



**HAL**  
open science

# Caractérisation phénotypique et fonctionnelle de l'activation astrocytaire induite par transfert lentiviral du CNTF in vivo: Implications pour la survie neuronale

Carole Escartin

## ► To cite this version:

Carole Escartin. Caractérisation phénotypique et fonctionnelle de l'activation astrocytaire induite par transfert lentiviral du CNTF in vivo: Implications pour la survie neuronale. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00433114

**HAL Id: tel-00433114**

**<https://theses.hal.science/tel-00433114>**

Submitted on 18 Nov 2009

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

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

**UNIVERSITE PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE**

**ECOLE DOCTORALE CERVEAU COGNITION COMPORTEMENT**

**THESE DE DOCTORAT**  
**Neurosciences**

Soutenue publiquement le 20 janvier 2006 par

**Carole ESCARTIN**

**Caractérisation phénotypique et fonctionnelle de  
l'activation astrocytaire induite  
par transfert lentiviral du CNTF *in vivo*:  
Implications pour la survie neuronale**

Thèse co-dirigée par les Drs. Gilles Bonvento et Philippe Hantraye

**Composition du jury**

Président	Pr. Jean Mariani	<i>CNRS/UPMC, Paris</i>
Rapporteurs	Dr. Luc Pellerin	<i>Institut de Physiologie, Lausanne</i>
	Dr. Franck Pfrieder	<i>CNRS/Max Planck, Strasbourg</i>
Examineurs	Dr. Lydia Kerkérian-Le Goff	<i>CNRS/Université Aix-Marseille II</i>
	Dr. Marc Peschanski	<i>INSERM/Généthon, Evry</i>
Co-Directeur de thèse	Dr. Gilles Bonvento	<i>CEA CNRS/Orsay</i>

## Résumé

Les astrocytes participent activement au fonctionnement cérébral. Ils réalisent des échanges métaboliques et trophiques avec les neurones et exercent un contrôle sur l'entrée des substrats énergétiques dans le parenchyme cérébral. Ils sont aussi responsables -par le biais de leurs transporteurs GLAST et GLT-1- de la recapture et du recyclage du glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur qui a aussi un potentiel neurotoxique.

Les astrocytes répondent à des situations pathologiques variées en devenant réactifs. Ils apparaissent hypertrophiques et surexpriment certaines protéines comme les filaments intermédiaires. Bien que cette modification du phénotype astrocytaire soit connue depuis longtemps, ses conséquences fonctionnelles sont toujours débattues. S'agit-il d'un mécanisme de protection et d'adaptation à des conditions pathologiques ou, au contraire, d'un processus délétère participant à la dégénérescence neuronale ?

Nous avons développé un modèle *in vivo* d'activation astrocytaire en utilisant un lentivirus (lenti-CNTF) pour induire une surexpression dans le striatum de rat du Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), un activateur endogène des astrocytes. Grâce à ce modèle d'activation stable et reproductible des astrocytes, nous avons pu mettre en évidence des modifications profondes du métabolisme énergétique cérébral avec une augmentation de l'utilisation des corps cétoniques au dépend du glucose. Par ailleurs, l'activation astrocytaire par le CNTF induit de nombreux changements dans la machinerie de recapture du glutamate. Les transporteurs astrocytaires sont hyperglycosylés et sont enrichis dans les microdomaines membranaires rafts. En conditions excitotoxiques, la gestion du glutamate, l'apport énergétique et la survie neuronale sont significativement améliorés dans le groupe lenti-CNTF.

Ces résultats soulignent le rôle bénéfique des astrocytes activés qui présentent un phénotype et un fonctionnement favorables à la survie des neurones. Cette étude permet à la fois de mieux cerner le rôle et l'intérêt de la réponse astrocytaire dans les processus pathologiques et également de caractériser les effets du CNTF, qui est un candidat thérapeutique pour différentes maladies neurodégénératives.

**Mots clés :** *Astrocytes réactifs, CNTF, Métabolisme énergétique cérébral, Corps cétoniques, Glutamate, Transporteurs au glutamate, Glycosylation, Rafts, Excitotoxicité, Neuroprotection.*

## Abstract

Astrocytes play an active role in brain function. They provide metabolic and trophic support to neurons and control the entry of metabolites inside brain parenchyma. Through their glutamate transporters GLAST and GLT-1, astrocytes are also responsible of the uptake and recycling of glutamate, the main excitatory neurotransmitter but also a potential neurotoxic agent.

Astrocytes become activated in response to various pathological situations. This brain hallmark has been known for a long time, however, its functional consequences are still a matter of debate. Does activation of astrocytes represent a protective and adaptive mechanism to face deleterious conditions or does it play a role in neuronal degeneration?

We have developed an *in vivo* model of astrocytic activation in the rat striatum through lentiviral gene transfer of Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), an endogenous activator of astrocytes. Using this stable and reproducible model of astrocytes activation, we observed marked alterations in brain energy metabolism, with a shift from glycolysis to the ketone bodies pathway. In addition, CNTF activation of astrocytes induced several changes in glutamate uptake machinery. Astroglial transporters were highly glycosylated and redistributed into raft microdomains. During an excitotoxic process, glutamate handling, energetic supply and neuronal survival were significantly improved.

These results underline the beneficial role of activated astrocytes that have a prosurvival phenotype and function towards neurons. This study gives new clues (1) to delineate the role and the interest of activated astrocytes in pathological processes and (2) to characterize the effects of CNTF, which is a therapeutic candidate for several neurodegenerative diseases.

**Key words :** *Reactive astrocytes, CNTF, Brain energy metabolism, Ketone bodies, Glutamate, Glutamate transporters, Glycosylation, Rafts, Excitotoxicity, Neuroprotection*

## Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement les nombreuses personnes qui m'ont aidée ou que j'ai côtoyées au cours de ma thèse.

Tout d'abord, Gilles, merci pour tout un tas de choses : merci pour tout le temps et l'énergie que tu as dépensés sans compter et pour ta motivation tout au long de ma thèse. J'ai beaucoup apprécié ces nombreuses heures de manips, discussions scientifiques et autres conversations en tous genres. Grâce à toi, j'ai pu orienter ma thèse dans une direction qui m'a passionnée, tu m'as sans aucun doute ralliée au clan des astrophiles !

Philippe, merci de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire en me donnant énormément de libertés dans la conduite de mon projet de thèse. Je te remercie de m'avoir toujours encouragée, accordé ta confiance et d'avoir fait le maximum pour me permettre de réaliser mes expériences dans les meilleures conditions.

Emmanuel, merci pour ton enthousiasme, ta générosité, ton soutien et ta boîte à idées scientifiques et techniques intarissable. Merci d'avoir si souvent mis la 'main à la pâte' pour mes manips. Je n'oublierai pas ces journées entières passées en P3 et tes leçons de citations latines !

Nicole, d'abord merci pour tes virus de compétition, mais pas seulement. Je te remercie de toute l'attention et l'intérêt que tu as portés à ce projet et de m'avoir permis de participer à l'écriture d'un chapitre de revue avec toi.

Merci à Albertine et Thierry de m'avoir fait entrer dans la 3<sup>ème</sup> dimension. Je vous remercie de votre patience et de votre inventivité à toute épreuve pour les reconstructions et l'analyse 3D de mes données.

Merci à mes deux stagiaires Audrey et Anna pour avoir partagé avec beaucoup d'enthousiasme les moments 'd'angoisse et de joie' qui font le quotidien du thésard.

Merci aux membres de l'URA 2210, en particulier Carine et Yaël pour leur aide précieuse et leur soutien infaillible, Martine pour ses soins attentionnés envers les quelques rongeurs qui sont passés entre mes mains. Merci à Gweltas pour son aide lors de l'expérience des synaptosomes. Merci aux secrétaires Bérangère et Patricia pour leur efficacité et leur gentillesse. Merci à Béchir, Albertine, Etienne, Caroline, Fanny, Hirc, Noëlle, Sandro, Nicolas, Isabelle, Anne-Sophie, Laurent, Aïcha, Raymonde, Ken, Jean-Michel, Françoise et les autres, c'était très agréable de travailler à vos côtés...  
○○○

Je tiens à remercier également les différentes personnes avec qui j'ai collaboré au cours de ma thèse.

Marc Peschanski qui nous a ouvert les portes du P3 de l'IM3 de Créteil, Christiane Fages, Elisabeth Marcos et Sandrine Machane qui m'ont offert une aide logistique précieuse pour les expériences d'infection avec les lentivirus.

Claire Smadja, Tui Tran et Myriam Taverna à Châtenay-Malabry, qui m'ont généreusement accueillie et beaucoup aidée pour les expériences d'HPLC. Merci à Ayat Abbood, pour sa gentillesse, sa motivation et son aide lors des dernières expériences d'HPLC.

Graham Knott qui a obtenu les magnifiques images en microscopie électronique, Jean-Yves Thuret qui m'a formée à l'utilisation du microscope confocal.

Marie-Claude Gaillard et Jean-Marc Elalouf qui m'ont initiée à la technique de RT-PCR.

Karin Pierre qui a réalisé les premiers marquages immunohistologiques des MCT et Luc Pellerin qui m'a accueillie pour entreprendre des manips pilotes *in vitro* et nous a fréquemment conseillés au cours du projet. J'espère que la poursuite du projet à Lausanne sera fructueuse.  
○○○

Enfin, je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit et de participer à ma soutenance de thèse, et tout particulièrement mes rapporteurs Luc Pellerin et Franck Pfrieger.



I. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	9
II. INTRODUCTION .....	12
A. Les astrocytes ont un rôle actif et primordial dans le fonctionnement cérébral .....	12
1. Les astrocytes .....	12
a. Les astrocytes : de la glue pour les neurones ? .....	12
b. Quelques particularités anatomiques des astrocytes .....	12
2. Les astrocytes interagissent avec les neurones .....	14
a. Homéostasie ionique .....	14
b. Recapture des neurotransmetteurs .....	16
c. Régulation de la synaptogenèse.....	16
d. Régulation des espèces réactives oxydantes (ROS).....	16
e. Formation de la barrière hématoencéphalique (BHE) .....	17
f. Support trophique.....	17
3. Des fonctions 'révolutionnaires' pour les astrocytes.....	19
a. Les astrocytes participent à la neurogénèse .....	19
b. Les astrocytes modulent activement la neurotransmission .....	19
B. Les astrocytes deviennent activés en réponse à différentes atteintes cérébrales.....	21
1. Quelques caractéristiques de la réaction gliale .....	21
2. Les cascades moléculaires impliquées dans l'activation des astrocytes.....	23
3. L'activation astrocytaire : délétère ou bénéfique ? .....	24
a. Les astrocytes réactifs peuvent former une cicatrice gliale .....	25
b. Les astrocytes réactifs libèrent des molécules bénéfiques pour les neurones : facteurs neurotrophiques et molécules antioxydantes .....	26
c. Les astrocytes réactifs produisent des cytokines et peuvent participer à l'inflammation et à la réponse immunitaire .....	26
d. D'autres caractéristiques des astrocytes réactifs.....	27
C. Le CNTF : un facteur neurotrophique activateur des astrocytes .....	29
1. Le CNTF : découverte et caractéristiques .....	29
a. Identification du CNTF .....	29
b. Profil d'expression du CNTF.....	29
c. La voie de signalisation du CNTF .....	30
d. Les expériences de knock-out: un autre ligand endogène pour le CNTFR- $\alpha$ ? .....	32
2. Le CNTF : activateur endogène des astrocytes .....	32
3. Le CNTF a des effets neuroprotecteurs variés.....	33
a. Le CNTF et les motoneurones : implication pour la SLA.....	34
b. Le CNTF et les neurones du striatum : implication pour la MH .....	35
c. Autres cibles neuronales pour le CNTF .....	35
4. Les autres effets du CNTF .....	36
a. Le CNTF et les autres cellules gliales : cellules myélinisantes et microglie.....	36
b. Le CNTF et la différenciation cellulaire.....	36
c. Le CNTF dans l'hypothalamus : des effets proches de ceux de la leptine.....	37
d. Les effets périphériques du CNTF.....	37
D. Le métabolisme énergétique cérébral.....	38
1. Quelques particularités du métabolisme énergétique cérébral.....	38
a. Des besoins énergétiques très importants .....	38
b. Le glycogène : une réserve énergétique limitée .....	38
c. Le cerveau utilise le glucose comme substrat énergétique quasi-obligatoire .....	39
2. Les corps cétoniques peuvent constituer des substrats énergétiques alternatifs.....	41
a. Les corps cétoniques et la cétogenèse .....	41
- description de la cétogenèse .....	41
- régulation de la cétogenèse.....	43
b. Les voies de dégradation des corps cétoniques.....	43
- voie cytoplasmique .....	43
- voie d'oxydation mitochondriale.....	43
c. Mise en évidence de l'utilisation des corps cétoniques par le cerveau .....	44
- utilisation des corps cétoniques chez l'adulte .....	44
- utilisation des corps cétoniques au cours du développement.....	44
d. Régulation de l'utilisation cérébrale des CC .....	44
- régulation de l'entrée des CC dans le parenchyme cérébral .....	45
- régulation des enzymes de la voie de cétolyse .....	45
3. Les astrocytes au cœur des régulations métaboliques cérébrales.....	46
a. couplage neuro-métabolique .....	47
b. couplage neuro-vasculaire .....	49
c. couplage neuro-barrière .....	50

4. Déficits métaboliques et pathologies .....	50
a. Atteinte énergétique aigue : conditions ischémiques .....	50
b. Atteinte énergétique chronique : les maladies neurodégénératives .....	51
E. Le glutamate et les transporteurs au glutamate .....	54
1. Le glutamate .....	54
a. Le glutamate est un intermédiaire métabolique .....	54
b. Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur .....	54
2. Les transporteurs au glutamate .....	56
a. La famille des transporteurs au glutamate .....	56
b. Fonctionnement des transporteurs au glutamate .....	59
c. Structure des transporteurs au glutamate .....	59
- topologie des transporteurs .....	59
- les glycosylations des transporteurs .....	60
d. Localisation subcellulaire des transporteurs au glutamate .....	61
- les transporteurs ne sont pas répartis uniformément dans les cellules .....	61
- les transporteurs sont enrichis dans des microdomaines membranaires : les rafts .....	61
e. Les mécanismes de régulation de la recapture de glutamate .....	63
- régulation du niveau d'expression des transporteurs .....	63
- régulation post-transcriptionnelle de l'activité des transporteurs .....	64
- régulation par des interactions protéiques .....	64
- régulation de la localisation subcellulaire des transporteurs .....	65
3. Glutamate et phénomènes d'excitotoxicité .....	65
a. L'excitotoxicité .....	65
b. Excitotoxicité et transporteurs au glutamate dans les pathologies cérébrales .....	68
- L'AVC .....	69
- la SLA .....	69
- La MH .....	70
c. Un modèle d'excitotoxicité : l'injection intrastriale d'acide quinolinique (QA) .....	71
- découvertes et caractéristiques du QA .....	71
- mécanismes d'action du QA .....	72
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	74
A. Production des lentivirus .....	74
B. Injections stéréotaxiques .....	75
1. Injection des lentivirus .....	75
2. Injection intrastriale de quinolinate .....	77
C. RT- PCR en temps réel .....	77
1. Purification des ARNm .....	77
2. Reverse transcription .....	77
3. PCR en temps réel .....	78
D. Immunohistologie .....	79
1. Obtention des coupes .....	79
2. Protocole d'immunohistochimie par détection au VIP .....	79
3. Protocole d'immunofluorescence .....	80
E. Histochimie .....	81
1. Histochimie de la $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH) .....	81
2. Histochimie de la cytochrome oxydase (COX) .....	81
3. Histochimie de la succinate déshydrogénase (SDH) .....	82
4. Histochimie de la lactate déshydrogénase (LDH) .....	82
F. Analyse des coupes .....	82
1. Etude en microscopie confocale .....	82
2. Quantification de volume .....	82
3. Mesure de densité optique (D.O.) .....	83
G. Immunoblots .....	83
1. Préparation des homogénats de cerveaux .....	83
2. Electrophorèse, transfert et immunoblot .....	84
3. Déglycosylation in vitro .....	84
H. Microscopie électronique .....	84
I. Purification des rafts .....	85
J. Mesure de la recapture de [ $^3$ H]-D-Aspartate par les synaptosomes .....	87
1. Préparation des synaptosomes .....	87
2. Mesure de la recapture d'aspartate tritié .....	87
K. Microdialyse et dosage du glutamate par chromatographie liquide à haute performance .....	88
1. Microdialyse .....	88
2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC) .....	89

L. Mesure autoradiographique de la consommation cérébrale de 2-[ <sup>18</sup> F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG).....	91
1. Consommation de FDG en conditions basales .....	92
2. Consommation de FDG après une atteinte excitotoxique par le QA .....	92
3. Analyse des autoradiogrammes.....	92
M. Mesure autoradiographique de la consommation cérébrale de [ <sup>14</sup> C]-3-hydroxybutyrate.....	93
1. Protocole .....	93
2. Reconstruction en 3 dimensions (3D) .....	94
3. Analyse .....	94
N. Analyse statistique .....	95
IV. RÉSULTATS.....	98
A. Caractérisation du modèle d'activation astrocytaire par le CNTF après infection lentivirale ...	98
1. L'infection par les lentivirus permet une expression importante, stable et étendue du transgène dans la striatum de rat .....	98
a. Absence de toxicité du lentivirus .....	98
b. Localisation des cellules infectées et diffusion de la protéine transgénique.....	100
c. Stabilité de l'expression du transgène dans le temps.....	101
d. Optimisation du modèle d'activation astrocytaire par le CNTF .....	103
2. Le CNTF active spécifiquement les astrocytes .....	104
a. Le CNTF induit un phénotype astrocytaire immature sans prolifération .....	104
b. Le CNTF n'a pas d'effet détectable sur les neurones.....	108
c. La surexpression du CNTF conduit à l'activation stable de la voie JAK-STAT .....	110
B. L'activation des astrocytes est associée à une modification de la régulation du métabolisme énergétique .....	111
1. L'activation des astrocytes est associée à une diminution de la consommation basale de glucose ..	111
2. L'activation des astrocytes par le CNTF ne produit pas d'hypométabolisme oxydatif généralisé dans le striatum .....	112
a. La succinate déshydrogénase (SDH) : une enzyme du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative .....	113
b. La cytochrome oxydase (COX) : une enzyme terminale de la phosphorylation oxydative .....	113
3. Les astrocytes activés sont capables d'utiliser la voie des corps cétoniques.....	114
a. Les astrocytes activés présentent une forte activité BDH.....	115
b. Le transporteur aux monocarboxylates MCT-1 est surexprimé dans le groupe lenti-CNTF .....	117
c. L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) n'est pas augmentée .....	117
d. L'activation des astrocytes est associée à une augmentation de la consommation du BHB.....	119
C. L'activation des astrocytes est associée à un changement dans la régulation de l'homéostasie glutamatergique .....	121
1. Les astrocytes activés expriment une forme hyperglycosylée des transporteurs au glutamate.....	121
2. L'hyperglycosylation des transporteurs n'altère pas leur localisation à la membrane ni l'affinité pour leur substrat .....	123
3. Les transporteurs au glutamate sont re-localisés dans les rafts des astrocytes activés.....	123
4. L'activation des astrocytes est associée à une meilleure gestion du glutamate in vivo.....	126
5. L'activation des astrocytes est associée à une consommation accrue de glucose lors d'un stress excitotoxique .....	128
D. Les modifications du fonctionnement astrocytaire sont associées à de forts effets neuroprotecteurs.....	130
V. DISCUSSION.....	133
A. Intérêts et limites du modèle d'activation astrocytaire par transfert lentiviral de CNTF.....	133
1. L'utilisation des vecteurs lentiviraux .....	133
2. L'utilisation du CNTF .....	136
B. Le métabolisme énergétique est profondément modifié lorsque les astrocytes sont activés par le CNTF.....	137
1. L'activation des astrocytes est associée à des modifications de plusieurs voies métaboliques .....	137
a. Les astrocytes activés par le CNTF sont capables d'utiliser les CC.....	137
b. Le CNTF induit une baisse de l'utilisation striatale de glucose.....	140
2. Quels sont les intérêts potentiels à l'utilisation des corps cétoniques ? .....	142
a. Une voie de production d'énergie alternative .....	142
b. Une voie de production d'énergie efficace.....	142
c. Une voie de production d'énergie à potentiel neuroprotecteur .....	143
C. Le système de régulation du glutamate est plus performant avec le CNTF : rôle des astrocytes activés .....	145

1. Mise en évidence de nouveaux mécanismes de régulation des transporteurs au glutamate in vivo.....	145
a. Hyperglycosylation des transporteurs : mécanismes et conséquences.....	145
- les transporteurs au glutamate des astrocytes activés par le CNTF sont hyperglycosylés .....	145
- mécanismes impliqués dans l'hyperglycosylation des transporteurs.....	147
- conséquences potentielles de l'hyperglycosylation des transporteurs.....	147
b. Localisation préférentielle dans les rafts : mécanismes et conséquences.....	148
- les transporteurs sont plus enrichis dans les rafts des astrocytes activés par le CNTF .....	148
- mécanismes impliqués dans le recrutement des transporteurs dans les rafts.....	148
- conséquences potentielles du recrutement des transporteurs dans les rafts .....	151
- et si les rafts n'existaient pas ?.....	153
2. L'activation des astrocytes est associée à une meilleure gestion du glutamate extracellulaire lors d'un stress excitotoxique in vivo.....	154
a. Les effets primaires du QA sur les neurones sont-ils modifiés en présence de CNTF ?.....	154
b. La libération de glutamate induite par le QA est-elle moins importante en présence de CNTF ? .....	154
c. Mécanismes impliqués dans l'amélioration de la recapture du glutamate .....	156
D. L'activation astrocytaire : une réponse adaptée pour protéger les neurones ?.....	158
1. La controverse autour des astrocytes réactifs.....	158
2. Les astrocytes réactifs et le CNTF .....	159
a. Les astrocytes activés sont-ils les seuls médiateurs des effets neuroprotecteurs du CNTF ? .....	159
b. Le CNTF : un facteur neurotrophique ou gliotrophique ?.....	160
c. Comprendre les effets du CNTF pour optimiser son utilisation clinique.....	160
3. L'activation astrocytaire comme stratégie thérapeutique ?.....	162
 VI. CONCLUSION GÉNÉRALE.....	 163
 VII. RÉFÉRENCES.....	 164
 VIII. ANNEXES.....	 185
A. Liste des abréviations.....	186
B. Publications .....	188
C. Articles.....	189

# **INTRODUCTION**

# I. Introduction générale

Alors que la première observation anatomique des astrocytes remonte au milieu du XIX<sup>e</sup> siècle, ce n'est que récemment que l'on a pu mettre à jour le rôle primordial de ces cellules et reconnaître leur implication directe, au même titre que les neurones, dans le fonctionnement cérébral.

Ainsi, les astrocytes participent activement à la régulation de l'homéostasie ionique, au soutien trophique des neurones, à la formation de la barrière hématoencéphalique et jouent même un rôle actif dans le traitement de l'information en modulant la neurotransmission (Ransom et al., 2003). Les astrocytes, par le biais des transporteurs membranaires GLAST et GLT-1, sont aussi responsables de la majorité de la recapture du glutamate libéré aux synapses. La recapture du glutamate permet le recyclage du neurotransmetteur sous forme de glutamine et 'façonne' la neurotransmission (diminution du temps de stimulation postsynaptique et restriction spatiale du signal, Danbolt, 2001). C'est une fonction capitale pour le fonctionnement cérébral car la grande majorité des synapses du système nerveux central sont des synapses excitatrices glutamatergiques et le glutamate est impliqué dans de nombreux processus cognitifs, dans la mémorisation et l'apprentissage (McEntee et Crook, 1993). La recapture évite aussi l'accumulation extracellulaire de glutamate et la stimulation excessive de ses récepteurs qui induit des phénomènes d'excitotoxicité (Choi, 1988). Le taux extracellulaire de glutamate doit donc être maintenu très bas et de nombreuses pathologies cérébrales sont associées à des déficits dans l'homéostasie glutamatergique. Ainsi, au cours d'un accident vasculaire cérébral, une grande quantité de glutamate est libérée dans le milieu extracellulaire, en partie par les transporteurs qui fonctionnent en mode inversé (Rossi et al., 2000), ce qui participe à la mort neuronale dans la zone de l'infarctus. Des anomalies du taux extracellulaire de glutamate ou de la capacité de recapture sont aussi nettement impliquées dans des maladies neurodégénératives chroniques comme la sclérose latérale amyotrophique, la maladie de Huntington et la maladie de Parkinson (Maragakis et Rothstein, 2001).

La recapture du glutamate constitue aussi un signal métabolique qui couple l'activité neuronale (i.e. la libération synaptique de glutamate) à l'entrée de glucose dans le parenchyme depuis les capillaires sanguins pour répondre aux besoins énergétiques des neurones. D'après les études menées par L. Pellerin et P. Magistretti, l'entrée de sodium qui accompagne la recapture de glutamate par les transporteurs astrocytaires active la pompe Na/K/ATPase, ce qui stimule la glycolyse et augmente la consommation de glucose dans les astrocytes. Les astrocytes utilisent partiellement l'énergie du glucose par la glycolyse, le

reste étant transmis aux neurones sous forme de lactate (Pellerin et Magistretti, 1994). Cette régulation de l'apport énergétique par les astrocytes est cruciale car le cerveau a d'énormes besoins énergétiques et ne possède pas de réserves propres. Le cerveau, et particulièrement les neurones, sont donc très sensibles aux perturbations du métabolisme énergétique, comme en témoigne l'observation de dysfonctions métaboliques dans de nombreuses atteintes cérébrales (ischémie et maladies neurodégénératives chroniques, Fiskum et al., 1999; Schon et Manfredi, 2003). Ainsi, les astrocytes, qui occupent une position stratégique à l'interface entre les neurones et leurs synapses d'une part et le réseau capillaire d'autre part, exercent un contrôle actif sur deux fonctions cérébrales primordiales: l'homéostasie glutamatergique et le métabolisme énergétique.

Les astrocytes répondent à de nombreuses conditions pathologiques d'origine traumatique, chimique ou ischémique par un changement de phénotype majeur et parfois par une prolifération limitée, appelée astrogliose (Kalman, 2004). Ces astrocytes dits 'réactifs' ou 'activés' sont observés également au cours de maladies dégénératives chroniques. Les deux index classiques utilisés pour mettre en évidence une réaction gliale sont l'hypertrophie cellulaire et la surexpression du filament intermédiaire astrocytaire GFAP. Pourtant, il semble que les astrocytes activés soient bien plus que des cellules hypertrophiques et ils expriment tout un éventail de protéines spécifiques (Eddleston et Mucke, 1993). Au vu des nombreuses fonctions régulées par les astrocytes, il est très probable que leur activation ait des conséquences profondes sur la physiologie cérébrale. Certains soutiennent que les astrocytes activés effectuent leurs fonctions basales (séquestration des espèces oxydantes, support trophique, régulation ionique ...) avec plus d'efficacité ce qui favorise la survie des neurones soumis à des conditions pathologiques (Liberto et al., 2004; Swanson et al., 2004). Mais d'autres considèrent que l'activation astrocytaire est délétère, qu'elle joue un rôle actif dans certains processus pathologiques (Minagar et al., 2002; Barbeito et al., 2004) et contribue à l'absence de récupération post-lésionnelle (notamment par la formation de la cicatrice gliale, Silver et Miller, 2004). En réalité, la vision actuelle du rôle des astrocytes activés s'est forgée à partir des fonctions connues des astrocytes 'au repos' et d'un ensemble d'expériences réalisées à partir de modèles d'activation très variés, le plus souvent *in vitro*. Mais finalement, assez peu d'expériences ont directement évalué si l'état d'activation des astrocytes modifiait des fonctions astrocytaires capitales, en particulier *in vivo* (Sofroniew, 2005). Un seul groupe a directement montré que les astrocytes réactifs étaient globalement bénéfiques, puisque leur ablation ciblée aggravait la sévérité d'une lésion mécanique (Bush et al., 1999).

Dans ce contexte, nous avons voulu étudier différents aspects du fonctionnement des astrocytes activés *in vivo*. Nous avons d'abord développé un modèle adapté d'activation astrocytaire chez le rat. En utilisant des vecteurs lentiviraux, nous avons induit la

surexpression dans le striatum de rat du ciliary neurotrophic factor (CNTF), une cytokine impliquée dans la réaction gliale. Les astrocytes sont ainsi maintenus dans un état activé, en l'absence de lésion, dans une structure cérébrale délimitée. Ce modèle est un outil idéal pour caractériser le phénotype des astrocytes activés et pour étudier leur fonctionnement *in situ*. De plus, il est possible d'évaluer la réponse des astrocytes activés à une condition pathologique de type excitotoxique. Nous observons des modifications profondes de la régulation du métabolisme énergétique et de la machinerie de recapture du glutamate dans les astrocytes activés. Ces changements astrocytaires sont associés à une meilleure gestion du glutamate, un apport énergétique accru et de forts effets protecteurs pour les neurones en conditions excitotoxiques.

Notre étude met en évidence des changements phénotypiques et fonctionnels uniques et de grande ampleur dans les astrocytes activés par le CNTF *in vivo*, et souligne la capacité de ces cellules à favoriser la survie neuronale. De plus, nos résultats apportent une meilleure caractérisation des effets du CNTF qui représente un candidat thérapeutique pour plusieurs maladies neurodégénératives.



## II. Introduction

### A. Les astrocytes ont un rôle actif et primordial dans le fonctionnement cérébral

#### 1. Les astrocytes

##### *a. Les astrocytes : de la glue pour les neurones ?*

Les astrocytes représentent 25 à 50% du volume cérébral (Pope, 1978) et le nombre d'astrocytes par neurone augmente avec la complexité et la taille du cerveau de l'espèce considérée (Nedergaard et al., 2003)(**Fig. 1A**). Malgré cette importance numérique, les astrocytes sont longtemps restés hors du champ d'investigation des neurobiologistes, principalement parce que les moyens d'étudier ces cellules non excitables étaient limités. La première référence à la glie remonte à 1846, quand le neuropathologiste Rudolf Virchow nomma la structure entourant les neurones d'après le nom grec qui signifie glue (Somjen, 1988). Il s'agissait pour lui d'un tissu conjonctif mais pas d'éléments cellulaires. C'est Ramón y Cajal qui le premier, définit clairement les astrocytes grâce à sa méthode d'imprégnation à l'or qui forme des dépôts sur les filaments intermédiaires et permet de révéler la structure d'astrocytes individuels (Somjen, 1988).

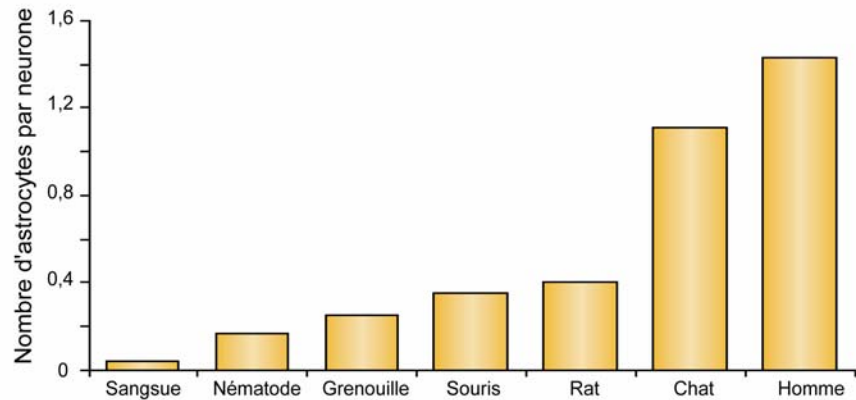
##### *b. Quelques particularités anatomiques des astrocytes*

Les astrocytes ont une morphologie étoilée caractéristique que l'on met en évidence avec un marquage immunohistologique de la glial fibrillary acidic protein (GFAP). Cependant, le remplissage des astrocytes de l'hippocampe par un composé fluorescent révèle que les astrocytes ont une structure 'en éponge' et forment des prolongements très fins qui s'étendent bien plus loin que ne le laissait supposer le marquage du 'squelette' formé par les faisceaux de GFAP (qui ne représente que 15% du volume total de l'astrocyte, Bushong et al., 2002). De plus, chaque astrocyte occupe un territoire spécifique qui ne chevauche quasiment pas celui de l'astrocyte voisin et qui se met en place au cours du développement (Bushong et al., 2004)(**Fig. 1B**).

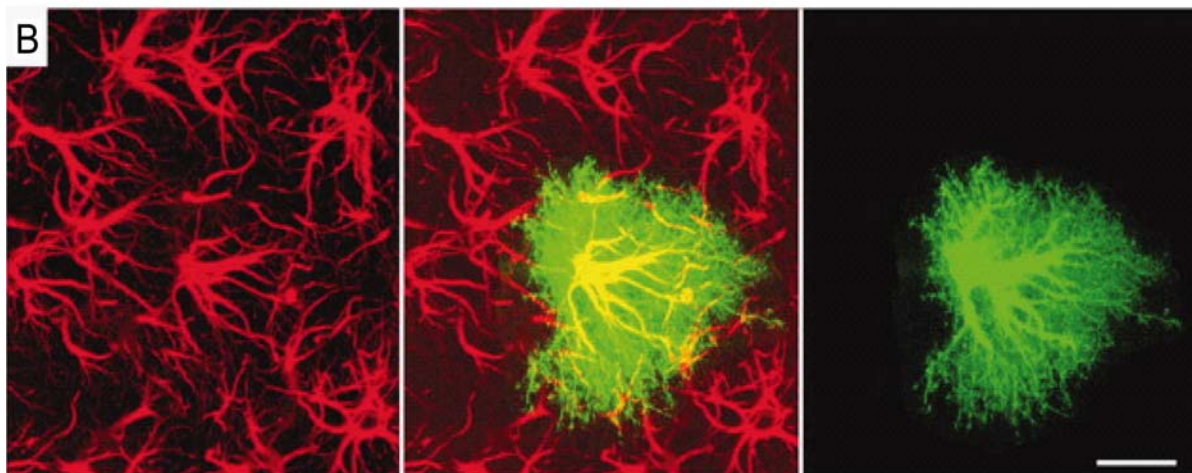
Une autre particularité anatomique avait frappé les premiers observateurs des astrocytes (Golgi en particulier) : ils établissent des contacts avec les capillaires sanguins par le biais de pieds astrocytaires (Somjen, 1988). Les astrocytes envoient des prolongements qui entourent les vaisseaux sanguins en formant des structures en rosette (Kacem et al., 1998)(**Fig. 2A**). En réalité, il semble que les pieds astrocytaires recouvrent la quasi totalité des capillaires sanguins par des prolongements plus fins dépourvus de GFAP

(Simard et al., 2003). Cette organisation spatiale impose à la majorité des solutés présents dans le sang de traverser les astrocytes (en plus des cellules endothéliales) avant d'atteindre les neurones. Les astrocytes sont aussi en contact avec les synapses qu'ils entourent de leurs prolongements (Spacek, 1985).

