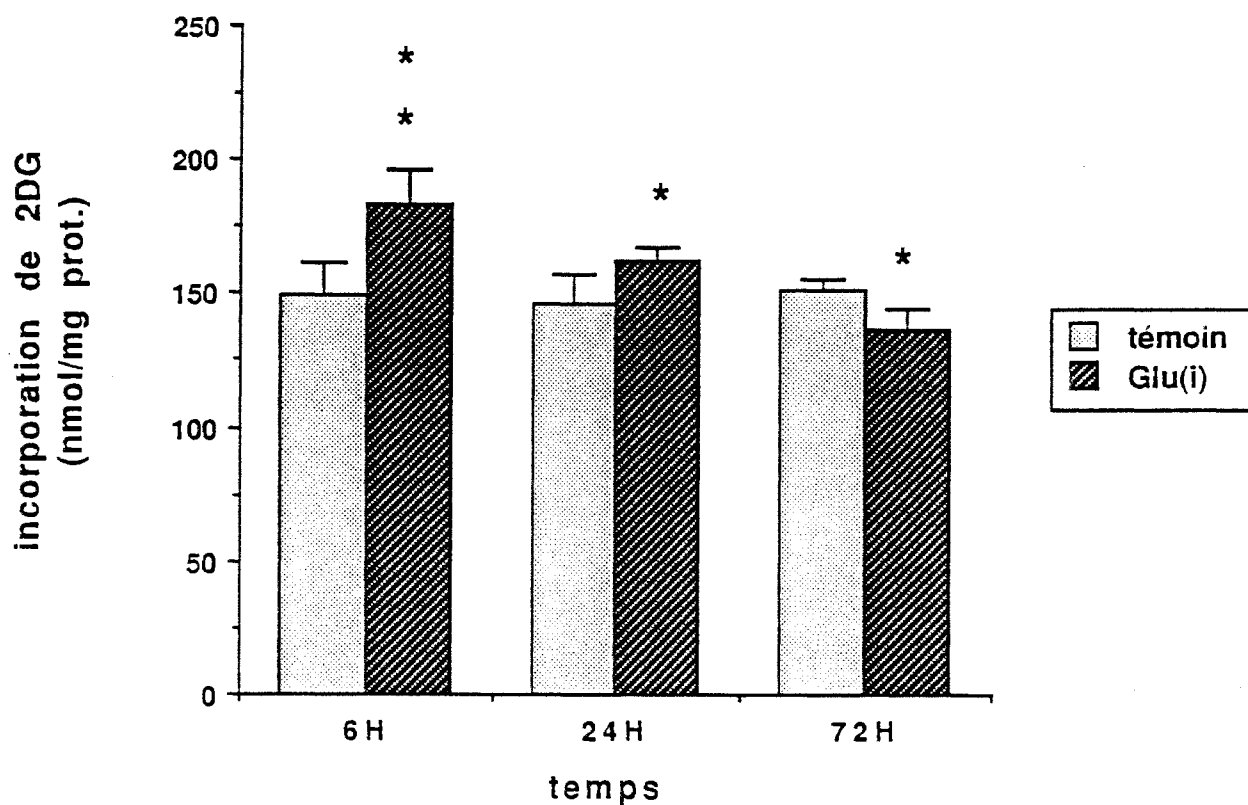


Figure 1:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate (100 μ M), en présence de 500 μ M de LABH, sur l'évolution du transport spécifique et de l'incorporation du 2-désoxyglucose dans les neurones après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nmoles par mg de protéines et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: *($p < 0,05$) et **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnnett).

Glu(i): traitement au glutamate, en présence de l'inhibiteur de sa recapture

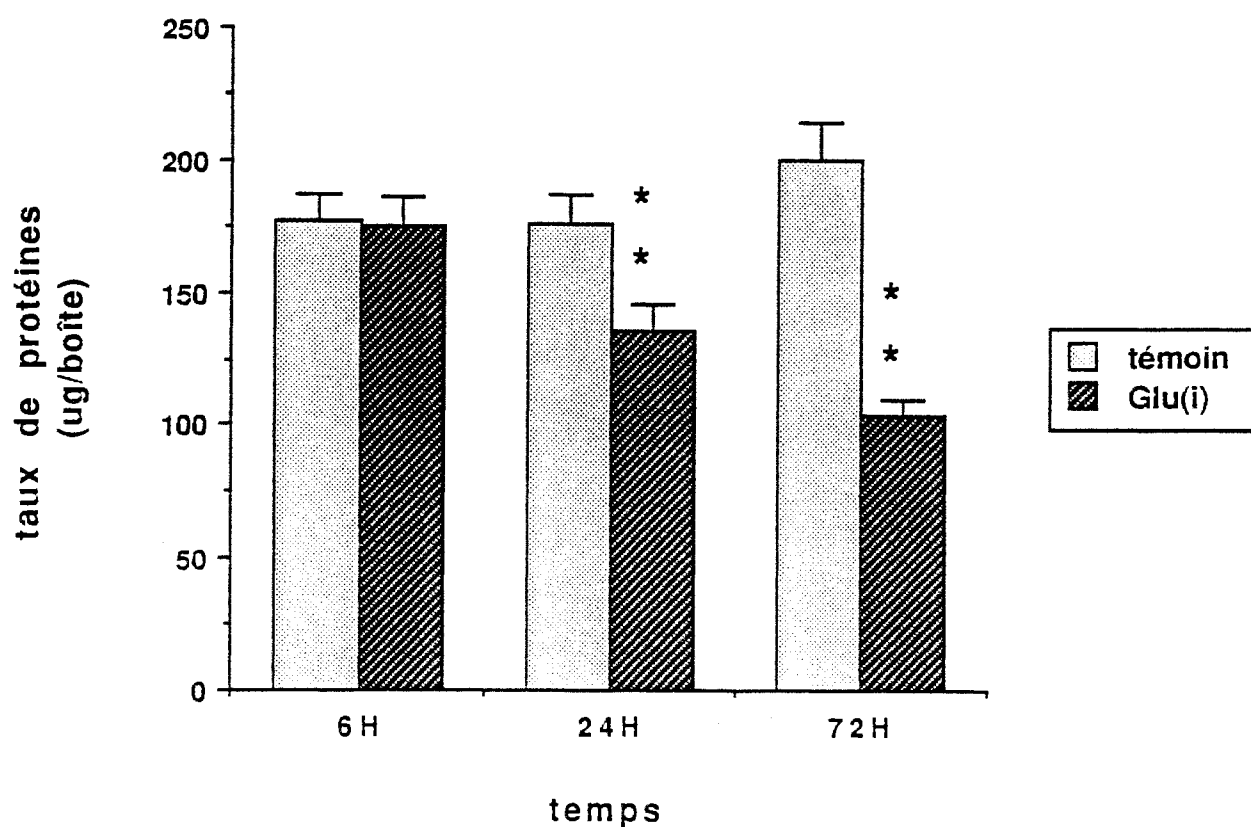


Figure 2:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate ($100 \mu\text{M}$), en présence de $500 \mu\text{M}$ de LABH, sur l'évolution des taux de protéines dans les neurones après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en μg par boîte de culture et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

Glu(i): traitement au glutamate, en présence de l'inhibiteur de sa recapture

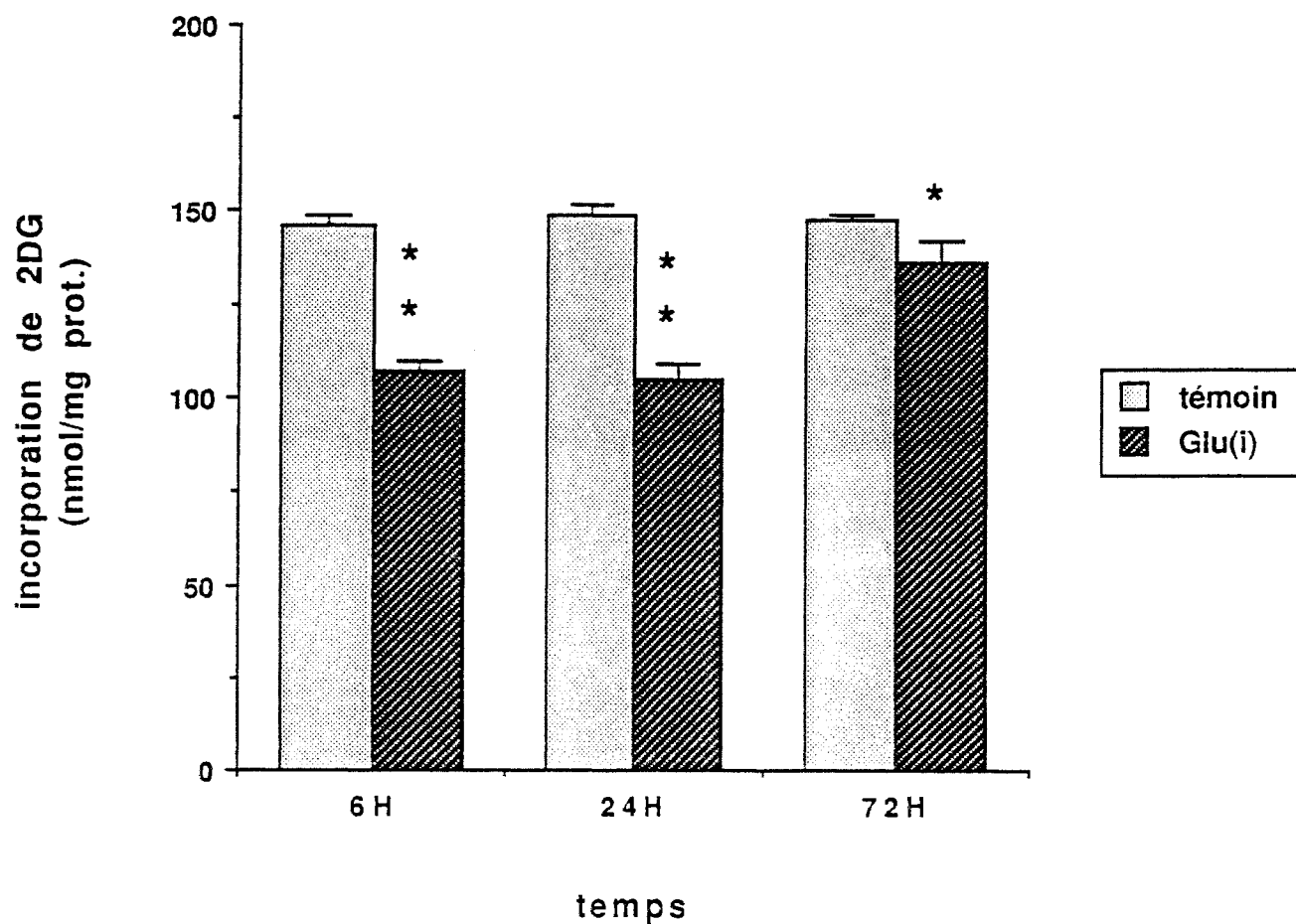


Figure 3:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate (100 μ M), en présence de 500 μ M de LABH, sur l'évolution du transport spécifique et de l'incorporation du 2-désoxyglucose dans les neurones après 13 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nmoles par mg de protéines et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: *(p<0,05) et **(p<0,01), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

Glu(i): traitement au glutamate, en présence de l'inhibiteur de sa recapture

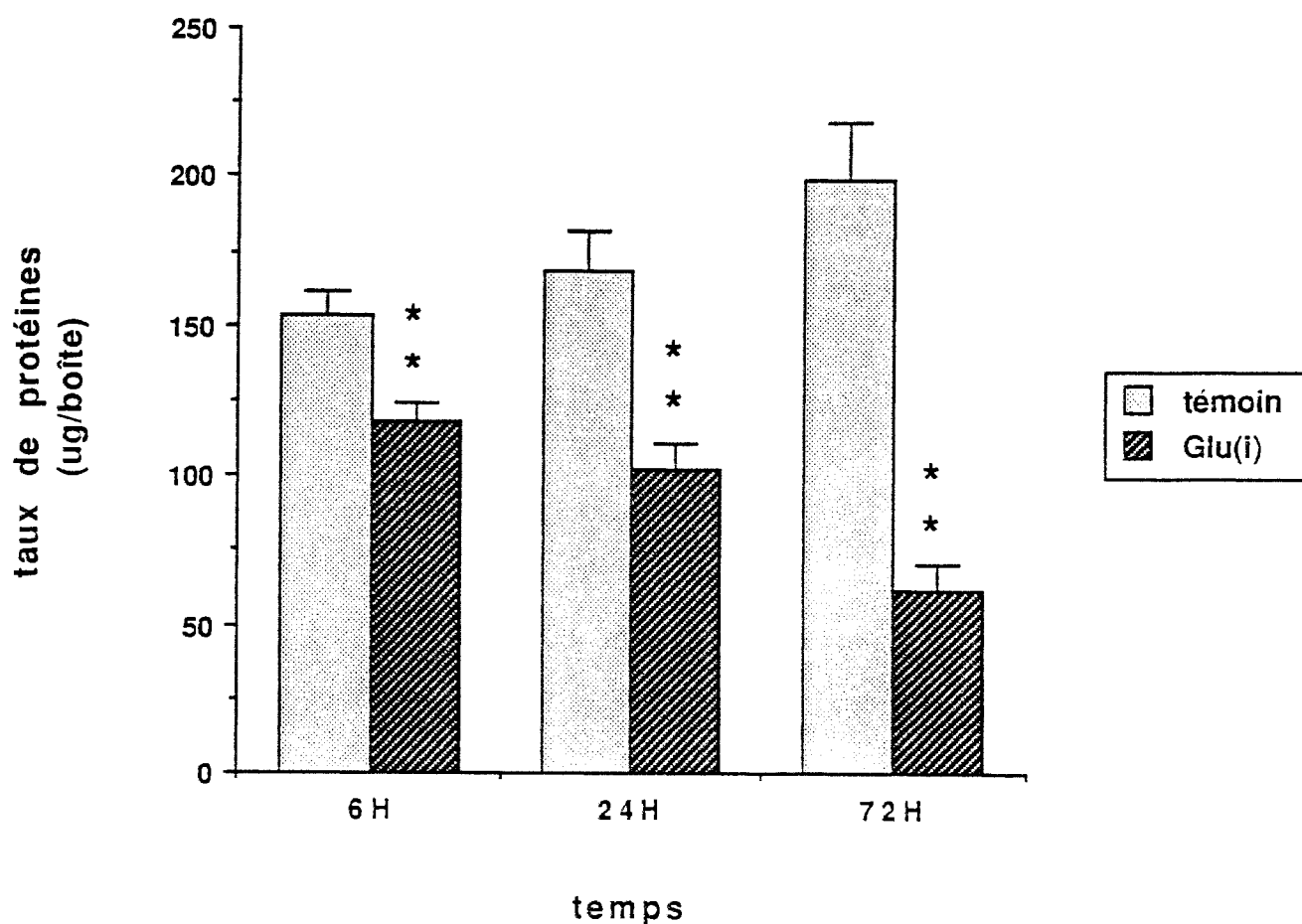


Figure 4:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate ($100 \mu\text{M}$), en présence de $500 \mu\text{M}$ de LABH, sur l'évolution des taux de protéines dans les neurones après 13 jours de culture. Les résultats sont exprimés en μg par boîte de culture et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