A



Adapté de Nedergaard et al. (2003) *Trends in Neuroscience* 26 : 523-530.



Wilhelmsson et al. (2004) *The Journal of Neuroscience* 24 : 5016-21.

### Figure 1. Les astrocytes

(A) Le nombre d'astrocytes par neurone augmente avec le degré de complexité du cerveau de l'espèce étudiée. (B) Le marquage immunohistologique de la GFAP (rouge) met en évidence 'le squelette' de l'astrocyte c'est à dire ses ramifications principales. En réalité, lorsque l'astrocyte est 'rempli' avec un traceur fluorescent (vert), la véritable morphologie de l'astrocyte apparaît, plus complexe, plus ramifiée avec des fins prolongements. Echelle 20  $\mu$ m.

Les astrocytes sont connectés entre eux par des jonctions GAP et forment un vaste syncytium. Les jonctions GAP sont constituées par l'apposition de deux connexons formés par 6 connexines. Différentes connexines existent, la connexine 43 étant l'isoforme astrocytaire majoritaire (Nagy et al., 2004). Les jonctions GAP laissent passer des molécules de taille inférieure à 1 kDa comme des ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ...), des seconds messagers (ATP, IP3

...) et même des métabolites comme le glucose ou le glutamate (Bennett et al., 1991). Les astrocytes peuvent donc participer au transfert de substrats énergétiques et à la régulation du  $K^+$  et du glutamate à l'échelle du réseau (Theis et al., 2005). Le niveau d'expression et la perméabilité des jonctions GAP sont variables et peuvent être modulées par différents agents (neurotransmetteurs,  $Ca^{2+}$ , phosphorylases...) ce qui change les propriétés du réseau astrocytaire (Giaume et McCarthy, 1996).

Ainsi, les particularités anatomiques et le positionnement stratégique des astrocytes à l'interface entre les synapses et les capillaires sanguins laissent supposer que les astrocytes sont bien plus que des simples éléments structuraux pour le cerveau.

## **2. Les astrocytes interagissent avec les neurones**

De nombreuses études sur les astrocytes ont permis de mettre en évidence des interactions fonctionnelles variées et complexes entre les neurones et les astrocytes et de clarifier leur rôle dans le fonctionnement cérébral. L'ensemble des fonctions potentiellement remplies par les astrocytes a été listé en 2003 par Ransom *et al.* (**Tableau 1**).

### *a. Homéostasie ionique*

Une des fonctions astrocytaires la mieux établie est la régulation de la concentration extracellulaire des ions  $K^+$  qui augmente avec l'activité neuronale. Les astrocytes ont une forte capacité à tamponner le potassium, en partie grâce au vaste syncytium qui permet une redistribution spatiale des ions excédentaires. Les astrocytes capturent le potassium extracellulaire par des canaux potassiques entrants, des pompes Na/K/ATPases et des cotransporteurs  $Na^+/K^+/Cl^-$ . L'excès d'ion potassium est évacué dans la circulation sanguine par des canaux potassiques sortants au niveau des pieds astrocytaires (Walz, 2000; Simard et Nedergaard, 2004).

Les astrocytes participent aussi à la régulation des ions  $H^+$  et  $HCO_3^-$  et par conséquent du pH (Chesler, 2003). De nombreux transporteurs tels que l'antiport  $Na^+/H^+$ , les cotransporteurs  $Na^+/HCO_3^-$  et  $Cl^-/HCO_3^-$  sont exprimés par les astrocytes et participent au maintien d'un pH extracellulaire autour de 7.

Enfin, les astrocytes participent à la régulation du niveau extracellulaire du  $Na^+$  et du  $Cl^-$  (Simard et Nedergaard, 2004). Le contrôle des ions  $Cl^-$  par les astrocytes est aussi impliqué dans la régulation du volume cellulaire et de l'osmolarité (Walz, 2002). L'aquaporine 4, qui est exprimée spécifiquement par les astrocytes et forme des canaux aqueux, participe aussi aux flux d'eau (Simard et Nedergaard, 2004).

## 1. Rôle établi

### Normal

- Sequestration et/ou redistribution du potassium au cours de l'activation neuronale
- Recapture du glutamate et du GABA au niveau des synapses
- Synthèse de précurseurs pour la production de glutamate et de GABA
- Détoxification de l'ammonium
- Guidage des neurones au cours du développement

### Pathologique

- Maladie d'Alexander
- Œdème cérébral cytotoxique
- Formation des gliomes
- Déficience de l'homéostasie du glutamate extracellulaire

## 2. Rôle probable

### Normal

- Apport de substrats énergétiques aux neurones (e.g. lactate)
- Partage de substrats énergétiques dérivés du glycogène avec les neurones
- Homéostasie de l'eau
- Influence sur l'intégrité de la barrière hématoencéphalique
- Régulation du pH extracellulaire

### Pathologique

- Encéphalopathie hépatique
- Modulation des conséquences d'un accident vasculaire cérébral :
  - Séquestration des radicaux libres
  - Homéostasie glutamatergique
  - Expression des connexines

## 3. Rôle émergent

### Normal

- Modulation des synapses excitatrices et inhibitrices
- Régulation de la synaptogénèse
- Régulation de la neurogénèse dans le cerveau adulte (e.g. hippocampe)
- Détoxification des ROS

### Pathologique

- Modulation trophique de la repousse axonale et de la récupération neuronale après une lésion
- Libération de cytokines et de chemokines
- Neuroinflammation

### Tableau 1. Les fonctions remplies par les astrocytes

Adapté de Ransom *et al.* (2003) *Trends in Neuroscience* 26 : 520-522.

### *b. Recapture des neurotransmetteurs*

Les synapses sont entourées par des éléments astrocytaires qui délimitent la fente synaptique et empêchent la diffusion des neurotransmetteurs (Araque et al., 1999). Cette organisation en synapse 'tripartite' permet une recapture efficace des neurotransmetteurs par les prolongements astrocytaires qui expriment des transporteurs à haute affinité pour le glutamate, le GABA ou la glycine (Masson et al., 1999). Ce mécanisme de recapture permet d'optimiser la neurotransmission (amélioration du rapport signal sur bruit, réduction du temps de stimulation de l'élément post-synaptique, restriction spatiale de la stimulation), de recycler les neurotransmetteurs et d'éviter leur accumulation, qui dans le cas du glutamate, peut être neurotoxique (Huang et Bergles, 2004, voir § E). De plus, les prolongements astrocytaires autour des synapses sont mobiles et dynamiques (Hirrlinger et al., 2004) ce qui peut induire des changements dans les propriétés de la neurotransmission. Par exemple, la réduction de la couverture astrocytaire des synapses dans l'hypothalamus en période de lactation entraîne une inhibition rétrograde de la libération de glutamate via la stimulation des récepteurs présynaptiques au glutamate mGluR (Oliet et al., 2001).

### *c. Régulation de la synaptogenèse*

En plus de participer au fonctionnement des synapses, les astrocytes peuvent réguler leur mise en place au cours du développement et favoriser leur maintien (Slezak et Pfrieder, 2003). Ainsi, le nombre de synapses fonctionnelles formées par des neurones en culture augmente en présence d'astrocytes (Pfrieder et Barres, 1997). La production par les astrocytes de cholestérol associé à l'apolipoprotéine E (Mauch et al., 2001) et de thrombospondines (Christopherson et al., 2005) est impliquée dans le contrôle la synaptogénèse.

### *d. Régulation des espèces réactives oxydantes (ROS)*

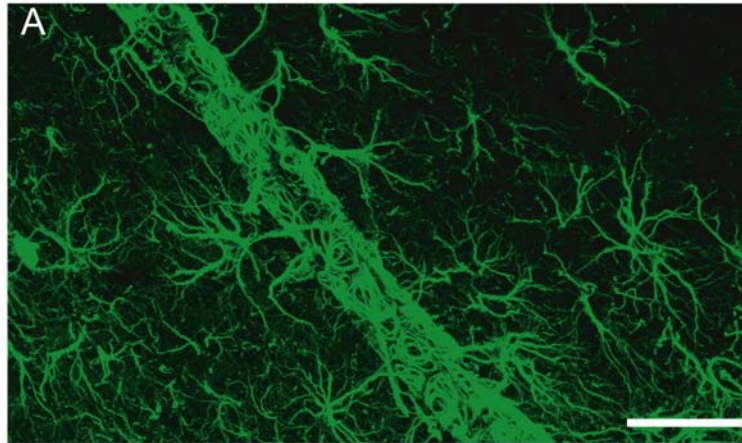
L'accumulation de ROS dans le cerveau a des effets délétères majeurs (péroxydation des lipides, nitrosylation des protéines, oxydation de l'ADN et formation de bases anormales...) et provoque une dégénérescence cellulaire (Halliwell, 1992; Fridovich, 1999). Les astrocytes résistent mieux que les neurones au stress oxydatif car ils expriment plus fortement des molécules à fort potentiel antioxydant comme le glutathion ou l'ascorbate ainsi que des enzymes détoxifiantes comme la catalase et la superoxyde dismutase (Pentreath et Slamon, 2000). Les astrocytes alimentent les neurones avec le glutathion réduit et participent à la détoxification des ROS extracellulaire, ce qui favorise la survie neuronale (Dringen et al., 2000).

#### *e. Formation de la barrière hématoencéphalique (BHE)*

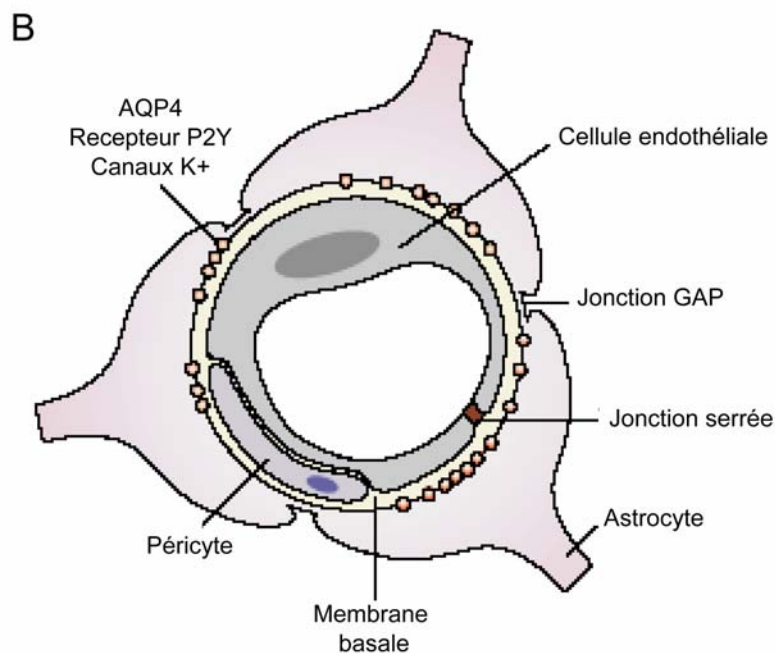
Les astrocytes jouent un rôle clé dans la formation et le maintien de la BHE qui est formée de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées, d'une membrane basale et des pieds astrocytaires (**Fig. 2B**). Les astrocytes envoient des signaux induisant la formation des jonctions serrées qui déterminent les propriétés de perméabilité de la BHE (Janzer et Raff, 1987; Ballabh et al., 2004). Ainsi, la majorité des molécules hydrophiles du sang ne traversent pas la BHE spontanément et nécessitent des transporteurs. Les astrocytes auraient aussi un rôle actif dans la régulation du débit sanguin cérébral et par conséquent de l'apport en nutriments dans le cerveau (voir §D-3-b).

#### *f. Support trophique*

Les astrocytes libèrent différentes molécules à effet trophique pour les neurones. De nombreux échanges métaboliques ont lieu entre les astrocytes et les neurones. Les astrocytes fournissent aux neurones des substrats énergétiques comme le lactate (Pellerin et Magistretti, 2004b), ou des intermédiaires du cycle de Krebs (Magistretti, 1999, voir § D-3), des précurseurs comme la glutamine ou le glutathion (Dringen et Hirrlinger, 2003) qui sont déterminants pour le fonctionnement neuronal. A cela s'ajoute la libération de molécules à effets neuroprotecteurs comme des stéroïdes (Garcia-Ovejero et al., 2005), des facteurs trophiques et des molécules d'adhésion cellulaire favorisant la croissance axonale (Muller et al., 1995).



Kacem *et al.* (1998) *Glia* **23** : 1-10



Adapté de Nedergaard *et al.* (2003) *Trends in Neuroscience* **26** : 523-530.

### Figure 2. La barrière hématoencéphalique (BHE)

(A) Les astrocytes (ici marqués avec la GFAP) entourent les capillaires sanguins avec leurs pieds astrocytaires. Echelle : 50  $\mu$ m.

(B) Les astrocytes participent à la formation de la BHE. Elle est constituée des cellules endothéliales liées par des jonctions serrées qui conditionnent l'imperméabilité de la barrière à la majorité des composés sanguins et d'une membrane basale. Les astrocytes envoient des prolongements autour des capillaires. Ces pieds astrocytaires sont connectés par des jonctions GAP et expriment de nombreux récepteurs (récepteur P2Y) et des canaux (AQP4, canal K<sup>+</sup>).

### 3. Des fonctions 'révolutionnaires' pour les astrocytes

Plus récemment, de nouvelles fonctions ont été attribuées aux astrocytes, qui bouleversent notre vision du fonctionnement cérébral.

#### *a. Les astrocytes participent à la neurogénèse*

Des cellules ayant des caractéristiques astrocytaires au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ, Doetsch et al., 1999) et du gyrus denté de l'hippocampe (Seri et al., 2001) sont capables, chez l'adulte, de se multiplier et de former de nouveaux neurones. Les astrocytes ont donc un potentiel de cellule souche et peuvent se réengager dans la voie de différenciation neuronale (pour une revue complète du sujet voir, Doetsch, 2003).

#### *b. Les astrocytes modulent activement la neurotransmission*

Les astrocytes sont capables de percevoir mais surtout d'intervenir directement dans la transmission synaptique, une fonction jusque là réservée aux neurones. Le concept de synapse tripartite prend ici tout son sens : les astrocytes peuvent moduler l'activité synaptique à l'échelle de la synapse et du réseau de neurones et intervenir dans le traitement de l'information (Auld et Robitaille, 2003; Newman, 2003) .

Les astrocytes expriment toute une gamme de récepteurs aux neurotransmetteurs, en particulier ceux au glutamate (Steinhauser et Gallo, 1996) et des canaux voltage dépendants (Sontheimer, 1992). Ils sont donc directement influencés par l'activité des neurones environnants. Si les astrocytes ne sont pas capables de générer des potentiels d'action comme les neurones, ce sont tout de même des cellules excitables, ce qui se traduit par l'apparition d'oscillations du taux intracellulaire de calcium et de vagues calciques qui peuvent se propager aux astrocytes voisins sur plusieurs centaines de micromètres à faible vitesse (Cornell-Bell et al., 1990). Les vagues calciques ont récemment été observées *in vivo* (Tian et al., 2005). Cependant, d'autres études restent nécessaires pour caractériser les conditions de mise en place et de propagation de ces vagues ainsi que leur rôle physiologique, en particulier *in vivo* (Haydon, 2001; Nedergaard et al., 2003).

De plus, les astrocytes sont capables de libérer de nombreuses molécules neuroactives (glutamate, ATP, D-Sérine...) en réponse à une stimulation physiologique comme une augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Ces gliotransmetteurs sont synthétisés et/ou stockés par les astrocytes, sont libérés de manière régulée suite à un stimulus physiologique, induisent des réponses rapides (de l'ordre de la milliseconde à la seconde) chez les cellules voisines et participent à des processus physiologiques (Volterra et Meldolesi, 2005). Par exemple, les astrocytes exercent une inhibition tonique de l'activité électrique des neurones, favorisent l'apparition de phénomène de plasticité (Pascual et al.,



2005) et synchronisent le réseau de neurones (Angulo et al., 2004). La libération des gliotransmetteurs peut se faire par une exocytose classique régulée par le  $Ca^{2+}$ . Dans le cas du glutamate, d'autres mécanismes de libération ont été suggérés : libération par des hémicanaux formés par des connexines, par l'échangeur cystine/glutamate, par des canaux sensibles au volume cellulaire (volume-regulated anion channel, VRAC, Takano et al., 2005) par des récepteurs purinergiques  $P_2X$  qui dans certaines conditions deviennent perméables à des molécules de plus grosse taille comme le glutamate (Nedergaard et al., 2002). Lorsque les gradients ioniques sont fortement perturbés, comme en conditions ischémiques, il est possible que les transporteurs astrocytaires au glutamate  $Na^+$ -dépendants fonctionnent en sens inverse (Seki et al., 1999). Certains de ces mécanismes de libération du glutamate ont été mis en évidence *in vitro* et semblent nécessiter des conditions ioniques spécifiques assez éloignées d'une situation physiologique *in situ* (Evanko et al., 2004). La caractérisation plus précise de ces phénomènes reste à entreprendre *in vivo*.

Pour ajouter une dernière touche de complexité au domaine de la physiologie des astrocytes, il apparaît que ces cellules présentent une très grande hétérogénéité (pour une revue récente voir, Kimelberg, 2004). La GFAP, marqueur astrocytaire par excellence, est exprimée à des niveaux très variables selon les astrocytes considérés (Kalman et Hajos, 1989) et elle est même exprimée par les cellules progénitrices de la SVZ (Garcia et al., 2004). Plus généralement, les astrocytes n'expriment pas les mêmes protéines selon la structure considérée (Bachoo et al., 2004).

Ainsi, l'ensemble de ces données, parfois récentes concernant les astrocytes souligne la complexité, la diversité et l'importance des interactions entre astrocytes et neurones pour la physiologie cérébrale. Qu'en est-il alors lorsque les astrocytes deviennent réactifs et qu'ils subissent des changements phénotypiques et fonctionnels majeurs ?

## **B. Les astrocytes deviennent activés en réponse à différentes atteintes cérébrales**

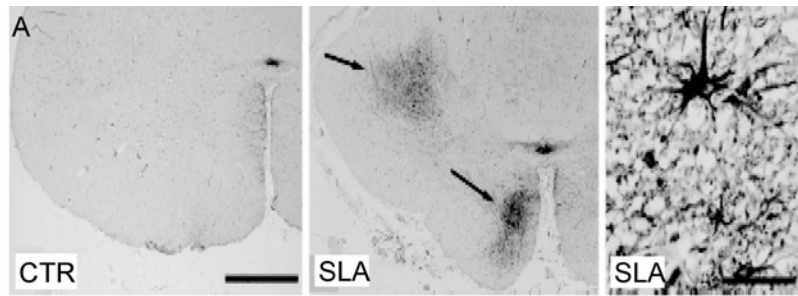
### **1. Quelques caractéristiques de la réaction gliale**

Les astrocytes ont pour caractéristique de s'activer en réponse à des situations pathologiques extrêmement diverses comme l'ischémie, le traumatisme cérébral, les infections virales, les maladies à prions, les maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaque, l'épilepsie et les maladies neurodégénératives (Kalman, 2004). Une légère astrogliose accompagne aussi le vieillissement cérébral (Abraham, 2001), mais elle est nettement plus importante dans de nombreuses pathologies neurodégénératives chroniques comme la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie de Huntington (MH) et la maladie d'Alzheimer (MA). Ainsi, indépendamment du type d'atteinte (traumatique, ischémique, chimique ou dégénérative) et de la région cérébrale affectée, les astrocytes deviennent réactifs, c'est-à-dire qu'ils sont hypertrophiques avec des processus élargis et surexpriment le filament intermédiaire GFAP (Kalman, 2004) (**Fig. 3**).

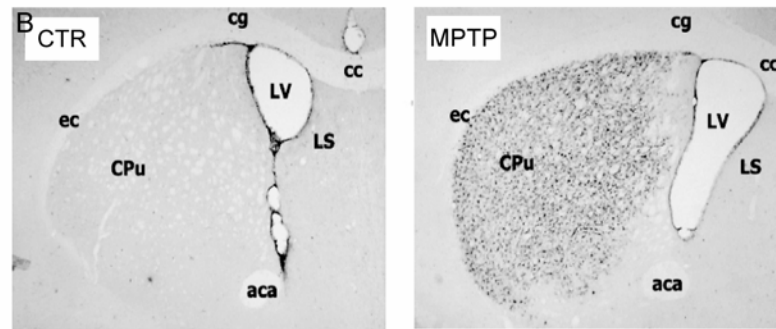
Cette réponse est alternativement nommée astrogliose, réaction gliale, activation astrocytaire. La réponse des astrocytes peut se mettre en place très rapidement, elle est visible une heure seulement après un accident ischémique (Mucke et al., 1991). Souvent, l'activation des astrocytes est associée à une activation des cellules microgliales, ce qui a de nombreuses conséquences en soit, mais qui ne seront pas abordées ici en détail (se référer à Raivich et al., 1999).

Le nombre d'astrocytes visibles dans la structure réactive augmente mais la quantification du nombre de cellules en divisions (par mesure de l'incorporation de bromodeoxyuridine) montre que la prolifération des astrocytes est le plus souvent très limitée, environ 2% de la population d'astrocytes (voir les références dans Kalman, 2004). En réalité, l'augmentation du nombre d'astrocytes visibles est probablement liée à une augmentation de l'immunoréactivité pour la GFAP, classiquement utilisée pour détecter les astrocytes. Une dernière explication avancée est la migration d'astrocytes vers la zone de lésion, mais ce mécanisme reste controversé (voir les références dans Kalman, 2004). Il est donc généralement admis que les astrocytes réactifs observés dans une structure cérébrale correspondent à des astrocytes résidents qui ont subi un changement phénotypique important (Eddleston et Mucke, 1993).

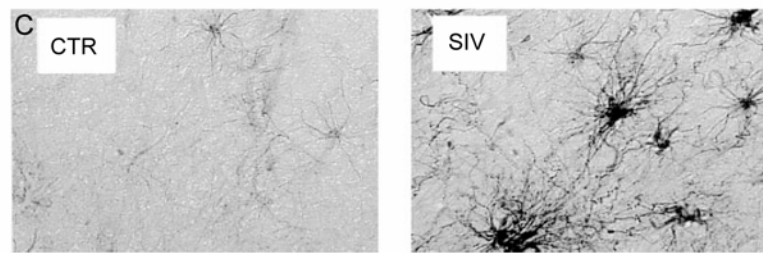
On distingue deux types de réaction gliale : isomorphique et anisomorphique. La réaction est dite anisomorphique quand les processus astrocytaires sont tous orientés dans la même direction et adoptent une organisation 'en palissade' (Kalman, 2004). C'est le cas



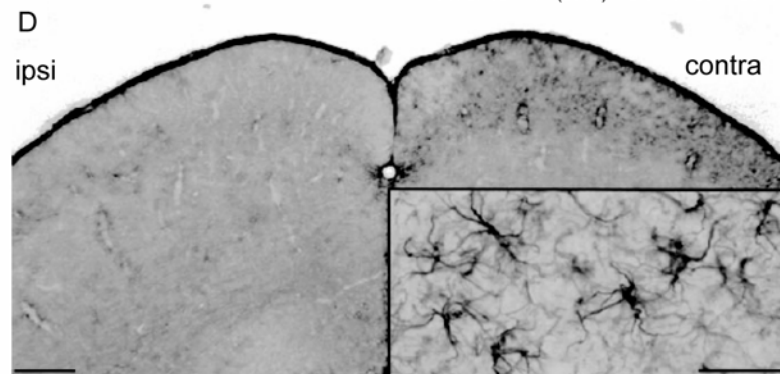
Aronica et al. (2001) *Neuroscience* 105 : 509



Chen et al. (2002) *Brain Research* 925 9-17.



Gonzalez et al. (2000) *AIDS* 14 : 2841-2849.



Martin et al. (2003) *Journal of Neuroscience* 23 : 5416-5424.

### Figure 3. La réaction astrocytaire

Quelques exemples d'astroglie dans des situations pathologiques, des espèces et des structures cérébrales variées :

**(A)** Dégénérescence chronique : Astrocytes réactifs exprimant la vimentine dans la moelle épinière d'un malade de la sclérose latérale amyotrophique Il n'y a pas d'astrocytes vimentine-positifs dans la moelle épinière d'un sujet sain (CTR). **(B)** Atteinte chimique et neurodégénérescence : Astrocytes réactifs surexprimant la nestine dans le striatum (caudé-putamen, Cpu) de la souris après injection périphérique du neurotoxique MPTP qui détruit les neurones de la substance noire projetant sur le striatum. Les astrocytes contrôles (CTR) n'expriment pas la nestine. **(C)** Infection : Astroglie corticale en réponse à une infection par le virus de l'immunodéficience simien (SIV). En comparaison avec un macaque contrôle (CTR), le macaque infecté (SIV) présente après 14 jours de nombreux astrocytes surexprimant la GFAP. **(D)** Lésion mécanique : Astroglie dans le colliculus supérieur de la souris en réponse à l'axotomie unilatérale du nerf optique. Marquage immunohistologique de la GFAP 5 jours après la lésion. Le colliculus ipsilatéral à la lésion ne présente pas d'activation astrocytaire.

lorsque les astrocytes forment une cicatrice autour d'un site de rupture de l'intégrité du parenchyme cérébral (i.e. 'lésion ouverte' : lésion mécanique, abcès...). La réaction isomorphique a lieu en réponse à des atteintes plus diffuses (chimique, ischémique...) et elle est le plus souvent réversible (Kalman, 2004).

Ainsi, la réaction gliale est caractéristique d'un état pathologique, elle est stéréotypique même si elle présente des gradations, ce qui laisse supposer qu'il existe des mécanismes communs d'induction.

## **2. Les cascades moléculaires impliquées dans l'activation des astrocytes**

Les molécules impliquées dans l'activation des astrocytes appartiennent généralement à la famille des cytokines, ce sont les interleukines (IL), les interférons (IFN)... Les mécanismes moléculaires sont extrêmement complexes avec des effets en cascade, des boucles de régulation positive et négative et des modes de libération paracrine et autocrine, qui sont loin d'être compris parfaitement (Merrill et Benveniste, 1996; Raivich et al., 1999; Schubert et al., 2000). La microglie activée, qui libère un grand nombre de ces molécules activatrices, joue un rôle important dans l'induction de l'astrogliose. Il est aussi possible que les astrocytes s'activent en réponse à une souffrance ou une dégénérescence neuronale, comme dans les pathologies chroniques où il y a une astrogliose progressive et durable sans qu'il n'y ait forcément d'activation microgliale (Wu et Schwartz, 1998).

De nombreuses molécules qui sont libérées lors d'une atteinte aiguë (en particulier quand les membranes cellulaires sont rompues) provoquent l'activation des astrocytes *in vitro* et/ou *in vivo*. Par exemple, l'IL-6, le basic fibroblast growth factor (bFGF), le platelet-derived growth factor (PDGF), le tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), le transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) et le CNTF qui sont libérés par les neurones et/ou les astrocytes, l'endothéline libérée par les vaisseaux sanguins, IL-1 $\beta$  et les molécules du complément venant de la microglie ou du système immunitaire infiltré pourraient participer au déclenchement de l'activation gliale (pour une revue récente se reporter à Kalman, 2004). L'IL-1 $\beta$  semble avoir un rôle d'induction de l'astrogliose et l'IFN- $\gamma$  un rôle de potentiation. TGF- $\beta$  favorise l'apparition de la cicatrice gliale mais inhibe l'inflammation (John et al., 2003). Enfin, l'IL-10 atténue l'astrogliose et contrôle la production de cytokines par les macrophages (Balasingam et Yong, 1996). Il est souvent difficile d'établir avec certitude le rôle de ces différentes molécules dans l'induction de l'astrogliose car il existe des redondances et des compensations entre elles (voir plus loin pour CNTF et TGF- $\beta$ , § C-2).

Ces facteurs ont généralement des effets transcriptionnels et induisent l'expression d'une classe de gènes appelés 'immediate early genes' (IEG). Le facteur de transcription c-

fos, les protéines de stress cellulaire 'heat shock' sont quelques uns des IEG qui sont induits dans les astrocytes réactifs en culture (Eddleston et Mucke, 1993; Wu et Yu, 2000) et après une lésion mécanique focale *in vivo* (Dragunow et Hughes, 1993). L'analyse extensive du transcriptome des astrocytes activés par la technique de puces à ADN, montre que l'expression de 1400 gènes est significativement modifiée par un traitement de 24 h avec IL-1 $\beta$  (John et al., 2005, voir § B-3-a pour plus de détails).

Récemment, des effets directs de IL-1 $\beta$  sur la réorganisation du cytosquelette des astrocytes réactifs ont été mis en évidence (John et al., 2004). Cette réorganisation diminue la capacité des astrocytes à migrer vers le site de lésion mécanique en culture.

Ainsi, l'activation des astrocytes fait intervenir des processus variés allant de la régulation du profil de transcription à la modulation des propriétés du cytosquelette. Les mécanismes d'induction de l'astrogliose sont encore mal connus et sont difficiles à étudier *in situ*. Malheureusement, les conséquences de l'astrogliose ne sont pas vraiment mieux caractérisées et comprises et ce champ de recherche reste complexe et foisonnant.

### **3. L'activation astrocytaire : délétère ou bénéfique ?**

L'activation gliale est un phénomène 'universel' du point de vue des espèces concernées (du moins chez les Mammifères) et des situations pathologiques impliquées. Cela suggère qu'elle représente une réponse évolutive qui confère un certain avantage sélectif (Kalman, 2004). Pourtant des questions demeurent : est-elle une cause ou une conséquence des processus pathologiques ? Est-ce un facteur aggravant ou un mécanisme de défense ?

Le profil d'expression moléculaire des astrocytes a été établi par Eddleston et Mucke en 1993, en faisant la revue de résultats obtenus à partir de différents modèles d'astrogliose *in vitro* et *in vivo*. Plus récemment, ce profil a été complété en utilisant la technique des puces à ADN qui permet d'étudier sans *a priori* un très grand nombre de gènes. Cette technique a été appliquée à quelques modèles d'astrogliose : modèle d'induction par IL-1 $\beta$  *in vitro* (John et al., 2005) et modèle d'activation dans le striatum par déplétion en dopamine *in vivo* (Nakagawa et Schwartz, 2004) et *in vitro* (Nakagawa et al., 2005). Plusieurs classes de gènes sont modifiées par l'activation des astrocytes comme les protéines du cytosquelette, des molécules neurotrophiques et antioxydantes, des cytokines et différentes enzymes. Le phénotype moléculaire des astrocytes réactifs permet d'avancer quelques hypothèses quant à leur rôle, dont certaines ont pu être confirmées expérimentalement.

### *a. Les astrocytes réactifs peuvent former une cicatrice gliale*

La première caractéristique moléculaire des astrocytes réactifs est bien sûr la surexpression d'éléments du cytosquelette. Il s'agit de la GFAP mais aussi de filaments immatures comme la vimentine et la nestine (voir les références dans Kalman, 2004). Cette restructuration du cytosquelette est impliquée dans les changements morphologiques des astrocytes réactifs, et en particulier dans leur capacité à former une 'cicatrice gliale'. Cette structure très compacte délimite le site d'une lésion du parenchyme et restaure l'isolement du système nerveux par rapport à la périphérie en reformant une '*glia limitans*'. Cependant, la cicatrice gliale entrave la repousse axonale en formant un barrière mécanique et les astrocytes réactifs de la cicatrice expriment certaines molécules comme les protéoglycans qui interfèrent avec la repousse axonale (Ridet et al., 1997; Silver et Miller, 2004). Dans la majorité des cas de lésion de la moelle épinière, les axones sectionnés ne franchissent pas le site de la lésion, ne ré-innervent pas les membres inférieurs ce qui entraîne une paralysie permanente. Après une hémisection de la moelle épinière, la repousse axonale et la récupération fonctionnelle sont plus importantes chez les souris doublement invalidées pour les gènes de la GFAP et de la vimentine, car les axones non sectionnés réussissent à franchir la cicatrice gliale qui est moins 'solide' (Menet et al., 2003). Cependant, même si la cicatrice gliale constitue un frein à la récupération post-lésionnelle, elle permet aussi d'éviter l'aggravation des effets de la lésion. En effet, les cellules mortes au niveau de la lésion libèrent de nombreuses molécules toxiques comme des protéases et une forte réponse inflammatoire a lieu. La cicatrice gliale permet donc de 'démarquer' le tissu malade et de préserver le parenchyme sain autour (Sofroniew, 2005). La démonstration du rôle capital de la cicatrice gliale a été faite par le groupe de Sofroniew qui a développé des souris transgéniques exprimant le gène de la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur de la GFAP. Ainsi, en présence de gancyclovir, seuls les astrocytes réactifs (i.e. qui surexpriment la GFAP) et prolifératifs (i.e. qui incorporent le gancyclovir triphosphate dans leur ADN) dégénèrent spécifiquement. L'ablation des astrocytes réactifs au niveau d'une lésion de la moelle épinière (Faulkner et al., 2004) et de l'hippocampe (Bush et al., 1999) accentue de nombreux paramètres pathologiques (dégénérescence neuronale, démyélinisation, œdème, réponse inflammatoire, perturbation de la BHE). L'ablation des astrocytes réactifs aggrave aussi des lésions de faible intensité qui n'auraient pas eu de conséquences motrices (Faulkner et al., 2004). Des mécanismes insuffisants de défense ont aussi été observés avec des souris dépourvues de GFAP et de vimentine (Pekny et al., 1999). Ainsi, la formation d'une cicatrice gliale peut être considérée comme un 'moindre mal' nécessaire pour faire face à la situation extrême de lésion du parenchyme cérébral.

*b. Les astrocytes réactifs libèrent des molécules bénéfiques pour les neurones : facteurs neurotrophiques et molécules antioxydantes*

Les astrocytes réactifs libèrent de façon plus importante différentes molécules à effets neurotrophiques comme le nerve growth factor (NGF, Goss et al., 1998), le CNTF (Seniuk et al., 1994) et le glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF, Miyazaki et al., 2001). Ces facteurs neurotrophiques ont des actions extrêmement variées qui favorisent le fonctionnement et la survie neuronale (Thoenen et Sendtner, 2002). Ainsi, *in vitro*, les astrocytes préalablement activés sont plus efficaces pour promouvoir la survie neuronale et la formation de neurites (Albrecht et al., 2002).

Les astrocytes réactifs surexpriment également la superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase, deux enzymes clés dans la détoxification des ROS (Lindenau et al., 1998; Noack et al., 1998). Enfin, les astrocytes réactifs surexpriment différentes molécules comme la céruloplasmine (Kuhlow et al., 2003), les métallothionines I et II (Liberto et al., 2004) et la transferrine (Connor et al., 1992) qui détoxifient différents métaux (cuivre, zinc et fer) et empêchent qu'ils ne catalysent des réactions produisant des ROS. Ainsi, les astrocytes activés semblent être plus performants pour combattre le stress oxydatif et protéger les neurones vulnérables (Wilson, 1997; Pentreath et Slamon, 2000).

*c. Les astrocytes réactifs produisent des cytokines et peuvent participer à l'inflammation et à la réponse immunitaire*

Les astrocytes activés libèrent aussi tout un panel de cytokines pro-inflammatoires (interleukines, TNF- $\alpha$ ...) et d'éicosanoïdes (leukotriène, prostaglandines) qui peuvent durablement activer la microglie et induire une inflammation (Eddleston et Mucke, 1993; Barbeito et al., 2004). De plus, les astrocytes activés surexpriment la NO synthase inductible et libèrent du NO, une molécule à potentiel oxydant qui est toxique pour les neurones (Chao et al., 1996) et peut aggraver la sévérité d'une atteinte excitotoxique (Hewett et al., 1994) ou ischémique (Gibson et al., 2005).

Le TNF $\alpha$  produit par les astrocytes activés est toxique pour les oligodendrocytes en culture (Robbins et al., 1987) et les astrocytes réactifs sont suspectés de participer aux phases de démyélinisation caractéristiques de la sclérose en plaques (De Keyser et al., 2003). Cependant, comme pour tous les exemples abordés ici, la situation est plus complexe ; les astrocytes activés ont sûrement une double fonction, puisqu'ils peuvent aussi libérer des molécules trophiques pour les oligodendrocytes comme CNTF et FGF2 (Louis et al., 1993; Albrecht et al., 2002). Enfin, la véritable participation des astrocytes dans la dégénérescence et/ou la mort neuronale est difficile à évaluer, car ces molécules toxiques

sont libérées en quantité beaucoup plus importante par les cellules microgliales (Liberto et al., 2004).

Les astrocytes réactifs expriment des molécules chémoattractives (Ambrosini et al., 2005) et modulent la perméabilité de la BHE (Abbott, 2002), ce qui favorise l'infiltration des cellules du système immunitaire (Minagar et al., 2002). Les astrocytes réactifs expriment aussi des protéines du système d'histocompatibilité impliquées dans la présentation d'antigènes, du moins en culture. Ils pourraient adopter un rôle de surveillance du parenchyme en phagocytant des débris cellulaires et en les présentant aux cellules du système immunitaire (Lee et al., 1990; Bechmann et Nitsch, 1997), mais cette fonction reste controversée (Dong et Benveniste, 2001). Ainsi, les astrocytes pourraient participer activement à la réponse inflammatoire, qui, lorsqu'elle est incontrôlée, durable ou excessive, a des conséquences délétères pour les neurones (Wyss-Coray et Mucke, 2002; Marchetti et Abbracchio, 2005).

#### *d. D'autres caractéristiques des astrocytes réactifs*

Les astrocytes activés expriment plus fortement certaines protéases et inhibiteur de protéases. Au final, les conséquences de cette surexpression sont donc difficiles à évaluer mais les astrocytes activés pourraient participer à l'élimination des débris extracellulaire et à la réorganisation de la matrice extracellulaire après une lésion mécanique (Eddleston et Mucke, 1993; Ridet et al., 1997). Dans la MA, les astrocytes réactifs sont présents autour des plaques amyloïdes formées de peptide A $\beta$  (Unger, 1998). Les astrocytes de souris sont capables de migrer vers ces dépôts et de les dégrader ; ce qui suggère que les astrocytes ont initialement une fonction neuroprotectrice qui est perdue ou insuffisante au cours de la MA (Wyss-Coray et al., 2003).

Il a été suggéré dès les premières études de l'astrogliose, que le métabolisme énergétique des astrocytes réactifs était modifié, mais les études sur ce sujet sont finalement assez rares (Eddleston et Mucke, 1993). Les astrocytes réactifs contiennent plus de granules de glycogène et ont un métabolisme oxydatif plus actif (Smith, 1963; Al-Ali et Robinson, 1982). Des résultats plus récents obtenus par la technique de puce à ADN suggèrent au contraire que de nombreux gènes du métabolisme sont sous-exprimés par les astrocytes réactifs (Nakagawa et al., 2005).

L'activation des astrocytes est souvent associée à une augmentation de l'expression des connexines et donc potentiellement de la connectivité des astrocytes (Kielian et Esen, 2004). Le couplage extensif des astrocytes qui favorise leur fonctionnement synchrone, pourraient participer à la formation de foyers épileptiques (Lee et al., 1995). Les astrocytes réactifs surexpriment aussi les récepteurs métabotropiques au glutamate mGluR5 et



mGluR3 (Aronica et al., 2000; Aronica et al., 2001; Vermeiren et al., 2005), ainsi que les récepteurs purinergiques (Shao et McCarthy, 1994). Les effets fonctionnels induits par ces changements d'expression des récepteurs aux neurotransmetteurs n'ont jamais été évalués précisément.

Enfin, dans certains modèles d'astrogliose en culture, les astrocytes rendus réactifs par des facteurs de croissance présentent une capacité de transport du glutamate accrue, par la biais de la phosphorylation du transporteur GLT-1 (Vermeiren et al., 2005) ou par une augmentation du niveau d'expression des transporteurs (Figiel et al., 2003, voir § E-2-e).

Cette carte d'identité moléculaire des astrocytes réactifs rassemble les résultats d'un très grand nombre d'expériences réalisées à partir de modèles d'activation -généralement *in vitro*- très variés et d'échantillons de cerveaux présentant une astrogliose. Une autre approche consiste à établir ce profil à partir d'une caractérisation quasi-complète du niveau d'expression des ARNm dans un seul modèle spécifique d'astrogliose. Ce deuxième type d'étude fournit des données très complexes, mais qui restent descriptives. Ainsi, même s'il est possible de voir émerger un certain nombre de grandes fonctions potentiellement modulées par les astrocytes réactifs, elles ont trop rarement été évaluées dans des modèles plus complexes de pathologies, en particulier *in vivo*. C'est dans ce contexte que nous avons voulu développer un modèle d'activation des astrocytes qui permettrait d'évaluer *in situ* leur fonctionnement. Nous avons utilisé le CNTF, un facteur neurotrophique connu pour activer les astrocytes.

## C. Le CNTF : un facteur neurotrophique activateur des astrocytes

### 1. Le CNTF : découverte et caractéristiques

#### a. Identification du CNTF

Le Ciliary Neurotrophic factor (CNTF) a été identifié par l'équipe de Varon en 1979 à partir d'extraits oculaires de poulet qui augmentaient significativement la survie des motoneurons parasympathiques du ganglion ciliaire *in vitro* (Adler et al., 1979; Manthorpe et al., 1980). La purification partielle du CNTF à partir d'oeil de poulet (Barbin et al., 1984) a permis d'obtenir une partie de la séquence en acide aminés et du cDNA du CNTF et de caractériser son profil d'expression (Lin et al., 1989; Stockli et al., 1989). Le CNTF est une protéine cytosolique d'environ 200 acides aminés (~ 23 kDa) et sa séquence peptidique le rattache à la famille des cytokines  $\alpha$ -hélicoïdales qui contient l'IL-6, le leukemia inhibitory factor (LIF) et l'oncostatine-M (Bazan, 1991). Le CNTF ne contient pas de site de glycosylation et sa structure tridimensionnelle putative est un ensemble de quatre hélices alpha antiparallèles (Kruttschger et al., 1995) (**Fig. 4A**).

Le CNTF ne possède pas de séquence signal consensus qui permette une libération par la voie classique du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi (Stockli et al., 1989) et on lui a attribué un rôle de facteur de lésion, qui n'est libéré que lorsque la membrane plasmique est rompue (Adler, 1993; Sendtner et al., 1994). Chez le poulet, la libération du CNTF est indépendante de la voie de sécrétion par le réticulum (Reiness et al., 2001), ce qui suggère que des modes 'non-conventionnels' de libération du CNTF pourraient se produire.

#### b. Profil d'expression du CNTF

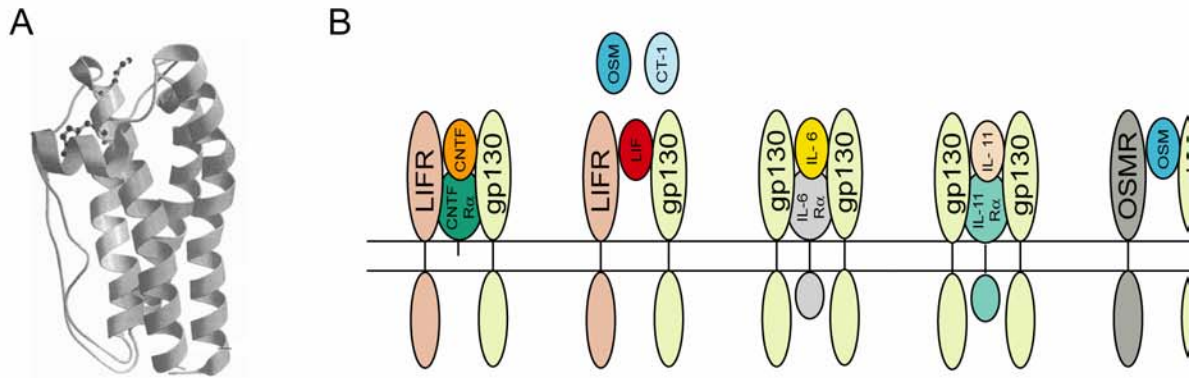
Le CNTF est exprimé exclusivement dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) (Sendtner et al., 1994). L'ARNm et la protéine du CNTF sont exprimés en plus grande quantité au niveau des nerfs périphériques, du bulbe olfactif et du nerf optique (Stockli et al., 1991; Sendtner et al., 1994). Dans les autres régions du SNC, le CNTF est faiblement exprimé en conditions basales (Stockli et al., 1991). Au niveau cellulaire, le CNTF est exprimé par les astrocytes et les cellules de Schwann (Sendtner et al., 1994). La quantité de CNTF détectable augmente significativement après une lésion aiguë ce qui est en accord avec son rôle de 'facteur de lésion'. La quantité d'ARNm du CNTF est aussi augmentée (Ip et al., 1993a), ce qui suggère qu'il existe une régulation de l'expression du CNTF en réponse à une atteinte cérébrale (voir § C-2, pour plus de détails sur l'induction du CNTF en conditions pathologiques).

Chez le rat, le CNTF est quasiment indétectable pendant le développement embryonnaire et le niveau d'expression des ARNm de CNTF atteint son niveau définitif quatre semaines après la naissance (Stockli et al., 1989; Sendtner et al., 1994).

### *c. La voie de signalisation du CNTF*

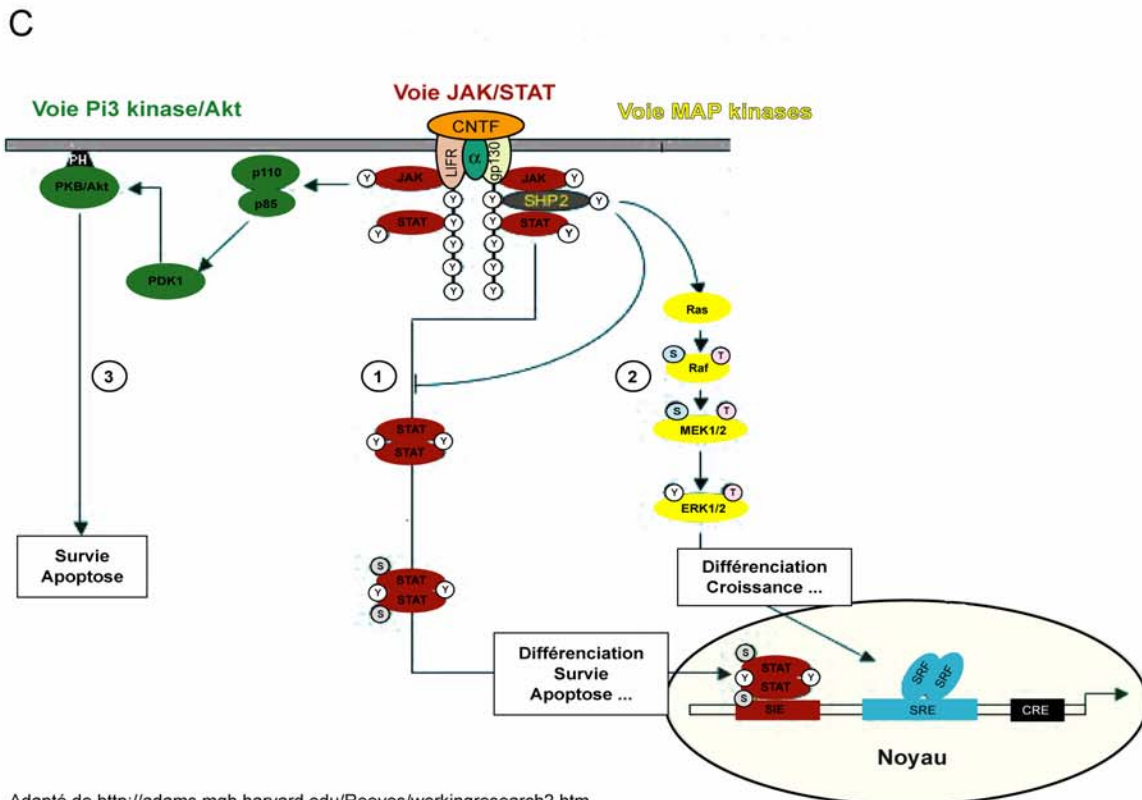
Le CNTF se fixe sur un récepteur tripartite composé de gp130, du récepteur  $\beta$  au LIF (LIFR $\beta$ ) et du récepteur  $\alpha$  au CNTF (CNTFR- $\alpha$ ) (Stahl et Yancopoulos, 1994). Gp130 et LIFR $\beta$  sont des récepteurs partagés avec d'autres cytokines comme l'IL-6 et le LIF (**Fig. 4B**). Le CNTF se fixe d'abord sur son récepteur spécifique CNTFR- $\alpha$ , et le complexe s'associe avec gp130 puis LIFR $\beta$ . La janus kinase (JAK) est constitutivement liée à gp130 qui la phosphoryle quand le complexe ligand-récepteur est formé (**Fig. 4C**). Phospho-JAK phosphoryle à son tour gp130 et LIFR $\beta$  qui deviennent des sites d'ancrage pour les protéines contenant un domaine SH2, comme les facteurs de transcription 'signal transducers et activators of transcription' (STAT3 majoritairement et STAT1) (Turnley et Bartlett, 2000). STAT3 et STAT1 sous forme phosphorylée forment alors des homo ou des hétérodimères et entrent dans le noyau où ils activent l'expression d'un ensemble de gènes dont le promoteur contient la séquence consensus TTN<sub>(5)</sub>AA (Bonni et al., 1993). L'expression du gène de la GFAP et des IEG *vip*, *tis-11*, *SOCS-3* et *c-fos* est ainsi activée par CNTF (Rao et al., 1992; Kahn et al., 1997; Kelly et al., 2004). SOCS3 est un inhibiteur de la voie JAK-STAT qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la voie (Wang et Campbell, 2002). Le CNTF peut aussi activer la voie des mitogen activated protein (MAP) kinase et de la PI3 kinase (Alonzi et al., 2001; Dolcet et al., 2001; Kuroda et al., 2001)(**Fig. 4C**). Ces deux voies de signalisation classiques ont des effets extrêmement variés comme le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation et de la survie (Brunet et al., 2001; Chen et al., 2001).

Le CNTFR- $\alpha$  est exprimé au niveau du SNC et des muscles squelettiques (Davis et al., 1991). Le CNTFR- $\alpha$  n'a pas de domaine de transduction intracellulaire, il est ancré dans la membrane par un groupement glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) qui peut être clivé par une phospholipase C spécifique (PiPLC), ce qui produit une forme soluble du récepteur (Davis et al., 1993). En conditions basales, CNTFR- $\alpha$  est majoritairement exprimé par les neurones (Ip et al., 1993b), bien qu'une expression astrocytaire ait été observée chez la souris (Dallner et al., 2002) et que les astrocytes de rat en culture présentent des sites de liaison spécifiques et fonctionnels pour le CNTF (Alderson et al., 1999). Les astrocytes réactifs surexpriment CNTFR- $\alpha$  (voir §C-2). Gp130 et LIFR $\beta$  ont une expression ubiquitaire et sont exprimés dès le stade blastocyste du développement embryonnaire (Nichols et al., 1996).



Kruttgen et al. (1995) *Biochem. J.* **309** : 215-220

Adapté de Turnley et Bartlett (2000) *Journal of Neurochem.*  
Stahl et Yancopoulos (1994) *Journal of Neurobiol.*



Adapté de <http://adams.mgh.harvard.edu/Reeves/workingresearch2.htm>

#### Figure 4. Le CNTF

**(A) Structure tridimensionnelle du CNTF.** Le CNTF est une protéine de 23kDa composée de quatre hélices  $\alpha$  antiparallèles. **(B) Le récepteur tripartite de CNTF.** Le CNTF se lie au composant du récepteur (CNTFR $\alpha$ ) qui lui est spécifique. CNTFR $\alpha$  est une protéine sans domaine de transduction intracellulaire qui est attachée à la membrane par une ancre GPI. Les autres éléments du récepteur, LIFR $\beta$  et gp130 sont des récepteurs partagés avec d'autres cytokines comme le LIF, la cardiotropine 1 (CT-1), l'oncostatine M (OSM) l'IL-6 et l'IL-11. **(C) La voie de signalisation de CNTF.** La liaison de CNTF à son récepteur induit la phosphorylation des récepteurs LIFR $\beta$  et gp130 et de la kinase JAK, qui phosphoryle de nombreux substrats intracellulaires. Les 5 sites de phosphorylation de ces récepteurs servent de site d'ancrage pour des protéines à domaine SH2 comme STAT ou SHP2. (1) STAT3 et STAT1 se lient aux sites de phosphorylation des récepteurs et se font eux-mêmes phosphoryler par JAK. Phospho-STAT3 et phospho-STAT1 forment des dimères et entrent dans le noyau où ils induisent la transcription de nombreux gènes cibles dont le gène de GFAP et les IEG. (2) L'activation de SHP2 au niveau du récepteur gp130 active la cascade de la voie des MAP kinases qui a des effets très variés et peut activer la transcription de certains gènes dans le noyau. (3) JAK active aussi la voie Pi3 kinase/Akt qui contrôle de nombreuses fonctions intracellulaires et favorise la survie cellulaire. NB : Seules les voies majoritaires ont été représentées, par exemple CNTF peut aussi induire l'activation de la kinase mTOR.

#### *d. Les expériences de knock-out: un autre ligand endogène pour le CNTFR- $\alpha$ ?*

Les souris invalidées pour le gène du CNTF n'ont pas de phénotype majeur, elles présentent une diminution transitoire du nombre de motoneurones faciaux entre quatre semaines et six mois après la naissance (-30%), ainsi qu'une légère atrophie cellulaire (Masu et al., 1993). En revanche, les souris invalidées pour le gène du CNTFR- $\alpha$  ont de graves déficits, ne présentent pas le réflexe moteur de succion et meurent quelques heures après la naissance (DeChiara et al., 1995). De plus, ces souris présentent une diminution de 27 à 50% du nombre de motoneurones à la naissance alors que le nombre de neurones sympathiques est normal. Cette différence flagrante de phénotype entre les souris invalidées pour le CNTF ou son récepteur, suggère qu'il existe un autre ligand endogène pour le CNTFR- $\alpha$ , qui aurait un rôle important, en particulier au cours du développement embryonnaire quand CNTF n'est pas exprimé. Le groupe de Gascan a ainsi mis en évidence deux ligands endogènes potentiels : le complexe formé par la cardiotrophin like cytokine (CLC) et la cytokine-like factor 1 (CLF) (Elsou et al., 2000) et la neuropoïétine (Derouet et al., 2004).

Le CNTF n'est donc pas un facteur neurotrophique 'classique' comme le NGF : il n'est pas exprimé pendant les phases critiques du développement embryonnaire cérébral quand se fait la sélection des neurones et des synapses, il n'est pas exprimé par les organes cibles (ex. les muscles) pour favoriser les motoneurones qui les innervent par action rétrograde et il n'est pas présent en quantité suffisante pour véritablement participer au soutien trophique des neurones en conditions normales. Ainsi, la fonction du CNTF paraît être restreinte aux conditions de lésion, au cours desquelles il pourrait participer à l'activation des astrocytes.

## **2. Le CNTF : activateur endogène des astrocytes**

Il est possible de reproduire certaines caractéristiques de l'astrogliose (hypertrophie des astrocytes et surexpression de la GFAP) en exposant des cultures d'astrocytes à du CNTF recombinant (Levison et al., 1998), en injectant du CNTF recombinant dans le cerveau de jeune rat (Kahn et al., 1995) et en surexprimant CNTF par transfert de gène chez le rat adulte (Lisovoski et al., 1997; van Adel et al., 2005). Des souris transgéniques surexprimant le CNTF présentent aussi une astrogliose permanente au niveau du bulbe olfactif et de la moelle épinière (Winter et al., 1995). Ces expériences montrent que le CNTF est un inducteur de l'astrogliose.

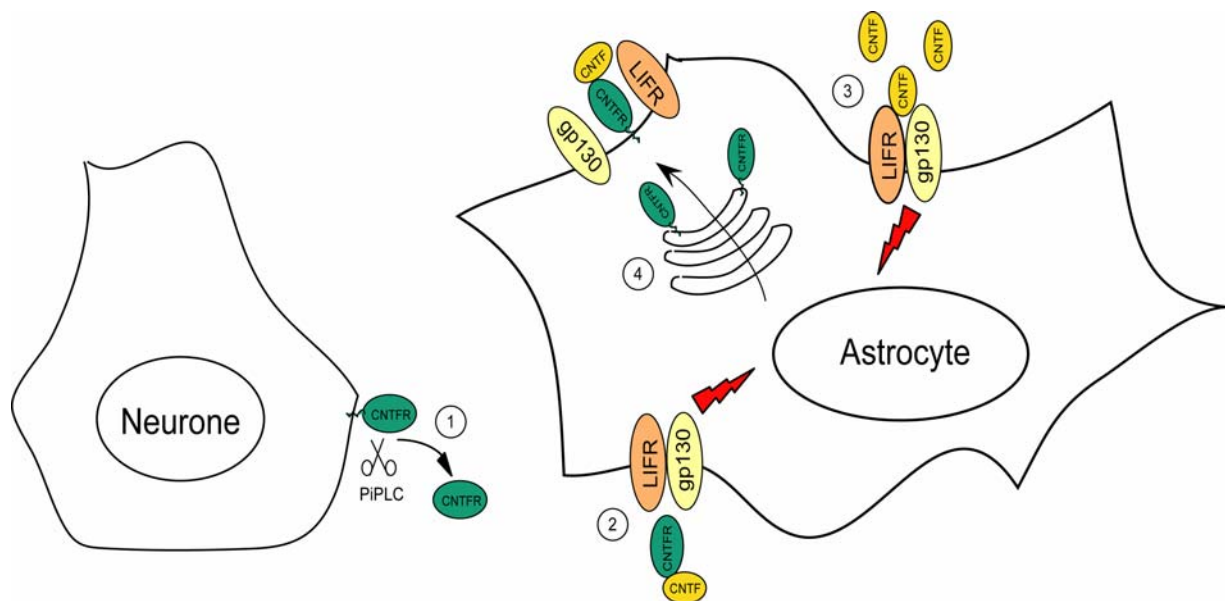
D'autres études se sont intéressées à la participation du CNTF endogène dans l'activation des astrocytes. La quantité de CNTF augmente dans différentes conditions

pathologiques associées à une astrogliose : lésion mécanique (Ip et al., 1993a; Lee et al., 1998) et excitotoxique (Haas et al., 2004). L'expression du récepteur CNTFR- $\alpha$  est induite dans les astrocytes réactifs (Rudge et al., 1994; Lee et al., 1997; Choi et al., 2004). Enfin, l'induction de la voie de transduction JAK-STAT3 est observée dans les astrocytes réactifs en réponse à une axotomie (Xia et al., 2002) et à une lésion neurochimique (Sriram et al., 2004), excitotoxique (Acarin et al., 2000) et ischémique (Justicia et al., 2000). Les astrocytes rendus réactifs par différents stimuli toxiques pour les photorécepteurs de la rétine présentent aussi une activation de la voie JAK-STAT (Peterson et al., 2000). La méthode idéale pour évaluer le rôle du CNTF dans l'induction de l'astrogliose réside dans l'étude de souris invalidées pour le CNTF. Malheureusement, des mécanismes de compensation se mettent en place (surexpression de TGF- $\beta$  et des récepteurs gp130 et LIFR $\beta$  en réponse à une axotomie) et ces souris présentent même une réponse astrocytaire plus rapide (Martin et al., 2003). Le développement de souris dont l'invalidation du gène du CNTF est inducible devrait permettre de préciser son rôle dans l'activation des astrocytes sans qu'il ne soit masqué par la surexpression d'autres cytokines.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats implique clairement le CNTF endogène dans l'activation des astrocytes. Pourtant les astrocytes n'expriment pas fortement le CNTFR- $\alpha$ . Plusieurs mécanismes d'activation sont envisageables (**Fig. 5**). Grâce à la présence de formes solubles du CNTFR- $\alpha$ , il est possible que les astrocytes, qui expriment les autres éléments du récepteur tripartite (LIFR $\beta$  et gp130) puissent répondre spécifiquement au CNTF (Davis et al., 1993). Comme les astrocytes réactifs surexpriment CNTFR- $\alpha$ , ils peuvent acquérir progressivement une sensibilité au CNTF. De plus, le CNTF, s'il est présent en concentration élevée (~ 250 ng/mL soit 11 nM), peut se lier au LIFR $\beta$  et activer les astrocytes (Monville et al., 2001), ce qui constitue une voie alternative d'activation des astrocytes pour le CNTF.

### **3. Le CNTF a des effets neuroprotecteurs variés**

Le traitement avec CNTF protège différentes classes de neurones vis-à-vis de conditions pathologiques extrêmement variées.



**Figure 5. Modes d'action du CNTF dans les astrocytes.**

Les astrocytes qui, en conditions basales n'expriment pas -ou peu- le récepteur CNTFR $\alpha$ , peuvent quand même répondre spécifiquement au CNTF. (1) Le CNTFR $\alpha$  peut-être libéré par la PIPLC de la membrane d'une autre cellule qui exprime le récepteur. (2) Le récepteur soluble CNTFR $\alpha$  peut alors lier le CNTF et activer les astrocytes. (3) Lorsque le CNTF est présent en concentration élevée, il peut se lier au LIFR $\beta$  et à gp130 sans CNTFR $\alpha$ . (4) Les astrocytes réactifs surexpriment le CNTFR $\alpha$  et deviennent donc de plus en plus sensibles au CNTF.

#### *a. Le CNTF et les motoneurones : implication pour la SLA*

Le CNTF, lorsqu'il est injecté *in ovo* chez le poulet (entre E5 et E9), augmente spécifiquement le taux de survie des motoneurones (Oppenheim et al., 1991). Le traitement avec du CNTF favorise la survie des motoneurones en culture (Sendtner et al., 1991), et les protège contre la dégénérescence induite par l'axotomie chez le rat nouveau-né qui est extrêmement sensible à ce type de lésion (Sendtner et al., 1990). Le CNTF améliore les déficits moteurs et les anomalies anatomiques des souris *pmn* et *woobler*, deux modèles classiques de dégénérescence des motoneurones (Sendtner et al., 1992; Mitsumoto et al., 1994). L'équipe de Sendtner a étendu ces démonstrations des effets neuroprotecteurs du CNTF exogène en étudiant le potentiel du CNTF endogène. La libération du CNTF endogène induite par la rupture mécanique des membranes des cellules de Schwann protège les motoneurones des souris *pmn* (Sendtner et al., 1997). Le CNTF a depuis lors été considéré comme un candidat thérapeutique potentiel pour la SLA (voir § E-3-b pour plus de détails sur la SLA). Des essais cliniques ont été entrepris en utilisant la technique d'encapsulation de cellules génétiquement modifiées pour produire le CNTF localement, au niveau des motoneurones de la moelle épinière. Les résultats restent à ce jour très décevants (Aebischer et al., 1996).



### *b. Le CNTF et les neurones du striatum : implication pour la MH*

La première démonstration des effets protecteurs du CNTF vis-à-vis des neurones striataux a été obtenue *in vivo*, dans un modèle excitotoxique de la MH par injection de quinolinate (QA) chez le rat (Anderson et al., 1996, voir § D-4-b pour plus de détails sur la MH). Il s'agissait plus précisément de l'Axokine, qui est obtenue après deux substitutions d'acides aminés et une délétion des 13 acides aminés de la partie C-terminale du CNTF, pour augmenter son efficacité et sa stabilité. Les effets protecteurs du CNTF ou de l'Axokine ont été confirmés dans des modèles primates de la MH (Emerich et al., 1997b; Mittoux et al., 2000). L'utilisation de vecteurs viraux pour surexprimer le CNTF a aussi permis de confirmer des effets neuroprotecteurs à long terme chez le rat (de Almeida et al., 2001; Mittoux et al., 2002; Régulier et al., 2002). Enfin, le CNTF améliore la survie neuronale dans des modèles génétiques de la MH *in vitro* (Saudou et al., 1998; Zala et al., 2005) et normalise le comportement locomoteur de souris exprimant la protéine mutée à l'origine de la MH (Zala et al., 2004). L'ensemble de ces données expérimentales a constitué un argument fort pour utiliser le CNTF en clinique en utilisant des cellules encapsulées génétiquement modifiées pour sécréter le CNTF (Bachoud-Levi et al., 2000). Malheureusement, comme pour la SLA, les résultats cliniques obtenus sont très limités (Bloch et al., 2004; Escartin et al., sous presse).

### *c. Autres cibles neuronales pour le CNTF*

Comme il a été initialement démontré, le traitement avec du CNTF augmente le taux de survie de nombreux types de neurones embryonnaires en culture (voir les références dans, Sendtner et al., 1994). Le CNTF exogène améliore aussi la survie des neurones de la rétine dans différents modèles de rétinopathie (Chaum, 2003). Le CNTF protège les cellules ganglionnaires de la rétine contre un stress oxydatif (Takahata et al., 2003) et les photorécepteurs contre une luminosité de forte intensité (LaVail et al., 1992). Enfin, le CNTF protège de nombreuses classes de neurones contre la dégénérescence rétrograde induite par une axotomie : dans le thalamus (Clatterbuck et al., 1993), la substance noire (Hagg et Varon, 1993) et le septum médian (Hagg et al., 1992).



#### 4. Les autres effets du CNTF

Le CNTF est une molécule pléiotrope, en plus de son potentiel neuroprotecteur et de sa capacité à activer les astrocytes, l'application de CNTF exogène produit des effets variés dans le système nerveux et en périphérie.

##### *a. Le CNTF et les autres cellules gliales : cellules myélinisantes et microglie*

Les effets du CNTF sur l'ensemble des types cellulaires de cerveau y compris les cellules microgliales et les oligodendrocytes ont été décrits.

L'injection intracérébrale de CNTF peut induire une activation de la microglie (Kahn et al., 1995; Levison et al., 1996) et augmenter l'expression des récepteurs CD4 par ces cellules (Hagg et al., 1993).

Le CNTF augmente aussi la prolifération des oligodendrocytes *in vitro* et *in vivo* (Barres et al., 1996). Le CNTF favorise la maturation des oligodendrocytes en culture, améliore leur capacité de myélinisation (Stankoff et al., 2002) et les protège de la mort induite par TNF $\alpha$  (Louis et al., 1993). CNTF est donc un candidat thérapeutique potentiel pour la sclérose en plaque (Linker et al., 2002). Il semble même que le CNTF endogène joue un rôle dans la maturation des oligodendrocytes (qui a lieu après la naissance) car les souris invalidées pour le CNTF présentent un retard de myélinisation et une diminution transitoire du nombre d'oligodendrocytes (Barres et al., 1996).

##### *b. Le CNTF et la différenciation cellulaire*

Bien que le CNTF ne soit pas exprimé au cours du développement, l'application du CNTF sur certains types de cellules en culture modifie leur voie de différenciation.

Le CNTF induit la différenciation des progéniteurs oligodendrocyte-type-2-astrocyte (O-2A) en astrocytes (Hughes et al., 1988). CNTF, en activant la voie JAK-STAT, favorise la différenciation de précurseurs corticaux selon le lignage astrocytaire et inhibe leur différenciation en neurones (Bonni et al., 1997). Des expériences récentes ont montré que FGF2 était nécessaire pour l'effet de différenciation astrocytaire du CNTF. FGF2 induit un remodelage de la structure chromatinienne qui contrôle l'effet pro-transcriptionnel du CNTF, en particulier sur le gène de la GFAP (Song et Ghosh, 2004).

Le CNTF favorise aussi la différenciation en culture des précurseurs de neurones sympathiques noradrénergiques en neurones cholinergiques (Saadat et al., 1989). Le CNTF induit une diminution de l'expression de la tyrosine hydroxylase ; un marqueur des neurones noradrénergiques et augmente l'expression de la choline acétyltransférase, l'enzyme de synthèse du neurotransmetteur acétylcholine.

### *c. Le CNTF dans l'hypothalamus : des effets proches de ceux de la leptine*

Le récepteur du CNTF présente une homologie de séquence avec le récepteur de la leptine, ils induisent les mêmes voies de signalisation intracellulaires et ils sont distribués de façon similaire dans les noyaux de l'hypothalamus. Le CNTF a donc des actions proches de la leptine ; il contrôle l'expression de protéines impliquées dans la régulation de la prise alimentaire comme le neuropeptide Y et la pro-opiomélanocortine (Sleeman et al., 2000; Duff et Baile, 2003). Le CNTF a même un avantage par rapport à la leptine, il produit des effets qui persistent après l'arrêt du traitement et qui sont liés à l'apparition de nouveaux neurones sensibles à la leptine dans l'hypothalamus (Kokoeva et al., 2005).

Le CNTF est donc aussi devenu un candidat pour le traitement de l'obésité, d'autant qu'il a aussi des effets d'activation du catabolisme en périphérie (Duff et Baile, 2003).

### *d. Les effets périphériques du CNTF*

Comme certains organes périphériques expriment le LIFR $\beta$  et gp130, ils sont sensibles à de fortes doses de CNTF. Ainsi, une injection périphérique de CNTF induit l'expression de gènes dits de 'acute-phase response' par le foie et provoque une douleur chronique, de la fièvre, une toux sèche et un amaigrissement (Cedarbaum et al., 1995a; Cedarbaum et al., 1995b).