Glu(i): traitement au glutamate, en présence de l'inhibiteur de sa recapture

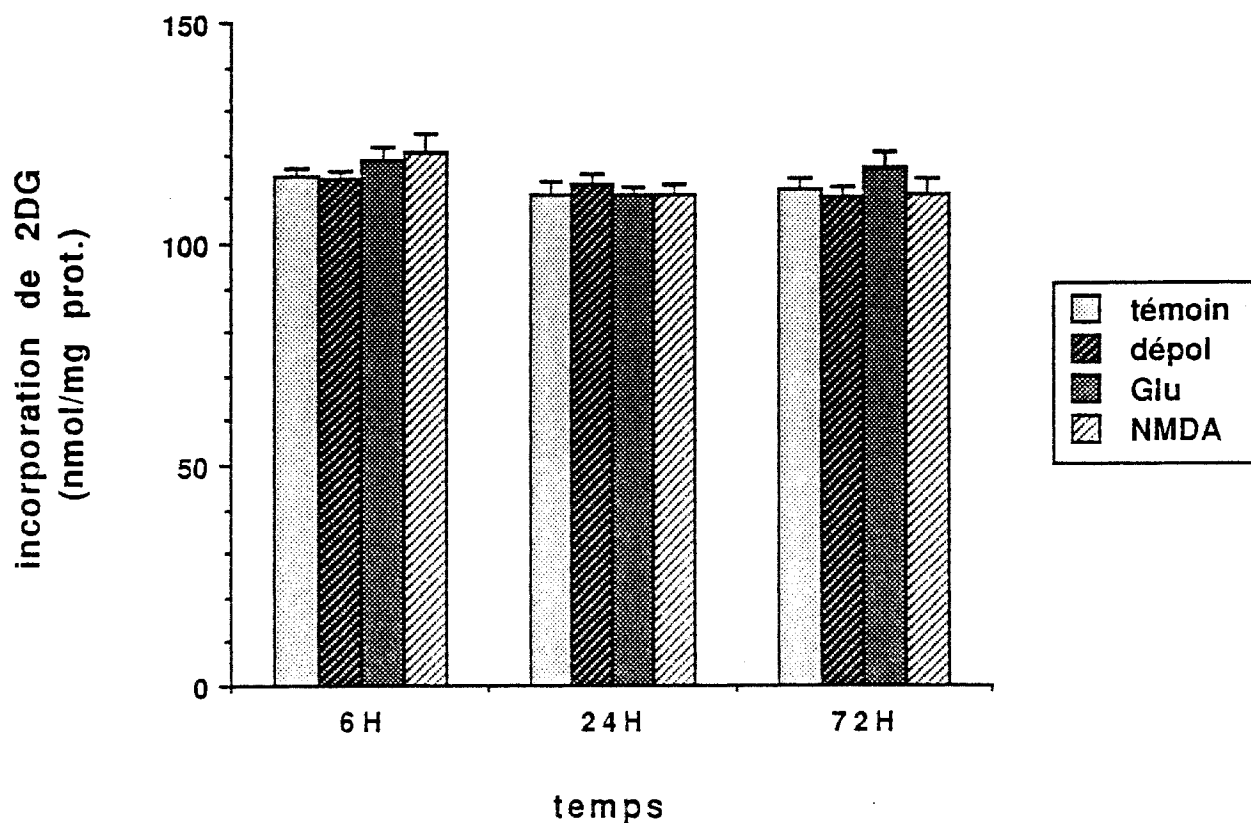


Figure 5:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate (100 μ M), à une dépolarisation par 50 mM de KCl et au NMDA (100 μ M) en milieu dépolarisant sur l'évolution du transport spécifique et de l'incorporation du 2-désoxyglucose dans les neurones après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nmoles par mg de protéines et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons.

dépol: traitement dépolarisant par 50 mM de KCl

Glu: traitement au glutamate, en absence de l'inhibiteur de sa recapture

NMDA: traitement au NMDA en milieu dépolarisant

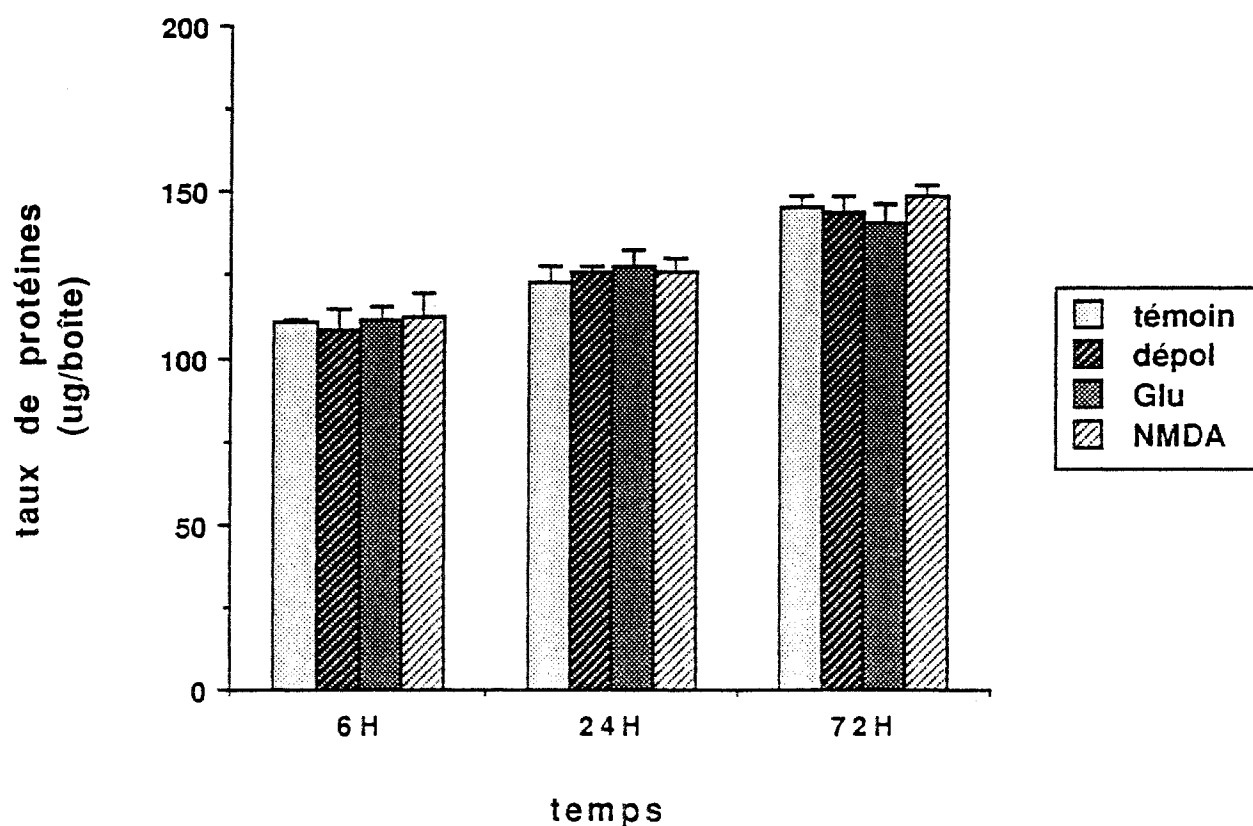


Figure 6:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate (100 μ M), à une dépolarisation par 50 mM de KCl et au NMDA (100 μ M) en milieu dépolarisant sur l'évolution des taux de protéines dans les neurones après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en μ g par boîte de culture et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons.

dépol: traitement dépolarisant par 50 mM de KCl

Glu: traitement au glutamate, en absence de l'inhibiteur de sa recapture

NMDA: traitement au NMDA en milieu dépolarisant

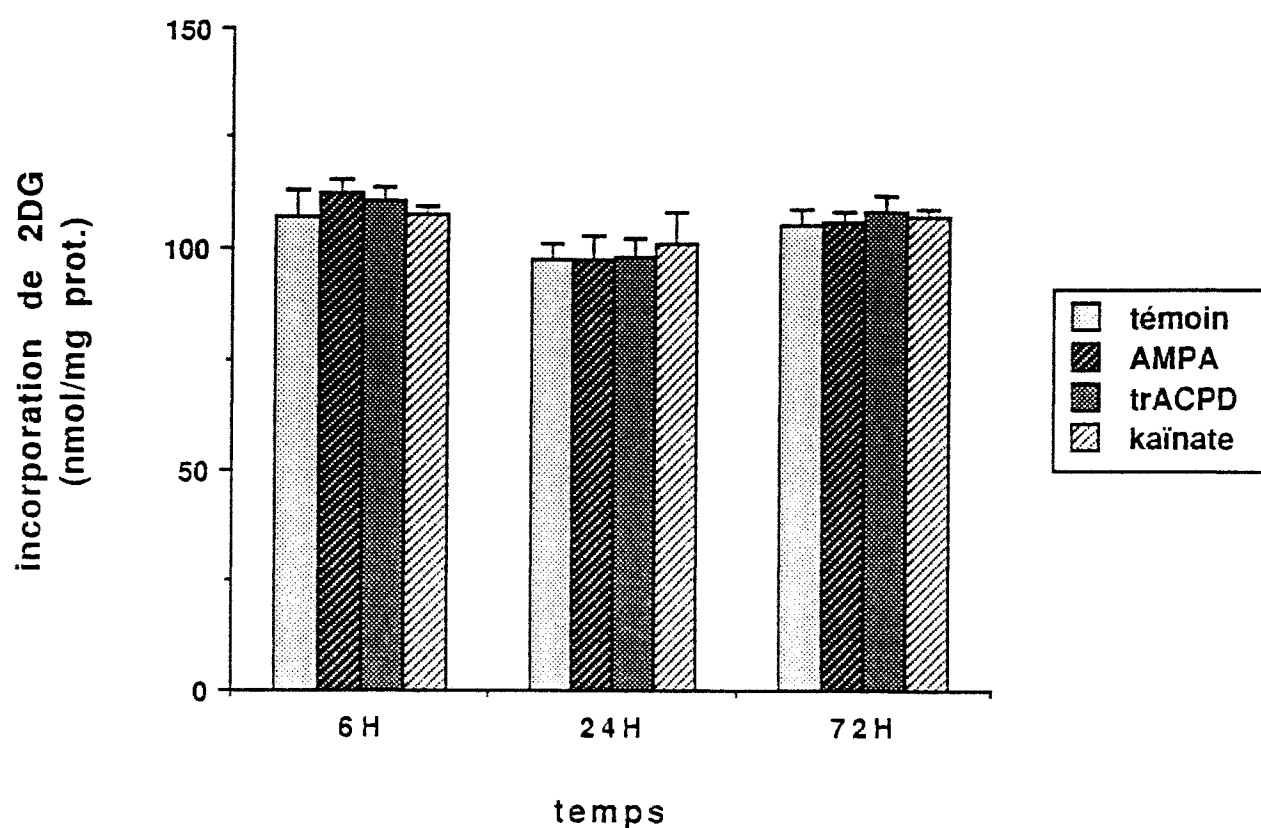


Figure 7:

Effets d'une exposition de 6 heures à l'AMPA, au trans-ACPD ou au kaïnite (100 μ M) sur l'évolution du transport spécifique et de l'incorporation du 2-désoxyglucose dans les neurones après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nmoles par mg de protéines et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons.

AMPA: traitement à l'AMPA

trACPD: traitement au trans-ACPD

kaïnite: traitement à l'acide kaïnique

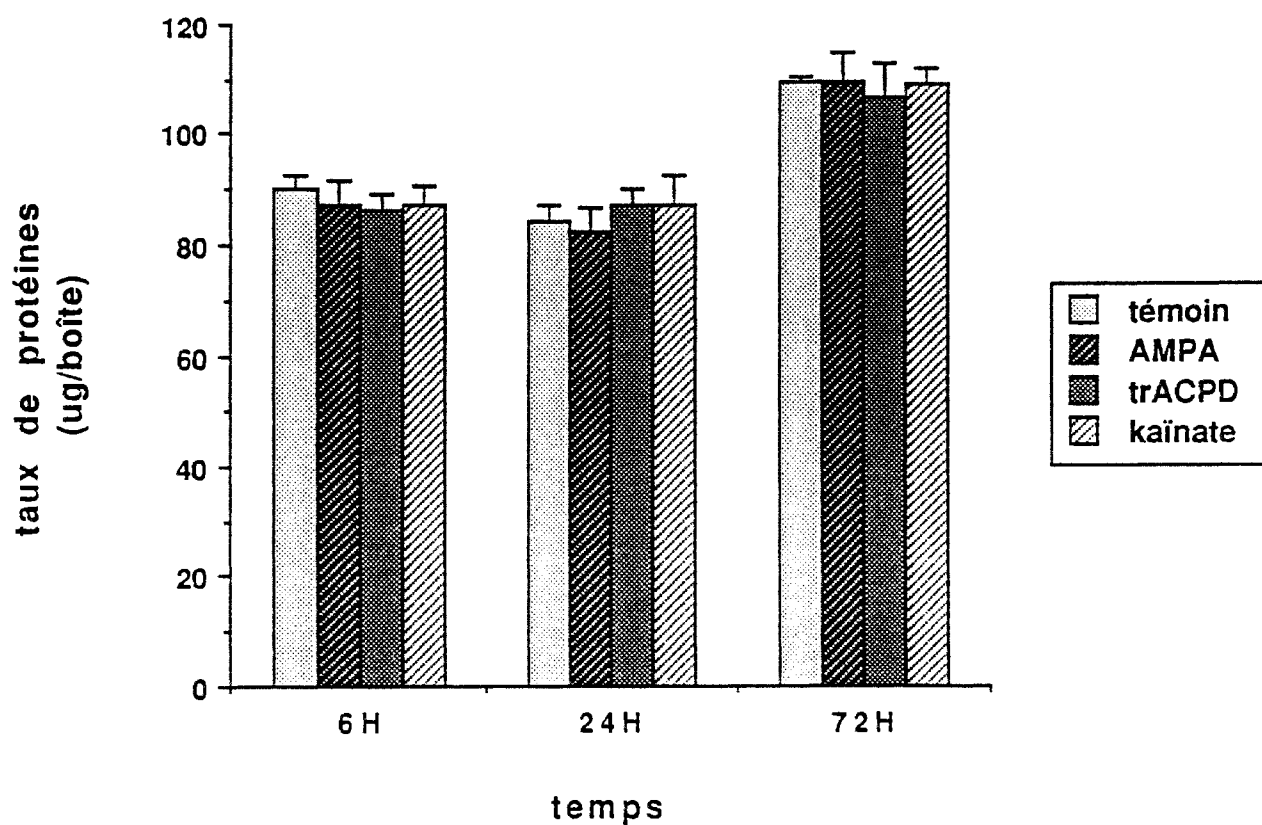


Figure 8:

Effets d'une exposition de 6 heures à l'AMPA, au trans-ACPD ou au kaïnate ($100 \mu\text{M}$) sur l'évolution des taux de protéines dans les neurones après 6 jours de culture. Les résultats sont exprimés en μg par boîte de culture et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons.