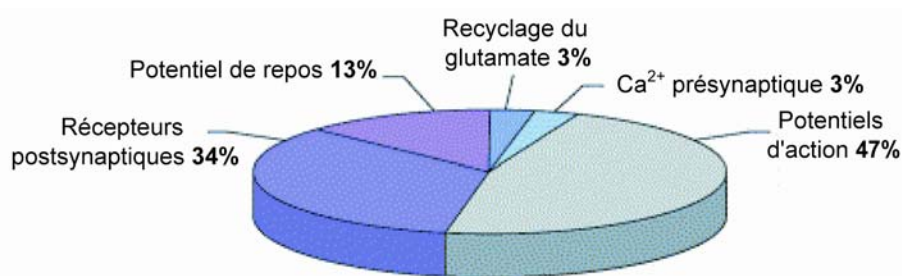
Ainsi, le CNTF a potentiellement des effets extrêmement variés quand il est appliqué de façon exogène. Cependant sa fonction endogène est sûrement limitée à un rôle de facteur de lésion qui améliore la survie des neurones et active les astrocytes, deux effets qui ne sont pas forcément indépendants (voir §B-3).

## D. Le métabolisme énergétique cérébral

### 1. Quelques particularités du métabolisme énergétique cérébral

#### a. Des besoins énergétiques très importants

Le cerveau, qui ne représente que 2% du poids du corps, reçoit 15% du volume sanguin total et consomme 25% du glucose total utilisé par l'organisme. Le cerveau extrait environ 50% de l'oxygène présent dans le sang artériel et 10% du glucose. Le cerveau utilise ainsi en moyenne  $30 \mu\text{mol d'ATP.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$ , ce qui correspond à la consommation du muscle de la cuisse pendant un marathon (Attwell et Laughlin, 2001). Ces besoins énergétiques très importants sont principalement liés à la restauration et au maintien des gradients ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique neuronale, en particulier par la pompe Na/K/ATPase (Attwell et Laughlin, 2001)(**Fig. 6**).



**Figure 6. Le budget énergétique du cerveau**

Adapté de Attwell et Laughlin (2001) *JCBFM* 21 : 1133-1145.

Les synapses excitatrices glutamatergiques sont les plus consommatrices en énergie et environ 90% de l'énergie serait consommée par les neurones (Attwell et Laughlin, 2001).

#### b. Le glycogène : une réserve énergétique limitée

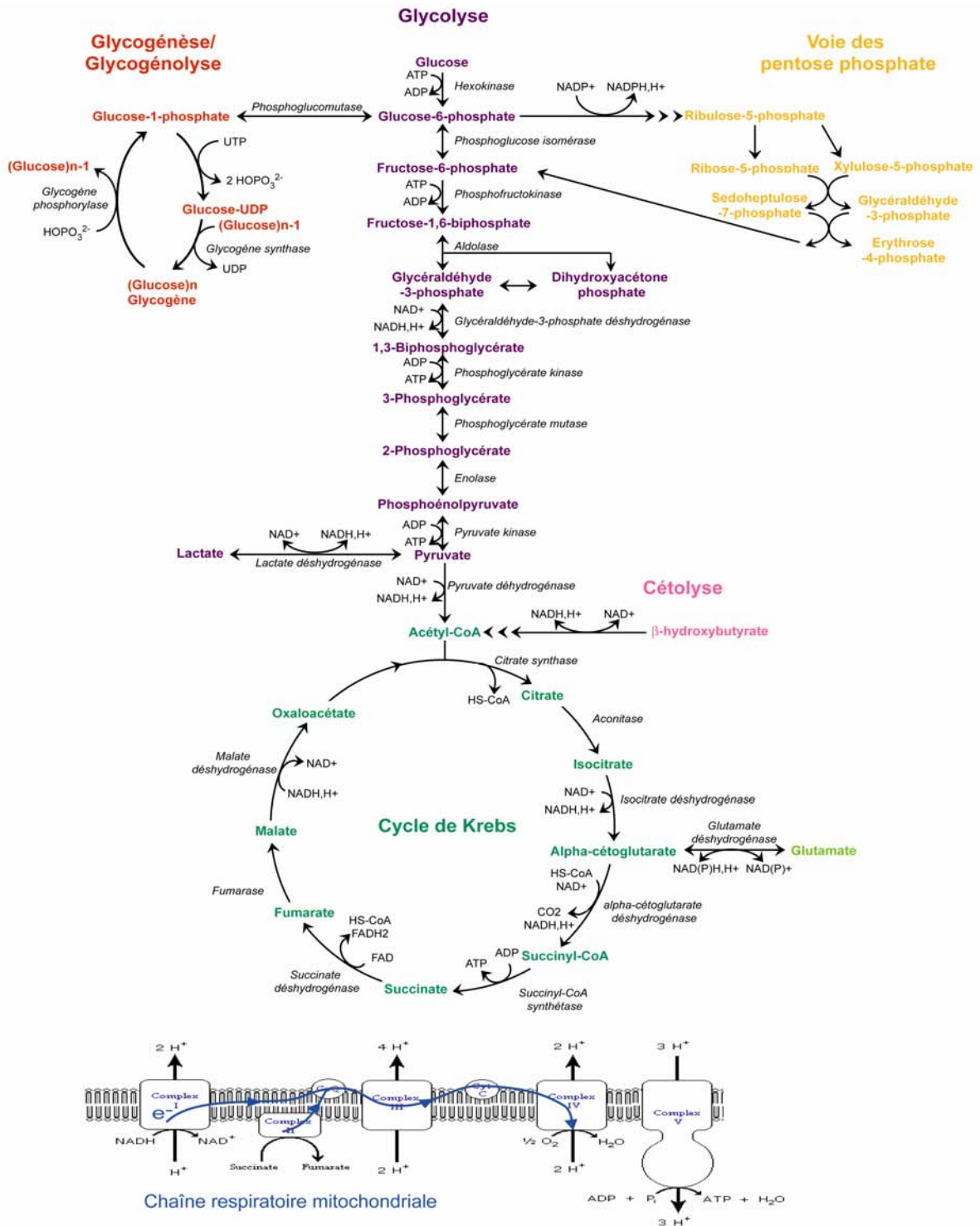
Le cerveau possède une réserve énergétique propre sous forme de glycogène mais elle est limitée puisque le glycogène ne représente que 0,1 % du poids du cerveau (contre 7% dans le foie, Brown, 2004). Le glycogène, qui est un polymère de glucose, est stocké majoritairement dans les astrocytes, sous forme de granules (Cataldo et Broadwell, 1986). Sa dégradation par la glycogène phosphorylase permet de produire du glucose et d'alimenter les neurones en lactate (Brown et al., 2004). Le glycogène est formé en période de 'repos' cérébral (sommeil, anesthésie...) et il est dégradé lors d'une activité cérébrale intense si l'apport de glucose est insuffisant, ou en cas d'hypoglycémie (Brown, 2004). Plus récemment, il a été proposé que la dégradation du glycogène pourrait servir à produire

rapidement de l'énergie pour le recyclage du glutamate dans les astrocytes (Shulman et al., 2001), le stock de glycogène étant restauré secondairement par le glucose provenant de la circulation sanguine. Ainsi, le glycogène peut être considéré comme un 'tampon métabolique'. La glycogénèse et la glycogénolyse dans les astrocytes sont finement régulées : l'AMP, le glucose et certains neurotransmetteurs contrôlent l'activité de la glycogène phosphorylase et la dégradation du glycogène (Magistretti, 1988). A l'inverse, le facteur trophique IGF-1 et la stimulation du récepteur à l'adénosine favorisent la formation du glycogène et son stockage (voir, Wiesinger et al., 1997). Cependant, en l'absence de glucose exogène, le stock de glycogène permet de soutenir le fonctionnement cérébral pendant quelques minutes seulement (Hossmann, 1994; Clarke et Sokoloff, 1999). Ainsi, le cerveau est fortement dépendant de l'apport de substrat énergétique exogène qui est constitué très majoritairement de glucose.

### *c. Le cerveau utilise le glucose comme substrat énergétique quasi-obligatoire*

La mesure de la différence de concentration artério-veineuse de plusieurs métabolites sanguins montre que seul le glucose est utilisé de façon significative par le cerveau. En effet, le quotient respiratoire, calculé à partir des valeurs de consommation d'O<sub>2</sub> et de production de CO<sub>2</sub> par le cerveau ( $QR = n_{CO_2 \text{ produit}} / n_{O_2 \text{ consommé}}$ ), a une valeur très proche de 1, ce qui confirme l'utilisation préférentielle des glucides par le cerveau (Magistretti, 1999). De plus, le ratio entre la consommation cérébrale de glucose et d'O<sub>2</sub> est légèrement inférieur à 6, ce qui montre que le glucose est majoritairement oxydé selon la voie classique de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative mitochondriale (**Fig. 7**). Ce ratio montre également qu'une partie (environ 14%) du glucose consommé par le cerveau n'est pas oxydé (Magistretti, 1999). Ce glucose excédentaire peut suivre d'autres voies métaboliques et participer à la synthèse de glycogène, de neurotransmetteurs (glutamate, GABA) ou de glycoprotéines (Magistretti, 1999). Il est aussi possible que ce glucose non oxydé soit libéré sous forme de lactate ou de pyruvate sans entrer dans le cycle de Krebs. Enfin, une fraction du glucose suit la voie des pentose phosphate qui produit des riboses et du NADPH au fort pouvoir réducteur. Les premiers entrent dans la synthèse des acides nucléiques, les seconds participent à la synthèse des acides gras et au recyclage du glutathion (Magistretti, 1999).

*In vitro*, d'autres métabolites, comme le lactate, le pyruvate, le mannose peuvent subvenir aux besoins énergétiques des neurones (Magistretti, 1999). Cependant, des expériences de perfusion de métabolites dans la circulation sanguine montrent qu'*in vivo*, seul le mannose peut se substituer au glucose pour alimenter le cerveau, car il est le seul à passer facilement la BHE. Le mannose, après deux réactions enzymatiques, est transformé en fructose-6-phosphate qui est un intermédiaire métabolique de la glycolyse, mais le



**Figure 7. Les voies majoritaires du métabolisme énergétique cérébral**

La glycolyse, l'oxydation du pyruvate, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire mitochondriale (oxydation phosphorylative) forment la voie métabolique majoritaire utilisée par le cerveau pour oxyder complètement le glucose. Les points d'entrée alternatifs dans cette voie sont la dégradation du glycogène en glucose-1-phosphate puis glucose-6-phosphate (glycogénolyse), l'oxydation du lactate en pyruvate par la lactate déshydrogénase, l'oxydation du glutamate en  $\alpha$ -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase, l'oxydation des corps cétoniques en acétyl-CoA. Ces trois dernières voies produisent aussi du NADH, H<sup>+</sup> qui alimente la chaîne respiratoire mitochondriale. Le glucose qui ne suit pas la voie d'oxydation complète peut être stocké sous forme de glycogène (glycogénèse), ou suivre la voie des pentoses phosphates qui produit des riboses et du NADPH, H<sup>+</sup>. NB. Pour plus de clarté, les cofacteurs et les réactifs/produits annexes des réactions n'ont pas tous été représentés. De plus, ces réactions sont compartimentées entre les neurones et les astrocytes (voir § II-D). Pour une représentation complète de ces voies, voir Magistretti, 1999.

mannose n'est pas présent dans la circulation sanguine, il ne joue donc sûrement aucun rôle physiologique dans le métabolisme cérébral. En revanche, d'autres métabolites, les corps cétoniques, voient leur concentration augmenter en conditions de jeûne prolongé et traversent la BHE en quantité non négligeable.

## **2. Les corps cétoniques peuvent constituer des substrats énergétiques alternatifs**

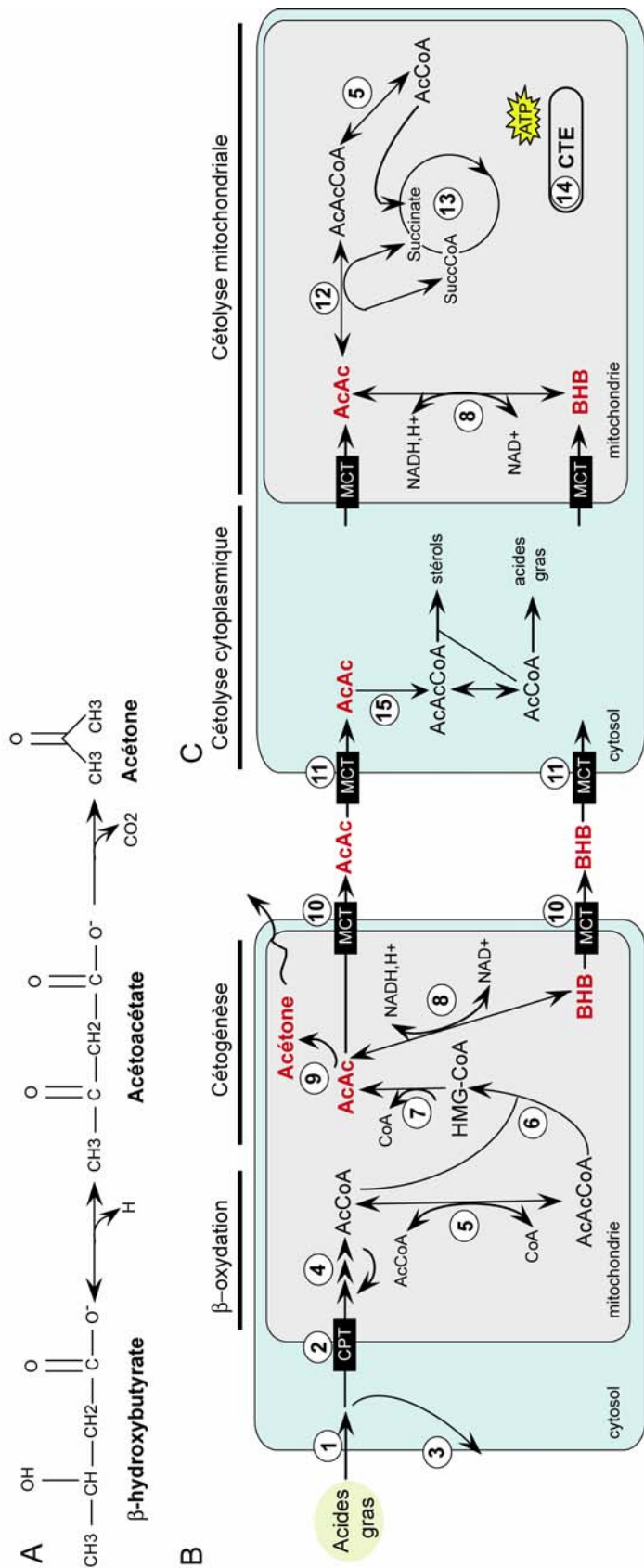
### *a. Les corps cétoniques et la cétogénèse*

#### *- description de la cétogénèse*

Les corps cétoniques (CC) : acétone, acétoacétate (AcAc),  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) sont constitués d'une courte chaîne de 3 ou 4 carbones (**Fig. 8A**). L'acétone qui est volatil, est perdu par l'expiration et n'a pas de rôle métabolique majeur. Les CC sont synthétisés par le foie. La production de CC (cétogénèse) se fait à partir de l'acétyl-CoA qui est issu de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (**Fig. 8B**). L'acétyl-CoA suit la voie irréversible du hydroxy-3-méthylglutarate CoA (HMG-CoA) qui forme l'AcAc (**Fig. 8B**). L'enzyme mitochondriale HMG-CoA synthase (mHS) a un rôle clé dans la cétogénèse, elle est présente en très grande quantité dans le foie, en quantité bien moindre dans le cerveau et elle est complètement absente de nombreux autres organes (Fukao et al., 2004). En revanche, le foie ne possède pas la succinyl CoA : 3-oxoacid-CoA transférase (SCOT), enzyme clé de la dégradation des CC (voir plus bas) et ne peut donc pas les métaboliser. La cétogénèse hépatique produit des CC qui sont libérés dans la circulation sanguine et sont utilisés dans des organes extra hépatiques (Fukao et al., 2004). Le potentiel d'oxydoréduction et le pH du foie favorisent la formation de BHB par la  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH) à partir d'AcAc (il y sept fois plus de BHB libéré dans le sang que d'AcAc). Le BHB étant le produit majoritaire de la cétogénèse hépatique, il est le principal CC utilisé par les organes périphériques (Nehlig, 2004).

Les astrocytes en culture réalisent aussi la  $\beta$ -oxydation des acides gras et sont capables de cétogénèse, mais leur production de CC est sûrement plus limitée que celle des cellules hépatiques (Auestad et al., 1991; Guzman et Blazquez, 2001).





Adapté de Fukao et al. (2004) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70 : 243-251

**Figure 8. Les corps cétoniques (CC)**

(A) **Structure des principaux corps cétoniques**. L'acétoacétate est transformé en  $\beta$ -hydroxybutyrate par une réaction d'oxydoréduction (réversible) et en acétone par une réaction de décarboxylation irréversible. (B) **Cétogénèse**. (1) Les acides gras présents dans la circulation sanguine sont 'activés' dans les cellules hépatiques par l'acyl CoA synthase qui les transforme en acyl CoA à longue chaîne. (2) Une partie de ces acyl CoA à longue chaîne entre dans la mitochondrie grâce à l'action de l'enzyme carnityl palmityl transférase (CPT) pour être oxydé. (3) L'autre partie est utilisée pour la synthèse des triglycérides, des phospholipides, des sphingolipides... (4) Dans la matrice mitochondriale, les acyl CoA à longue chaîne sont oxydés par des tours successifs de la  $\beta$ -oxydation des acides gras (ou hélice de Lyneen). Chaque cycle produit une molécule d'acétyl CoA (AcCoA), une molécule de NADH, de FADH et un acyl CoA avec deux carbones en moins. (5) L'acétoacetyl CoA (AcAcCoA) est formé à partir d'AcCoA par l'acétoacetyl-CoA thiolase mitochondriale T2. A partir de ces deux précurseurs, la cétogénèse hépatique peut avoir lieu. (6) Le 3-hydroxy-3-méthylglutarate CoA (HMG-CoA) est formé par l'action de l'enzyme HMG-CoA synthase (mHS), puis, (7) il est clivé par la HMG-CoA lyase. Ces réactions irréversibles produisent le corps cétonique acétoacétate (AcAc). (8) L'AcAc peut être réduit en  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) par la BHB déshydrogénase ou (9) être décarboxylé en acétone volatili par l'AcAc décarboxylase. (C) **Cétolyse**. (10) Les CC produits sont libérés dans la circulation sanguine par les transporteurs aux monocarboxylates (MCT) et peuvent être utilisés par les tissus extra hépatiques comme le cœur et le cerveau. (11) Les CC entrent dans le cytoplasme, puis dans la mitochondrie par les transporteurs MCT. (8) L'AcAc est réversiblement transformé en BHB ou (12) est transformé en AcAcCoA par la succinyl CoA : 3-oxoacid-CoA transférase (SCOT). (5) Enfin, l'acétoacetyl-CoA thiolase forme l'AcCoA qui peut alimenter le cycle de Krebs (13) puis la chaîne de transport d'électron mitochondriale (CET, 14) pour produire de l'ATP. (15) Les CC peuvent aussi participer à une voie métabolique cytoplasmique de synthèse des lipides et des acides aminés. Cette voie d'anabolisme joue surtout un rôle chez le jeune, pendant la phase de myélinisation. NB. Pour plus de clarté, les cofacteurs et les réactifs/produits annexes des réactions n'ont pas tous été représentés.

#### *- régulation de la céto-genèse*

L'abondance des précurseurs (les acides gras) dans la mitochondrie conditionne l'efficacité de la céto-genèse. Le niveau d'expression de la mHS (protéine et ARNm) est aussi finement régulé et il augmente suite à un régime alimentaire riche en lipides. L'insuline diminue son niveau d'expression, le glucagon ayant l'effet inverse (Eaton et al., 1996; Fukao et al., 2004). De façon générale, la céto-genèse est activée par des états d'hypoglycémie et d'hyperlipidémie. L'augmentation de la production et de l'utilisation de CC en cas de déplétion de glucose plasmatique constitue une réponse évolutive puissante car elle permet d'éviter que ce soit le catabolisme des muscles qui alimente le cerveau (Veech et al., 2001).

En condition de glycémie normale, les CC sont présents en faible concentration dans le sang (~ 10 µM) mais leur taux augmente après un jeûne prolongé, au cours d'un régime riche en corps gras et sans glucide (régime céto-génique) et peut atteindre plusieurs mM (Veech et al., 2001). Une concentration élevée de CC est également observée chez les mammifères nouveaux-nés avant leur sevrage car le lait maternel est très riche en acide gras et favorise la production hépatique de CC. Le taux de CC circulant est aussi variable selon les espèces. Il atteint 7 mM chez l'Homme à jeun, alors qu'il ne dépasse pas 3 mM chez le rat. A l'inverse, durant la période d'allaitement, le jeune rat non sevré présente un taux de CC de 1,5 mM, alors que chez le nourrisson humain il est inférieur à 0,4 mM, car le lait maternel humain est moins riche en lipides (Morris, 2005).

#### *b. Les voies de dégradation des corps cétoniques*

Les corps cétoniques présents dans le sang entrent dans les cellules par les transporteurs aux monocarboxylates (MCT) qui transportent aussi le lactate et le pyruvate (Pierre et Pellerin, 2005). Ils peuvent alors suivre deux voies : voie d'anabolisme dans le cytoplasme et une voie de catabolisme dans la mitochondrie.

#### *- voie cytoplasmique*

Le métabolisme de l'AcAc dans le cytoplasme forme des précurseurs pour la synthèse de certains acides aminés (glutamate, leucine), des lipides (acides gras et stérols, **Fig. 8C**) (Morris, 2005). Dans le cerveau, cette voie joue un rôle important dans les phases précoces du développement post-natal, mais n'est quasiment pas utilisée par la suite. Ainsi, les CC participent à la synthèse des lipides pour la myélinisation qui est intense aux stades précoces de développement (Nehlig, 2004; Morris, 2005).

#### *- voie d'oxydation mitochondriale*

L'oxydation des CC dans la mitochondrie est une source alternative d'énergie. Cette voie est composée de trois réactions linéaires, qui dégradent le BHB en AcAc puis en acéto-



acétyl-CoA pour former de l'acétyl-CoA, (**Fig. 8C**)(Morris, 2005). La dégradation des CC produit donc rapidement de l'acétyl-CoA et du nicotinamide adénine dinucléotide sous forme réduite (NADH, H<sup>+</sup>) qui peuvent alimenter le cycle de Krebs et le complexe I de la chaîne mitochondriale, respectivement. Les trois enzymes de la voie, BDH, SCOT et acétoacétyl-CoA thiolase T2 sont mitochondriales et sont présentes dans de nombreux organes, y compris dans le cerveau (Page et Williamson, 1971). Ces enzymes sont exprimées par l'ensemble des cellules nerveuses, les astrocytes exprimant les plus forts taux de SCOT et de T2 (Chechik et al., 1987).

### *c. Mise en évidence de l'utilisation des corps cétoniques par le cerveau*

#### *- utilisation des corps cétoniques chez l'adulte*

La première mise en évidence de consommation de CC remonte à 1967. La mesure des différences artérioveineuses des CC sur trois patients obèses mis à jeun pendant 5-6 semaines permit de conclure que les CC pouvaient représenter jusqu'à 60% de la consommation énergétique du cerveau (Owen et al., 1967). En réalité, le cerveau utilise les CC comme substrat énergétique dans différentes conditions de cétogenèse (Sokoloff, 1973). La technique de tomographie par émission de positons (TEP) en utilisant du BHB marqué au <sup>11</sup>C, a permis d'évaluer à 0,5 nmol.min<sup>-1</sup>.mL<sup>-1</sup>, la consommation des CC en conditions de jeûne prolongé (Blomqvist et al., 1995). Elle est hétérogène mais dans une moindre mesure que le glucose. Chez le rat, les plus forts taux d'utilisation sont observés dans le cortex, le colliculus et les régions dépourvues de BHE (glande pinéale...) et les plus bas dans le corps calleux, et les structures profondes (striatum...)(Hawkins et Biebuyck, 1979).

#### *- utilisation des corps cétoniques au cours du développement*

Les CC représentent surtout un substrat énergétique important chez les mammifères avant le sevrage. Ainsi, on observe une consommation importante de <sup>14</sup>C-BHB par le cerveau de jeunes rats non sevrés (Nehlig et al., 1991), qui représente plus de 30% de l'apport énergétique cérébral de ces rats (Cremer, 1982).

### *d. Régulation de l'utilisation cérébrale des CC*

Il existe différents niveaux de régulation de la consommation cérébrale des CC : l'entrée des CC dans le parenchyme cérébral et le niveau d'expression /d'activité des enzymes de la voie de cétolyse (Nehlig, 2004; Morris, 2005).

#### *- régulation de l'entrée des CC dans le parenchyme cérébral*

L'entrée des CC dans le cerveau est directement proportionnelle à la concentration sanguine de CC chez le jeune rat ou le rat adulte en conditions cétogéniques (Hawkins et al., 1971). Ainsi, c'est la concentration sanguine de CC qui semble être le facteur limitant dans l'utilisation cérébrale des CC (Nehlig, 2004). Les états cétogéniques (jeune non sevré, régimes cétogéniques, jeûne) favorisent donc directement l'utilisation des CC par le cerveau. Cependant, chez l'Homme, qui présente des taux de CC plus élevés, l'oxydation des CC dans le cerveau pourrait devenir le facteur limitant plutôt que le transport qui augmente linéairement avec un  $K_d$  de 13,9 mM (Nehlig, 2004; Morris, 2005). L'AcAc entre deux fois plus rapidement que le BHB dans le cerveau (Hawkins et al., 1971).

Dans une moindre mesure, la quantité des transporteurs MCT peut influencer la quantité de CC entrant dans le cerveau. Différentes isoformes existent, les cellules endothéliales expriment MCT1, les astrocytes MCT1 et MCT2 et les neurones MCT2 (Pellerin et al., 1998). C'est le niveau d'expression du transporteur endothélial qui semble le plus soumis à la régulation. Les transporteurs endothéliaux sont exprimés plus fortement chez le jeune non sevré que chez l'adulte (25 fois plus, chez le rat, Leino et al., 1999), ce qui rend la BHE sept fois plus perméable aux CC (Moore et al., 1976). Par ailleurs, l'expression endothéliale de MCT1 peut être augmentée d'un facteur 8 par un régime cétogénique prolongé (Leino et al., 2001) ce qui va de pair avec une augmentation de la perméabilité aux CC (Moore et al., 1976).

Les transporteurs astrocytaires et neuronaux semblent moins sujets à des modifications de leur niveau d'expression. En particulier, leur expression ne diminue pas significativement après le sevrage, ce qui est sûrement lié au fait qu'ils ont un autre rôle physiologique d'importance: le transfert de lactate entre les neurones et les astrocytes (Pellerin et al., 1998, voir §C-3-a). Des différences plus locales sont observées, le niveau d'expression de MCT1 au niveau des pieds astrocytaires est plus important chez le rat de 17 jours par rapport à l'adulte (Leino et al., 1999). Enfin, une équipe a mis en évidence qu'un régime cétogénique prolongé augmentait l'expression des MCT dans le neuropile (Leino et al., 2001). *In vitro*, l'expression des transporteurs est aussi régulée par certains neurotransmetteurs comme la noradrénaline (Pour une revue complète du sujet se référer à Pierre et Pellerin, 2005).

#### *- régulation des enzymes de la voie de cétolyse*

La régulation des enzymes de la voie des CC n'a lieu qu'au cours du développement. Les enzymes de la voie de cétolyse cytoplasmique sont exprimées le plus fortement à la naissance et leur expression diminue ensuite pour atteindre 25-50% du taux initial (Morris, 2005). Les niveaux d'expression de la BDH, la SCOT et la thiolase T2 augmentent à partir

de la naissance, atteignent leur niveau maximal avant le sevrage (5 fois le niveau initial) et baissent ensuite (Nehlig, 2004; Morris, 2005). La BDH est plus fortement exprimée dans le cortex (Bilger et Nehlig, 1992), ce qui coïncide avec le niveau d'utilisation des CC. Chez l'adulte, les états cétogéniques n'induisent pas d'augmentation détectable de l'expression ou de l'activité des enzymes de la voie dans le cerveau, c'est le cas lors d'un régime cétogénique (Middleton, 1973) ou d'un jeûne prolongé (Williamson et al., 1971).

Il est généralement admis que ces enzymes sont en quantité suffisante pour ne pas constituer un facteur limitant (Morris, 2005). Pourtant, sur des tranches d'hippocampe, le BHB peut se substituer efficacement au glucose et maintenir un fonctionnement neuronal normal, seulement si les tranches proviennent de jeunes rats, âgés de moins de 30 jours (Wada et al., 1997; Izumi et al., 1998). Ce qui suggère que les CC sont des substrats énergétiques adaptés pour le cerveau mais, dans certaines conditions, les enzymes de la voie de cétolyse peuvent être limitantes pour leur utilisation cérébrale. Le contrôle de l'utilisation cérébrale des CC est donc peut-être plus complexe qu'une simple régulation par l'abondance du substrat dans le sang. C'est clairement le cas pour d'autres substrats énergétiques comme le glucose, dont la consommation est très finement régulée par des mécanismes complexes dans lesquels les astrocytes jouent un rôle non négligeable.

### **3. Les astrocytes au cœur des régulations métaboliques cérébrales**

Le métabolisme énergétique cérébral se caractérise par une forte hétérogénéité, qui est encore amplifiée en période d'activité cérébrale. Les zones de forte activité neuronale ont un métabolisme actif et des besoins énergétiques plus importants. Il existe différentes formes de couplage qui permettent d'accroître l'apport et la production d'énergie en réponse à une augmentation de l'activité neuronale. Ces couplages servent de base à l'imagerie TEP des zones d'activité cérébrale, qui mesure l'augmentation de consommation de glucose marqué ou l'augmentation de débit sanguin en utilisant de l'eau marquée (Bonvento et al., 2002). De plus, l'équipe de Raichle a montré que le métabolisme dans les zones d'activation cérébrale après une stimulation visuelle était transitoirement non-oxydatif (Fox et al., 1988). Ainsi, la consommation d'oxygène dans la zone d'activation est plus faible que celle du glucose, et une augmentation relative du taux d'oxygénation de l'hémoglobine est effectivement mesurable. La technique d'imagerie par blood oxygenation level dependence couplée à l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (BOLD-IRMf) se base sur cette caractéristique, en mesurant le signal paramagnétique de la déoxyhémoglobine. Ces mécanismes de couplage ont donc une grande importance physiologique (pour alimenter les neurones actifs, 'gourmands' en énergie) et technique puisqu'ils sous-tendent des signaux

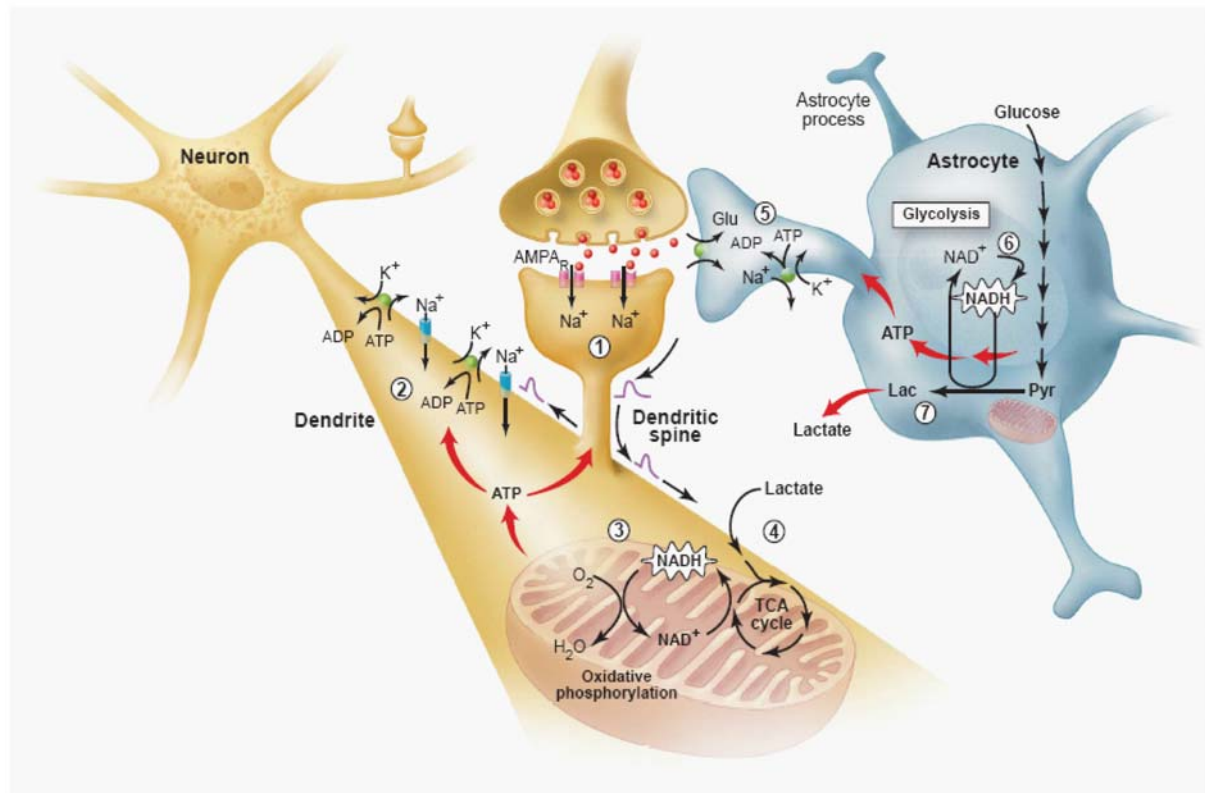
classiquement utilisés en recherche fondamentale et en clinique. Des données récentes montrent que les astrocytes, qui ont une position stratégique à l'interface entre les vaisseaux et les neurones et qui contrôlent le débit sanguin local, joueraient un rôle majeur dans ces couplages.

#### *a. couplage neuro-métabolique*

Le couplage neuro-métabolique permet de répondre à l'activité synaptique par une activation du métabolisme pour augmenter la production d'énergie. Selon le mécanisme 'classique' de couplage, c'est le déficit énergétique dans les neurones qui active la glycolyse et favorise l'entrée accrue de glucose dans les neurones, à travers GLUT3, le transporteur neuronal au glucose. Ainsi, les neurones contrôleraient directement leur apport énergétique (mécanisme de couplage neuronal). Pourtant, de nombreuses données expérimentales suggèrent que les astrocytes pourraient être des acteurs clés du couplage neuro-métabolique. Selon les travaux de Magistretti et Pellerin, le mécanisme de couplage est le suivant (voir plus loin **Fig. 9**) : la recapture de glutamate libéré aux synapses par les transporteurs astrocytaires s'accompagne d'une entrée de  $\text{Na}^+$ , qui est cotransporté avec le glutamate (voir § E pour les transporteurs au glutamate). L'accumulation de  $\text{Na}^+$  dans le cytoplasme astrocytaire active la pompe Na/K/ATPase pour restaurer les gradients ioniques. Le fonctionnement de la pompe Na/K/ATPase crée un déficit en ATP, et une augmentation d'ADP, d'AMP et de  $\text{P}_i$ , ce qui active la glycolyse et augmente la consommation et l'entrée de glucose dans les astrocytes par le transporteur GLUT1. La glycolyse produit deux molécules d'ATP par molécule de glucose, qui sont utilisées pour la pompe Na/K/ATPase et pour la réaction de transamination du glutamate en glutamine. La glutamine est recyclée vers le neurone pour réapprovisionner son stock de neurotransmetteur (cycle glutamate-glutamine). Le lactate qui est le métabolite terminal de la glycolyse astrocytaire est transféré vers les neurones par les transporteurs MCT, pour soutenir leurs besoins énergétiques accrus (Pellerin et Magistretti, 1994; Magistretti et al., 1999).

Le rôle clé des transporteurs astrocytaires au glutamate dans le couplage neuro-métabolique a été confirmé par des expériences *in vivo* avec des souris invalidées pour l'un ou l'autre des transporteurs. Dans ces souris la réponse métabolique (i.e. augmentation de consommation de glucose) à une stimulation sensorielle (Voutsinos-Porche et al., 2003) ou visuelle (Herard et al., 2005a) est réduite. Cependant cette hypothèse reste l'objet d'une vive controverse (Chih et al., 2001; Pellerin et Magistretti, 2003; Hertz, 2004). Les critiques visent principalement deux aspects de l'hypothèse : la nature majoritairement glycolytique des astrocytes et l'utilisation préférentielle du lactate d'origine astrocytaire (par rapport au glucose sanguin) par les neurones (pour une revue complète des arguments expérimentaux et des critiques de l'hypothèse, voir Gladden, 2001). La caractérisation des voies

métaboliques (oxydative ou glycolytique) préférentielle de chaque type cellulaire reste difficile *in vivo*.



Pellerin et Magistretti (2004) *Science* **305** : 50-52

### Figure 9. Le couplage neuro-métabolique

(1) La libération de glutamate à la synapse active les récepteurs post-synaptiques au glutamate et induit une réponse post-synaptique qui se traduit par une dépolarisation au niveau de l'épine dendritique. (2) La dépolarisation peut se propager le long du dendrite par le biais des canaux sodium voltage-dépendants, ce qui active la pompe Na/K/ATPase et accroît la demande énergétique. (3) L'énergie nécessaire est produite au niveau des mitochondries neuronales par le biais de la phosphorylation oxydative qui consomme du NADH. (4) La mitochondrie est réalimentée en NADH par l'activation du cycle de Krebs (TCA cycle) qui oxyde le lactate extracellulaire produit par les astrocytes. (5) En parallèle, la recapture de glutamate libéré à la synapse par les transporteurs astrocytaires, induit une augmentation du Na<sup>+</sup> intracellulaire et une activation de la pompe Na/K/ATPase dans les astrocytes. (6) L'activité de la pompe est alimentée par une consommation accrue de glucose par les astrocytes. Le glucose subit la glycolyse et produit du NADH. (7) Le NADH est recyclé en NAD au cours de la réaction catalysée par la lactate déshydrogénase. Ceci évite un ralentissement de la glycolyse et produit du lactate qui est libéré pour restaurer le stock extracellulaire et maintenir une activité neuronale durable. Ainsi, la recapture du glutamate constitue le signal déclenchant l'augmentation de la consommation de glucose.

Des expériences récentes réalisées grâce à de nouvelles techniques d'imagerie par fluorescence (imagerie confocale de cellule unique et microscopie biphotonique) montrent en tous cas qu'il existe une compartimentation du métabolisme énergétique cérébral entre les neurones et les astrocytes. Dans des cultures mixtes d'hippocampe de rat, le glutamate induit une augmentation de la consommation de glucose dans les astrocytes par l'intermédiaire d'une augmentation de l'activité du transporteur au glucose GLUT1 (Loaiza et al., 2003). L'effet inverse est observé dans les neurones avec une inhibition de la

consommation de glucose par un mécanisme dépendant des récepteurs au glutamate de type alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate (AMPA, Porrás et al., 2004). De plus, l'analyse des formes réduites du NAD sur des tranches d'hippocampe de rat mettent en évidence une dégradation rapide ('dip') du NADH, H<sup>+</sup> dans les dendrites des neurones (i.e. métabolisme oxydatif) et une production retardée ('overshoot') de NADH, H<sup>+</sup> dans les astrocytes qui témoigne d'un métabolisme glycolytique (Kasischke et al., 2004). Cette étude a apporté un changement chronologique dans l'hypothèse de couplage proposée par Pellerin et Magistretti : les neurones oxydèrent d'abord le lactate (= dip de NADH, H<sup>+</sup>) puis seraient réapprovisionnés en substrat énergétique par la glycolyse astrocytaire (= overshoot de NADH, H<sup>+</sup>) (Pellerin et Magistretti, 2004a) (**Fig. 9**). En condition d'activation neuronale, une diminution transitoire (~ 10s) du taux de lactate a été mise en évidence par une mesure enzymatique rapide. Le taux de lactate est ensuite restauré dans les 20s, parallèlement à une augmentation de la consommation de glucose (Hu et Wilson, 1997). Une modélisation mathématique montre que l'explication la plus probable à ces observations réside dans l'utilisation préférentielle du lactate par les neurones lors de l'activation cérébrale (Aubert et al., 2005). Ces résultats soulignent l'importance du lactate comme substrat énergétique cérébral. Il faut noter qu'un tel mécanisme de couplage ne semble pas se produire avec les synapses inhibitrices (Chatton et al., 2003). Il est assez probable que le mécanisme de couplage (astrocytaire ou neuronal) dépende de la structure cérébrale considérée et du type de stimulus utilisé, et que la situation réelle soit un mélange entre ces deux formes de couplage (Gladden, 2001; Pellerin et Magistretti, 2003).

### *b. couplage neuro-vasculaire*

Le couplage neuro-vasculaire définit la stricte corrélation spatiale et temporelle entre l'activité neuronale et l'augmentation du débit sanguin cérébral. Les premiers mécanismes proposés pour expliquer cette 'hyperémie fonctionnelle' (qui permet d'adapter l'apport en nutriments - glucose, O<sub>2</sub> - aux besoins neuronaux et d'améliorer l'élimination des déchets métaboliques) font intervenir les neurones directement. Les perturbations associées à l'activité neuronale (augmentation de K<sup>+</sup> extracellulaire, acidification du milieu) ou l'activité neuronale elle-même (libération de neurotransmetteurs, de NO) peuvent créer une vasodilatation et augmenter le débit sanguin cérébral (Iadecola, 2004).

Plus récemment, les recherches sur la régulation du flux sanguin cérébral se sont tournées vers les astrocytes et le glutamate (Bonvento et al., 2002). Les récepteurs métabotropiques des astrocytes sont activés par la libération synaptique de glutamate et induisent un influx calcique qui se propage jusqu'aux pieds astrocytaires. A ce niveau, le calcium active la production de molécules vasoactives par la cyclooxygénase (Zonta et al., 2003). Ce mécanisme permet de coupler directement l'activité glutamatergique à l'apport

sanguin. Un mécanisme opposé a aussi été décrit, où l'augmentation intracellulaire de calcium dans les astrocytes provoque l'émission d'eicosanoïdes et la constriction des artérioles (Mulligan et MacVicar, 2004). Ces différences sont sûrement liées aux conditions expérimentales et notamment au tonus vasculaire présent en conditions basales. Dans tous les cas, ces résultats témoignent du rôle clé de l'astrocyte comme intermédiaire entre l'activité synaptique et le contrôle du débit sanguin.

### *c. couplage neuro-barrière*

Comme les pieds astrocytaires forment une barrière de diffusion pour les métabolites sanguins, les propriétés de perméabilité et de transport des astrocytes, c'est-à-dire le niveau d'expression et l'efficacité des différents transporteurs (GLUT au glucose, MCT aux monocarboxylates...) vont fortement conditionner l'apport en substrat énergétique dans le parenchyme cérébral. Ce niveau de régulation du métabolisme cérébral par les astrocytes, appelé couplage 'neuro-barrière' a récemment été l'objet d'une revue (Leybaert, 2005). Ainsi, de nombreuses molécules induisent une surexpression ou une translocation du transporteur GLUT-1 à la membrane endothéliale ou astrocytaire. La modulation du transport peut aussi passer par un changement d'activité de GLUT1, comme il a été démontré après application de glutamate en culture (Loaiza et al., 2003). Cette étape de contrôle de l'entrée des métabolites (qui est réalisée par les cellules astrocytaires et endothéliales) n'est pas forcément bien connue mais peut influencer fortement le statut métabolique du cerveau en évitant que l'entrée de glucose ne soit l'étape limitante dans la production d'énergie (Barros et al., 2005).

## **4. Déficits métaboliques et pathologies**

Le fait que le cerveau ait des besoins énergétiques importants (qui correspondent à 90% à des besoins neuronaux, Attwell et Laughlin, 2001) et peu de réserve le rend très vulnérable à des dysfonctions métaboliques.

### *a. Atteinte énergétique aigue : conditions ischémiques*

La meilleure illustration de la vulnérabilité énergétique des neurones est l'accident vasculaire cérébral (AVC), lorsque l'apport sanguin est interrompu dans un territoire cérébral. Les conséquences de l'AVC sont le plus souvent dramatiques, avec dans 40% des cas, des séquelles neurologiques sévères et irréversibles, liées à la dégénérescence neuronale massive dans la zone de l'infarct. Les AVC représentent ainsi la troisième cause de mortalité en Occident et la première cause d'invalidité permanente acquise (Burst, 1985). L'arrêt de

l'afflux sanguin dans le territoire irrigué par le vaisseau est causé par une occlusion ou une hémorragie. Dans tous les cas, il y a un déficit en ATP au cœur de la zone d'infarct après quelques minutes seulement. Comme ce sont les mécanismes de restauration des gradients ioniques qui consomment le plus d'énergie, ils sont perturbés en premier. Une forte dépolarisation est observée, avec pour conséquence la libération massive de neurotransmetteurs (en particulier le glutamate, voir § E-3-b), des flux ioniques (propagation d'une dépolarisation anoxique de  $K^+$ , influx calcique...), œdème, perturbation de l'intégrité cellulaire et finalement activation de voies de mort cellulaire. Les mécanismes conduisant à la mort et/ou la souffrance neuronale en conditions d'ischémie sont bien plus complexes que cette cascade linéaire d'évènements. L'excitotoxicité, le stress oxydatif, l'inflammation, les dépolarisations péri-infract et des mécanismes apoptotiques jouent chacun un rôle délétère (pour une revue complète et récente de la physiopathologie de l'ischémie voir, Lo et al., 2003; Mergenthaler et al., 2004). Il est intéressant de constater que les neurones, qui sont des cellules excitables avec un fort métabolisme oxydatif, sont très dépendants de l'apport extérieur en énergie, contrairement aux astrocytes qui résistent beaucoup mieux à ces conditions (Giffard et Swanson, 2005). Quand on considère le large éventail de leurs fonctions en conditions physiologiques, il est très probable que les astrocytes aient un impact sur la gravité de l'AVC (Swanson et al., 2004; Nedergaard et Dirnagl, 2005). Les astrocytes peuvent par exemple, dans les phases initiales, alimenter les neurones en énergie en dégradant leur glycogène, réguler les concentrations de certains ions et du glutamate extracellulaire (mais voir aussi § E-3-b), et plus tardivement détoxifier les ROS qui sont formées en quantité lors de la reperfusion. Là encore, en conditions pathologiques, on constate l'importance des relations neurones-astrocytes pour la fonction et la survie neuronale (Swanson et al., 2004; Nedergaard et Dirnagl, 2005).

#### *b. Atteinte énergétique chronique : les maladies neurodégénératives*

De nombreuses maladies neurodégénératives comme la MP, MA, MH et la SLA ont une composante énergétique, avec une implication des dysfonctions métaboliques dans la physiopathologie (Beal, 1998, 2000). Dans tous ces exemples, la dysfonction métabolique n'est pas forcément la cause primaire de la maladie. En particulier pour la MH et les formes génétiques de la MA, MP et SLA, la mutation d'un gène unique a été identifiée, et ce gène n'est pas directement impliqué dans le métabolisme énergétique. Néanmoins, les dysfonctions métaboliques jouent certainement un rôle aggravant non négligeable. Nous prendrons ici l'exemple de la MH, car elle est caractérisée par une dégénérescence des neurones du striatum, structure cérébrale dans laquelle l'ensemble des expériences suivantes a été réalisé. De plus, le CNTF est un candidat thérapeutique potentiel pour la MH (cf. § C-3-b).



La MH est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. La mutation responsable de la maladie consiste en une expansion de triplet CAG codant pour la glutamine dans la partie N-terminale du gène de la huntingtine (htt) (The Huntington's disease study group, 1993). La fonction de la htt est mal connue, elle pourrait avoir un rôle dans la transcription, le transport vésiculaire et la signalisation intracellulaire (Humbert et Saudou, 2001). Les patients présentent un hypométabolisme précoce (baisse de la consommation de glucose et d'oxygène) dans le striatum, la structure qui présente la perte neuronale la plus massive (Kuwert et al., 1990). Les patients présentent également une baisse du taux de N-acétyl-aspartate, un intermédiaire métabolique, et de phospho-créatine (Sanchez-Pernaute et al., 1999), alors que le taux de lactate augmente (Jenkins et al., 1993). Les patients présentent une baisse de l'activité striatale de la pyruvate déshydrogénase, de l'aconitase au niveau du cycle de Krebs (-70%) et de la chaîne oxydative mitochondriale (complexe II-III/succinate déshydrogénase, SDH -55% et complexe IV-cytochrome oxydase) (Browne et Beal, 2004). Il est d'ailleurs possible de reproduire les lésions histopathologiques de la maladie (i.e. dégénérescence préférentielle du striatum avec une perte massive des neurones de projection GABAergiques et préservation relative des interneurons) en injectant de façon systémique un inhibiteur irréversible de la SDH, l'acide 3 nitropropionique (3NP). L'intoxication au 3NP reproduit chez le rongeur et le primate non-humain de nombreux symptômes caractéristiques de la maladie (hyperkinésie puis hypokinésie, dystonies, déficits cognitifs de type frontaux...) (Brouillet et al., 1995; Palfi et al., 1996). De nombreuses anomalies mitochondriales sont d'ailleurs associées à la mutation de la htt (voir, Brouillet et al., 2005): baisse de capacité à tamponner le calcium, baisse du potentiel transmembranaire, sensibilité aux stimuli apoptotiques (Sawa et al., 1999; Panov et al., 2002). La htt mutante, au contraire de la htt sauvage, s'associe avec la mitochondrie (Panov et al., 2002). De plus, la htt interagit avec de nombreuses protéines, dont certaines sont liées au métabolisme énergétique et cette interaction est modulée par le nombre de répétitions de glutamine présentes sur la htt (Harjes et Wanker, 2003; Li et Li, 2004). Enfin, des molécules comme la créatine et le coenzyme Q10 qui améliorent le statut métabolique des neurones striataux, ont des effets neuroprotecteurs significatifs dans des modèles phénotypiques et génétiques de la maladie (Matthews et al., 1998; Ferrante et al., 2000; Ferrante et al., 2002). Il existe donc tout un faisceau d'arguments pour attribuer un rôle majeur aux déficits métaboliques dans la dégénérescence neuronale de la MH. De tels arguments (hypométabolisme régional, atteinte mitochondriale et parfois modélisation de la maladie par inhibition métabolique) existent aussi dans la MP, la MA et la SLA (Beal, 1998, 2000). Dans tous les cas, il ne s'agit bien sûr pas d'un mécanisme pathologique unique, la MH étant vraisemblablement multifactorielle (Voir, Humbert et Saudou, 2001 et; Beal et Ferrante, 2004, pour la MH). Des déficiences dans la gestion du glutamate extracellulaire,

principal neurotransmetteur excitateur, semblent également avoir un rôle délétère non négligeable dans ces pathologies.

## E. Le glutamate et les transporteurs au glutamate

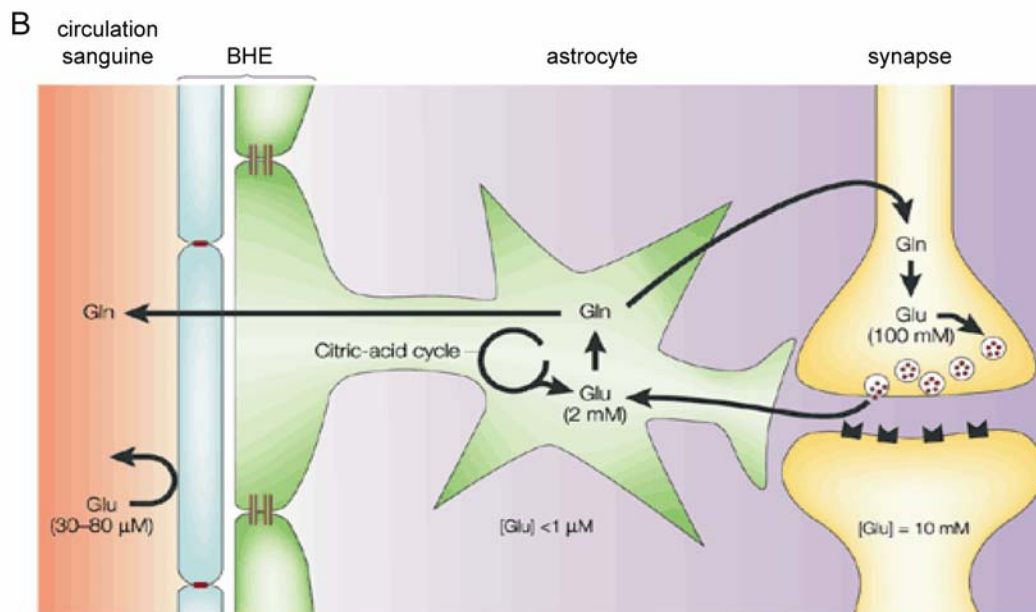
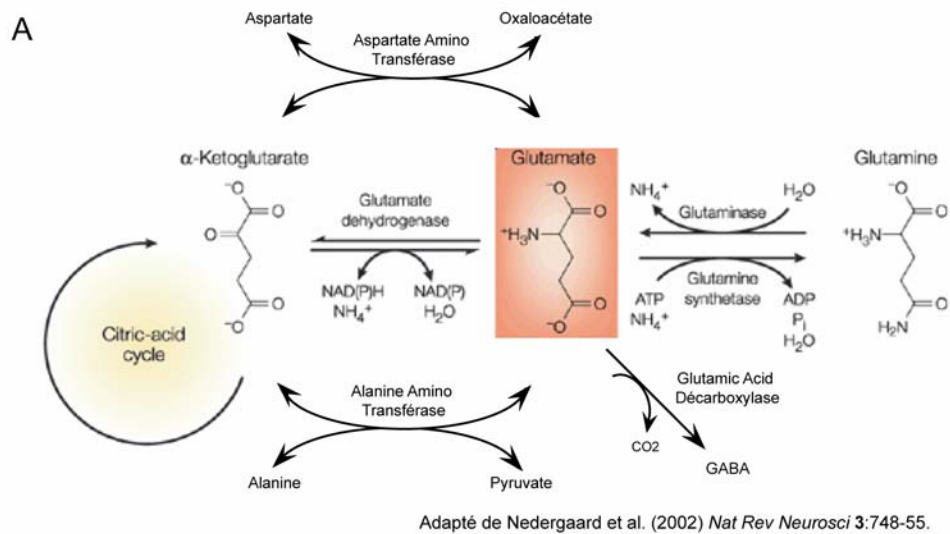
### 1. Le glutamate

#### a. *Le glutamate est un intermédiaire métabolique*

Le L-glutamate est un acide aminé qui entre dans la composition des protéines. C'est aussi un intermédiaire métabolique qui est impliqué dans plusieurs flux importants pour le fonctionnement cérébral comme le cycle de Krebs et le cycle glutamate-glutamine (**Fig. 10A**). Le glutamate intracellulaire peut être oxydé en  $\alpha$ -cétoglutarate, un intermédiaire du cycle de Krebs, par trois enzymes : la glutamate déshydrogénase (GDH), l'alanine amino-transférase et l'aspartate amino-transférase (Magistretti, 1999). Cette voie conduit à l'oxydation complète du glutamate et produit de l'énergie. Le glutamate perdu peut être resynthétisé *de novo* dans les neurones et les astrocytes à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate. Dans les astrocytes, le cycle de Krebs est réalimenté en  $\alpha$ -cétoglutarate par l'oxaloacétate produit par la pyruvate carboxylase (Hertz et Zielke, 2004). Les astrocytes fournissent aussi aux neurones de l' $\alpha$ -cétoglutarate et de l'alanine qui leur permettent de réaliser leur propre synthèse de glutamate (Magistretti, 1999). Enfin, les astrocytes sont les seules cellules à transformer le glutamate en glutamine grâce à leur enzyme glutamine synthase. Cette réaction consomme une molécule d'ATP par molécule de glutamate et permet le recyclage du glutamate vers les neurones qui l'utilisent comme neurotransmetteur. Le flux relatif du glutamate entre ces différentes voies dépend des conditions expérimentales et reste controversé, mais ces observations soulignent l'importance des astrocytes dans la régulation de la concentration cérébrale de glutamate.

#### b. *Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur*

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritaire du SNC (Fagg et Foster, 1983), il participe à un tiers des synapses excitatrices et il joue un rôle important dans l'apprentissage, la mémoire et dans de nombreuses fonctions cognitives (McEntee et Crook, 1993). On distingue deux grandes classes de récepteurs au glutamate : les récepteurs ionotropiques qui forment un canal cationique transmembranaire et les récepteurs « métabotropiques » qui possèdent 7 segments transmembranaires et sont couplés aux protéines G (Heath et Shaw, 2002). Les récepteurs ionotropiques sont divisés en trois sous-types d'après leurs caractéristiques pharmacologiques. On distingue les récepteurs de type AMPA, kaïnate et N-méthyl-D-Aspartate (NMDA), qui sont nommés d'après leur agoniste spécifique. Les propriétés électrophysiologiques de ces récepteurs dépendent du type sous-unités qui les composent (Burnashev, 1996).



### Figure 10. Le glutamate

(A) Les voies métaboliques principales du glutamate dans le cerveau. Le glutamate peut entrer dans le cycle de Krebs (Citric-acid cycle) après avoir été oxydé par la glutamate déshydrogénase. Les transférases peuvent récupérer le groupement amine du glutamate et le transférer au pyruvate ou à l'oxaloacétate pour donner respectivement de l'alanine et de l'aspartate. Le glutamate peut être décarboxylé en GABA par la GAD. Enfin, dans les astrocytes, le glutamate est aussi transformé en glutamine par la glutamine synthase.

(B) Répartition du glutamate dans le cerveau. Le glutamate est très peu abondant dans le milieu extracellulaire (quelques  $\mu$ M) alors que sa concentration atteint 100 mM au niveau de la terminaison synaptique. Le glutamate est plus abondant dans le cytoplasme des neurones que dans celui des astrocytes. Le glutamate présent dans le sang ne passe pas la BHE.

Les récepteurs métabotropiques sont aussi divisés en trois groupes. Les récepteurs du groupe I (mGluR1 et 5) sont couplés à la phospholipase C et induisent une libération du calcium depuis le réticulum endoplasmique. Les récepteurs du groupe II (mGluR2 et 3) et du

groupe III (mGluR4, 6, 7 et 8) inhibent l'adénylate cyclase et diminuent la quantité d'AMPc intracellulaire (Heath et Shaw, 2002).

Il existe un stock intracellulaire important de glutamate (autour de 5 mM dans les neurones et de 100 mM au niveau présynaptique et 2-3 mM dans les astrocytes) alors que sa concentration dans le milieu extracellulaire est à un niveau extrêmement faible, de l'ordre de quelques  $\mu\text{M}$  (**Fig. 10B**)(Nedergaard et al., 2002). Dans les capillaires sanguins cérébraux, le taux de glutamate est sensiblement plus élevé, autour de 30-80  $\mu\text{M}$ . Le pool de glutamate utilisé comme neurotransmetteur représente environ 20% de la quantité totale intracellulaire de glutamate. Seuls des mécanismes de régulation efficaces et finement contrôlés peuvent expliquer de telles différences dans la concentration en glutamate entre les compartiments cérébraux. Il s'agit entre autre de la recapture du glutamate par les transporteurs membranaires à haute affinité.

## 2. Les transporteurs au glutamate

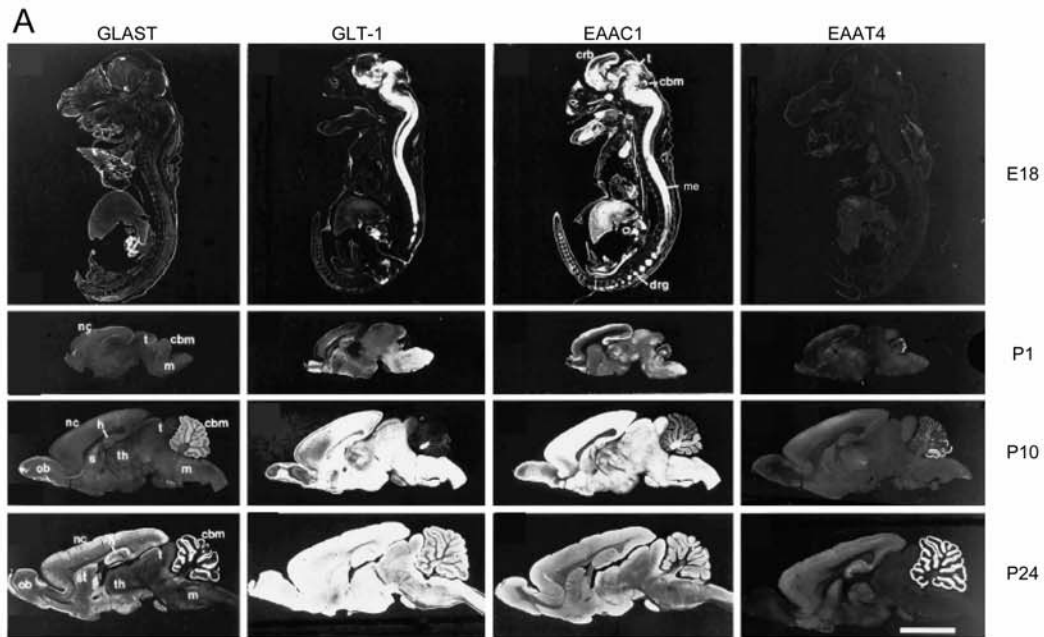
Il existe plusieurs types de transporteurs au glutamate: les transporteurs intracellulaires (vésiculaires et mitochondriaux), les échangeurs cystine/glutamate et les transporteurs à haute affinité, localisés au niveau de la membrane plasmique (Danbolt, 2001). Nous ne traiterons ici que des transporteurs à haute affinité.

### *a. La famille des transporteurs au glutamate*

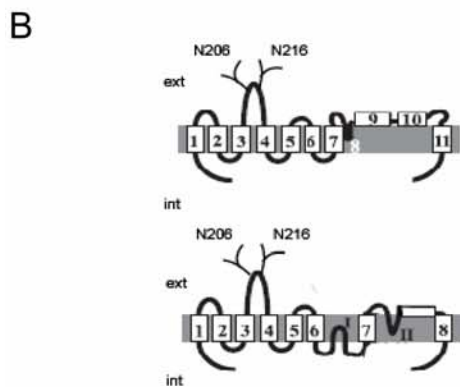
Cinq transporteurs au glutamate (excitatory amino acid transporter, EAAT) ont été identifiés à ce jour chez l'Homme et le Rongeur : EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1) qui sont exprimés majoritairement par les astrocytes, EAAT3 (EAAC1) qui est le transporteur neuronal, EAAT4 qui est exprimé exclusivement par les cellules de Purkinje du cervelet et EAAT5 par les cellules de Müller de la rétine (Danbolt, 2001) (**Fig. 11A**). Contrairement à GLAST, GLT-1 est indétectable avant la naissance et atteint son niveau d'expression définitif après 5 semaines (Ullensvang et al., 1997). GLT-1 est le transporteur astrocytaire le plus exprimé dans le télencéphale, à part dans le cervelet, l'oreille interne et les organes circumventriculaires où GLAST est majoritaire (Danbolt, 2001). Chez l'adulte, GLAST et GLT-1 peuvent être exprimés dans les mêmes astrocytes (Lehre et al., 1995). L'ARNm de GLT-1 est présent dans certains neurones de l'hippocampe et du cortex (Schmitt et al., 1996), mais l'expression neuronale de la protéine est généralement indétectable, sauf en culture, au cours du développement et dans la rétine (Gegelashvili et al., 2001). Cependant, ce sujet reste controversé puisque l'expression de GLT-1 dans les terminaisons synaptiques de l'hippocampe a été rapportée récemment (Chen et al., 2004). Il existe des variants

d'épissage des transporteurs, notamment de GLT-1, appelé GLT-1v. Seuls 11 acides aminés de la partie C-terminale le distinguent de GLT-1 et il est majoritairement exprimé par les neurones (Utsunomiya-Tate et al., 1997; Chen et al., 2002b). Des homologues des transporteurs existent aussi chez les amphibiens, les insectes, les nématodes et même les bactéries (Seal et Amara, 1999). Les transporteurs astrocytaires sont très fortement exprimés ; on estime qu'il y a environ 15 000 transporteurs par  $\mu\text{m}^3$  de tissu au niveau du stratum radiatum de l'hippocampe de rat adulte (Danbolt, 2001).

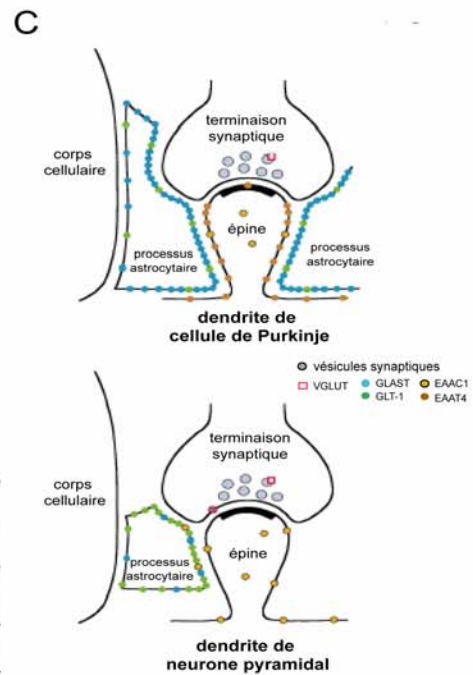
Des expériences d'inactivation ont permis de déterminer l'importance relative de chaque sous-type de transporteur. Dans le striatum, les transporteurs astrocytaires sont responsables de 80% de la recapture du glutamate et ce sont eux qui ont le plus grand impact sur la concentration extracellulaire de glutamate en conditions de repos (Rothstein et al., 1996). L'inactivation permanente de GLT-1 chez la souris augmente le niveau extracellulaire de glutamate, induit des crises d'épilepsie spontanées, aggrave les conséquences d'une lésion corticale aigüe et induit une létalité progressive (Tanaka et al., 1997). Les synaptosomes préparés à partir du cortex de ces souris transgéniques ont une capacité de recapture du glutamate réduite de 95%, ce qui suggère que GLT-1 joue un rôle majoritaire dans le cortex. Les souris invalidées pour GLAST sont plus sensibles aux atteintes cérébelleuses et présentent une mauvaise coordination motrice (Watase et al., 1998). Au final, GLT-1 est responsable de la majorité de la recapture du glutamate dans le télencéphale. Enfin, EAAC1 qui est exprimé par les neurones glutamatergiques et GABAergiques, semble plutôt jouer un rôle métabolique en alimentant les neurones en précurseur pour la synthèse du GABA. L'inactivation de EAAC1 induit des crises d'épilepsie liées à la déplétion en GABA (Sepkuty et al., 2002).



Furuta et al. (1997) *The Journal of Neuroscience* 17 : 8363-8375.



Shigeri et al. (2004) *Brain Research Reviews* 45 : 250-65.



Danbolt (2001) *Progress in Neurobiology* 65 : 1-105.

**Figure 11. Les transporteurs membranaires à haute affinité au glutamate**

(A) Profil d'expression des quatre transporteurs GLAST, GLT-1, EAAC1 et EAAT4 chez le rat. Marquage immunohistologique de sections parasagittales à E18, P1, P10 et P24. Le niveau d'expression de GLAST, GLT-1 augmente au cours du développement. EAAC1 a un niveau d'expression maximal autour de P5-P10. GLAST et EAAT4 sont très exprimés au niveau du cervelet alors que GLT-1 est fortement exprimé dans l'ensemble du système nerveux. EAAC1 est aussi exprimé au niveau de l'intestin et du rein. nc, neocortex; t, tectum; cbm, cervelet ; m, medulla oblongata; ob, bulbe olfactif; s, septum; h, hippocampe; th, thalamus; st, striatum; drg, ganglion de la racine dorsale; me, moelle épinière. Echelle : 5 mm. NB. Ces marquages ont été faits avec des anticorps différents ce qui ne permet pas une comparaison du niveau d'expression entre les différents transporteurs

(B) Topologie des transporteurs au glutamate. Deux modèles de topologie existent, avec chacun six domaines transmembranaires successifs dans la section N-terminale. Les deux modèles diffèrent dans la topologie de la partie C-terminale qui possède aussi deux hélices  $\alpha$ . Les transporteurs possèdent des sites de glycosylation dans les boucles extracellulaires (pour GLAST et GLT-1, les sites sont situés sur l'asparagine (N) 206 et 216.

(C) Répartition subcellulaire des transporteurs. Dans le cervelet, les neurones de Purkinje expriment majoritairement EAAT4 (marron) qui est localisé dans le dendrite, près du site de libération du glutamate. GLAST (bleu) est aussi principalement situé dans les membranes astrocytaires qui font face aux synapses. Au niveau des neurones pyramidaux du cortex, les transporteurs sont majoritairement astrocytaires (GLT-1 (vert) >>GLAST) et sont aussi disposés en face des synapses. EAAC1 (orange) est au niveau pérисynaptique et dans le cytoplasme des neurones en quantité non négligeable.



### *b. Fonctionnement des transporteurs au glutamate*

La recapture du glutamate se fait par transport facilité secondaire : une molécule de glutamate est cotransportée dans la cellule avec 2 ou 3 ions  $\text{Na}^+$ , un ion  $\text{H}^+$  tandis que deux ions  $\text{K}^+$  sont transportés en sens inverse (Danbolt, 2001). Selon la stoechiométrie généralement acceptée de 3  $\text{Na}^+$ , le glutamate peut être accumulé dans la cellule avec un facteur  $10^6$  par rapport au milieu extracellulaire. Le transport est électrogénique (une à deux charges positives nettes entrantes) ce qui le rend mesurable par des techniques d'électrophysiologie. EAAT4 et EAAT5 présentent une importante conductance au chlore, qui est activée par le transport du glutamate mais n'y est pas couplée thermodynamiquement (Ryan et Vandenberg, 2005). Les transporteurs présentent une cinétique classique de Michaelis-Menten avec une affinité ( $K_d$ ) allant de 1 à 100  $\mu\text{M}$  selon le système étudié. Ils transportent aussi le D-aspartate, le L-aspartate et le L-cystéate avec des affinités similaires (Danbolt, 2001). Les transporteurs au glutamate ont un cycle de transport relativement lent ( $\sim 70$  ms), mais la liaison du glutamate est très rapide (quelques ms) ce qui permet de soustraire le glutamate de la fente synaptique (Wadiche et al., 1995).