AMPA: traitement à l'AMPA

trACPD: traitement au trans-ACPD

kaïnate: traitement à l'acide kaïnique

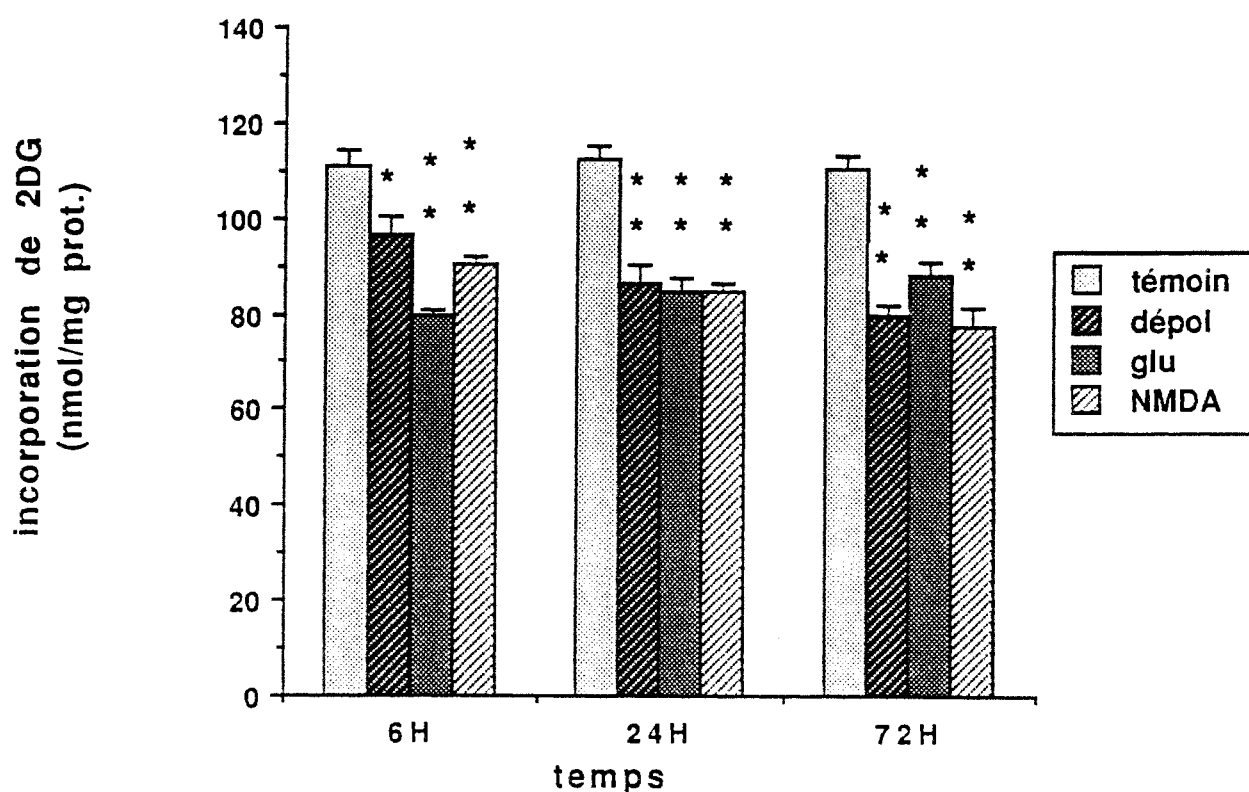


Figure 9:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate (100 μ M), à une dépolarisation par 50 mM de KCl et au NMDA (100 μ M) en milieu dépolarisant sur l'évolution du transport spécifique et de l'incorporation du 2-désoxyglucose dans les neurones après 13 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nmoles par mg de protéines et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: *($p < 0,05$) et **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

dépol: traitement dépolarisant par 50 mM de KCl

Glu: traitement au glutamate, en absence de l'inhibiteur de sa recapture

NMDA: traitement au NMDA en milieu dépolarisant

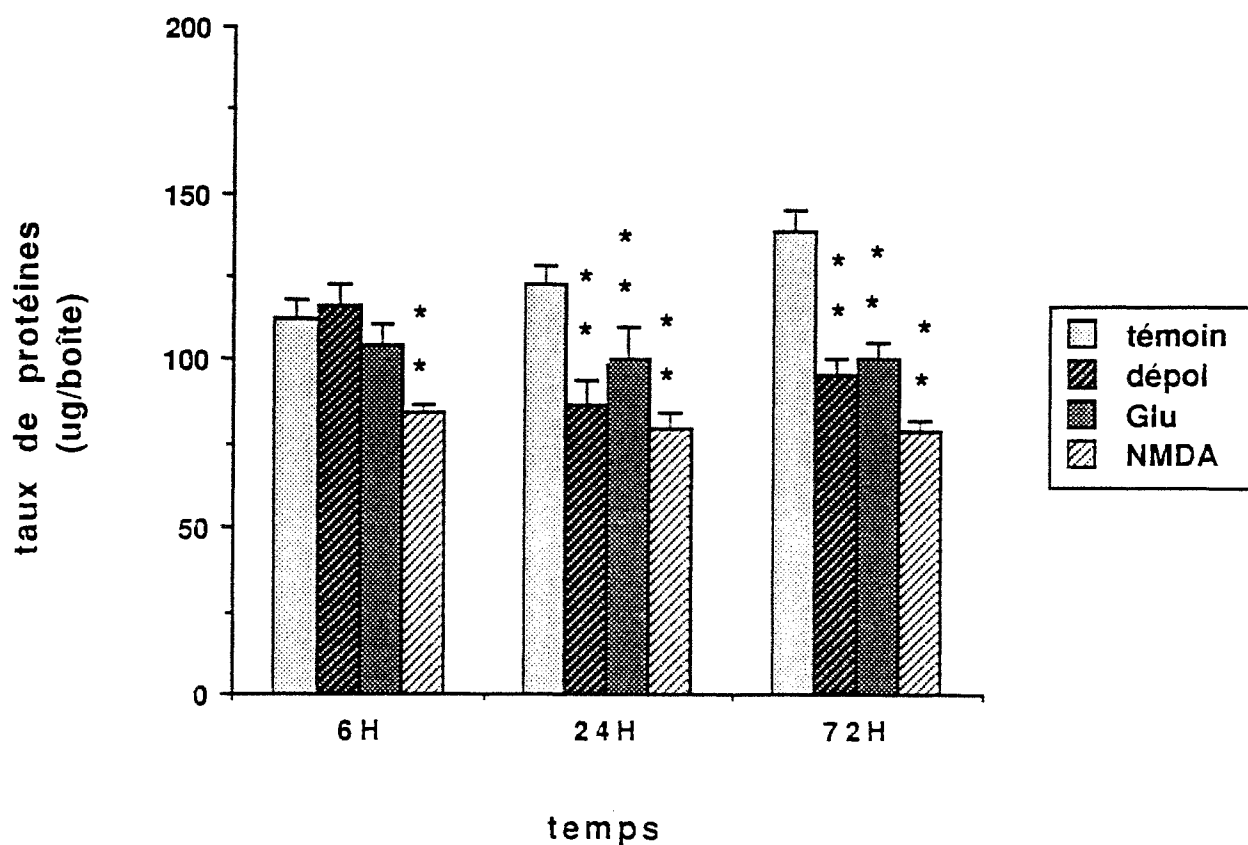


Figure 10:

Effets d'une exposition de 6 heures au glutamate (100 μ M), à une dépolarisation par 50 mM de KCl et au NMDA (100 μ M) en milieu dépolarisant sur l'évolution des taux de protéines dans les neurones après 13 jours de culture. Les résultats sont exprimés en μ g par boîte de culture et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

dépol: traitement dépolarisant par 50 mM de KCl

Glu: traitement au glutamate, en absence de l'inhibiteur de sa recapture

NMDA: traitement au NMDA en milieu dépolarisant

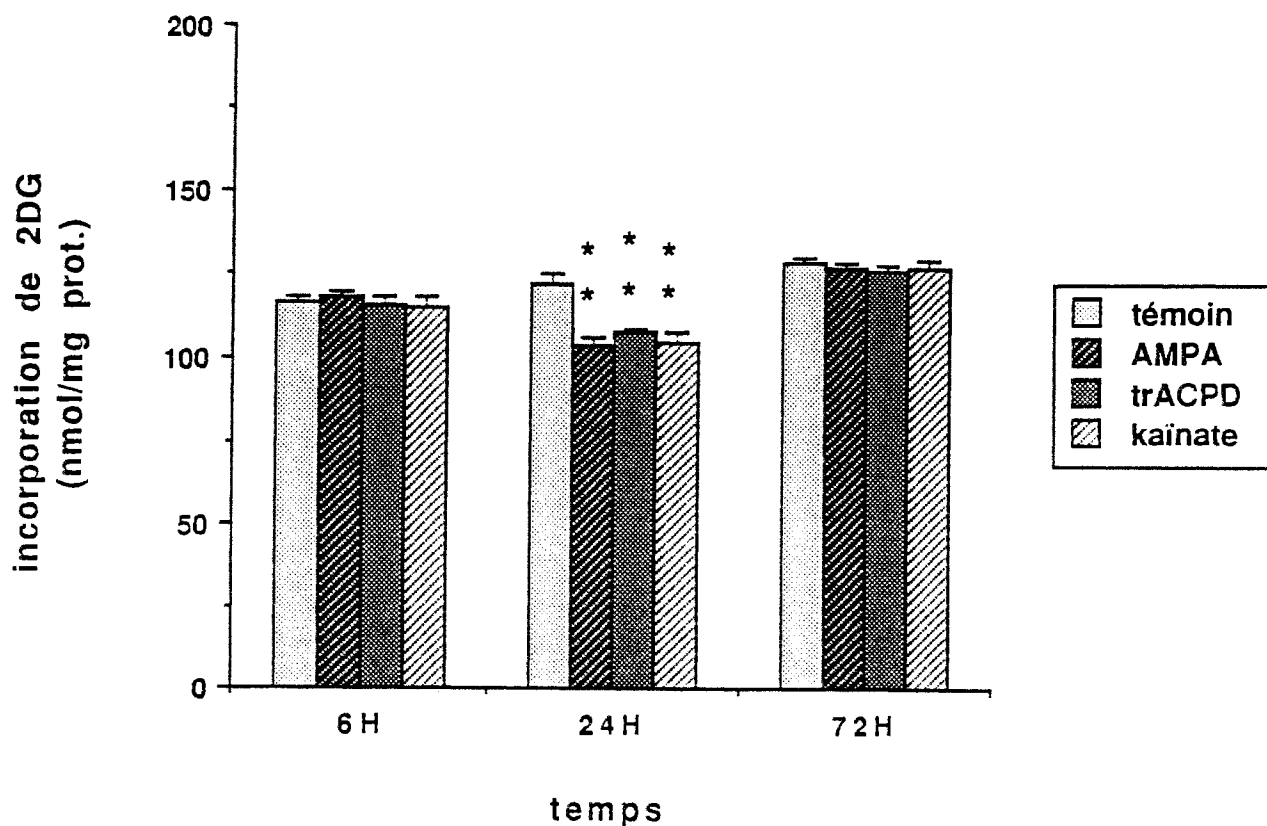


Figure 11:

Effets d'une exposition de 6 heures à l'AMPA, au trans-ACPD ou au kaïnite (100 μ M) sur l'évolution du transport spécifique et de l'incorporation du 2-désoxyglucose dans les neurones après 13 jours de culture. Les résultats sont exprimés en nmoles par mg de protéines et rapportés en moyennes $\pm$ E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

AMPA: traitement à l'AMPA

trACPD: traitement au trans-ACPD

kaïnite: traitement à l'acide kaïnique

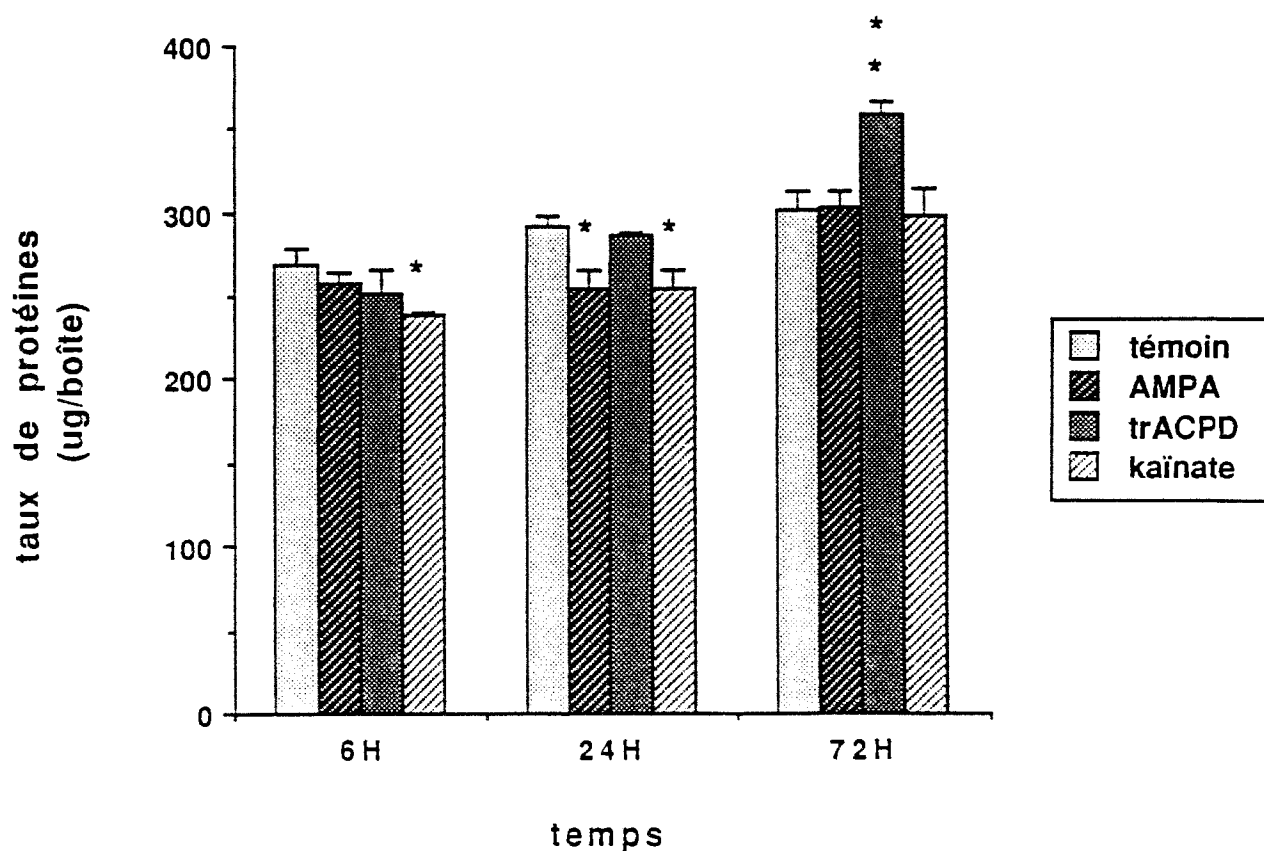


Figure 12:

Effets d'une exposition de 6 heures à l'AMPA, au trans-ACPD ou au kaïnate (100 µM) sur l'évolution des taux de protéines dans les neurones après 13 jours de culture. Les résultats sont exprimés en µg par boîte de culture et rapportés en moyennes ± E.S.M. obtenues à partir de 30 à 36 échantillons: *($p < 0,05$) et **($p < 0,01$), différences significatives avec le groupe témoin au même temps (test de Dunnett).

AMPA: traitement à l'AMPA

trACPD: traitement au trans-ACPD

kaïnate: traitement à l'acide kaïnique

DISCUSSION

Les précédents travaux effectués sur notre modèle de neurones centraux de rat en culture ont montré les effets délétères d'une exposition transitoire de 6 heures à l'hypoxie au stade de 6 jours, ces effets s'aggravant progressivement pour conduire à une mort neuronale 3 jours après réoxygénation (Daval *et al*, 1991; Oillet *et al*, 1995). A ce stade de développement, il a par ailleurs été possible de mettre en évidence l'expression des différents types de récepteurs du glutamate (Oillet *et al*, 1995), suggérant la participation d'un processus excitotoxique dans les mécanismes de la mort cellulaire retardée faisant suite à l'hypoxie dans ce modèle. Cette hypothèse a certes été validée dans de nombreuses situations expérimentales, tant *in vivo* que *in vitro*, mais d'autres observations ont soulevé des réserves quant à sa généralisation et ont imposé certaines limites à son application (Choi & Rothman, 1990). Par ailleurs, la présence des récepteurs des acides aminés excitateurs au niveau des membranes neuronales n'est pas un indice certain de leur implication dans une excitotoxicité potentielle. En effet, des études de l'effet des différents agonistes des récepteurs glutamatergiques, effectuées sur des neurones corticaux de souris en culture à divers stades de développement, ont montré qu'il n'existait pas de corrélation simple entre l'expression des sites de liaison des acides aminés excitateurs et leur capacité à induire une cytotoxicité, l'apparition des sites de liaison précédant en général celle de l'excitotoxicité (Wahl *et al*, 1991). Ainsi, la neurotoxicité du glutamate n'est effective que pour des cellules matures, et il demeure des sous-populations neuronales résistantes possédant pourtant des récepteurs glutamatergiques (Choi *et al*, 1987). Cette résistance serait liée à une moindre conductance membranaire pour le calcium.

Les résultats de la présente étude sont mitigés, ne confirmant ni n'infirment l'hypothèse excitotoxique de l'hypoxie évoquant une neurotoxicité du glutamate comme mécanisme de dégénérescence des neurones de 6 à 9 jours. En effet, l'activation exclusive de chacun des différents types de récepteurs du glutamate sous l'action d'un agoniste spécifique ne semble provoquer aucune toxicité à ce stade, tandis que l'activation simultanée de l'ensemble des récepteurs sous l'action du glutamate, renforcée par la présence d'un inhibiteur de sa recapture, conduit à une neurotoxicité similaire, tant dans son intensité que dans son décours temporel, à celle observée pour l'hypoxie (Daval *et al*, 1991). Toutefois, sans l'inhibiteur de recapture, le glutamate n'a aucun effet, montrant l'efficacité des systèmes de transport à haute affinité à ce stade. Cette résistance partielle des neurones de 6 jours à l'effet toxique des acides aminés excitateurs apparaît liée à des caractéristiques de cellules encore immatures, puisque les neurones de 13 jours sont sensibles aux effets toxiques des différents analogues du glutamate, de même qu'au glutamate dont l'action n'est plus limitée par sa recapture, impliquant une sensibilité plus grande des cellules de 13 jours vis-à-vis de l'excitotoxicité. A ce stade, le

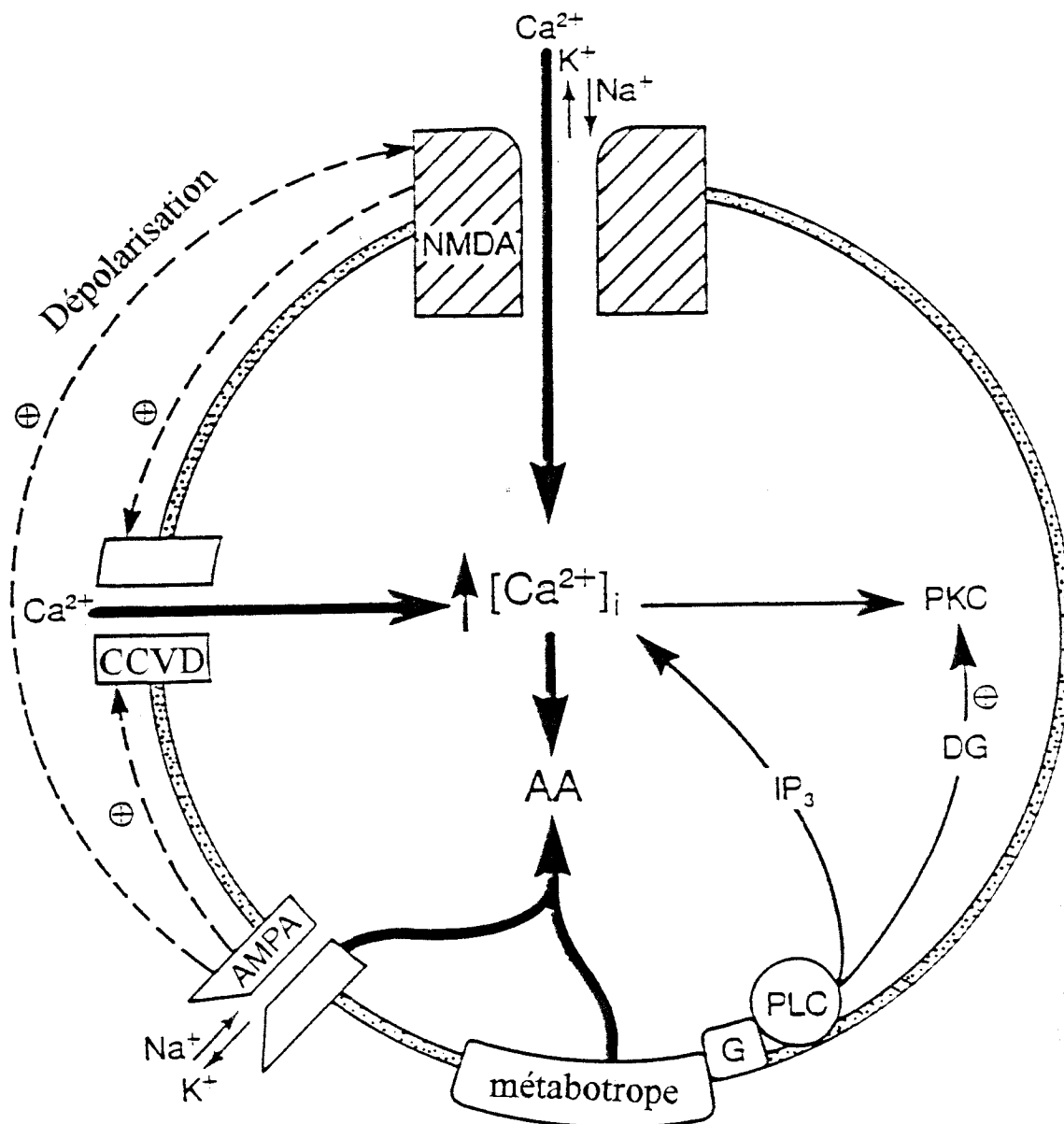


Figure 8:

Comparaison des réponses cellulaires induites par l'activation combinée des récepteurs AMPA/métabotropes ou AMPA/NMDA. La dépolarisation induite par le récepteur NMDA ou AMPA conduit à l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants (CCVD). De plus, un influx calcique à travers le canal du récepteur NMDA activé par cette dépolarisation contribue à l'élévation du taux de calcium intracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Cette accumulation intracellulaire de calcium est à l'origine de la formation d'acide arachidonique (AA), et pourrait être responsable de l'activation d'une protéine kinase C (PKC) observée après la stimulation du récepteur NMDA. Dans le cas de l'activation combinée des récepteurs AMPA/métabotropes, les courants ioniques (influx de Na^+ et de Ca^{2+} , efflux de K^+) sont dus au récepteur AMPA. Le récepteur métabotrope, lié par une protéine de liaison du GTP (G) à la phospholipase C (PLC), l'enzyme responsable de la formation de diacylglycérol (DG) et de D-inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3), active quant à lui une protéine kinase C via le diacylglycérol et augmente le taux de calcium intracellulaire via l'inositol phosphate IP_3 . L'activation de ces deux récepteurs serait nécessaire à la formation accrue d'acide arachidonique.

récepteur NMDA semble être le principal médiateur de la toxicité du glutamate, puisque son activation spécifique par le NMDA en milieu dépolarisant conduit à une mort neuronale après 72 heures alors que les effets médiés par l'activation des autres classes de récepteurs sont peu marqués et transitoires. L'effet sur les neurones d'une simple dépolarisation de 6 heures est proche de celui de l'exposition au NMDA, quoique avec un délai plus long et une moindre amplitude. Diverses études *in vitro* suggèrent qu'un tel effet pourrait être lui aussi médié par les récepteurs NMDA, en levant le blocage du magnésium voltage-dépendant (Cox *et al*, 1989), et en provoquant l'activation de ces récepteurs avec une libération de glutamate et un influx calcique (Takahashi *et al*, 1995; Uchiyama-Tsuyuki *et al*, 1995).

L'activation simultanée de différents récepteurs par de fortes concentrations en glutamate serait donc nécessaire pour induire un effet neurotoxique sur des neurones encore immatures, peu sensibles à l'excitotoxicité. Cette observation peut s'expliquer par l'interaction des différents récepteurs dans les mécanismes générant la toxicité du glutamate, une telle interaction renforçant l'effet toxique (fig.8). Ceci est confirmé par le fort potentiel neurotoxique que possèdent les agonistes multiples, comme l'iboténate qui active à la fois les récepteurs NMDA et métabotropes et qui provoque des lésions cérébrales excitotoxiques similaires à celles observées dans les pathologies du cerveau en développement chez le fœtus et le nouveau-né (Marret *et al*, 1995). De plus, il a été établi que le blocage d'un site récepteur particulier par un antagoniste spécifique n'empêchait pas la toxicité du glutamate (Frandsen *et al*, 1989). Les récepteurs métabotropes couplés au métabolisme des inositols phosphates participeraient également à l'excitotoxicité, par le biais d'une protéine kinase C qui va activer, en la phosphorylant, une sous-unité du complexe ionophore du récepteur NMDA, aboutissant ainsi à un influx calcique (Schoepp & Conn, 1993). Par ailleurs, les récepteurs du glutamate modulent leur activité en agissant les uns sur les autres (Cunningham *et al*, 1993), alors que l'action prolongée d'agonistes particuliers entraîne en retour une régulation négative de leurs récepteurs, diminuant leur sensibilité ou la capacité des cellules à libérer les acides aminés excitateurs (Martin *et al*, 1991).

L'hypothèse excitotoxique n'est donc au mieux qu'une explication partielle de la survenue des dommages cellulaires post-hypoxiques dans les neurones immatures peu sensibles à l'excitotoxicité. Dans un modèle *in vitro* d'exposition de neurones centraux à des inhibiteurs métaboliques, la déplétion en énergie, perturbation majeure du métabolisme énergétique qui accompagne l'hypoxie/ischémie et sous-tend pour une grande part ses effets délétères, est apparu comme pouvant conduire à un type de mort neuronale retardée n'impliquant ni le calcium, ni le glutamate (Uto *et al*, 1995). D'autres facteurs liés à l'hypoxie et initiant une mort cellulaire retardée dans des cerveaux encore immatures peuvent donc être évoqués. Ainsi, il a été montré qu'un stress oxydatif induisait l'apoptose dans des neurones corticaux

embryonnaires, effet lié à un affaiblissement des défenses cellulaires parmi lesquelles les systèmes antioxydants (Ratan *et al*, 1994). Cette observation ouvre une voie nouvelle à l'explication des mécanismes sous-jacents aux atteintes neuronales post-hypoxiques.

Ainsi, une hypothèse alternative à l'excitotoxicité repose sur la production accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène pendant l'hypoxie, comme nous l'avons montré dans une précédente étude, ce résultat recoupant des observations faites par d'autres équipes (Cazevielle *et al*, 1993). Ces radicaux sont des espèces réactives à fort potentiel cytotoxique et peuvent provoquer la mort neuronale par leur action directe sur les lipides membranaires (Sakamono *et al*, 1991), ou secondairement en activant les processus excitotoxiques (Buisson *et al*, 1993; Manzoni & Bockaert, 1993).

VI. DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

1) Problèmes inhérents au modèle

1.1. avantages du modèle

Dans le chapitre consacré aux différents types de modèles d'étude des effets de l'hypoxie sur les cellules nerveuses, nous avons montré que de multiples avantages peuvent être retirés d'un modèle de neurones centraux en culture pure. En premier lieu, les neurones sélectionnés proviennent de territoires cérébraux (hippocampe, cortex et striatum) dont la sensibilité particulière à une privation en oxygène a été largement prouvée. En second lieu, les neurones sont incubés dans un milieu chimiquement défini et présentent une pureté et une viabilité élevées. Enfin, l'étude et l'interprétation d'un mécanisme spécifique sont plus aisées dans ces conditions. De même que pour les autres modèles *in vitro*, la modification de variables expérimentales et l'introduction comme l'élimination d'agents exogènes dans le milieu d'incubation sont de pratique très simple. La culture de neurones est donc un outil de choix qui permet d'établir des relations de cause à effet (Cestelli *et al*, 1992).

En dépit des avantages certains d'un tel modèle, il demeure quelques point délicats qui méritent notre attention en vue de l'interprétation des données.