Les transporteurs astrocytaires au glutamate ont un effet sur la transmission glutamatergique : ils maintiennent une faible concentration extracellulaire de glutamate, raccourcissent la durée des courants NMDA et AMPA, évitent la stimulation de synapses voisines (spillover) et empêchent l'activation de récepteurs métabotropiques au glutamate (Marcaggi et Attwell, 2004). Leur invalidation modifie les propriétés des courants post-synaptiques (Tong et Jahr, 1994).

### *c. Structure des transporteurs au glutamate*

#### *- topologie des transporteurs*

Les transporteurs présentent 50 à 60% d'homologie de séquence en acides aminés. La topologie putative des transporteurs est identique pour les 5 transporteurs, avec au moins six domaines transmembranaires constitués d'hélices  $\alpha$ , et deux sections terminales intracytoplasmiques (Shigeri et al., 2004). La topologie de la partie C-terminale reste débattue, et deux modèles coexistent (**Fig. 11B**). Les transporteurs au glutamate semblent fonctionner sous forme d'oligomère de transporteur de même type. Chez le rat, GLAST, GLT-1 et EAAC1 forment des homotrimères par des liaisons non covalentes qui représentent la forme active (Haugeto et al., 1996). Cette structure quaternaire trimérique s'observe aussi avec le GLT-1 humain et avec son homologue chez *E. Coli*, ce qui souligne l'importance de cette organisation multimérique, conservée au cours de l'évolution (Gendreau et al., 2004).



### - les glycosylations des transporteurs

Les transporteurs au glutamate possèdent tous des sites consensus de glycosylation (Asn-X<sub>AA</sub>-Ser/Thr) sur les boucles extracellulaires (**Fig. 11B**). Il existe deux asparagines glycosylées sur GLT-1 et EAAC1, une sur EAAT5 et trois sur EAAT4. GLAST possède trois sites de glycosylation mais seules les asparagines 206 et 216 sont effectivement glycosylées avec des résidus de type 'hybride' (voir § V-C-1-a et figure 3 de la discussion, Conradt et al., 1995; Schulte et Stoffel, 1995).

Les rares fois où le rôle des glycosylations a été étudié, c'était à l'aide de systèmes d'expression hétérologue (ovocytes de Xénope, lignées de cellules issues de rein). Il est très probable que dans ces systèmes, certains mécanismes de régulation (localisation subcellulaire, interaction avec des protéines spécifiques, voir § 2-e) soient différents de ce qui se produit dans les neurones et les astrocytes de mammifère, les résultats suivants sont donc à considérer avec précaution. Le retrait d'un site de glycosylation sur GLAST par mutagenèse dirigée ne modifie pas ses propriétés de recapture du glutamate mesurées indirectement sur des ovocytes de Xénope par le biais des courants induits par le transport. En revanche, GLAST déglycosylé a une plus faible capacité à former des multimères (Conradt et al., 1995). Avec un autre système d'étude constitué de cellules BHK surexprimant le transporteur GLT-1 de rat, il a été montré que le GLT-1 purifié était moins stable sous forme non glycosylée (Raunser et al., 2005). Cependant, la forme non glycosylée de GLT-1 conservait des propriétés de transport identiques, était bien adressée à la membrane et formait des trimères normalement. Enfin, une autre équipe a rapporté que la mutation de GLT-1 au niveau de l'asparagine 206 diminuait la quantité de transporteur localisé à la membrane de cellules COS7 et d'ovocytes de Xénope, ce qui induisait une diminution du transport mesuré sans changer l'affinité pour le glutamate et le sodium ni perturber la sensibilité à l'inhibiteur spécifique dihydroxykainate (DHK) (Trotti et al., 2001). De plus, ces transporteurs hypoglycosylés fonctionnaient plus facilement en mode réverse et avaient un effet dominant négatif sur les transporteurs GLT-1 sauvages coexprimés dans les mêmes cellules.

Ces rares expériences, parfois contradictoires, suggèrent tout de même que les glycosylations ont un rôle d'adressage et d'assemblage qui est important pour le fonctionnement des transporteurs, sans forcément affecter directement les propriétés intrinsèques du transport.

#### *d. Localisation subcellulaire des transporteurs au glutamate*

*- les transporteurs ne sont pas répartis uniformément dans les cellules*

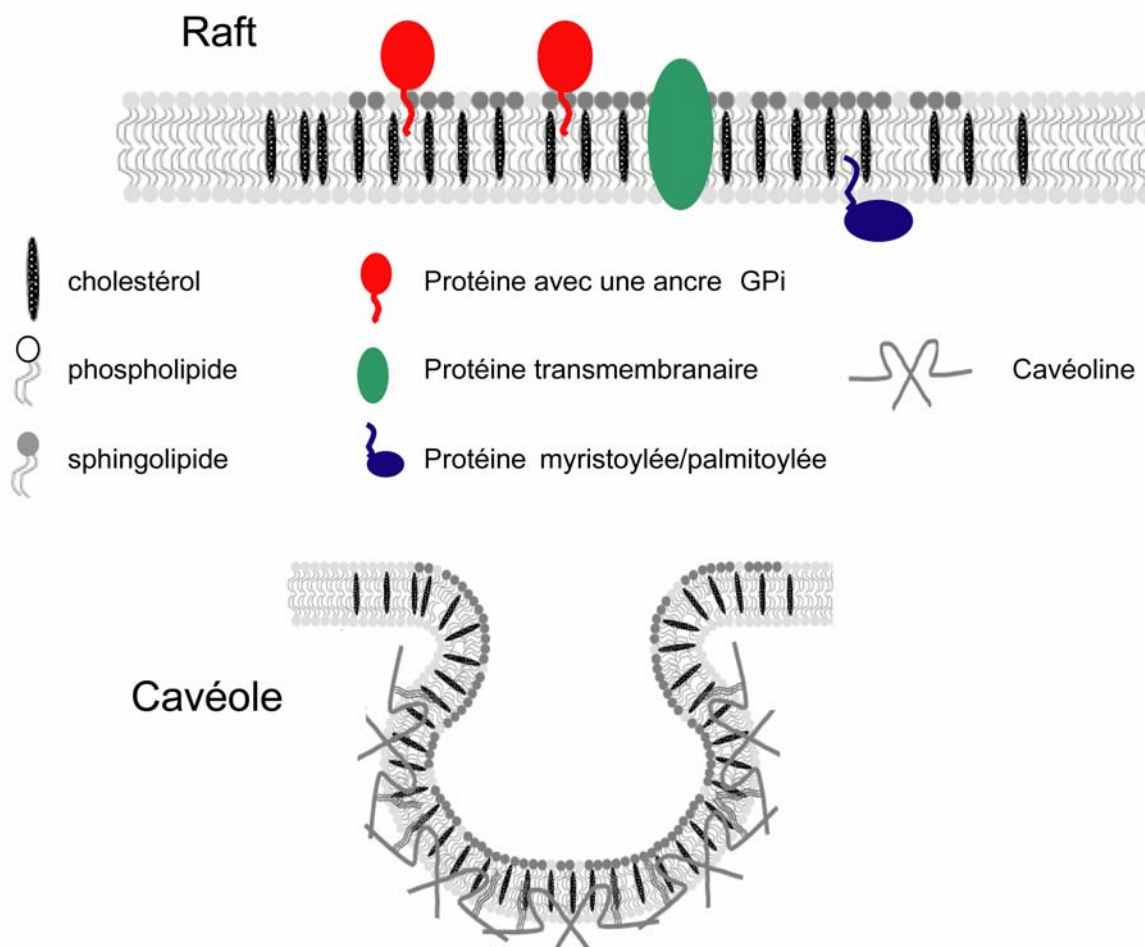
Alors que GLT-1 et GLAST sont situés à près de 90% au niveau de la membrane plasmique, EAAC1 est présent en proportion non négligeable à l'intérieur de la cellule (Danbolt, 2001).

Les transporteurs n'ont pas une répartition homogène à la membrane et forment des 'clusters' (ou amas) *in vivo*. Les amas formés par GLT-1 se colocalisent fréquemment avec des protéines synaptiques (Minelli et al., 2001). En microscopie électronique, GLAST et GLT-1 apparaissent enrichis dans les membranes accolées aux synapses (Chaudhry et al., 1995), EAAT4 et EACC1 sont préférentiellement situés dans les régions dendritiques pérисynaptiques (Furuta et al., 1997b)(**Fig. 11C**). La localisation précise des transporteurs par rapport au site de libération de glutamate a une grande importance pour l'efficacité de recapture (Huang et Bergles, 2004). Plusieurs protéines qui se lient directement aux parties intracellulaires des transporteurs et à des éléments du cytosquelette pourraient participer à la restriction de leur localisation. GLT-1 interagit avec la protéine Ajuba (Marie et al., 2002) et EAAT4 interagit avec les glutamate transporter associated proteins GTRAP41 et GTRAP48 (Jackson et al., 2001). Les protéines du cytosquelette sont aussi importantes pour la formation de 'clusters' dynamiques de GLT-1 à la membrane des astrocytes en culture (Zhou et Sutherland, 2004). Les travaux de Hughes *et al.* illustrent l'importance de l'interaction des transporteurs avec le cytosquelette : les souris invalidées pour le gène de la GFAP présentent une baisse de 25% de la capacité de transport du glutamate dans le cortex et l'hippocampe (Hughes et al., 2004). L'existence de ces clusters suggère que les transporteurs sont rassemblés dans des domaines spécifiques de la membrane. Les rafts constituent un type de domaine fonctionnel membranaire et ont une grande importance pour l'efficacité de transport.

*- les transporteurs sont enrichis dans des microdomaines membranaires : les rafts*

Récemment, l'équipe de Lin a montré que les transporteurs (en particulier GLT-1 et dans une moindre mesure GLAST et EAAC1) étaient enrichis dans les rafts *in vitro* et *in vivo* (Butchbach et al., 2004). Par des techniques immunocytochimiques et biochimiques, Zschocke *et al.* (2005), ont montré que GLT-1 était localisé dans les rafts d'astrocytes en cultures primaires mais pas dans les cavéoles, qui constituent un sous-type particulier de raft (**Fig. 12**). Ces rafts forment des microdomaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides qui constituent des 'plateformes' où certaines protéines sont spécifiquement adressées (**Fig. 12**). Les rafts ont été étudiés en détails dans les neurones, mais l'intérêt porté aux rafts astrocytaires est relativement récent. Les rafts sont impliqués dans de

nombreux processus physiologiques en périphérie (Simons et Toomre, 2000) et dans le système nerveux (guidance axonale, transmission synaptique et signalisation de facteurs neurotrophiques, Tsui-Pierchala et al., 2002). Les rafts ont aussi un rôle dans l'adressage et le tri des protéines membranaires et favorisent la formation de complexes protéiques (Helms et Zurzolo, 2004). Dans le cas des transporteurs au glutamate, il a été démontré que la quasi-totalité de la recapture du glutamate avait lieu au niveau des rafts et que l'intégrité des rafts était déterminante pour le bon fonctionnement des transporteurs (Butchbach et al., 2004), sans que l'on connaisse les mécanismes sous-jacents (voir discussion, § V-C-b).



**Figure 12. Les rafts et les cavéoles**

Les rafts ont une composition lipidique spécifique, avec un enrichissement relatif en cholestérol et en sphingolipides, ce qui leur confère une densité plus basse que le reste de la membrane. De nombreuses protéines sont présentes dans les rafts, en particulier les protéines possédant une ancre GPI. D'autres modifications post-traductionnelles comme la myristoylation et la palmitoylation sont connues pour participer à l'adressage des protéines vers les rafts. Enfin, certaines protéines transmembranaires sont localisées dans les rafts, sans que l'on connaisse leur motif d'adressage. Il existe une sous-classe de rafts appelée 'cavéole' qui présente une forme invaginée caractéristique, à cause de la cavéoline qui impose une courbure à la membrane.

### *e. Les mécanismes de régulation de la recapture de glutamate*

La recapture du glutamate peut être régulée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, mais peut être aussi modulée par des interactions avec des protéines régulatrices ou des changements de localisation subcellulaire. Il existe un très grand nombre d'articles relatifs à ces mécanismes de régulation et il est impossible de les traiter tous ici. Pour plus de détails se référer à (Gegelashvili et Schousboe, 1997; Sims et Robinson, 1999; Danbolt, 2001; Gegelashvili et al., 2001).

#### *- régulation du niveau d'expression des transporteurs*

L'expression de l'ARNm et/ou de la protéine des transporteurs, en particulier GLAST et GLT-1 est augmentée par différents traitements en culture : exposition au dibutyryl AMP cyclique (Schlag et al., 1998) ou à des facteurs de croissance comme l'épidermal growth factor (EGF) et FGF-2 (Figiel et al., 2003). *In vivo*, l'expression des transporteurs astrocytaires est augmentée par les antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactames (Rothstein et al., 2005). Une avancée importante dans la caractérisation de la régulation transcriptionnelle a été faite avec le séquençage du promoteur humain de GLT-1 qui permet de cribler très efficacement l'activité pro-transcriptionnelle de différentes molécules et de caractériser la séquence promotrice impliquée (Su et al., 2003).

L'expression des transporteurs fait intervenir un double contrôle par les astrocytes et les neurones : les neurones produisent des facteurs diffusibles qui augmentent l'expression de GLAST et surtout de GLT-1 (Gegelashvili et al., 1997; Swanson et al., 1997; Figiel et Engele, 2000) et les astrocytes induisent l'expression de EACC1 par les neurones (Canolle et al., 2004).

*In vivo*, le niveau d'expression des transporteurs est modulé par le degré d'innervation, par l'activité électrique et par certains neurotransmetteurs comme la dopamine (Nieoullon et al., 1983; Kerkerian et al., 1987). Le niveau d'expression des transporteurs et l'efficacité de transport sont modifiés après une déafférentation des neurones glutamatergiques mais les effets sont variables selon le type de déafférentation et la voie concernée (Lievens et al., 2000a, et voir les références citées). Ces résultats montrent qu'*in situ*, l'expression des transporteurs est finement régulée et qu'elle s'adapte à de nombreux changements physiologiques et pathologiques de l'environnement.

Néanmoins, ces mécanismes de régulation transcriptionnelle sont relativement longs à se mettre en place (quelques heures pour synthétiser l'ARNm et la protéine), d'autres mécanismes efficaces existent et permettent de s'adapter et de répondre à plus court terme aux stimuli externes.

*- régulation post-transcriptionnelle de l'activité des transporteurs*

Les transporteurs possèdent des sites consensus de phosphorylation pour les kinases PKA et PKC et la Pi3 kinase, dont certains sont conservés sur plusieurs transporteurs (Anderson et Swanson, 2000). Les effets de ces kinases et en particulier de la PKC sont extrêmement variables selon les conditions expérimentales, le transporteur étudié et le type cellulaire (Gonzalez et Robinson, 2004b). Il peut s'agir d'un effet direct sur l'efficacité de transport (Gonzalez et al., 2002) ou bien d'un changement de localisation à la membrane (voir § suivant et Guillet et al., 2005). Les phosphorylations entraînent des changements d'activité qui ont l'avantage d'être extrêmement rapides (15s, Vermeiren et al., 2005).

Les transporteurs sont aussi modulés par l'acide arachidonique, un second messager qui est produit lors d'une activation neuronale. De nouveau, les effets produits sont variables selon le transporteur (Zerangue et al., 1995; Amara et Fontana, 2002).

Enfin, les transporteurs possèdent des cystéines qui peuvent être oxydées en formant des ponts disulfure (Trotti et al., 1997). Ces changements covalents de la structure des transporteurs induisent une baisse d'activité sans changement de Kd. Ainsi, les transporteurs sont sensibles au stress oxydatif ce qui pourrait expliquer des déficits de transport du glutamate dans certaines pathologies associées à un stress oxydatif (Trotti et al., 1998, voir § 3-a).

*- régulation par des interactions protéiques*

L'interaction avec des protéines régulatrices est un mécanisme courant de contrôle de l'activité des transporteurs aux neurotransmetteurs (Gonzalez et Robinson, 2004a). Pour les transporteurs au glutamate, il s'agit d'un domaine très récent de recherche. L'équipe de Rothstein a caractérisé trois protéines appelées 'glutamate transporters associated proteins' (GTRAP) qui interagissent avec les transporteurs. EAAC1 interagit avec GTRAP<sub>3-18</sub> qui réduit son affinité pour le glutamate et diminue le transport (Lin et al., 2001). GTRAP41 et GTRAP48 participent à l'ancrage de EAAT4 à la membrane (Jackson et al., 2001). La PKC $\alpha$  forme un complexe avec EAAC1, qui semble impliqué dans la localisation à la membrane (Gonzalez et al., 2003). Enfin, la septine 2 interagit avec la partie C-terminale de GLAST de façon GDP-dépendante et induit son internalisation (Kinoshita et al., 2004). Ainsi, l'interaction des transporteurs avec des protéines régulatrices apparaît comme un mécanisme général de contrôle de leur localisation subcellulaire qui a un grand impact sur l'efficacité de transport de la cellule.

### *- régulation de la localisation subcellulaire des transporteurs*

Une façon d'accroître rapidement la capacité de transport d'une cellule est d'augmenter la quantité de transporteurs actifs à la membrane, comme c'est le cas pour le transporteur au glucose GLUT4, dans des adipocytes exposés à l'insuline (Pessin et al., 1999). Ce type de régulation existe également pour les transporteurs au glutamate. L'activation de la PKC, de la voie Pi3 kinase et le recrutement à la membrane par le substrat transportable sont les trois mécanismes rapportés à ce jour (Robinson, 2002). EAAC1 est particulièrement sujet à ce type de régulation car il est présent en quantité importante dans le cytoplasme.

La 'réserve' intracellulaire de EAAC1 est rapidement mobilisable à la membrane par un traitement des cellules de la lignée C6 avec du PDGF qui active la voie Pi3 kinase-Akt (Sims et al., 2000) ou par la stimulation de la protéine kinase C (Davis et al., 1998). La PKC a l'effet inverse sur le transporteur GLT-1 en phosphorylant une sérine de la partie C-terminale (Kalandadze et al., 2002). Ainsi, la capacité de transport du glutamate est susceptible d'être régulée dans les deux sens avec un recrutement ou une internalisation des transporteurs. De nouveau, le rôle des différentes kinases dans ces mécanismes sont très variables et dépendent du type de transporteur (pour plus de détails, voir Guillet et al., 2005 et les références citées).

Un mécanisme de régulation assez intrigant est le recrutement des transporteurs à la membrane en réponse au substrat transporté. La quantité de GLAST présent à la membrane d'astrocytes de souris en culture augmente lorsque les cellules ont été prétraitées avec du glutamate. Le mécanisme de recrutement rapide de GLAST dans cette expérience fait intervenir le cytosquelette, indépendamment des récepteurs au glutamate et des voies classiques de signalisation intracellulaire (Duan et al., 1999). Ce type de recrutement dépendant de l'activité du transporteur existe aussi pour le transporteur EAAT4, dans des lignées astrocytaires (Gegelashvili et al., 2000).

L'ensemble de ces observations montre que la localisation membranaire des transporteurs est régulée par des mécanismes très complexes et hautement dynamiques. La localisation subcellulaire des transporteurs a un grand impact sur la capacité de transport du glutamate qui doit être performant pour éviter l'accumulation de glutamate et les phénomènes d'excitotoxicité associés.

## **3. Glutamate et phénomènes d'excitotoxicité**

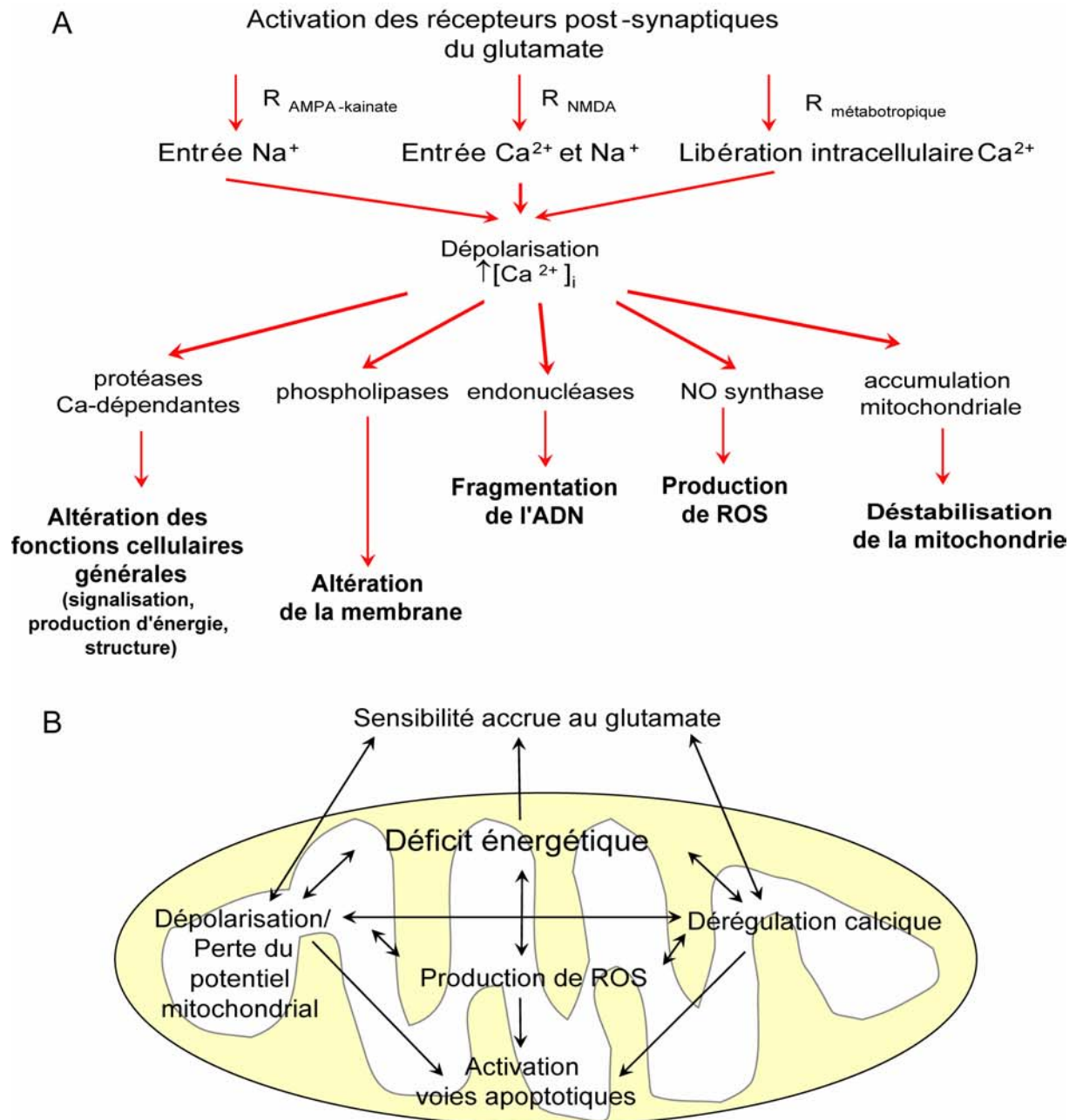
### *a. L'excitotoxicité*

La toxicité potentielle du glutamate a été mise en évidence par les travaux d'Olney. En traitant de façon chronique des souris ou des singes rhésus avec du glutamate, Olney

observa des lésions cérébrales importantes, démontrant que ce neurotransmetteur excitateur engendrait une souffrance neuronale et une mort par un mécanisme qu'il appela excitotoxicité (Olney, 1969; Olney et Sharpe, 1969) en référence aux effets à la fois « excitateurs » et « toxiques » du glutamate. La toxicité du glutamate (et, plus généralement des acides aminés excitateurs et des analogues du glutamate) passe par une stimulation excessive de ses récepteurs qui entraîne un influx important de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui induit une dépolarisation et un gonflement des cellules et active des voies intracellulaires délétères. Parmi les nombreuses molécules activées par le  $\text{Ca}^{2+}$ , on compte des protéases comme la calpaïne, des phospholipases, des endonucléases et la NO synthase, (**Fig. 13A**) (Choi, 1988). Les protéases (calpaïnes, métalloprotéinases, caspases, cathepsines) digèrent sélectivement de nombreuses protéines fondamentales comme les éléments du cytosquelette, des enzymes, des récepteurs. La calpaïne dégrade aussi l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , ce qui crée un cercle vicieux en empêchant l'expulsion du calcium (Bano et al., 2005). Les phospholipases dégradent les lipides membranaires en produisant de l'acide arachidonique, potentiellement toxique. Les endonucléases clivent irrémédiablement l'ADN. La NO synthase produit du monoxyde d'azote qui en s'associant avec les ions superoxydes forme du peroxyde d'azote ( $\text{ONOO}^-$ ) au fort pouvoir oxydant. Par ailleurs, la stimulation excessive des récepteurs ionotropiques au glutamate induit en elle-même une production accrue de ROS.

Dans les phénomènes excitotoxiques aigus, l'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  est l'événement « initial » qui active la cascade excitotoxique, mais la mort neuronale ne se produit qu'à la suite d'une dérégulation calcique irréversible d'origine mitochondriale (Stout et al., 1998). En effet, le calcium en excès est stocké dans la mitochondrie qui a une grande capacité de rétention du  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, l'accumulation intramitochondriale de  $\text{Ca}^{2+}$  perturbe le fonctionnement de la chaîne respiratoire et augmente la production des ROS, ce qui induit la perte du potentiel mitochondrial (et de la force protomotrice), l'ouverture du pore de perméabilité transitoire, l'activation de cascades apoptotiques et la libération du calcium accumulé. Le rôle central de la mitochondrie dans les phénomènes excitotoxiques a été souligné par de nombreuses études (Schinder et al., 1996; White et Reynolds, 1996) (**Fig. 13B**).





**Figure 13. L'excitotoxicité**

(A) La stimulation excessive des récepteurs au glutamate entraîne une augmentation intracellulaire des ions Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. Le calcium a de nombreuses cibles intracellulaires, il active des protéases, des phospholipases, des endonucléases, la NO synthase et déstabilise la mitochondrie qui a une capacité limitée à tamponner le calcium. L'ensemble de ces mécanismes concourt à la mort des neurones.

(B) Au niveau de la mitochondrie, qui participe à de nombreuses fonctions cellulaires, se met en place un cercle vicieux. Par exemple, la dérégulation calcique active la production de ROS qui sont formés en quantité par la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale, au niveau du coenzyme Q/ubiquinone. Les ROS 'attaquent' les enzymes de la chaîne, réduisent la production d'énergie et accroissent en retour la génération des ROS. La baisse d'énergie disponible augmente la dépolarisation cellulaire et mitochondriale et réduit la capacité de stockage du calcium. Les ROS favorisent aussi l'ouverture du pore de perméabilité transitoire dans la membrane mitochondriale, ce qui induit un relargage massif de Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol ainsi que la libération de plusieurs molécules pro-apoptotiques (cytochrome c, Bad...). D'autres cercles d'amplification existent et rendent les neurones encore plus sensibles au glutamate. Ces altérations cellulaires finissent par être irrémédiables et conduisent à la dégénérescence neuronale.



De plus, les atteintes mitochondriales favorisent l'apparition de mécanismes d'excitotoxicité : une inhibition métabolique augmente la sensibilité au glutamate et en aggrave les effets sur les neurones (Beal, 1992). Plusieurs mécanismes sont invoqués (Greene et Greenamyre, 1996): les déficits énergétiques neuronaux induiraient (1) une dépolarisation membranaire qui fait perdre le blocage voltage-dépendant des récepteurs NMDA par le magnésium et les rend plus sensibles au glutamate ; (2) des dérégulations ioniques générales qui perturbent le fonctionnement des neurones et les rendent plus sensibles à une stimulation –même physiologique- par le glutamate, une atteinte mitochondriale qui peut (3) réduire l'efficacité de détoxification des ROS et (4) diminuer la capacité de rétention du  $Ca^{2+}$ . Des résultats obtenus récemment au laboratoire montrent que la dérégulation calcique joue un rôle déterminant dans la potentialisation des effets du glutamate par les déficits métaboliques (Jacquard et al., soumis). Ce phénomène d'excitotoxicité indirecte souligne le lien étroit entre le métabolisme énergétique et le glutamate.

Le glutamate représente donc un danger potentiel pour les neurones mais des mécanismes de défense ont été développés sous forme de systèmes de recapture du glutamate. Ceux-ci sont très efficaces puisque le cerveau est relativement résistant à l'injection intracérébrale de glutamate (Mangano et Schwarcz, 1983). L'inhibition chronique des transporteurs au glutamate induit une mort neuronale par excitotoxicité (Lievens et al., 2000b), ce qui souligne que des déficits de recapture du glutamate peuvent jouer un rôle majeur dans les phénomènes neurodégénératifs.

#### *b. Excitotoxicité et transporteurs au glutamate dans les pathologies cérébrales*

L'excitotoxicité est impliquée dans un très grands nombres de pathologies aiguës (AVC et traumatismes cérébraux) et chroniques (SLA, MH, MA) et pourrait être un mécanisme d'invasion des tumeurs cérébrales. Les transporteurs au glutamate ont une localisation aberrante dans les cellules du gliome et l'échangeur cystine/glutamate y est très actif (Ye et al., 1999). La libération de glutamate par l'échangeur est responsable de crises d'épilepsie et de la nécrose neuronale qui libère de la place pour la croissance de la tumeur (Takano et al., 2001). Des changements du niveau d'expression des transporteurs sont aussi observés chez les malades et dans les modèles animaux de la SLA, de la MH, de la MA, d'ischémie ou d'épilepsie (Gegelashvili et al., 2001; Maragakis et Rothstein, 2001, 2004). Nous ne détaillerons ici que l'exemple d'une atteinte aiguë lors d'un AVC et de la SLA pour laquelle le dysfonctionnement des transporteurs au glutamate est le plus directement impliqué, ainsi que de la MH dans laquelle l'implication des transporteurs est moins démontrée, mais où les processus excitotoxiques jouent clairement un rôle dans la dégénérescence neuronale.

### - L'AVC

Le niveau d'expression de GLT-1, GLAST et de EAAC1 est modifié à la suite d'une ischémie. Selon le type d'ischémie, la structure cérébrale, le transporteur et le type d'analyse effectuée (étude des ARNm ou des protéines), les résultats sont assez variables (voir, Gegelashvili et al., 2001; Maragakis et Rothstein, 2001) .

Mais la participation principale des transporteurs au glutamate à cette situation pathologique se fait sans doute par leur fonctionnement en sens inverse lorsque les gradients ioniques sont fortement perturbés. Lorsque des tranches d'hippocampe sont privées d'apport énergétique, on observe d'abord une diminution de la recapture de glutamate, puis après quelques minutes, une inversion du transport qui compte pour la moitié de l'accumulation extracellulaire de glutamate, l'autre moitié étant la conséquence d'une libération vésiculaire de glutamate qui n'est plus recapturé (Jabaudon et al., 2000). Dans ces conditions, ce sont les transporteurs neuronaux qui s'inversent majoritairement (Rossi et al., 2000) mais des expériences de microdialyse *in vivo* montrent que la réversion de GLT-1 participe à 50% de l'augmentation du taux extracellulaire de glutamate (Seki et al., 1999). Pourtant, la perte d'expression de GLT-1 (mais pas de EAAC1) par une stratégie d'oligonucléotides anti-sens aggrave les effets de l'ischémie (Rao et al., 2001), ce qui témoigne d'un effet globalement bénéfique du transporteur.

L'ensemble de ces données reste contradictoire et suggère que les transporteurs astrocytaires au glutamate ont deux effets opposés au cours d'une ischémie. Il est possible que la réversion du transport ait plutôt lieu au cœur de l'infarct où l'apport énergétique est nul et que la recapture de glutamate soit maintenue dans la pénombre qui conserve des ressources énergétiques (Swanson et al., 2004).

### - la SLA

La SLA est une maladie neurodégénérative majoritairement sporadique qui se caractérise par une dégénérescence des motoneurones et conduit assez rapidement (2 à 5 ans) à la mort du malade. Les malades de la SLA souffrent d'une paralysie progressive sans perte des fonctions cognitives. Comme pour la MH, l'étiologie de la SLA est complexe et multifactorielle. Le stress oxydatif, les altérations mitochondriales et l'excitotoxicité font partie des mécanismes impliqués dans la pathologie (Rowland et Shneider, 2001).

Il existe de nombreuses preuves que l'excitotoxicité et des anomalies des transporteurs au glutamate participent à la dégénérescence des motoneurones dans la SLA (Heath et Shaw, 2002) et à ce jour, le riluzole, qui diminue l'exocytose de glutamate, est le seul traitement proposé aux malades (Bensimon et al., 1994). La capacité de recapture du glutamate est réduite spécifiquement dans des synaptosomes de patients de la SLA et n'est

pas observée chez des malades de la MA et de la MH (Rothstein et al., 1992). La diminution de transport dans les régions touchées dans le SLA (moelle épinière et cortex moteur) correspond à la baisse d'expression de GLT-1 dans les zones affectées (Rothstein et al., 1995). Ces déficits de transport du glutamate sont aussi observés dans des modèles rongeurs de la SLA (Alexander et al., 2000; Dunlop et al., 2003). La présence de formes d'épissage aberrantes de GLT-1 chez les malades a été rapportée, mais des ARNm anormaux de GLT-1 sont aussi observés chez des individus contrôles, cet aspect reste donc controversé (Honig et al., 2000). Le stress oxydatif joue un rôle important dans l'évolution de la maladie et la forme familiale de la SLA est liée à la mutation de l'enzyme antioxydante SOD1 (Rosen et al., 1993). La SOD mutante acquiert une activité peroxydase qui produit des radicaux libres qui oxydent spécifiquement GLT-1 dans sa partie C-terminale et altèrent sa capacité de recapture du glutamate (Trotti et al., 1999). Ces résultats établissent un lien direct entre une mutation à l'origine de la maladie et les déficits de recapture de glutamate observés dans la SLA. Enfin, il faut préciser que les astrocytes ne sont pas à l'origine de tous les processus pathologiques dans la SLA. Les motoneurones eux-mêmes expriment plus fortement la sous-unité GluR2 non éditée des récepteurs AMPA, ce qui augmente leur perméabilité au calcium et donc leur sensibilité au glutamate (Takuma 99). De plus, l'entrée accrue de calcium, qui est relativement mal tamponné dans les motoneurones peut aggraver la production de ROS par la mitochondrie et initier un cercle vicieux (Rao et Weiss, 2004).

Ainsi, l'excitotoxicité joue un rôle dans la SLA même si n'est pas forcément la cause initiale de la pathologie. Les défauts du fonctionnement des transporteurs astrocytaires au glutamate associées à des anomalies neuronales concourent à la dégénérescence rapide des motoneurones.

#### - La MH

Dans la MH, l'implication des transporteurs au glutamate dans la dégénérescence des neurones est moins bien établie que pour la SLA. Les cerveaux de malades présentent une diminution de la quantité globale d'ARNm de GLT-1 mais il y a plus d'astrocytes qui possèdent ces ARNm du fait de l'astrogliose (Arzberger et al., 1997). Il existe également une diminution de plus de 60% des sites de lésions d'aspartate tritié dans le striatum de malades (Cross et al., 1986), mais l'équipe de Rothstein n'a pas mis en évidence de diminution de la capacité de recapture du glutamate dans des synaptosomes de patients (Rothstein et al., 1992). Dans deux modèles transgéniques de la MH, il existe une diminution assez tardive de l'expression striatale et corticale de GLT-1 accompagnée d'une baisse de la capacité de transport du glutamate, ce qui suggère que des déficits du système de recapture pourraient aggraver la toxicité de la htt mutée (Lievens et al., 2001). En accord avec une participation des astrocytes dans l'étiologie de la MH, l'équipe de Li a rapporté lors d'un congrès que

l'expression de la htt mutée dans les astrocytes diminuait l'expression des transporteurs et entraînait la mort des neurones cocultivés par excitotoxicité (Shin et al., 2004). On constate que l'implication des transporteurs au glutamate dans la MH n'est pas complètement clarifiée, en revanche, l'existence de processus excitotoxiques est bien mieux démontrée dans la MH.

Les récepteurs NMDA striataux sont rapidement perdus au cours de la maladie, ce qui suggère que ce sont d'abord les neurones qui les expriment qui dégénèrent (Young et al., 1988). Les souris transgéniques exprimant la htt mutée présentent une hypersensibilité à la stimulation des récepteurs NMDA dans le striatum avec une augmentation des afflux calciques, ce qui aggrave la sévérité des lésions excitotoxiques (Laforet et al., 2001; Zeron et al., 2002). Deux mécanismes d'hypersensibilisation ont été proposés : la mutation de la htt (1) altère sa capacité d'interaction avec PSD95, une protéine 'd'échafaudage' qui participe à l'ancrage du récepteur NMDA à la membrane (Sun et al., 2001), et/ou (2) entraîne une augmentation du niveau de phosphorylation de la sous-unité NR<sub>2B</sub> du récepteur (Song et al., 2003). Enfin, le dernier argument en faveur d'un rôle majeur des phénomènes excitotoxiques dans la maladie est que l'injection intrastriatale de quinolinate, un agent excitotoxique, reproduit différentes caractéristiques de la MH.

*c. Un modèle d'excitotoxicité : l'injection intrastriatale d'acide quinolinique (QA)  
- découvertes et caractéristiques du QA*

Le quinolinate (QA) est un métabolite endogène du tryptophane, il est produit par les cellules microgliales mais sa concentration reste basse dans le cerveau normal (entre 50 et 1000 nM, Schwarcz et Pellicciari, 2002). Son potentiel neurotoxique a été mis en évidence en 1978 : l'injection intracérébroventriculaire de QA provoque des convulsions chez les souris (Lapin, 1978). C'est un agoniste sélectif des récepteurs NMDA qui n'est pas transportable par les transporteurs au glutamate.

L'injection intrastriatale de QA provoque des lésions importantes chez le rongeur (Beal et al., 1986) et le primate (Ferrante et al., 1993) avec une dégénérescence préférentielle des neurones GABAergiques de projection et une préservation relative des interneurons. Ces lésions rappellent étonnement celles observées chez les patients atteints de la MH, les atteintes neuronales produites par le QA étant plus sélectives que les lésions excitotoxiques induites par d'autres agonistes des récepteurs au glutamate (AMPA, kainate). De façon intrigante, la quantité de QA endogène augmente significativement chez les patients dès les stades précoces (Guidetti et al., 2004). L'injection intrastriatale de QA reproduit donc plusieurs aspects de la MH liés aux anomalies du système glutamatergique et constitue un modèle animal classique de la maladie (Brouillet et al., 1999).

- *mécanismes d'action du QA*

L'injection intrastriatale de QA active d'abord les récepteurs NMDA et induit des influx sodiques et calciques dans les neurones postsynaptiques. Le QA induit aussi une libération massive de glutamate endogène (Connick et Stone, 1988), par un mécanisme d'exocytose inhibé par la tétrodontoxine (Carboni et al., 1990) qui semble lié à l'activation directe par le QA des récepteurs NMDA présynaptiques des neurones glutamatergiques (Tavares et al., 2002). Les rats dont les projections glutamatergiques ont été enlevées par une ablation du cortex ont un volume de lésion réduit de plus de 90%, ils sont donc 'résistants' au QA (Beal et al., 1993; Orlando et al., 2001). Ces expériences montrent que la libération de glutamate endogène est nécessaire pour induire la mort des neurones striataux et que le glutamate libéré vient majoritairement des neurones du cortex. Le glutamate libéré agit secondairement sur les autres récepteurs au glutamate, en particulier mGluR1 et 5, qui sont fortement exprimés par les neurones de projection du striatum (Kerner et al., 1997). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs métabotropiques du groupe I diminue la taille de la lésion (Orlando et al., 2001). Ces antagonistes pourraient agir par un mécanisme post-synaptique (réduction de l'activation des neurones et des dérégulations calciques) mais aussi par un mécanisme présynaptique de réduction de la libération de glutamate (Popoli et al., 2004b). L'inhibition des récepteurs  $A_{2A}$  à l'adénosine réduit aussi l'afflux de glutamate sans atténuer les effets 'primaires' d'activation des récepteurs NMDA (Popoli et al., 2004a).

Le QA provoque également un stress oxydatif à l'origine de la peroxydation des lipides et qui participe à la toxicité du QA (Stone et al., 2000). La formation de ROS pourrait être dépendante des récepteurs NMDA et de l'entrée de calcium ou être un effet direct du QA sur les cellules (Stone et al., 2000).

Ainsi, le QA est plus qu'un simple agoniste des récepteurs NMDA, c'est une excitotoxine qui n'est pas recapturée par les transporteurs au glutamate et induit une libération massive du glutamate endogène. L'injection de QA permet ainsi de mesurer la gestion *in situ* du glutamate sans avoir à injecter du glutamate exogène. Nous l'avons donc utilisé pour produire des conditions pathologiques d'excitotoxicité.

# **MATERIELS ET METHODES**

### III. Matériels et méthodes

#### A. Production des lentivirus

Les vecteurs lentiviraux utilisés sont dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), ils sont incapables de se répliquer et sont dépourvus de toutes les séquences codant pour les protéines du virus sauvage. Le gène d'intérêt est placé sous le contrôle du promoteur ubiquitaire de la phosphoglycérate kinase (PGK). Par ailleurs, une séquence de régulation post-transcriptionnelle issue du virus de l'hépatite de la marmotte d'Amérique (Woodchuck hepatitis post-regulatory element, WPRE) est placée en aval du gène pour augmenter son niveau d'expression (Zufferey et al., 1999).

Les lentivirus ont la capacité d'infecter des cellules post-mitotiques comme les neurones. Ils ont aussi la propriété d'intégrer leur génome au génome de la cellule hôte ce qui permet une expression stable du transgène.

La production des vecteurs lentiviraux est basée sur la cotransfection transitoire de cellules 293T par quatre plasmides (Buchsacher et Wong-Staal, 2000; Hottinger et al., 2000) (**Fig. 1A**).

- *plasmide de transfert pSIN-W-PGK*: contient le gène du CNTF humain (lenti-CNTF) ou le gène de la  $\beta$ -galactosidase (lenti-LacZ). Le gène du CNTF est fusionné à la séquence signal de l'immunoglobuline pour permettre la libération du CNTF transgénique selon une voie classique de sécrétion. Le gène de la  $\beta$ -galactosidase est couplé à une séquence de localisation nucléaire (nls). Ce plasmide est le seul à contenir la séquence  $\psi$  qui est essentielle pour l'encapsidation du génome dans la particule virale. Les éléments de régulation de la transcription virale présents dans la partie 3' du Long Terminal repeat (LTR) ont été délétés. Ceci diminue le risque de formation de virus compétents pour la réplication par recombinaison avec des virus sauvages et élimine les éléments transcriptionnels viraux qui risquent d'interférer soit avec le promoteur du transgène, soit avec les gènes cellulaires voisins du site d'intégration. Les virus sont alors dits 'self inactivating' (Zufferey et al., 1998)(**Fig. 1B**).

- *plasmide pCMV $\Delta$ R8.92* : contient l'ensemble des gènes de structure et des enzymes du virus (protéines de la capsid, reverse transcriptase, intégrase...). La majorité des autres gènes viraux ont été retirés (**Fig. 1B**). En particulier le gène *rev* qui est porté par un autre plasmide.

- *plasmide pRSV-Rev* : contient le gène *rev* sous le promoteur du rous sarcoma virus (RSV).

- *plasmide pMD.2G* : contient le gène de la protéine G de l'enveloppe du virus vesicular stomatitis (VSV-G) qui améliore la stabilité des lentivirus lors de leur production et favorise l'infection des neurones (Naldini et al., 1996).

Les virus s'auto-assemblent dans le cytoplasme des cellules 293T et bourgonnent vers le milieu extracellulaire. Quarante-huit heures après la quadruple transfection, le surnageant est collecté et filtré puis les virus sont concentrés par ultracentrifugation. Les virus sont finalement re-suspendus dans du tampon phosphate salin (PBS) contenant 1% d'albumine sérique bovine (BSA), ce qui correspond au 'véhicule' du virus (Veh). Les lots de virus sont testés pour vérifier l'absence de virus capables de réplication et le titre infectieux du lot est évalué par dosage ELISA de la protéine de la capsid virale p24. Les lentivirus codant pour le CNTF (lenti-CNTF) ou la  $\beta$ -galactosidase (lenti-LacZ) ainsi produits sont utilisés à un titre final de 0,1 à 300 ng p24/ $\mu$ L.

## **B. Injections stéréotaxiques**

### **1. Injection des lentivirus**

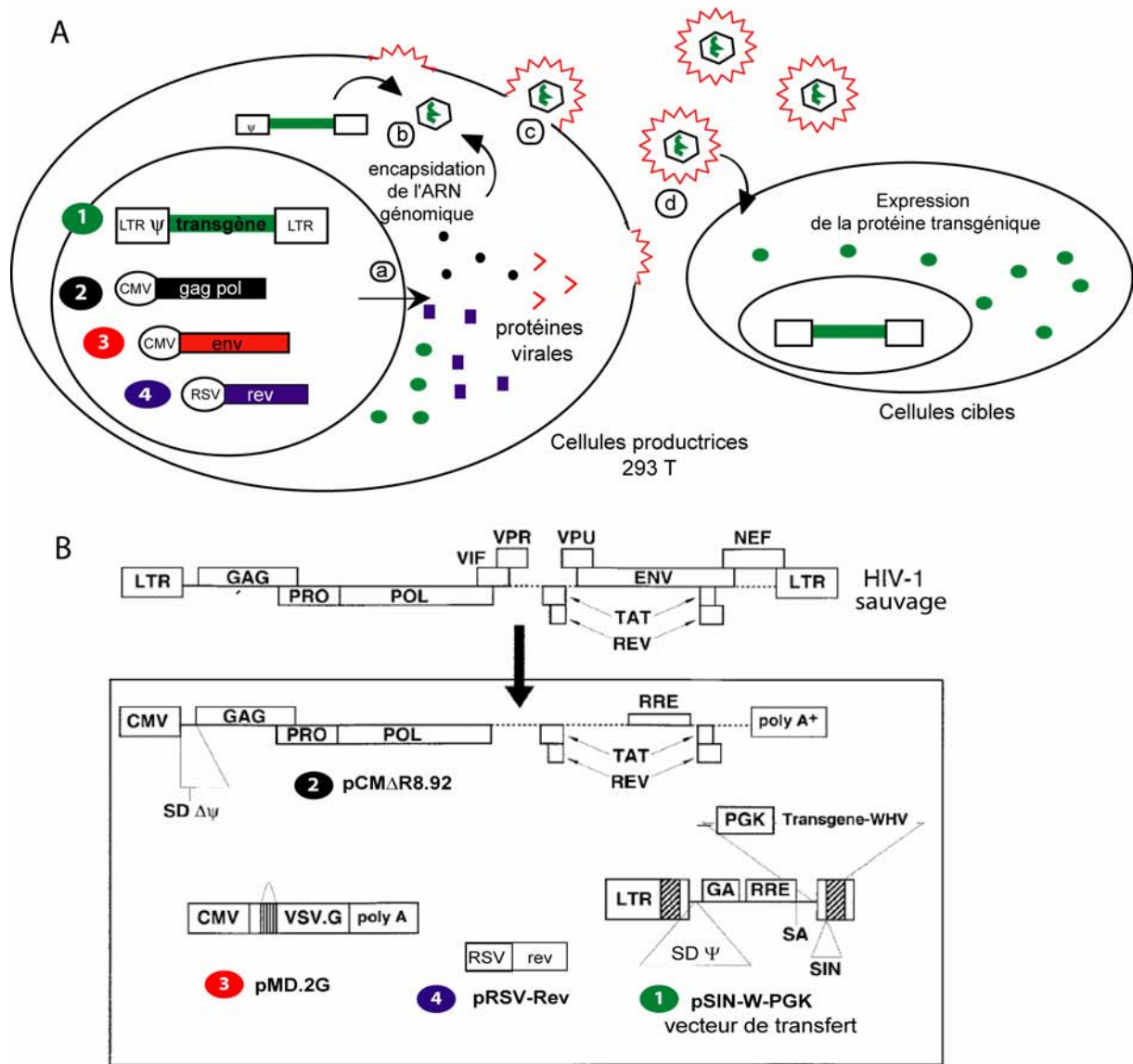
Des rats Lewis mâles âgés de 10 semaines ont été utilisés pour l'ensemble des expériences. Les injections de lentivirus se font dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Les rats sont anesthésiés à l'aide d'un mélange de kétamine (15 mg/kg) et de xylazine (1,5 mg/kg) injecté par voie intrapéritonéale (i.p.). Les rats sont placés dans un cadre stéréotaxique avec la barre de gueule réglée à -3,3 mm. Les rats reçoivent une injection stéréotaxique de 2  $\mu$ L de virus ou de véhicule à l'aide de seringue Hamilton (0,2  $\mu$ L/min) aux coordonnées stéréotaxiques suivantes (antérieur : + 0,5 mm, latéral :  $\pm$  3 mm par rapport à Bregma, et ventral : - 4,5 mm par rapport à la dure mère). Une minute après la fin de l'injection, les seringues sont retirées, la peau du crâne est suturée et les animaux sont placés dans leur cage.

Deux types d'injections ont été réalisés :

- injections bilatérales identiques: les deux striata reçoivent le même traitement (lentivirus codant pour le CNTF, pour la  $\beta$ -galactosidase ou véhicule). Ces rats appartiennent au groupe lenti-CNTF, lenti-LacZ ou Veh.

- injections bilatérales différentes. Par exemple, le striatum droit est infecté avec du virus lenti-LacZ alors que le striatum gauche est injecté avec du virus lenti-CNTF. Les rats ayant reçu ce type d'injections appartiennent aux groupes lenti-CNTF/lenti-LacZ, lenti-CNTF/Veh ou Veh/lenti-LacZ.





Adapté de Déglon *et al.* (2000) *Hum. Gene Ther.* 11:179-190.

**Figure 1. La production des lentivirus**

(A) Le gène d'intérêt est cloné dans le plasmide de transfert pSIN-W-PGK (1). Le plasmide pCMVΔR8.92 contient les gènes codant les protéines de la capsid du virus et les enzymes virales (rétrotranscriptase, intégrase...) et le plasmide pRSV-Rev contient le gène rev. Le plasmide pMD.2G contient le gène de la protéine de l'enveloppe. Les quatre plasmides servent à la cotransfection transitoire des cellules 293T. (a) Les protéines virales sont synthétisées dans le cytoplasme et (b) s'auto assemblent autour de l'ARN génomique qui contient le signal d'encapsidation ( $\psi$ ) et le gène d'intérêt (vert). Les virus formés bourgeonnent des cellules en s'entourant d'une enveloppe membranaire contenant la protéine VSV-G (c, rouge). (d) Ces vecteurs viraux pourront être utilisés pour infecter des cellules cibles qui exprimeront le transgène, mais aucune protéine d'origine virale.

(B) Structure des quatre plasmides utilisés. Le plasmide pCMVΔR8.92 (2) dérive du génome du virus HIV-1 dans lequel les gènes env (codant pour l'enveloppe) et rev ont été retirés ainsi que les gènes accessoires vif, vpr, vpu et nef. De plus les séquences régulatrices LTR et le site de signal d'assemblage ( $\psi$ ) ont aussi été retirées. L'expression des gènes restants (gag, pro, pol et tat) est sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV). Le plasmide pRSV-Rev contient le gène rev sous le contrôle du promoteur RSV. Le plasmide pMD.2G contient le gène codant pour la protéine de l'enveloppe VSV-G sous le contrôle du promoteur CMV. Le plasmide de transfert pSIN-W-PGK contient le transgène sous le contrôle du promoteur de la PGK ainsi qu'une séquence WPRE pour augmenter le niveau d'expression du transgène. Ce plasmide contient un signal d'assemblage  $\psi$ . Des séquences virales régulatrices de la transcription ont été retirées dans la partie 3' LTR pour éviter une interférence de ces séquences régulatrices avec le promoteur interne et pour empêcher la formation de virus répliatifs après recombinaison avec un virus sauvage.

## 2. Injection intrastriatale de quinolinate

Le quinolinate (QA) est un agoniste des récepteurs au glutamate de type NMDA qui induit une libération massive de glutamate endogène (voir §E-3-c).

Le quinolinate est préparé à une concentration stock de 180 mM dans du PBS et mis à pH=7,4 avec 0,1 M de NaOH. Avant l'injection, le QA est dilué dans du PBS à une concentration finale de 80 mM ou 40 mM selon l'expérience. Les rats anesthésiés reçoivent une injection stéréotaxique de QA (0,2 µL/10s, 1 µL) aux coordonnées stéréotaxiques suivantes (antérieur : + 0,8 mm, latéral : ± 3,5 mm par rapport à Bregma, et ventral : - 4,5 mm par rapport à la dure mère).

## C. RT- PCR en temps réel

Cette technique a été utilisée pour détecter la présence d'ARNm viral grâce à sa séquence spécifique WPRE. On peut ainsi mettre en évidence les structures cérébrales qui expriment l'ARNm transgénique, c'est-à-dire les structures infectées par le virus.

### 1. Purification des ARNm

Le cerveau des rats Veh/lenti-CNTF (n=3) est prélevé rapidement et le striatum, le cortex moteur, la substance noire et le *globus pallidus* sont disséqués sur de la glace à partir de tranches de 1 mm. Chaque structure est homogénéisée à l'aide d'un potter verre-verre dans 500 µL tampon de lyse (4 M de thiocyanate de guanidium, 24,5 mM de Tris-citrate de sodium, 0,5% de sarcosyl et 7,2 µL/mL de β-mercaptoéthanol), puis est stockée à -80°C. Les ARNm sont isolés après extraction au phénol-chloroforme selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987).

### 2. Reverse transcription

L'ADN potentiellement présent avec les ARNm est dégradé par traitement avec la RQ1 DNase I (0,1 u/µL, Promega) de manière à éviter des contaminations lors de la phase de PCR. Les ARNm (4 ng) sont reverse-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) par la Superscript II (4 u/µL, Invitrogen) en présence d'hexamères servant d'amorces (pdN6, 2 µM, Invitrogen), d'un mélange de déoxy-nucléotides (dNTP, 1 mM, Promega) et d'inhibiteur de RNase (Rnasin, 0,32 u/µL, Promega). Un aliquot d'ARNm subit le même traitement sans reverse transcriptase de manière à avoir un contrôle négatif. A la fin de la réaction les ARNm restant sont digérés par la RNase H.

### 3. PCR en temps réel

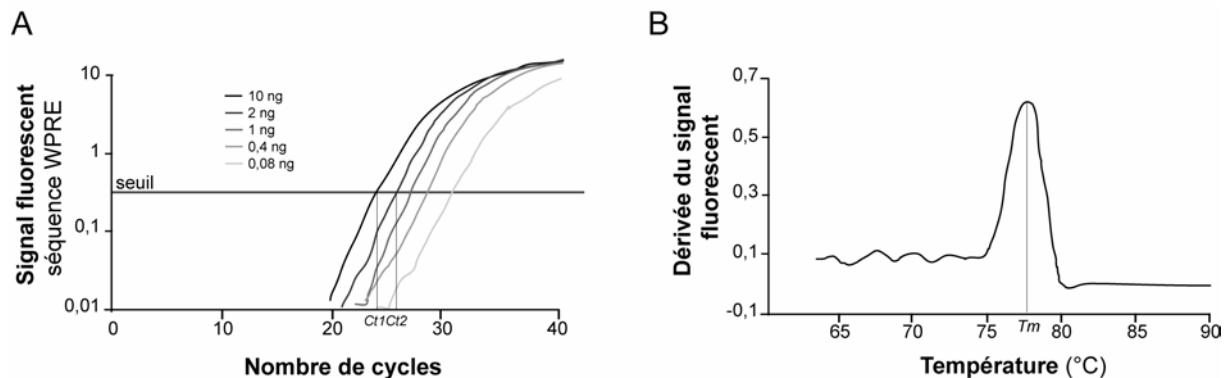
La technique de PCR en temps réel permet de suivre en continu par fluorométrie la réaction d'amplification d'une séquence d'ADN grâce à des déoxy-nucléotides qui fluorescent lorsqu'ils sont intégrés à de l'ADN double brin.

La séquence WPRE des ADNc est amplifiée par la Taq polymérase à l'aide d'amorces spécifiques (amorce 1 : 5'-TGTGGATACGCTGCTTTAATG, amorce 2 : 5'-CATAAAGAGACAGCAACCAGGA, 300 nM), et de déoxy-nucléotides couplés au fluorophore SYBR green (Invitrogen). En parallèle, une séquence du gène de la cyclophiline est amplifiée de manière à contrôler l'équichargement en ADNc entre les groupes expérimentaux. Les conditions de PCR sont les suivantes :

- Activation de la polymérase : 10 min à 95°C
- Cycles (40) : dénaturation : 15 sec à 95°C  
                  élongation : 1 min à 60°C
- Dissociation : de 60°C à 95°C par pas de 0,5°C

La quantité de séquence amplifiée est évaluée par une mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle (normalisée par rapport à la fluorescence de base, mesurée dans les premiers cycles). Le nombre de cycle (Ct) nécessaires pour dépasser un seuil de fluorescence (**Fig. 2A**) est calculé. L'abondance relative (Ar) de la séquence WPRE normalisée par la cyclophiline entre la condition 2 par rapport à la condition 1 est égale à :

$$Ar = 2^{[(Ct_{1WPRE} - Ct_{1cyclo}) - (Ct_{2WPRE} - Ct_{2cyclo})]}$$



**Figure 2. La PCR en temps réel**

**(A)** Gamme d'amplification pour la séquence WPRE (en équivalent ARN). A chaque cycle de PCR, à la fin de la phase d'élongation, la fluorescence émise par les dNTP couplés au fluorophore SYBER green est mesurée. Le signal fluorescent est proportionnel au nombre de dNTP intégrés à de l'ADN double brin. Pour chaque condition, le nombre de cycles (Ct) nécessaires pour dépasser un seuil de fluorescence est déterminé. Etant donné que pendant la phase linéaire, la quantité d'ADN double à chaque cycle, il est possible de calculer l'abondance relative (Ar) de la séquence dans l'échantillon 1 par rapport à l'échantillon 2 :  $Ar = 2^{(Ct_2 - Ct_1)}$ .

**(B)** A la fin de la réaction de PCR, la température est augmentée progressivement jusqu'à atteindre la température de fusion  $T_m$ . A cette température, les deux brins d'ADN de l'amplicon se dissocient, ce qui induit une diminution brusque du signal fluorescent, qui apparaît en pic lorsque l'on étudie la dérivée du signal fluorescent en fonction de la température. La présence d'un seul pic témoigne de la sélectivité de la réaction de PCR qui n'a produit qu'un seul amplicon.

La dernière phase de PCR permet d'évaluer la température de fusion ( $T_m$ ) de l'amplicon, c'est-à-dire la température où 50% des amplicons sont dénaturés. La perte du signal fluorescent est représentée par la dérivée du signal fluorescent par rapport à la température (**Fig. 2B**). Cette étape permet de contrôler que la réaction de PCR n'a produit qu'un seul amplicon (i.e. une seule  $T_m$  identifiable). La sélectivité de l'amplification peut aussi être contrôlée après migration des amplicons sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium (BET).

## D. Immunohistologie

### 1. Obtention des coupes

Selon l'expérience réalisée, les rats ont été perfusés avec une solution de 4% paraformaldéhyde (PFA) ou le cerveau a été extrait et post-fixé une semaine dans du PFA. Dans les deux cas, les cerveaux sont cryoprotégés dans des bains successifs de sucrose (12, 16 et 18 %). Les cerveaux sont ensuite coupés dans le plan coronal en sections sériées de 40  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide d'un microtome à congélation. Les sections sont collectées en 10 séries et conservées dans une solution de stockage à  $-20^\circ\text{C}$ .

### 2. Protocole d'immunohistochimie par détection au VIP

Les coupes sont rincées dans du PBS 0,1 M, exposées pendant 30 min à 1% de peroxyde d'hydrogène pour inactiver les peroxydases endogènes, puis prétraitées avec 0,4% de Triton X-100, 4,5% de sérum normal de chèvre (NGS) dans 0,1 M de PBS pendant 30 min. Les coupes sont incubées pendant 2 jours à  $4^\circ\text{C}$  avec l'anticorps primaire dilué dans 0,4% de Triton X-100, 0,03 % azide, 0,5% BSA, 3% NGS, 0,1 M PBS (**Tableau 1**). Les coupes sont rincées, puis incubées avec l'anticorps secondaires biotinylé dilué au 3000<sup>ème</sup> dans 0,4% de Triton X-100, 3% de NGS, PBS 0,1 M pendant 1h. Le signal des anticorps secondaires est alors amplifié en trois étapes séparées par des rinçages :

- incubation pendant 1 h avec un complexe avidine-biotine couplée à une peroxydase (HRP) dans 0,4 % Triton et 0,1 M PBS.

- incubation avec de la tyramine biotinylée dans 0,005% de peroxyde d'hydrogène pendant 20 min.

- incubation pendant 1 h avec un complexe avidine-biotine couplée à une peroxydase (HRP) dans 0,4 % Triton, 0,1 M PBS.

L'activité des peroxydases est alors révélée à l'aide d'un kit VIP qui conduit à la formation de précipité de couleur rose. Les coupes sont montées sur lames, mises à séchées puis montées entre lame et lamelle après déshydratation dans des bains successifs d'acétone et de toluène.

ANTICORPS ANTI-	ESPECE	FOURNISSEUR/ PRODUCTEUR	DILUTION IMMUNOHISTOLOGIE		DILUTION IMMUNOBLOT
			amplification-VIP	Fluorescence	
actin	lapin	Sigma	*	*	10 000e
BDH	lapin	<i>Kabine et al., 2003</i>	*	250e	*
III tubuline	souris	Sigma	*	*	1000e
galactosidase	souris	Sigma	3000e	*	*
Calbindin	souris	Sigma	10 000e	*	1000e
CD-11b	souris	Serotec	5000e	*	*
connexin 43	souris	BD Bioscience	*	*	250e
COX I	souris	Molecular Probes	*	*	100e
DARPP32	lapin	Chemicon	*	*	1000e
EAAC1	lapin	Alpha Diagnostic	*	*	1000e
ED1	souris	Serotec	5000e	*	*
phospho-Erk (Tyr202/204)	lapin	Cell Signaling	*	*	1000e
Erk	lapin	Santa Cruz	*	*	5000e
flotillin-1	souris	BD Bioscience	*	*	500e
GAD	lapin	Chemicon	*	*	3000e
GFAP	lapin	Dako	100 000e	1000e	2000e
GLAST (C-ter)	lapin	<i>Harada et al., 1998</i>	*	2000e	10 000e
GLT-1 (C-ter)	lapin	<i>Yamada et al., 1998</i>	*	1000e	10 000e
GLT-1 (N-ter)	lapin	<i>Chen et al., 2002</i>	*	*	1000e
GluR2	souris	Chemicon	*	*	500e
Glut-1	lapin	Calbiochem	*	*	500e
LDH1	souris	Sigma	*	*	5000e
MCT-1	lapin	<i>Pierre et al., 2000</i>	500e	*	*
Nestin	souris	BD Bioscience	1000e	500e	1000e
NeuN	souris	Chemicon	10 000e	1000e	*
NR2A	chèvre	Santa Cruz	*	*	500e
NR2B	chèvre	Santa Cruz	*	*	500e
PCNA	souris	Sigma	5000e	*	1000e
S100 <sup>2</sup>	souris	Sigma	*	1000e	*
SDH Fp	souris	Molecular Probes	*	*	5000e
SDH Ip	souris	Molecular Probes	*	*	5000e
phospho-Stat3 (Tyr705)	lapin	Cell Signaling	*	*	1000e
Stat3	lapin	Cell Signaling	*	200e	1000e
Synaptophysine	souris	Sigma	*	*	250e
VGLUT-1	lapin	<i>Herzog et al., 2001</i>	*	*	1000e
vimentin	souris	Dako	*	*	200e
vimentin	souris	Calbiochem	5000e	1000e	*

### 3. Protocole d'immunofluorescence

Les coupes de cerveau sont rincées dans du PBS, prétraitées avec 0,4% de Triton X-100, 4,5% de NGS dans 0,1 M de PBS pendant 30 min. Les coupes sont incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans 0,4% de Triton, 3% NGS, 0,1 M PBS (**Tableau 1**). Après rincage les coupes sont incubées 1 h avec l'anticorps secondaire (dilution 1/200) couplé à un fluorophore (AlexaFluor 488 et 594) dans 0,4% de Triton X-100, 3% de NGS, PBS 0,1 M. Les coupes sont alors rincées, montées entre lame et lamelle à l'aide d'un milieu de montage aqueux adapté à la conservation de la fluorescence et sont stockées à l'abri de la lumière à 4°C.

## E. Histochimie

Les marquages histochimiques sont réalisés sur des coupes de cerveaux congelées et non fixées, de manière à mettre en évidence *in situ* l'activité de certaines enzymes. Les enzymes étudiées ici sont toutes des déshydrogénases qui catalysent des réactions d'oxydo-réduction. Les enzymes sont mises en présence de leur substrat et d'un accepteur d'électron qui, sous forme réduite, forme un précipité coloré sur la coupe, au site de la réaction. Comme le substrat est en large excès, cette méthode permet d'évaluer la vitesse maximale de la réaction enzymatique.

Les cerveaux de rat sont prélevés et immédiatement congelés dans de l'isopentane à -30°C. Les cerveaux congelés sont coupés à l'aide d'un cryostat (Leica), et des sections de 20 µm d'épaisseur sont récupérées sur des lames Superfrost plus. Les coupes sont stockées à -20°C jusqu'à utilisation.

### 1. Histochimie de la $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH)

La BDH est une enzyme clé de la voie de dégradation des corps cétoniques, elle catalyse la dégradation du  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB) en acétoacétate et utilise le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur (voir § II-D-2-b).

Les coupes sont mises à incuber pendant 30 minutes à 37°C dans un tampon Tris-HCl, pH=7,6 avec 4 mM de NAD<sup>+</sup> (Roche), 80 mM de D,L-BHB de sodium (Fluka) et 0,3 mM de nitrobleu tétrazolium (NBT) (Bilger et Nehlig, 1992).

### 2. Histochimie de la cytochrome oxydase (COX)

La COX est une enzyme du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale qui est responsable de l'oxydation du cytochrome c. Le niveau d'activité de la COX est un reflet de la phosphorylation oxydative qui est majoritairement neuronale. Ainsi, une baisse d'activité de la COX est un index classique d'une dégénérescence ou d'un dysfonctionnement neuronal (Bizat et al., 2003).

Les coupes sont mises à incuber pendant 1 heure à 37°C dans un tampon 0,1 M PBS avec 0,1 g/L de cytochrome c et 0,6 g/L de diaminobenzamidine (DAB) (Greene et Greenamyre, 1995).

### **3. Histochimie de la succinate déshydrogénase (SDH)**

La SDH est une enzyme du cycle de Krebs et du complexe II-III de la chaîne respiratoire mitochondriale. La SDH est responsable de l'oxydation du succinate et sert de point d'entrée alternatif dans la chaîne respiratoire mitochondriale.

Après rinçage au PBS pendant 20 min pour activer la SDH, les coupes sont mises à incuber pendant 30 min à 37°C dans un tampon 0,05 M PB, avec 0,05 M de succinate de sodium et 0,3 mM de NBT (Brouillet et al., 1998).

### **4. Histochimie de la lactate déshydrogénase (LDH)**

La LDH est une enzyme cytoplasmique qui oxyde le lactate en pyruvate qui peut alimenter le cycle de Krebs après transformation en acétyl-coA

Les coupes sont postfixées pendant une heure avec du PFA à 4% pour éviter que la LDH, qui est cytoplasmique ne diffuse dans le milieu au cours de la réaction. Après rinçage, les coupes sont mises à incuber pendant 90 min à 37°C dans un tampon 0,05 M Tris-HCl pH=7 ; avec 100 mM de L-Lactate de sodium, 4 mM de NAD<sup>+</sup>, 0 ;33 mM de phénazine méthosulfate et 2,5 mM de NBT (Dufour et al., 2003).

Dans tous les cas, des coupes sont incubées en parallèle sans substrat pour contrôler la spécificité de la réaction. A la fin de la réaction, les coupes sont rincées, fixées avec du PFA 4%. Après séchage, les coupes sont digitalisées à l'aide d'un scanner à haute résolution (Amersham) puis déshydratées dans des bains d'éthanol et de toluène, et montées entre lame et lamelle.

## **F. Analyse des coupes**

### **1. Etude en microscopie confocale**

Une analyse par microscopie confocale a été menée pour étudier la colocalisation cellulaire de différents marqueurs en utilisant un microscope LSM510 (Zeiss).

### **2. Quantification de volume**

Il est possible d'évaluer des volumes (ex : volume de lésion ou volume présentant un marquage immunohistologique) à partir de coupes sériées en utilisant la méthode de Cavalieri. Dans l'exemple d'un volume **V** de lésion :

$$V = S \times k \times n$$

Où **k** est la distance intercoupe, **n** le nombre de coupes présentant une lésion et **S** l'aire moyenne de la lésion sur les **n** coupes (Coggeshall, 1992). Les coupes montées sur lame sont digitalisées. Sur chaque coupe, l'aire est délimitée manuellement à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Total Lab, Amersham).