1.2. inconvénients du modèle

Les limites d'un modèle *in vitro*, quel qu'il soit, proviennent des divergences par rapport aux réalités physiologiques. Ainsi, *"une ischémie in vivo ne se limite pas à un déficit en énergie et à une libération de glutamate. Elle est associée également avec une acidose sévère, une disponibilité limitée en calcium extracellulaire comparée à l'apport ad infinitum dans les cultures tissulaires, et une libération concomitante de zinc et de divers neurotransmetteurs inhibiteurs, pour lesquels il a été montré in vitro qu'ils réduisaient la toxicité du glutamate"* (Hossmann, 1994). Il existe par ailleurs des interactions entre le cerveau et le système cardiovasculaire qui n'interviennent plus au niveau du neurone isolé. Il a été montré, par exemple, que la stimulation de récepteurs NMDA dans le cerveau augmentait le débit sanguin cérébral chez le mouton nouveau-né, en liaison avec une production de monoxyde d'azote (Northington *et al*, 1995). Il est indéniable que, dans un modèle de neurones en culture comme le nôtre, le pouvoir neurotoxique du glutamate est supérieur à ce qu'il serait *in vivo* ou même dans des coupes de cerveau, l'explication probable étant le libre accès de l'acide aminé excitateur aux membranes neuronales dans les cultures (Choi *et al*, 1987; Garthwaite, 1985).

Cet effet est encore accentué dans une culture pure de neurones en comparaison avec une culture mixte neurones/astrocytes, les cellules gliales étant responsables de l'élimination rapide du glutamate du milieu extracellulaire en assurant son prélèvement et sa dégradation (Rosenberg *et al*, 1992). Enfin, l'exposition à un type donné d'agoniste spécifique activant une classe particulière de récepteurs ne reflète pas la réalité physiopathologique de l'hypoxie/ischémie, situation dans laquelle le glutamate libéré provoque l'activation de l'ensemble de ses récepteurs.

Le type et la composition du milieu de culture peuvent influencer les variables expérimentales. Parmi les éléments concernés, nous passerons en revue l'importance du sérum, des facteurs de croissance et de la présence de glutamate.

Dans notre modèle, le milieu de culture n'est enrichi en sérum que le premier jour, puis les neurones se développent dans un milieu sans sérum mais en présence de promoteurs de croissance, incluant des hormones (insuline, progestérone, oestradiol) et des facteurs de croissance (EGF et FGF, pour 48h). Nous n'employons le sérum et les facteurs de croissance qu'au cours des premiers stades de culture, afin de préserver la pureté des cellules, car ces substances qui activent la multiplication et la différenciation des neurones pendant les premiers jours provoqueraient une prolifération des cellules gliales et des fibroblastes si elles n'étaient pas éliminées du milieu.

De tels facteurs trophiques sont certes nécessaires à la survie des neurones dans les conditions normales, mais ils semblent également jouer un rôle protecteur contre différents types d'agression. D'une part, il a été montré que le FGF provoque la différenciation et la multiplication de neurones d'hippocampe en culture (Creuzet *et al*, 1995), tandis qu'une simple privation du facteur de croissance nerveuse (NGF) provoque la mort par apoptose de neurones sympathiques *in vitro* (Deckwerth & Johnson, 1993). D'autre part, l'étude présentée dans ce mémoire a établi le rôle protecteur du sérum dans l'hypoxie, les neurones développés en présence de 2,5% de sérum de veau foetal produisant moins de radicaux superoxydes toxiques que ceux cultivés en milieu sans sérum, dans les conditions de notre modèle (Daval *et al*, 1995). Il a également été démontré que le sérum, comme le FGF, atténue la neurotoxicité du glutamate dans des neurones centraux en culture, en agissant au niveau de l'influx calcique secondaire lié à la mort neuronale retardée (Uto *et al*, 1994) et en diminuant la production de radicaux peroxydes tout en activant des systèmes enzymatiques antioxydants (Mattson *et al*, 1995). Enfin, le FGF et le glutamate ont des actions opposées dans le développement cérébral, qui s'accordent normalement pour générer l'architecture neuronale, en régulant les flux calciques transmembranaires, mais qui conduisent à la dégénérescence des neurones en cas de déséquilibre (Mattson *et al*, 1989).

La nécessité de changements réguliers du milieu est une contrainte inhérente aux cultures cellulaires. Or, de telles manipulations ne sont pas sans influence sur les conditions expérimentales. Ainsi, il est apparu que des dommages cellulaires peuvent survenir à la suite d'un changement du milieu de culture. Cet effet néfaste serait lié à l'apport de glutamine et à la génération de glutamate extracellulaire (Driscoll *et al*, 1993). Les neurones immatures tirent bénéfice d'un apport direct de glutamate dans le milieu, mais une culture à plus long terme présente une meilleure viabilité dans un milieu sans glutamate, puisque les cellules régulent la synthèse des pools de ce neurotransmetteur, entre autres en prélevant et en métabolisant la glutamine du milieu et en contrôlant la libération et la recapture du glutamate (Fonnum, 1993), alors que l'apport direct de glutamate va activer des récepteurs et provoquer une éventuelle toxicité, d'autant plus que l'effet est renforcé à chaque changement. C'est pourquoi nous avons adopté le milieu DMEM pour des cultures à long terme, alors que le mélange DMEM/HamF12 semble bien adapté pour un temps de développement limité (10 jours au maximum).

2) Mécanismes de la neurotoxicité dans l'hypoxie

2.1. statut énergétique - spécificité du cerveau immature

Le cadre général de l'étude concerne les conséquences de l'hypoxie cérébrale, et nous avons évoqué différents mécanismes d'action possibles en soulignant leurs limites. Cependant, il y a lieu de souligner le contexte particulier de l'hypoxie, qui diffère de l'ischémie sur plusieurs points importants. Dans notre modèle, les neurones sont soumis à une privation d'oxygène en présence d'un taux normal de glucose dans le milieu de culture. Or, l'ischémie est caractérisée par une privation simultanée d'oxygène et de glucose, impliquant une déplétion énergétique plus marquée. Ce point est essentiel vis-à-vis de la réponse des cellules nerveuses à l'agression. En effet, en présence de glucose, les neurones résistent aussi bien à une hypoxie modérée qu'à une exposition au glutamate. Il a ainsi été montré *in vitro* que seule une hypoxie combinée à une hypoglycémie pouvait provoquer un influx calcique (Badar-Goffer *et al*, 1993), tandis que la présence de glucose dans le milieu de culture protégeait les neurones contre une exposition au glutamate à des concentrations allant jusqu'à 5 mM (Lysko *et al*, 1989; Cox *et al*, 1989). A l'inverse, les taux élevés de glucose chez l'adulte potentialisent les effets néfastes de l'hypoxie, vraisemblablement par accumulation de lactate (Johnston, 1993). Le statut énergétique est donc un important facteur dans la survenue des dommages après anoxie. Ce point a par exemple été démontré dans des coupes d'hippocampe de rat, la survie des neurones hypoxiques étant liée aux taux de créatine phosphate (Carter *et al*, 1995).

L'adaptation métabolique du cerveau immature soumis à une hypoxie permet d'éviter une déplétion énergétique grave. Les mécanismes de défense cellulaire dépendant de l'énergie restent fonctionnels et protègent le neurone efficacement contre l'agression hypoxique. Par contre, l'exposition à une ischémie, laquelle perturbe gravement le métabolisme énergétique, compromet la survie de la cellule nerveuse. En effet, elle induit un processus neurotoxique tout en diminuant les capacités de défense cellulaire propres au neurone et en empêchant la protection par l'environnement glial, également inhibé en conditions ischémiques.

2.2. le stress oxydatif lié à l'hypoxie

Dans notre modèle de neurones isolés en culture pure, nous avons montré une production accrue de radicaux superoxydes à la suite d'une privation transitoire de l'apport d'oxygène. Ces radicaux sont des espèces réactives à fort potentiel cytotoxique et peuvent provoquer la mort neuronale par leur action directe sur les lipides membranaires (Sakamono *et al*, 1991), ou secondairement en activant les processus excitotoxiques (Buisson *et al*, 1993; Manzoni & Bockaert, 1993). Ainsi, dans des neurones corticaux embryonnaires, il a été observé qu'une mort par apoptose était induite par un stress oxydatif, à la suite d'un affaiblissement des défenses cellulaires liées aux systèmes antioxydants (Ratan *et al*, 1994). Par contre, un antioxydant comme la N-Acétylcystéine protégerait des neurones sympathiques en culture contre l'apoptose induite par la privation de facteurs trophiques (Ferrari *et al*, 1995). Le stress oxydatif serait donc un processus général impliqué dans la survenue d'une mort neuronale de type apoptotique.

La présence de sérum dans le milieu de culture pourrait protéger les neurones contre l'hypoxie en limitant la production du radical superoxyde. Les effets délétères de ce dernier seraient donc essentiels pour déterminer la neurodégénérescence après hypoxie.

L'hypoxie provoque également une dérégulation de l'homéostasie du fer libre, responsable de processus oxydatifs avec génération de radicaux libres, tout en stimulant des systèmes défensifs antioxydants, en activant par exemple la synthèse de la ferritine par les oligodendrocytes (Qi *et al*, 1995). Les relations entre une privation d'oxygène et l'apparition d'un stress oxydatif sont donc complexes, puisque là encore les cellules sont capables de se défendre et de limiter les effets de l'agression hypoxique. Cette capacité d'adaptation est cependant limitée pour le neurone isolé en culture pure et les effets de l'hypoxie sont amplifiés par rapport à la situation physiologique.

2.3.rôle de l'excitotoxicité

Il a été montré *in vivo* qu'une ischémie cérébrale provoquait l'accumulation de glutamate dans le milieu extracellulaire (Shimada *et al*, 1993; Wahl *et al*, 1994; Benveniste *et al*, 1984), exposant ainsi le neurone à des doses dépassant le seuil de toxicité de cet acide aminé exciteur, ce qui va suractiver ses récepteurs et entraîner une cascade d'événements conduisant à la mort cellulaire. L'inhibition métabolique serait essentielle à l'apparition d'une telle toxicité, en déterminant une plus grande sensibilité de la cellule nerveuse au glutamate et en prolongeant les effets de l'ischémie (Rajdev & Reynolds, 1994; Voronov, 1995). Ainsi, il est apparu que des neurones en culture résistaient à de fortes doses de glutamate en présence de glucose. Dans le contexte particulier des effets de l'hypoxie sur le cerveau immature, nous avons vu que ce dernier présentait une adaptation métabolique limitant la déplétion énergétique. Dans ces conditions, il s'avère donc que le seuil de toxicité du glutamate est très élevé. Par ailleurs, nous avons observé que l'inhibition par l'hypoxie de la recapture du glutamate extracellulaire pouvait contribuer à l'apparition d'une excitotoxicité. Un tel effet pourrait en effet potentialiser la neurotoxicité du glutamate comme cela est apparu *in vitro*. Cependant, il a été établi *in vivo* que l'accumulation du glutamate produite par le blocage de son prélèvement par des inhibiteurs spécifiques ne suffisait pas à induire des dommages neuronaux (Massieu *et al*, 1995).

Dans notre modèle, nous avons mis en évidence l'expression des différents types de récepteurs du glutamate au stade 6 jours. Il était alors possible d'établir si, à ce degré de maturation, l'activation de ces récepteurs pouvait produire une excitotoxicité. Nous avons alors pu évaluer la sensibilité des neurones au glutamate et à ses analogues. La dose utilisée, 100 μ M, a été choisie comme étant supérieure aux concentrations mesurées par microdialyse *in vivo* après hypoxie/ischémie et dépassant même les doses léthales évaluées dans des travaux *in vitro* concernant des neurones matures (Frandsen & Schousboe, 1987; Frandsen & Schousboe, 1990). A priori, cette dose se situait donc largement au-delà du seuil toxique normal.

Au vu des résultats de nos travaux, il semble que l'excitotoxicité ne soit pas impliquée dans le processus de dégénérescence des neurones centraux immatures à la suite d'une privation en oxygène, puisque des doses normalement toxiques du glutamate et de ses analogues n'ont pas eu d'effets à un stade précoce de développement où le seuil de toxicité est très élevé. L'apparition d'une excitotoxicité à un stade ultérieur de développement confirme que la résistance des neurones de 6 jours aux acides aminés excitateurs est liée à leur faible degré de maturité. Comme ces cellules immatures possèdent toutefois des récepteurs glutamatergiques, leur moindre sensibilité pourrait être associée à une conductance membranaire réduite pour le calcium (Choi *et al*, 1987). L'activation de ces récepteurs pourrait ainsi participer à la

neurotoxicité induite par l'hypoxie, mais ne suffirait pas à provoquer par elle-même la dégénérescence des neurones privés d'oxygène.

2.4. autres mécanismes

La privation d'oxygène implique d'autres systèmes neurotransmetteurs que celui du glutamate, dans lesquels l'hypoxie perturberait la transmission synaptique du signal nerveux. Au niveau présynaptique, elle inhiberait la libération de neurotransmetteurs et au niveau postsynaptique, elle s'opposerait à la liaison du ligand à son récepteur, comme cela a été observé pour les récepteurs cholinergiques de type nicotinique (Lee *et al*, 1995). Cet effet est très spécifique puisque cette action ne s'étend pas à l'autre classe de récepteurs cholinergiques, de type muscarinique. Par contre, l'activation de ces récepteurs muscariniques inhiberait l'apoptose dans des cellules PC12 (Lindenboim *et al*, 1995). Or, ce type de mort cellulaire correspond à celui induit par l'hypoxie. Les récepteurs gabaergiques seraient également impliqués, du moins dans l'ischémie. En effet, l'activation de la neurotransmission du GABA par le diazépam, administré après la période ischémique au niveau de sites vulnérables comme l'hippocampe et le striatum, protège les neurones contre une mort retardée (Schwartz *et al*, 1995).

La synthèse protéique serait également perturbée par l'hypoxie, ce point étant actuellement à l'étude au laboratoire. L'hypoxie/ischémie pourrait aussi interagir au niveau de l'expression de certains gènes impliqués dans la mort cellulaire retardée. Ainsi, un couplage stimulus-transcription a pu être évoqué dans le cas de l'ischémie cérébrale focale, où la stimulation des récepteurs NMDA provoquerait l'induction de facteurs de transcription par l'expression de gènes précoces (Kiesslig & Gass, 1994). La transcription de deux de ces gènes, *c-fos* et *c-jun*, a ainsi été mise en évidence dans des régions du cerveau de nouveau-né particulièrement vulnérables au stress hypoxique/ischémique, comme le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum, de même que l'expression du gène codant pour une protéine de choc thermique, la protéine hsp70 (Munell *et al*, 1994). Par ailleurs, une expression du gène *c-fos* dans l'hippocampe de gerbille après ischémie aurait lieu dans les neurones résistants à l'agression, et serait médiée par l'activation de récepteurs NMDA (Uemura *et al*, 1991). Enfin, l'expression du protooncogène *bcl-2* protégerait une lignée cellulaire de type neuronal contre une hypoxie chimique, par l'activation d'un mécanisme antioxydant (Myers *et al*, 1995).



Schéma récapitulatif des effets de l'hypoxie sur le neurone, résumant les mécanismes d'action et les systèmes concernés, leurs interactions avec les fonctions et les structures cellulaires

3) Conclusion et perspectives

Les effets d'une privation d'oxygène sur le neurone apparaissent complexes et impliqueraient différents mécanismes à l'origine des perturbations des fonctions et des altérations des structures cellulaires (fig.9). Le cerveau immature s'avère être plus résistant à l'hypoxie. *In vivo*, le système nerveux central en développement est peu sensible aux perturbations du métabolisme énergétique, et les mécanismes de défense du neurone contribuent à prévenir l'apparition de dommages cellulaires. Cependant, nos résultats indiquent que, malgré son faible degré de maturité, le neurone isolé en culture pure succombe à une privation d'oxygène. Cette mort neuronale se produirait à travers un processus de type oxydatif plutôt que de type excitotoxique. Les travaux à venir auront pour but de préciser la nature de ce processus, dont les caractéristiques de mort cellulaire retardée correspondent à l'apoptose. A cet effet, le marquage spécifique des cellules apoptotiques et leur révélation par fluorescence permettront d'évaluer l'importance du phénomène et son évolution dans le temps. En parallèle, la synthèse de protéines et d'ARN sera analysée par la mesure de l'incorporation de leucine ou d'uridine dans les neurones, et leur expression génique sera évaluée. Une attention particulière sera apportée aux gènes associés à la différenciation, à la croissance et à la dégénérescence des cellules, comme les gènes précoces *c-fos* ou *c-jun* ou celui codant pour les protéines de choc thermique.

Il reste également à confirmer l'importance du stress oxydatif dans notre modèle d'hypoxie/réoxygénation. Ce point sera abordé de deux façons complémentaires. D'une part, nous étudierons le potentiel bénéfique d'un traitement par des antioxydants (superoxyde dismutases, catalase, N-acétyl-L-cystéine, glutathion et vitamine E). Enfin, nous comparerons les effets délétères de l'hypoxie/réoxygénation sur les neurones en culture à ceux qui seront provoqués par exposition des cellules à un système qui génère la production de radicaux libres, à savoir un mélange xanthine/xanthine oxydase.

VII. ANNEXE TECHNIQUE

MISE EN CULTURE DES NEURONES

Les animaux utilisés sont des rats Sprague-Dawley. Un groupe de 20 femelles a été constitué, maintenu en conditions d'élevage standard (alternance jour/nuit de 12 heures, lumière allumée à 6h00, la nourriture et la boisson étant fournies *ad libitum*). L'ensemble des expérimentations portant sur les animaux a été effectuée selon les recommandations décrites dans le "Guide for Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, Bethesda, MD, 1985).

Après identification histologique du cycle oestral des rates par coloration au bleu de Giemsa, des animaux en prooestrus ont été mis en accouplement pendant 24 heures. Les femelles ont ensuite été isolées jusqu'au 14ème jour de gestation. Les manipulations suivantes ont toutes été effectuées en conditions stériles sous hotte à flux laminaire et avec du matériel à usage unique ou stérilisé à l'étuve ou en autoclave avant leur utilisation.

Mise en culture

Le milieu de culture utilisé est à base d'un mélange DMEM/HamF12 pour les cultures à court terme, et de DMEM simple pour les cultures à plus long terme, ce milieu étant dépourvu de glutamate mais enrichi en glutamine.

La veille de la mise en culture, les boîtes de Pétri pour culture de tissus (35x10 mm, Falcon) ont été recouvertes de 2 ml d'une solution stérile de poly-L-lysine (1 mg/100 ml) et placées dans un incubateur en conditions contrôlées (37°C, atmosphère humide et mélange gazeux 95% air et 5% CO₂). Le jour de la culture, cette solution a été éliminée et les boîtes ont été rincées par 2x2 ml de milieu, pour être ensuite replacées dans l'incubateur avec 2 ml du milieu enrichi de sérum de veau foetal à 5% (Gibco).

La poly-L-lysine se dépose au fond des boîtes et forme en 24 heures un réseau polymérisé homogène auquel les cellules adhèrent et restent accrochées tout au long de la culture (Yavin & Yavin, 1974).

Le jour de la culture, une rate gestante est anesthésiée à l'halothane, son abdomen incisé et l'utérus gravide prélevé. Les embryons sont libérés de leur placenta et placés dans du milieu enrichi en sérum chauffé à 37°C. La partie supérieure de l'encéphale est sectionnée, les méninges et les microvaisseaux sanguins sont dégagés et les amas cellulaires isolés sont

Milieu de base	Milieu enrichi en sérum	Milieu enrichi en hormones
- milieu de Eagle modifié par Dulbecco et milieu de Ham F12 sans glutamine - glucose - bicarbonate de sodium - glutamine - pénicilline - streptomycine	- milieu de base - sérum de veau foetal	- milieu de base - transférine humaine - insuline bovine - putrescine - 17-β-oestradiol - sélénite de sodium
50:50 5 g/l 1,9 g/l 0,2 g/l 25 mg/l 25 mg/l 7,4	5%	0,1 g/l 5 mM 100 μ M 1 pM 30 nM

Tableau :

Composition des différents milieux de culture.

transférés dans un tube conique contenant 10 ml de milieu enrichi en sérum, et conservés à 37°C. Une suspension cellulaire est réalisée par dissociation mécanique douce à la seringue, pour être ensuite centrifugée à 700g pendant 10 minutes. Le surnageant est remplacé par 10 ml de milieu frais et une seconde homogénéisation est effectuée. Enfin, la suspension est passée au-travers d'un tamis de nylon stérile (taille des mailles 0,46 μm) afin d'éliminer les impuretés et les amas cellulaires résiduels.

La densité des cellules dans la suspension est évaluée à l'aide d'un hématocytomètre et ajustée à 10^6 cellules par ml par une dilution appropriée, pour finalement ensemercer chaque boîte par 10^6 cellules. Les boîtes sont ensuite replacées dans l'incubateur en conditions standard. La croissance initiale des neurones se fait ainsi en présence de sérum, qui ne sera utilisé que pendant les premières 24 heures.

Le lendemain, le milieu de culture est intégralement remplacé par un milieu sans sérum enrichi en hormones et microéléments (tableau ci-contre), lequel sera renouvelé tous les 3 ou 4 jours jusqu'au stade désiré. Au cours du premier changement qui a lieu après 24 heures de culture, le milieu contient également des facteurs de croissance pour les 2 jours suivants (basic Fibroblast Growth Factor ou bFGF à 2 ng/ml, et Epidermal Growth Factor ou EGF à 10 ng/ml). Ces derniers stimulent la croissance et la multiplication des neurones les premiers jours de culture, et améliorent leur survie à long terme en absence de sérum.

MESURE DE LA LDH DANS LE MILIEU DE CULTURE

La présence de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture est liée au degré de souffrance cellulaire, le neurone lésé libérant l'enzyme dans la mesure de la dégradation de sa membrane cellulaire. L'activité de la LDH, sans distinction des différentes formes isoenzymatiques, est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic 2000, Bausch et Lomb) selon le protocole décrit par Amador et coll. (1963) et basé sur l'oxydation du lactate en pyruvate et la mesure à 340 nm de la réduction simultanée du NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$. La quantification de l'enzyme a été validée à l'aide d'un sérum de contrôle (Accutrol, Sigma Diagnostics). Les valeurs sont rapportées en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

MESURE DU TRANSPORT SPECIFIQUE DU GLUCOSE

Le transport spécifique du glucose, reflet du métabolisme énergétique, est déterminé par la mesure du prélèvement spécifique de 2-désoxyglucose(^3H), ou 2DG, par les cellules en culture. Les boîtes sont rincées deux fois par 2 ml d'une solution Krebs-Ringer (NaCl 125 mM, KCl 4,8 mM, MgSO_2 1,2 mM, CaCl_2 1,3 mM, KH_2PO_4 1,2 mM) tamponnée par de l'HEPES (pH 7,4), et les cellules sont préincubées pendant 15 mn à 37°C dans cette solution saline. Après élimination du milieu, les neurones sont incubés dans 1,5 ml de la solution tampon contenant 1 mM de 2DG(^3H). Après 30 mn, les cultures sont rapidement lavées trois fois par 2 ml de tampon, puis séchées. Les neurones sont ensuite solubilisés dans 1 ml de NaOH 1N et des échantillons (100 μl) sont prélevés pour le comptage de la radioactivité par scintillation liquide (compteur Beckmann, modèle LS 1801). Le prélèvement non spécifique de 2DG par les cellules en culture est estimé par incubation des neurones dans des conditions similaires en présence d'un excès de D-glucose (100 mM). Dans nos conditions expérimentales, le transport spécifique de 2DG(^3H) a été établi à 92-95% du transport total.

VIII. BIBLIOGRAPHIE

Almeida, A., Allen, K.L., Bates, T.E. & Clark, J.B. (1995) Effect of reperfusion following cerebral ischemia on the activity of the mitochondrial respiratory chain in the gerbil brain. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 1698-1703.

Aruoma, O.I., Halliwell, B. & Dizdaroglu, M. (1989) Iron ion-dependant modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *Journal of biology and chemistry*, **264**, 13024-13028.

Badar-Goffer, R.S., Thatcher, N.M., Morris, P.G. & Bachelard, H.S. (1993) Neither moderate hypoxia nor mild hypoglycemia alone causes any significant increase in cerebral intracellular calcium: only a combination of the two insults has this effect. A ³¹P and ¹⁹F NMR study. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 2207-2214.

Barnard, E.A. & Henley, J.M. (1990) The non-NMDA receptors: types, protein structure and molecular biology. *Trends in Pharmacological Sciences*, **11**, 500-507.

Barnes, J.M. & Henley, J.M. (1992) Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors. *Progress in Neurobiology*, **39**, 113-133.

Baudry, M. & Lynch, G. (1981) Characterization of two (3H) glutamate binding sites in rat hippocampal membranes. *Journal of Neurochemistry*, **36:3**, 811-820.

Beal, M.F. (1992) Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Current opinion in neurobiology*, **2**, 657-662.

Beilharz, E.J., Williams, C.E., Dragunow, M., Sirimanne, E.S. & Gluckman, P.D. (1995) Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Molecular brain research*, **29**, 1-14.

Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N.H. (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, **43**, 1369-1374.

Benveniste, H., Jorgensen, M.B., Diemer, N.H. & Hansen, A.J. (1988) Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. *Acta Neurologica Scandinavica*, **78**, 529-536.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, **72**, 248-254.

Brawn, K. & Fridovich, I. (1981) DNA strand scission by enzymatically generated oxygen radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **206**, 414-419.

Buisson, A., Margaill, I., Callebort, J., Plotkine, M. & Boulu, R.G. (1993) Mechanisms involved in the neuroprotective activity of a nitric oxide synthase inhibitor during focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 690-696.

Carroll, J.M., Toral-Barza, L. & Gibson, G. (1992) Cytosolic free calcium and gene expression during chemical hypoxia. *Brain Research*, **59**, 1836-1843.

Carter, A.J., Muller, R.E., Pschorn, U. & Stransky, W. (1995) Preincubation with creatine enhances levels of creatine phosphate and prevents anoxic damage in rat hippocampal slices. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 2691-2699.

Cazevieuille, C., Muller, A., Meynier, F. & Bonne, C. (1993) Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation induced neuron injury. *Free radical biology and medicine*, **14**, 389-395.

Cestelli, A., Savettieri, G., Salemi, G. & Di liegro, I. (1992) Neuronal cell cultures: a tool for investigations in developmental neurobiology. *Neurochemical Research*, **17:12**, 1163-1180.

Choi, D.W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience*, **7:2**, 369-379.

Choi, D.W. (1988) Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends in Neurosciences*, **11:10**, 465-469.

Choi, D.W., Koh, J.Y. & Peters, S. (1988) Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists. *The Journal of Neuroscience*, **8(1)**, 185-196.

- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M. & Kriegstein, A.R. (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *The Journal of Neuroscience*, **7**(2), 357-368.
- Choi, D.W. & Rothman, S.M. (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annual review of neurosciences*, **13**, 171-182.
- Christine, C.W. & Choi, D.W. (1990) Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, **10**, 108-116.
- Churn, S.B., Limbrick, D., Sombati, S. & DeLorenzo, R.J. (1995) Excitotoxic activation of the NMDA receptor results in inhibition of calcium/calmodulin kinase II activity in cultured hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, **15**, 3200-3214.
- Churn, S.B., Sombati, S., Taft, W.C. & DeLorenzo, R.J. (1993) Excitotoxicity affects membrane potential and calmodulin kinase II activity in cultured rat cortical neurons. *Stroke*, **24**, 271-278.
- Clark, G.D. & Rothman, S.M. (1987) Blockade of excitatory amino acids receptors protects anoxic hippocampal slices. *Neuroscience*, **21**, 665-671.
- Collingridge, G.L. & Bliss, T.V.P. (1987) NMDA receptors: their role in long term potentiation. *Trends in Neurosciences*, **10**:7, 288-293.
- Collingridge, G.L. & Lester, R.A.J. (1989) Excitatory aminoacid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacological Reviews*, **40**:2, 143-210.
- Collingridge, G.L. & Singer, W. (1990) Excitatory aminoacid receptors and synaptic plasticity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42-48.
- Cox, J.A., Lysko, P.G. & Henneberry, R.C. (1989) Excitatory amino acid neurotoxicity at the NMDA receptor in cultured neurons: role of the voltage dependent magnesium block. *Brain Research*, **499**, 267-272.
- Craig, A.M., Craig, D.B., Huganir, R.L. & Banker, G. (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA selective subunits. *Neuron*, **10**, 1055-1068.

Creuzet, C., Loeb, J. & Barbin, G. (1995) Fibroblast growth factor stimulate protein tyrosine phosphorylation and mitogen-activated protein kinase activity in primary cultures of hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 1541-1547.

Cunningham, M.D., Ferkany, J.W. & Enna, S.J. (1993) Excitatory amino acid receptors: a gallery of new target for pharmacological intervention. *Life Sciences*, **54**, 135-148.

Danbolt, N.C. (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Progress in Neurobiology*, **44**, 377-396.

Daval, J.L., Gherzi-Egea, J.F., Oillet, J. & Koziel, V. (1995) A simple method for evaluation of superoxide radical production in neural cells under various culture conditions: application to hypoxia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, **15**, 71-77.

Daval, J.L., Koziel, V. & Nicolas, F. (1991) Functional changes in cultured neurons following transient asphyxia. *Neuronal Report*, **2**, 97-100.

Deckwerth, T.L. & Johnson, E.M. (1993) Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. *The journal of cell biology*, **123:5**, 1207-1222.

Dessi, F., Charriaut-Marlangue, C. & Ben-ari, Y. (1994) Glutamate induced neuronal death in cerebellar culture is mediated by two distinct components: a sodium-chloride component and a calcium component. *Brain Research*, **650**, 49-55.

Dingledine, R., MacBain, C.J. & MacNamara, J.O. (1990) Excitatory aminoacid receptors in epilepsy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 49-53.

Doble, A. (1995) Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. *Thérapie*, **50**, 319-337.

Doriat, J.F., Cortey, A. & Daval, J.L. (1995) Modification des caractéristiques des récepteurs NMDA induites par un épisode convulsif chez le rat en développement. *Circulation et métabolisme du cerveau*, **12**, 233-245.

Drejer, J., Benveniste, H., Diemer, N.H. & Schousboe, A. (1985) Cellular origin of ischemia induced glutamate release from brain tissue in vivo and in vitro. *Journal of Neurochemistry*, **45**, 145-151.

- Driscoll, B.F., Deibler, G.E., Law, M.J. & Crane, A.M. (1993) Damage to neurons in culture following medium change: role of glutamine and extracellular generation of glutamate. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 1795-1800.
- Duc, G. (1985) Oxygénothérapie. *Médecine néonatale* (ed. by P. Vert and L. Stern), p.504. Masson,
- Dunford, H.B. (1989) Free radical in iron containing systems. *Free radical biology and medicine*, **3**, 405-421.
- Fagg, G.E., Foster, A.C., Mena, E.E. & Cotman, C.W. (1983) Chloride and calcium ions separate L-glutamate receptor populations in synaptic membranes. *European Journal of Pharmacology*, **88**, 105-110.
- Farooqui, A.A. & Horrocks, L.A. (1994) Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long term potentiation and neurodegeneration. *Journal of Neuroscience Research*, **38**, 6-11.
- Ferrari, G., Yan, C.Y.I. & Greene, L.A. (1995) N-Acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *The Journal of Neuroscience*, **15**, 2857-2866.
- Fonnum, F. (1993) Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Progress in biophysical and molecular biology*, **60**, 47-57.
- Foster, A.C. & Fagg, G.E. (1984) Acidic aminoacid binding sites in mammalian neuronal membranes: their characteristics and relationship to synaptic receptors. *Brain Research*, **7**, 103-164.
- Frandsen, A., Drejer, J. & Schousboe, A. (1989) Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via NMDA as well as non-NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*, **53**, 297-299.
- Frandsen, A. & Schousboe, A. (1987) Time and concentration dependency of the toxicity of excitatory amino acids on cerebral neurones in primary culture. *Neurochem Int*, **10:4**, 583-591.

Frandsen, A. & Schousboe, A. (1990) Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **8**:2, 209-216.

Frandsen, A. & Schousboe, A. (1993) Excitatory amino acid mediated cytotoxicity and calcium homeostasis in cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, **60**, 1202-1211.

Froissard, P. & Duval, D. (1994) Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem Int*, **24**:5, 485-493.

Garlin, A.B., Sinor, A.D., Sinor, J.D., Jee, S.H., Grinspan, J.B. & Robinson, M.B. (1995) Pharmacology of sodium-dependent high-affinity L-[3h]Glutamate transport in glial cultures. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 2572-2580.

Garthwaite, J. (1985) Cellular uptake disguises action of L-glutamate on NMDA receptors. *Brain Journal of Pharmacology*, **85**, 297-307.

Globus, M.Y.-T., Busto, R., Martinez, E., Valdés, I., Dietrich, W.D. & Ginsberg, M.D. (1991) Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat. *Journal of Neurochemistry*, **57**, 470-478.

Goldberg, M.P. & Choi, D.W. (1990) Intracellular free calcium increases in cultured cortical neurons deprived of oxygen and glucose. *Stroke*, **3**, 75-77.

Goldberg, M.P., Weiss, J.H., Pham, P.C. & Choi, D.W. (1987) NMDA receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **243**, 784-791.

Goldberg, W.J., Kadingo, R.M. & Barrett, J.N. (1986) Effects of ischemia-like conditions on cultured neurons: protection by low sodium, low calcium solutions. *The Journal of Neuroscience*, **6**, 3144-3151.

Goldhaber, J.I., Ji, S., Lamp, S.T. & Weiss, J.N. (1989) Effects of exogenous free radicals on electromechanical function and metabolism in isolated rabbit and guinea pig ventricle. Implication for ischemia and reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*, **83**, 1800-1809.

Gray, P.H., Tudehope, D.I., Masel, J.P., Burns, Y.R., Mohay, H.A. & O'Callaghan, M.J. (1993) Perinatal hypoxic-ischemic brain injury: prediction of outcome. *Developmental Medicine of Child Neurology*, **35**, 965-973.

Gunasekar, P.G., Kanthasamy, A.G., Borowitz, J.L. & Isom, G.E. (1995) NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 2016-2021.

Haddad, G.G. & Jiang, C. (1993) O₂ deprivation in the central nervous system: on mechanisms of neuronal response, differential sensitivity and injury. *Progress in Neurobiology*, **40**, 277-318.

Haldeman, S. & MacLennan, H. (1972) The antagonistic action of glutamate diethyl ester towards amino acid-induced and synaptic excitations of central neurons. *Brain Research*, **45**, 393-400.

Hartley, D.M. & Choi, D.W. (1989) Delayed rescue of NMDA receptor mediated neuronal injury in cortical culture. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **250:2**, 752-758.

Hartley, D.M., Kurth, M.C., Bjerkness, L., Weiss, J.H. & Choi, D.W. (1993) Glutamate receptor induced calcium accumulation in cortical cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. *The Journal of Neuroscience*, **13:5**, 1993-2000.

Hermans, R.H.M., Hunter, D.E., MacGivern, R.F., Cain, C.D. & Longo, L.D. (1992) Behavioral sequelae in young rats of acute intermittent antenatal hypoxia. *Neurotoxicology and Teratology*, **14**, 119-129.

Hillered, L., Hallstrom, A., Segersvard, S., Persson, L. & Ungerstedt, U. (1989) Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, **9**, 607-616.

Holopainen, I., Louve, M., Enkvist, M.O.K. & Akerman, K.E.O. (1990) Coupling of glutamatergic receptors to changes in intracellular calcium in rat cerebellar granule cells in primary culture. *Journal of Neuroscience Research*, **25**, 187-193.

Honoré, T. & Lauridsen, J. (1982) The binding of [3H]AMPA, a structural analog of glutamic acid, to rat brain membranes. *Journal of Neurochemistry*, **38**, 173-178.

Hossmann, K.A. (1994) Glutamate mediated injury in focal cerebral ischemia: the excitotoxin hypothesis revised. *Brain pathology*, **4**, 23-36.

Johnson, J.W. & Ascher, P. (1987) Glycine potentiate the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, **325**, 529-531.

Johnston, M.V. (1993) Cellular alterations associated with perinatal asphyxia. *Clinical investigation in medicine*, **16:2**, 122-132.

Jones, K.A. & Baughman, R.V. (1991) Both NMDA and non NMDA subtypes of glutamate receptors are concentrated at synapses on cerebral cortical neurons in culture. *Neuron*, **7**, 593-603.

Kiesslig, M. & Gass, P. (1994) Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain pathology*, **4**, 77-83.

Koyama, Y., Ishibashi, T. & Baba, A. (1995) Increase in chloride-dependent L-glutamate transport activity in synaptic membrane after in vitro ischemic treatment. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 1798-1804.

Lee, K., Ito, A., Koshimura, K., Ohue, T., Takagi, Y. & Miwa, S. (1995) Differential effects of hypoxia on ligand binding properties of nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors on cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 874-882.

Lees, G.J. (1993) The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *Journal of Neurological Science*, **114**, 119-122.

Lindenboim, L., Pinkas-kramarski, R., Sokolovsky, M. & Stein, R. (1995) Activation of muscarinic receptors inhibits apoptosis in PC12M1 cells. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 2491-2499.

Littman, L., Glatt, B.S. & Robinson, M.B. (1993) Multiple subtypes of excitatory amino acid receptors coupled to the hydrolysis of phosphoinositides in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 586-593.

Lucas, D.R. & Newhouse, J.P. (1957) The toxic activity of sodium-L-glutamate on the inner layers of the retina. *Archiv Ophthalmology*, **58**, 193-201.

Lysko, P.G., Cox, J.A., Vigano, M.A. & Henneberry, R.C. (1989) Excitatory amino acid neurotoxicity at the NMDA receptor in cultured neurons: pharmacological characterisation. *Brain Research*, **499**, 258-266.

MacBain, C.J. & Mayer, M.L. (1994) NMDA receptor structure and function. *Physiological Reviews*, **74:3**, 723-760.

MacDonald, J.W. & Johnston, M.V. (1990) Physiologic and pathophysiologic roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Review*, **15**, 41-70.

Maier, C.M., Sun, G.H., Kunis, D.M., Giffard, R.G. & Steinberg, G.K. (1995) Neuroprotection by the NMDA receptor antagonist CGP 40116: in vivo and in vitro studies. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 652-659.

Maneuf, Y.P., Mitchell, I.J., Crossman, A.R., Woodruff, G.N. & Brotchie, J.M. (1995) Functional implications of kappa opiod receptor-mediated modulation of glutamate transmission in the output regions of the basal ganglia in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Brain Research*, **683**, 102-108.

Manzoni, O. & Bockaert, J. (1993) Nitric oxide synthase activity endogenously modulates NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 368-370.

Marcoux, F.W., Probert, A.W. & Weber, M.L. (1990) Hypoxic neuronal injury in tissue culture is associated with delayed calcium accumulation. *Stroke*, **3**, 71-74.

Marret, S., Mukendi, R., Gadisseux, J.F., Gressens, P. & Evrard, P. (1995) Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *Journal of Neuropathologie and Experimental Neurology*, **54**, 358-370.

Martin, D., Bustos, G.A., Bowe, M.A., Bray, S.D. & Nadler, J.V. (1991) Autoreceptor regulation of glutamate and aspartate release from slices of the hippocampal CA1 area. *Journal of Neurochemistry*, **56**, 1647-1655.

- Massieu, L., Morales-Villagran, A. & Tapia, R. (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 2262-2272.
- Mattson, M.P., Dou, P. & Kater, S.B. (1988) Outgrowth regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience*, **8**:6, 2087-2100.
- Mattson, M.P., Lovell, M.A., Furukawa, K. & Markesbery, W.R. (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular calcium concentration and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activity in hippocampal neurons. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 1740-1751.
- Mattson, M.P., Murrain, M., Guthrie, P.B. & Kater, S.B. (1989) Fibroblast growth factor and glutamate: opposing roles in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *The Journal of Neuroscience*, **9**, 3728-3740.
- Meier, E. (1988) *The role of aminoacid neurotransmitters in brain development*, Jonstrup, Copenhagen.
- Meldrum, B. & Garthwaite, J. (1990) Excitatory aminoacid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 54-62.
- Mena, E.E., Fagg, G.E. & Cotman, C.W. (1982) Chloride ions enhance L-glutamate binding to rat brain synaptic membranes. *Brain Research*, **243**, 378-381.
- Meyer, F.B. (1989) Calcium, neuronal hyperexcitability and ischemic injury. *Brain Research Review*, **14**, 227-243.
- Michaels, R.L. & Rothman, S.M. (1990) Glutamate neurotoxicity in vitro: antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *The Journal of Neuroscience*, **10**(1), 283-292.
- Mishra, O.P. & Delivoria-Papadopoulos, M. (1992) NMDA receptor modification in the fetal guinea pig brain during hypoxia. *Neurochemical Research*, **17**:12, 1211-1216.
- Mitani, A. & Kataoka, K. (1991) Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study. *Neuroscience*, **42**:3, 661-670.

- Mody, I. & MacDonald, J.F. (1995) NMDA receptor dependent excitotoxicity: the role of intracellular calcium release. *Trends in Pharmacological Sciences*, **16**, 356-359.
- Monahan, J.B. & Michel, J. (1987) Identification and characterisation of an NMDA specific L-(3H)Glutamate recognition site in synaptic plasma membranes. *Journal of Neurochemistry*, **48**, 1699-1708.
- Mori-Okamoto, J., Ikeda, Y. & Tatsuno, J. (1989) Characterization of excitatory amino acid receptors in cultured chick cerebellar neurons. *Neuroscience*, **28:2**, 413-422.
- Munell, F., Burke, R.E., Bandele, A. & Gubits, R.M. (1994) Localization of c-fos, c-jun, and hsp70 mRNA expression in brain after neonatal hypoxia-ischemia. *Developmental brain research*, **77**, 111-121.
- Murphy, D.E., Snowhill, E.W. & Williams, M. (1987) Characterization of quisqualate recognition sites in rat brain tissue using DL-(3H)a-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) and a filtration assay. *Neurochemical Research*, **12:7**, 775-782.
- Myers, K.M., Fiskum, G., Liu, Y., Simmens, S.J., Bredesen, D.E. & Murphy, A.N. (1995) Bcl-2 protects neural cells from cyanide/aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 2432-2440.
- Nabetani, M., Okada, Y., Kawai, S. & Nakamura, H. (1995) Neural activity and the levels of high energy phosphates during deprivation of oxygen and/or glucose in hippocampal slices of immature and adult rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **13:1**, 3-12.
- Nadler, J.V., Wang, A. & Werling, L.L. (1985) Binding sites for L-(3H) glutamate on hippocampal synaptic membranes: three populations differentially affected by chloride and calcium ions. *Journal of Neurochemistry*, **44**, 1791-1798.
- Newell, D.W., Malouf, A.T. & Franck, J.E. (1990) Glutamate mediated selective vulnerability to ischemia is present in organotypic cultures of hippocampus. *Neuroscience Letters*, **116**, 325-330.
- Northington, F.J., Tobin, J.R., Koehler, R.C. & Traystman, R.J. (1995) In vivo production of nitric oxide correlates with NMDA-induced cerebral hyperemia in newborn sheep. *American Journal of Physiology*, **269**, 215-221.

O'Neill, C.M., Ball, S.G. & Vaughan, P.F.T. (1994) Effects of ischaemic conditions on uptake of glutamate, aspartate, and noradrenaline by cell lines derived from the human nervous system. *Journal of Neurochemistry*, **63**, 603-611.

Obrenovitch, T.P., Urenjak, J., Richards, D.A., Ueda, Y., Curzon, G. & Symon, L. (1993) Extracellular neuroactive amino acids in the rat striatum during ischemia: comparison between penumbral conditions and ischemia with sustained anoxic depolarisation. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 178-186.

Ogata, T., Nakamura, Y., Tsuji, K., Shibata, T. & Kataoka, K. (1995) A possible mechanism for the hypoxia-hypoglycemia-induced release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes. *Neurochemical Research*, **20:6**, 737-743.

Oillet, J., Koziel, V., Vert, P. & Daval, J.L. (1995) Influence of post-hypoxia reoxygenation conditions on energy metabolism and superoxide production in cultured neurons from the rat forebrain. *Pediatric research*, (In Press)

Oillet, J., Nicolas, F., Koziel, V. & Daval, J.L. (1995) Analysis of glutamate receptors in primary cultured neurons from fetal rat forebrain. *Neurochemical Research*, **20:6**, 761-768.

Orrenius, S., MacConkey, D.J., Bellomo, G. & Nicotera, P. (1989) Role of calcium in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*, **10**, 281-285.

Paschen, W. & Djuricic, B. (1995) Comparison of in vitro ischemia-induced disturbance in energy metabolism and protein synthesis in the hippocampus of rats and gerbils. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 1692-1697.

Patel, A.J., Sanfeliu, C. & Hunt, A. (1990) Development and regulation of excitatory amino acids receptors involved in the release of arachidonic acid in cultured hippocampal neural cells. *Developmental brain research*, **57**, 55-62.

Pellegrini-Giampietro, D.E., Bennett, M.V.L. & Zukin, R.S. (1992) Are calcium permeable kainate/AMPA receptors more abundant in immature brain ? *Neuroscience Letters*, **144**, 65-69.

Pellegrini-Giampietro, D.E., Cherici, G., Alesiani, A., Carla, V. & Moroni, F. (1990) Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia induced neuronal damage. *The Journal of Neuroscience*, **10:3**, 1035-1041.

Peterson, C.L., Thompson, M.A., Martin, D. & Nadler, J.V. (1995) Modulation of aspartate and glutamate release from slices of hippocampal area CA1 by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 1152-1160.

Pontonnier, G. & Grandjean, H. (1985) L'asphyxie foetale. *Médecine néonatale* (ed. by P. Vert and L. Stern), p.127. Masson,

Pulsinelli, W.A. (1985) Deafferentation of the hippocampus protects CA1 pyramidal neurons against ischemic injury. *Stroke*, **16**, 144-152.

Qi, Y., Jamindar, T.M. & Dawson, G. (1995) Hypoxia alters iron homeostasis and induces ferritin synthesis in oligodendrocytes. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 2458-2464.

Rajdev, S. & Reynolds, I.J. (1994) Glutamate induced intracellular calcium changes and neurotoxicity in cortical neurons in vitro: effect of chemical ischemia. *Neuroscience*, **62:3**, 667-679.

Ramakers, G.J.A., Wit, C.d., Wolters, P.S. & Corner, M.A. (1993) A developmental decrease in NMDA mediated spontaneous firing in cultured rat cerebral cortex. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **11:1**, 25-32.

Ratan, R.R., Murphy, T.H. & Baraban, J.M. (1994) Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, **62**, 376-379.

Reynolds, I.J. & Hastings, T.G. (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *The Journal of Neuroscience*, **15:5**, 3318-3327.

Reynolds, I.J., Murphy, S.N. & Miller, R.J. (1987) 3H labeled MK-801 binding to the excitatory amino acid complex from rat brain is enhanced by glycine. *Proc Natl Acad Sci USA*, **84**, 7744-7748.

Rice, J.E., Vannucci, R.C. & Brierley, J.B. (1981) The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann neurol*, **9**, 131-141.

Robert, V., Ayoub, S. & Bergson, G. (1991) Effects of hydroxyl radicals on ATPase and protein structure of myofibrils from rat hearts. *American Journal of Physiology*, **261**, 1785-1790.

Robinson, M.B., Djali, S. & Buchhalter, J.R. (1993) Inhibition of glutamate uptake with L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate potentiate glutamate toxicity in primary hippocampal cultures. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 2099-2103.

Rosenberg, M.E. & Paller, M.S. (1991) Differential gene expression in the recovery of ischemia renal injury. *Kidney International*, **39**, 1156-1161.

Rosenberg, P.A., Amin, S. & Leitner, M. (1992) Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *The Journal of Neuroscience*, **12**(1), 56-61.

Rothman, S.M. (1983) Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science*, **220**, 536-537.

Rothman, S.M. & Olney, J.W. (1986) Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann neurol*, **19**, 105-111.

Rothman, S.M. & Olney, J.W. (1987) Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends in Neurosciences*, **10**:7, 299-302.

Sakamono, A., Ohinishi, S.T. & Ogawa, R. (1991) Relationship between free radical production and lipid peroxydation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Research*, **554**, 186-192.

Sanchez-Prieto, J. & Gonzalez, P. (1988) Occurrence of a large Ca^{2+} -independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes). *Journal of Neurochemistry*, **50**, 1322-1324.

Schoepp, D., Bockaert, J. & Sladeczek, F. (1990) Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **11**, 508-515.

Schoepp, D.D. & Conn, P.J. (1993) Metabotropic glutamate receptor in brain function and pathology. *Trends in Pharmacological Sciences*, **14**, 13-20.

Schurr, A., Payne, R.S. & Rigor, B.M. (1995) Protection by MK-801 against hypoxia-, excitotoxin-, and depolarisation-induced neuronal damage in vitro. *Neurochem Int*, **26:5**, 519-525.

Schwartz, R.D., Yu, X., Katzman, M.R., Hayden-Hixson, D.M. & Perry, J.M. (1995) Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum. *The Journal of Neuroscience*, **15**, 529-539.

Sher, P.K. & Hu, S. (1990) Increased glutamate uptake and glutamine synthetase activity in neuronal cell cultures surviving chronic hypoxia. *Glia*, **3**, 350-357.

Shimada, N., Graf, R., Rosner, G. & Heiss, W.D. (1993) Ischemia induced accumulation of extracellular aminoacids in cerebral cortex, white matter, and cerebrospinal fluid. *Journal of Neurochemistry*, **60**, 66-71.

Siesjö, B.K., Bendek, G., Koide, T., Westerberg, E. & Wieloch, T. (1985) Influence of acidosis on lipid peroxidation in brain tissues in vitro. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, **5**, 253-258.

Siesjö, B.K. & Bengtsson, F. (1989) Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: an unifying hypothesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, **9**, 127-140.

Siesjö, B.K., Memezawa, H. & Smith, M.L. (1991) Neurocytotoxicity: pharmacological implications. *Fundamental clinical pharmacology*, **5**, 755-767.

Simpson, P.B., Challis, R.A.J. & Nahorski, S.R. (1993) Involvement of intracellular stores in the calcium responses to NMDA and depolarisation in cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, **61**, 760-763.

Sladeczek, F., Recasens, M. & Bockaert, J. (1988) A new mechanism for glutamate receptor action: phosphoinositide hydrolysis. *Trends in Neurosciences*, **11:12**, 545-549.

Slotkin, T.A., Cowdery, T.S., Orband, L., Pachman, S. & Whitmore, W.L. (1986) Effects of neonatal hypoxia on brain development in the rat: immediate and long term biochemical alterations in discrete regions. *Brain Research*, **374**, 63-74.

Sochocka, E., Juurlink, B.H.J., Code, W.E., Hertz, V., Peng, L. & Hertz, L. (1994) Cell death of primary cultures of mouse neurons and astrocytes during exposure to and recovery from hypoxia, substrate deprivation and simulated ischemia. *Brain Research*, **638**, 21-28.

Takahashi, M., Liou, S.Y. & Kuniyara, M. (1995) Calcium- and chloride-dependent, NMDA receptor mediated neuronal death induced by depolarization in rat hippocampal organotypic cultures. *Brain Research*, **675**, 249-256.

Takata, T. & Okada, Y. (1995) Effects of deprivation of oxygen or glucose on the neural activity in the guinea pig hippocampal slice-intracellular recording study of pyramidal neurons. *Brain Research*, **683**, 109-116.

Trombley, P.Q. & Westbrook, G.L. (1992) L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor. *The Journal of Neuroscience*, **12**:6, 2043-2050.

Uchiyama-Tsuyuki, Y., Araki, H. & Otomo, S. (1995) Depolarization and hypoxia-induced cell damage in serum-free cultures of the rat cortex, and related extracellular glutamate changes. *European Journal of Pharmacology*, **293**, 245-250.

Uemura, Y., Kowall, N.W. & Beal, M.F. (1991) Global ischemia induces NMDA receptor-mediated c-fos expression in neurons resistant to injury in gerbil hippocampus. *Brain Research*, **542**, 343-347.

Uto, A., Dux, E. & Hossmann, K.A. (1994) Effect of serum on intracellular calcium homeostasis and survival of primary cortical and hippocampal CA1 neurons following brief glutamate treatment. *Metabolic Brain Disease*, **9**, 333-345.

Uto, A., Dux, E., Kusumoto, M. & Hossmann, K.A. (1995) Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 2185-2192.

Vierck, C.J. & Meier, G.W. (1963) Effects of prenatal hypoxia upon locomotor activity of the mouse. *Experimental Neurology*, **7**, 418-425.

Volpe, J.J. (1995) *Neurology of the newborn chap.6-9: Hypoxic-ischemic encephalopathy*, pp. 211-369. W.B.Saunders company, Philadelphia.

Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S. & Racagni, G. (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *The Journal of Neuroscience*, **14**:5, 2924-2932.

Vornov, J.J. (1995) Toxic NMDA receptor activation occurs during recovery in a tissue culture model of ischemia. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 1681-1691.

Wahl, F., Obrenovitch, T.P., Hardy, A.M., Plotkine, M., Boulu, R. & Symon, L. (1994) Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency. *Journal of Neurochemistry*, **63**, 1003-1011.

Wahl, P., Honore, T., Drejer, J. & Schousboe, A. (1991) Development of binding sites for excitatory amino acids in cultured cerebral cortex neurons. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **9**:3, 287-296.

Watkins, J.C. & Olverman, H.J. (1987) Agonists and antagonists for excitatory aminoacid receptors. *Trends in Neurosciences*, **10**:7, 265-272.

Waxman, S.G., Ransom, B.R. & Stys, P.K. (1991) Non-synaptic mechanisms of calcium-mediated injury in CNS white matter. *Trends in Neurosciences*, **14**, 461-468.

Wigglesworth, J.S. (1964) Experimental growth retardation in the foetal rat. *J Path Bact*, **88**, 1-33.

Williams, R.J., Murphy, N., Glowinski, J. & Prémont, J. (1995) Glucose regulates glutamate evoked arachidonic acid release from cultured striatal neurons. *Journal of Neurochemistry*, **65**, 241-249.

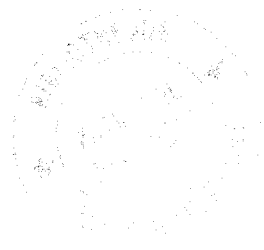
Winder, D.G. & Conn, P.J. (1995) Metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated potentiation of cyclic AMP responses does not require phosphoinositide hydrolysis: mediation by a group II-like mGluR. *Journal of Neurochemistry*, **64**, 592-599.

Wisden, W. & Seeburg, P.H. (1993) Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Current opinion in neurobiology*, **3**, 291-298.

Yavin, E. & Yavin, Z. (1974) Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine coated surface. *The journal of cell biology*, **62**, 540-546.

Young, A.M.J. & Bradford, H.F. (1991) NMDA releases excitatory amino acids in rat corpus striatum in vivo. *Journal of Neurochemistry*, **56**, 1677-1683.

Zorumski, C.F. & Olney, J.W. (1993) Excitotoxic neuronal damage and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Therapeutic*, **59**, 145-162.



Nom, Prénom : O I L L E T Jean

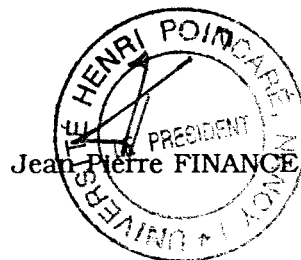
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 23 FÉV 1997 n° 105

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



Résumé:

Il est établi que le cerveau du nouveau-né résiste mieux à une privation en oxygène que celui de l'adulte. Cependant, l'encéphalopathie hypoxique/ischémique demeure une cause majeure de morbidité périnatale. Les événements conduisant à la mort retardée des neurones soumis à une privation d'oxygène ont été étudiés sur l'animal entier dans des modèles *in vivo*, mais les mécanismes impliqués demeurent hypothétiques. La perturbation du métabolisme énergétique pendant l'hypoxie/ischémie serait à l'origine d'une dérégulation des fonctions cellulaires, aboutissant à la perte de l'homéostasie ionique, une surcharge cellulaire en calcium précédant la mort neuronale retardée et une accumulation extracellulaire de glutamate. L'activation des récepteurs des acides aminés excitateurs participerait à l'influx calcique et provoquerait l'activation de systèmes enzymatiques aux effets délétères. Par ailleurs, des événements se produisant pendant la période de réoxygénation pourraient également être impliqués dans la survenue des dommages, avec en particulier une production accrue de radicaux libres dérivés de l'oxygène.

Afin d'étudier les effets de l'hypoxie/réoxygénation au niveau cellulaire, il a été mis au point au laboratoire un modèle *in vitro* de neurones centraux de rat en culture. En vue de mesurer la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène par les cellules, nous avons développé une méthode spectrophotométrique pour détecter et quantifier le radical anion superoxyde dans le milieu de culture, en mesurant la réduction spécifique de l'acétylcytochrome c. Cette technique a été appliquée à l'hypoxie pour montrer l'évolution des taux de radicaux libres à l'issue de l'hypoxie et au cours de la phase de réoxygénation, et pour analyser l'impact de l'hypoxie sur le métabolisme énergétique et la production de radicaux libres en relation avec les conditions de réoxygénation.

Afin d'évaluer la possibilité d'un mécanisme excitotoxique de l'hypoxie, nous avons étudié l'expression des récepteurs des acides aminés excitateurs par l'analyse de la liaison du glutamate et son déplacement par les agonistes spécifiques des différentes classes de récepteurs du glutamate: NMDA, AMPA, kainate et métabotropes. Nous avons ensuite analysé la sensibilité des neurones en culture au glutamate et à ses analogues en relation avec le degré de maturité des cellules.

Ces travaux montrent que les neurones expriment les différentes classes de récepteurs du glutamate après 6 jours en culture et que l'activation de ces récepteurs par le glutamate dépolarise les cellules. A ce stade, l'hypoxie provoque une mort neuronale retardée corrélée à une production accrue du radical superoxyde et à une altération du métabolisme énergétique, mais ne semble pas impliquer un mécanisme excitotoxique. En effet, les neurones après 6 jours en culture sont encore immatures et résistent à l'action de doses toxiques du glutamate, alors qu'après 13 jours le glutamate provoque une neurodégénérescence retardée principalement en activant le récepteur NMDA. Ainsi, les effets délétères de l'hypoxie pourraient être médiés par différents mécanismes selon le degré de maturité du neurone.