Pour quantifier des volumes de lésions dans le striatum, des coupes sériées immunomarquées pour NeuN, une protéine neuronale, ont été utilisées (espace intercoupe : 200  $\mu\text{m}$ ). Pour mesurer le volume immunopositif pour la  $\beta$ -galactosidase ou la vimentine des coupes sériées espacées de 400  $\mu\text{m}$ , ont été utilisées.

### **3. Mesure de densité optique (D.O.)**

La densité optique dans le striatum (et le cas échéant, dans le cortex somatosensoriel) peut être mesurée après les marquages histochimiques de manière à quantifier l'activité de l'enzyme correspondante. L'ensemble des réactions histochimiques est réalisé dans des conditions où la D.O. de la section (i.e. l'accumulation de l'accepteur d'électron de la réaction) est proportionnelle à l'activité de l'enzyme (Greene et Greenamyre, 1995; Brouillet et al., 1998; Dufour et al., 2003). La densité optique dans le striatum a également été mesurée après un marquage immunohistochimique comme index du niveau d'expression de la protéine marquée. Un logiciel d'analyse d'image (Total Lab) permet de mesurer la D.O. dans la région d'intérêt tracée manuellement autour du striatum. La D.O. non spécifique (i.e. marquage histochimique sans substrat ou coupe sans marquage immunohistologique) est soustraite pour obtenir la D.O. spécifique.

## **G. Immunoblots**

### **1. Préparation des homogénats de cerveaux**

Le striatum des rats est rapidement disséqué sur la glace et homogénéisé à l'aide d'un potter en verre (20 passages, 400 rpm) dans 300  $\mu\text{L}$  de tampon composé de 50 mM Tris-HCl, pH=7,4, 100 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM  $\beta$ -glycérophosphate, 1 mM orthovanadate avec 1/100 de cocktail d'inhibiteur de phosphatases (Sigma) et une tablette de cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche). La quantité de protéine est mesurée par la méthode BCA. Un aliquot de chaque échantillon est directement dilué dans du tampon de charge (62,5 mM Tris, pH=6,8, 100 mM DTT, 10% glycérol, 2% SDS et bleu de bromophénol) et mis à bouillir pendant 5 minutes. Le reste de l'échantillon est stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ .



## **2. Electrophorèse, transfert et immunoblot**

Les échantillons dilués (10 à 20 µg de protéine) sont chargés sur un gel d'acrylamide à 10% et migrent en conditions dénaturantes. Les protéines sont alors transférées sur des membranes de nitrocellulose ou de PVDF. Les membranes sont colorées au rouge Ponceau pour contrôler la migration et le transfert. Les membranes sont prétraitées pendant 1 heure dans du tampon Tris 25 mM pH=7,4, NaCl 150 mM et 0,1% Tween-20 (TBS-T) avec 5% de lait en poudre (5% BSA pour les anticorps dirigés contre des protéines phosphorylées). Les membranes sont alors incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T et 5% de lait (**Tableau 1**) sur la nuit à 4°C. Après rinçage avec du TBS-T, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP), dilué au 1000<sup>ème</sup> dans du TBS-T + 5% de lait. Après rinçage, les anticorps secondaires sont détectés par une réaction de chemiluminescence (ECL, Amersham) et suivie d'une exposition des membranes sur film (Biomax ML, Kodak). Les films sont révélés et digitalisés pour analyse.

L'intensité moyenne des bandes obtenues est quantifiée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (Total Lab), en soustrayant la densité optique du fond. L'intensité des bandes étudiées est normalisée à celle de l'actine, qui est détectée sur les mêmes membranes et sert de contrôle d'équi-chargement.

Certaines membranes ont été utilisées plusieurs fois, en particulier pour étudier la forme totale et phosphorylée d'une protéine sur la même membrane. Dans ce cas, les membranes ont été incubées pendant 30 min à 60°C dans 2% SDS, 100 mM β-mercaptoéthanol dans du 62,5 mM de Tris-HCl, pH=6,8, de manière à décrocher les anticorps de la première hybridation. Après rinçage au TBS-T, les membranes subissent alors une deuxième hybridation.

## **3. Déglycosylation *in vitro***

Les homogénats sont incubés avec l'enzyme peptide N-déglycosydase F (PNGase F), qui clive les N-glycosylations, selon les instructions du fabricant (New England Biolabs). Les réactions se font sur la glace pendant 2 h pour limiter l'agrégation des transporteurs. Des homogénats sont incubés avec la PNGase F dénaturée pour servir de contrôle négatif.

## **H. Microscopie électronique**

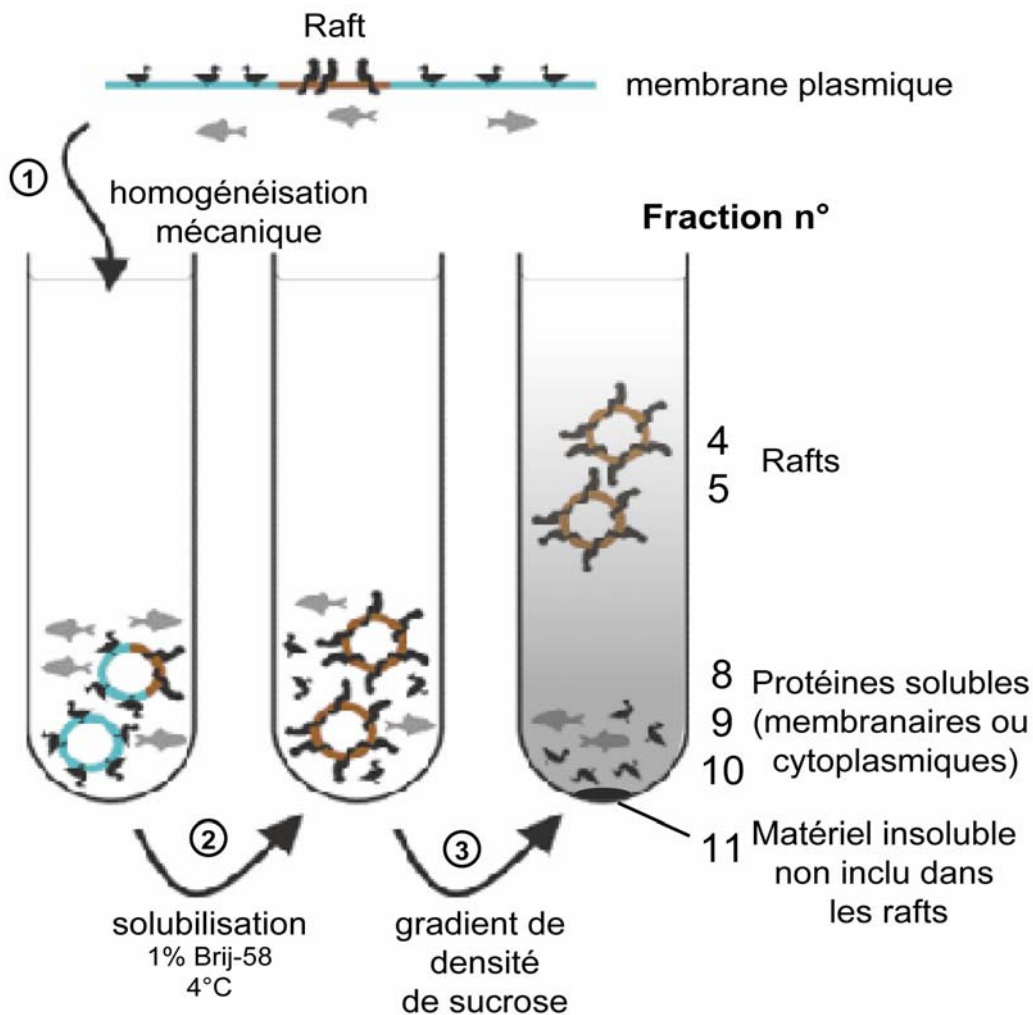
Des analyses par microscopie électronique ont été faites pour étudier les modifications du phénotype astrocytaire au niveau ultra structural. Des rats lenti-CNTF et lenti-LacZ (n=1/ groupe) sont profondément anesthésiés avec du pentobarbital et perfusés

par voie transcardiaque avec 0,2% de glutaraldéhyde (EMS) et 2% de PFA dans 0,1 M PB, pH=7,4, puis par 2,5% de glutaraldéhyde et 2% de PFA. Une heure après la fin de la perfusion, les cerveaux sont extraits et stockés à 4°C dans du PBS. Des coupes de 60 µm d'épaisseur sont coupées au niveau du striatum à l'aide d'un vibratome (Leica VT100) en encadrant le site d'injection d'environ 1 mm. Après rinçage dans un tampon cacodylate (0,1 M, pH=7,4), les sections sont post-fixées pendant 40 minutes avec 1,5% de ferrocyanide de potassium et 1% de tetroxyde d'osmium, puis 1 heure avec 1% de tetroxyde d'osmium et enfin, 40 minutes avec 1% d'acétate d'uranyle dans 70% d'éthanol. Les coupes sont ensuite déshydratées dans des bains croissants d'éthanol et enrobées dans de la résine Durcapan. Des coupes sériées de 50 nm d'épaisseur sont faites dans une zone située à 600 µm de l'extrémité du trajet de l'aiguille. Les coupes sont contrastées avec du citrate de plomb et des images sont prises à l'aide d'une caméra CCD avec un microscope électronique Philips CM12 en utilisant un voltage de 80kV.

## I. Purification des rafts

La technique de purification des rafts se base sur leur capacité à être résistants aux détergents non ioniques à faible température et à flotter dans les fractions de faible densité lors d'une ultracentrifugation de gradients de densité (**Fig. 3**). Nous avons suivi la méthode détaillée par Butchbach *et al.* (2004).

Des rats lenti-CNTF et lenti-LacZ (n=3/groupe) sont injectés avec du QA et du PBS dans le striatum gauche et droit respectivement selon la méthode décrite plus haut. Quinze minutes après le début de l'injection, les rats sont sacrifiés, le striatum est disséqué sur de la glace, pesé et homogénéisé dans 10 volumes de tampon salin MES (MBS; 150 mM NaCl, 100 µM phenylmethylsulfonyl fluoride, cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche) dans 25 mM MES, pH=6,5) à l'aide d'un broyeur Dounce (20 passages) puis d'une seringue munie d'une aiguille de 27-gauge (5 passages). La quantité de protéine est mesurée à l'aide d'un dosage BCA et ajustée à 3 µg/µL. Les échantillons sont incubés avec 1% de Brij-58 (v/v) pendant 1 heure à 4 °C. Les homogénats sont mélangés volume à volume avec du sucrose à 80% (sans Brij-58) dans du MBS, puis 1 mL du mélange est déposé au fond d'un tube à ultracentrifugation. Des gradients discontinus de sucrose sont réalisés en ajoutant 1,8 mL de sucrose à 30% puis 1,2 mL de sucrose à 5%, puis le tube est rempli avec du MBS. Les gradients sont mis à ultracentrifuger pendant 16 h à 35 000 rpm/ 200 000 g à 4 °C en utilisant un rotor de type SW40Ti (Beckman Coulter).



Adapté de Briggs *et al.* (2002) *Journal of General Virology* **84** : 757-768

### Figure 3. Purification des rafts

Les rafts sont purifiés par une technique biochimique qui se base sur deux propriétés fondamentales des rafts : leur résistance aux détergents non ionique à faible température et leur faible densité qui les fait flotter quand ils sont soumis à un gradient de densité. Des extraits cérébraux constitués des membranes plasmiques (bleu) contenant des rafts (marron) et des protéines solubles (poissons gris) sont homogénéisés mécaniquement (1) et mis en présence du détergent (2). Seuls les microdomaines raft résistent et forment des vésicules qui flottent au niveau des fractions de faible densité dans un gradient de sucrose (3). La récolte des fractions par le haut du gradient permet de séparer les protéines des rafts (fraction 4, 5) des protéines 'solubles' qu'elles soient cytoplasmiques ou membranaires (fractions 8, 9, 10) et des protéines non solubles dans le détergent mais qui n'appartiennent pas aux rafts car elles forment un culot au fond du tube (fraction 11).

Le lendemain, dix fractions de 400  $\mu$ L sont récupérées à partir du haut du gradient et le culot est resuspendu dans 400  $\mu$ L de MBS (=fraction 11). Les rafts forment un anneau blanc qui diffracte la lumière à l'interface entre le sucrose à 5% et 30% (fractions 4-5). La quantité de protéine est mesurée dans chaque fraction. Une partie de chaque fraction est

diluée à du tampon de charge et stockée à -20°C tandis que le reste est congelé directement à -80°C. Par ailleurs, pour faciliter l'analyse, les fractions contenant les rafts (fractions 4 et 5) et les fractions contenant le matériel soluble au Brij-58 (fractions 8, 9 et 10) ont chacune été regroupées. Ces fractions sont analysées par western blot selon le protocole décrit plus haut. La D.O spécifique de chaque bande est normalisée par la quantité de protéine déposée dans le puit correspondant. L'abondance relative des transporteurs entre les rafts et les fractions solubles a été calculée pour chaque transporteur et correspond à la D.O. normalisée dans le raft divisée par la somme des D.O normalisées dans les rafts et les fractions solubles (i.e. abondance totale). Cette abondance relative est exprimée en pourcentage.

## **J. Mesure de la recapture de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate par les synaptosomes**

Le fonctionnement des transporteurs au glutamate peut être mesuré sur des synaptosomes issus d'extraits cérébraux. Les synaptosomes sont constitués par les membranes formant les synapses (membranes pré et post-synaptiques et membranes astrocytaires entourant les synapses). Cette technique permet d'évaluer les propriétés du transport du glutamate *ex vivo* et notamment de mesurer l'affinité (Km) et la vitesse maximale de transport (Vm). La méthode utilisée est basée sur celle décrite par Dunlop *et al.* (2003).

### **1. Préparation des synaptosomes**

Le striatum des rats lenti-CNTF, lenti-LacZ ou Veh (n=4/groupe) est disséqué sur glace et homogénéisé dans 300 µL de tampon composé de 310 mM de sucrose et 10 mM d'HEPES, pH=7,4 à l'aide d'un potter verre-téflon (10 passages, 900 rpm). Les gros débris et impuretés sont éliminés par centrifugation à 1000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 20 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le culot, qui correspond aux synaptosomes, est resuspendu dans 940 µL de tampon HEPES buffer saline (HBS ; composé en mM de : HEPES :10, Tris base : 5, NaCl : 140, KCl : 2,5, CaCl<sub>2</sub> : 1,2, MgCl<sub>2</sub> : 1,2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 1,2 et glucose :10, pH=7,4). La quantité de protéine est mesurée par dosage BCA et ajustée à 1 µg/µL.

### **2. Mesure de la recapture d'aspartate tritié**

Le D-Aspartate a été utilisé dans ces expériences car c'est un analogue du glutamate transporté seulement par les transporteurs membranaires (et pas vésiculaires), de plus, il

n'est pas métabolisé dans les cellules. Les synaptosomes (75 µg de protéine par essai) sont incubés à température ambiante avec 5 concentrations de D-aspartate (1, 5, 10, 20, 30 µM, en duplicat) en présence de 0,25 µCi de [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate (16,2 Ci/mmol, Perkin Elmer) dans 250 µL de tampon HBS. Une autre série de synaptosomes est incubée en même temps avec 200 µM de L-trans-2,4-PDC (Tocris), un inhibiteur spécifique du transport au glutamate, de manière à mesurer l'accumulation d'aspartate tritié indépendante des transporteurs. Après 6,5 minutes d'incubation, l'incorporation d'aspartate tritié par les transporteurs est arrêtée par ajout de 3 mL de tampon HBS froid dans lequel le sodium a été remplacé par de la choline. Les synaptosomes sont alors filtrés sur des filtres en fibre de verre (GF/C, Whatman) et rincés trois fois avec le tampon dépourvu de sodium. Les filtres sont récupérés et mis en présence de scintillant (Optiphase Hisafe, Perkin Elmer). Après équilibration pendant 24 heures, l'incorporation de radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard).

L'accumulation d'aspartate dans les synaptosomes qui est dépendante des transporteurs est calculée pour chaque concentration en faisant la différence entre les conditions avec ou sans inhibiteur. La recapture est exprimée en pmol d'aspartate.minute<sup>-1</sup>.mg de protéine<sup>-1</sup>. Les courbes expérimentales représentant la recapture en fonction de la concentration d'aspartate (issue de la moyenne de 4 expériences par groupe) ont été analysées avec le logiciel Prism (Amersham) qui permet d'estimer les deux paramètres (Kd et Vm) de la cinétique de recapture selon l'équation de Michaelis-Menten :  $V = \frac{V_m [Asp]}{K_d + [Asp]}$

## **K. Microdialyse et dosage du glutamate par chromatographie liquide à haute performance**

### **1. Microdialyse**

La technique de microdialyse est utilisée pour mesurer le taux extracellulaire de différents métabolites et neurotransmetteurs. Une sonde de microdialyse perfusée avec un liquide physiologique est implantée dans le cerveau de l'animal et se comporte comme un vaisseau sanguin. Les solutés présents dans le milieu extracellulaire vont transités à travers la membrane de dialyse selon leur gradient de concentration et ainsi, le liquide récupéré à la sortie de la sonde de microdialyse constitue un échantillon du milieu extracellulaire. Cette technique a été utilisée pour mesurer le taux de glutamate extracellulaire après avoir induit sa libération massive par le quinolinate (Popoli et al., 2004b)

Des rats Lenti-CNTF/lenti-LacZ (n=5) et Veh/lenti-LacZ (n=4) sont anesthésiés à l'isoflurane (4,5% pendant l'induction puis 2,5% pour le maintien) et placés dans un cadre stéréotaxique. La température corporelle est contrôlée et maintenue à une valeur physiologique (~37,5°C) à l'aide d'une couverture chauffante thermostatée. Les sondes de microdialyse (CMA/12, 4mm de membrane de dialyse, limite de diffusion: 20 kDa, CMA Microdialysis) sont implantées dans le striatum aux coordonnées suivantes: AP +0,8 mm, L ±3,5 mm, V -6,5 mm. Les sondes sont perfusées avec un débit de 2 µL/min avec du liquide céphalorachidien artificiel (aCSF, en mM : NaCl : 147, KCl : 2,7, CaCl<sub>2</sub> : 1,2, MgCl<sub>2</sub> : 0,85). Des expériences préliminaires ont montré que le milieu extracellulaire retournait à l'état d'équilibre 2 h après l'implantation des sondes. Après ce délai, les microdialysats sont récupérés automatiquement toutes les dix minutes (volume : 20 µL) dans un collecteur réfrigéré et sont stockés à -80°C jusqu'au moment de l'analyse. Les microdialysats collectés pendant les 30 premières minutes de l'expérience seront utilisés pour mesurer la concentration basale de glutamate, qui doit être stable. Le quinolinate (5 mM dans aCSF) est ensuite perfusé par la sonde de microdialyse pendant 30 minutes, puis les sondes sont de nouveau perfusées avec du aCSF pendant 1 h. Les sondes sont alors retirées, rincées dans du aCSF et plongées pendant 10 min dans une solution de glutamate de concentration connue (mélange standard d'acide aminés, Sigma). La concentration en glutamate dans ce dialysat est mesurée par HPLC ce qui permet de calculer le taux de récupération/l'efficacité de chaque sonde et ainsi d'évaluer la concentration absolue de glutamate extracellulaire. L'efficacité des sondes est de l'ordre de 10-25% et ne diffère pas entre les groupes expérimentaux. Vingt-quatre heures après la fin de l'expérience, le rat est sacrifié et son cerveau est immédiatement coupé en tranches de 1 mm à l'aide d'une matrice. Les sections sont incubées pendant 10 min dans une solution à 1,5% de 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), un colorant vital qui entre dans les cellules selon leur potentiel de membrane négatif et prend une teinte rosée (Bederson et al., 1986). Cette coloration permet de vérifier l'implantation des sondes dans le striatum et de constater l'apparition d'une petite lésion (zone non colorée) autour du site d'injection, liée à la perfusion de quinolinate.

## **2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)**

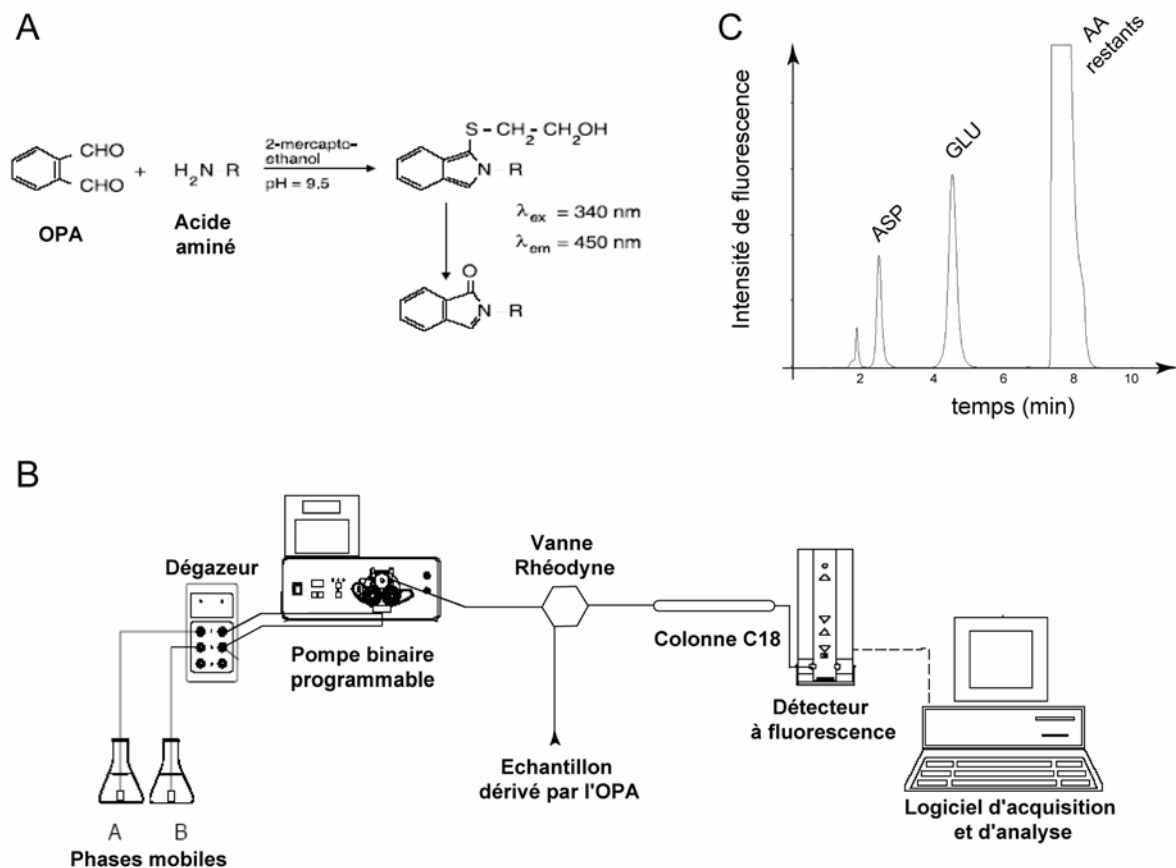
La technique d'HPLC permet de séparer les différents composés d'un échantillon selon leurs propriétés physico-chimiques pour ensuite les détecter par fluorométrie avec une grande sensibilité. Les acides aminés peuvent être dosés par cette méthode s'ils sont dérivés avec du o-phthalaldehyde (OPA) ce qui les rend fluorescents et donc détectables (**Fig. 4A**). En fonction des propriétés physico-chimiques des acides aminés et de leur affinité pour la phase stationnaire (la silice composant la colonne d'HPLC) et les phases mobiles, ils seront élués de la colonne et détectés par fluorométrie à différents temps. Nous avons choisi

un protocole simplifié qui permet une détection rapide du glutamate et de l'aspartate en utilisant un gradient d'éluion binaire de 12 minutes selon la méthode proposée par Kehr (1998).

Une chaîne d'HPLC est mise en place avec les phases mobiles (phase A : 100 mM d'acétate de sodium pH=6,95, 5% méthanol et 2,5 % tétrahydrofuran (THF), phase B : 97,5 % méthanol et 2,5 % THF), un dégaseur (Jou Research) une colonne Nucleosil C<sub>18</sub>, 5 µm, 125 x 4 mm (Macherey-Nagel), une vanne rhéodyne, une pompe à gradient (Merck), un détecteur de fluorescence (λ excitation : 340 nm, λ émission 460 nm, Jasco) et un ordinateur (**Fig. 4B**). Le gradient binaire suivant est utilisé avec un débit de 1 mL/min.

Temps (min)	0	6	6,1	7,0	7,1	12
Voie A (%)	100	100	0	0	100	100
Voie B (%)	0	0	100	100	0	0

Les acides aminés présents dans le dialysat sont dérivés volume à volume avec 40 mM d'OPA, 10 % éthanol et 0,4 % β-mercapto-éthanol dans un tampon borate 360 mM, pH=9,3. Après 1 min de réaction, 20 µL du mélange est injecté dans la vanne à l'aide d'une seringue Hamilton. L'aspartate est détecté environ à 2,5 min après l'injection, le glutamate à 4,5 min et un pic de fluorescence correspondant aux autres acides aminés qui sont élués avec la phase mobile B est détecté à 8 min (**Fig. 4C**). Les pics du chromatogramme sont détectés automatiquement et l'aire correspondante est quantifiée par le logiciel Borwin. Une gamme d'acides aminés (0,05; 0,5; 1 et 5 µM) est utilisée pour calibrer les mesures en établissant une droite de régression [glutamate]= a x (aire du pic) + b. Cette droite de régression a été établie pour chaque journée d'analyse, les coefficients a et b ont toujours des valeurs très proches et le coefficient de régression R<sup>2</sup> de la droite est toujours supérieur à 0,995. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la concentration basale de glutamate (calculée à partir des temps T<sub>0</sub>, T<sub>10</sub> et T<sub>20</sub>).



**Figure 4. L'HPLC**

(A) La réaction de l'o-phthalaldehyde (OPA) avec les acides aminés en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol conduit à la formation d'acides aminés dérivés qui sont fluorescents pour des longueurs d'onde d'excitation proches de 340 nm.

(B) Montage expérimental pour la détection par fluorescence des acides aminés après séparation à travers une colonne nucléosil C18 en phase inverse. Les phases mobiles sont dégazées et mises en circulation par une pompe binaire à gradient. Une vanne rhéodyne est utilisée pour injecter 20  $\mu$ L d'échantillon préalablement dérivé par l'OPA. La colonne C18 permet de séparer les différents acides aminés de l'échantillon selon leurs propriétés physico-chimiques, ils sont détectés par fluorométrie. Les pics des chromatogrammes obtenus sont détectés automatiquement et leur aire est quantifiée.

(C) Exemple de chromatogramme obtenu à partir de microdialysat de cerveau de rat. ASP : aspartate, GLU : glutamate (temps de rétention : 2,5 min et 4,5 min respectivement). Le dernier pic correspond à l'ensemble des autres acides aminés.

## L. Mesure autoradiographique de la consommation cérébrale de 2- $^{18}$ F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG)

La technique autoradiographique de mesure de la consommation de glucose a été mise au point par Sokoloff en utilisant le deoxyglucose marqué au  $^{14}$ C comme traceur. L'utilisation du [ $^{18}$ F]-fluorodeoxyglucose (FDG) a ensuite été introduite, permettant l'utilisation de cet isotope à période courte émetteur de positons pour des examens chez l'Homme. Le deoxyglucose, qui est transporté comme le glucose, reste séquestré dans les cellules après



sa conversion en deoxyglucose 6-phosphate par l'héxokinase ce qui permet d'évaluer la consommation de glucose par les cellules de cerveau en utilisant le modèle développé par Sokoloff (1977).

### **1. Consommation de FDG en conditions basales**

Des rats appartenant au groupe lenti-CNTF/lenti-LacZ et Veh/lenti-LacZ (n=6/groupe) reçoivent une injection intrapéritonéale de FDG (1 à 1,7 mCi dans 1 mL de sérum physiologique). Les rats vigiles sont laissés dans leur cage pendant 45 min, puis sont euthanasiés avec une overdose de pentobarbital. Les cerveaux sont extraits, congelés dans de l'isopentane à -40°C et immédiatement coupés au cryostat en sections sériées de 20 µm d'épaisseur avec espace intercoupe de 100 µm. Les sections sont deshydratées au fur et à mesure de la coupe à l'aide d'un banc chauffant à 60°C et sont mises à exposer sur un film Biomax MR (Kodak) pendant la nuit. Les films sont alors révélés en chambre noire et les autoradiogrammes sont digitalisés.

### **2. Consommation de FDG après une atteinte excitotoxique par le QA**

Des rats appartenant au groupe lenti-CNTF (n=6), lenti-LacZ (n=5) et Veh (n=4) sont anesthésiés avec un mélange kétamine-xylazine puis la veine et l'artère fémorale sont cathétérisées. Les rats sont alors placés dans un cadre stéréotaxique et reçoivent une injection de QA (40 nmol) et de PBS dans le striatum droit et gauche respectivement selon le protocole décrit plus haut. Quinze minutes plus tard, ils reçoivent une injection intraveineuse de FDG (1 à 1,5 mCi dans 0,7 mL de sérum physiologique). Après 45 min, les rats sont euthanasiés avec une overdose de pentobarbital et les cerveaux sont traités comme précédemment.

La température corporelle des rats est contrôlée et maintenue autour de 37°C tout au long de l'expérience à l'aide d'une couverture thermostatée. La glycémie, le pH, les pressions partielles artérielles en O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> sont mesurées au début et à la fin de l'expérience à l'aide d'appareils de mesure de la glycémie (Onetouch glucose meter, Lifescan ) et des gaz du sang (ABL5, Radiometer).

### **3. Analyse des autoradiogrammes**

Dans nos conditions expérimentales, il n'est pas possible de calculer une consommation moyenne de glucose (CMR<sub>glu</sub>) à proprement parler (exprimée en mol/min/g) selon l'équation de Sokoloff, car nous n'avons pas réalisé de fonction d'entrée (Sokoloff et al., 1977). Pour simplifier, nous utiliserons le terme de 'consommation' de glucose alors que le paramètre véritablement mesuré est l'accumulation de glucose-6-phosphate radioactif

dans le parenchyme cérébral. De plus, des expériences préliminaires menées au laboratoire ont montré qu'avec cette activité totale injectée, la D.O. spécifique augmente linéairement avec l'épaisseur de la coupe (de 3 à 40  $\mu\text{m}$ ) même dans les régions de forte activité comme le cortex. De plus, la D.O. spécifique augmente linéairement avec la quantité de FDG injecté (en mCi/kg) pour des coupes de 20  $\mu\text{m}$ . Ceci montre que dans ces conditions expérimentales, il n'y a pas de saturation du film et que la consommation de FDG peut être déterminée de façon semi-quantitative (Jacquard et al., soumis).

Pour les deux expériences, une région d'intérêt correspondant à chaque striatum est tracée en utilisant le logiciel Total Lab. La D.O. spécifique moyenne est calculée pour chaque rat et chaque côté en soustrayant la D.O du fond (non spécifique).

Pour la mesure en conditions basales, le niveau d'activité dans le striatum est relativement homogène et la mesure finale de consommation de FDG correspond à la moyenne de D.O. sur 10 coupes successives pour chaque animal.

Pour la mesure en conditions d'activation, la D.O. moyenne est mesurée dans le striatum injecté avec du PBS et celui injecté avec du QA, ce qui permet de calculer un pourcentage d'augmentation de consommation de glucose induit par le QA. Le pourcentage moyen mesuré sur 20 sections successives qui correspond au pourcentage maximum d'activation est calculé pour chaque animal.

## **M. Mesure autoradiographique de la consommation cérébrale de [ $^{14}\text{C}$ ]-3-hydroxybutyrate**

Une technique similaire a été utilisée pour mesurer la consommation cérébrale du  $\beta$ -hydroxybutyrate marqué au  $^{14}\text{C}$  en utilisant la méthode décrite par Nehlig *et al.* (1991). A la différence du déoxyglucose, lors de la dégradation enzymatique du BHB, il n'y a pas d'étape qui conduise à son accumulation à l'intérieur des cellules. Ainsi les animaux sont sacrifiés très peu de temps après l'injection (5 min) de manière à éviter une perte du signal radioactif sous forme de [ $^{14}\text{C}$ ]- $\text{CO}_2$ .

### **1. Protocole**

Des rats appartenant au groupe CNTF/lenti-LacZ (n=8) et Veh/lenti-LacZ (n=3) sont habitués à la contention pendant 30 min la veille de l'expérience. Ceci permet de garder les rats vigiles sans provoquer de stress trop important le jour de l'expérience. Les rats sont anesthésiés à l'isoflurane et la veine et l'artère fémorale sont cathétérisées. Les rats sont ensuite mis en contention sur le support et récupèrent de l'anesthésie pendant 90 min. Ils

reçoivent alors une injection intraveineuse de [<sup>14</sup>C]-β-hydroxybutyrate (200 μCi/kg, 35 Ci/mol, PerkinElmer). Après 5 min, le rat est sacrifié et son cerveau est extrait, congelé dans de l'isopentane et coupé en 3 séries de coupes de 20 μm à l'aide d'un cryostat. La première série est immédiatement mise à déshydrater sur un banc chauffant. Les coupes de cette série sont utilisées pour l'autoradiographie, elles sont exposées sur film avec des standards de radioactivité <sup>14</sup>C (American radiochemical company) à -80 °C pendant 1 mois. Les deux autres séries sont congelées à -20°C, la deuxième série étant utilisée pour un marquage histochimique de la BDH (cf. § E.1).

## 2. Reconstruction en 3 dimensions (3D)

Etant donné que la consommation de [<sup>14</sup>C]-BHB est hétérogène dans le striatum (voir introduction §D-2-c et résultats), nous avons réalisé une analyse en trois dimensions des images autoradiographiques, qui permet de détecter des différences fines et locales de consommation dans une structure.

Les autoradiogrammes et les coupes histochimiques sont scannés à 600 dpi. A l'aide de logiciels développés au SHFJ (Aims, BrainVisa et Anatomist, Rivière et al., 2003), les coupes marquées pour la BDH sont automatiquement extraites, rangées dans l'ordre antéro-postérieur et le volume anatomique complet est reconstruit par une méthode d'alignement rigide coupe à coupe (chaque coupe est recalée selon des critères anatomiques par rapport à la précédente, Ourselin et al., 2001). Ce volume anatomique sert de référence pour la reconstruction du volume autoradiographique en co-alignant chaque coupe autoradiographique avec la coupe anatomique adjacente correspondante. Les niveaux de gris des images d'autoradiographie sont transformés en activité (nCi/g) en appliquant un polynôme de degré 4 dont les coefficients sont déterminés à partir des standards de radioactivité (Herard et al., 2005b). Les deux volumes reconstruits sont en correspondance, ce qui permet de définir les régions d'intérêts avec beaucoup de précision sur le volume anatomique (car les coupes histochimiques présentent beaucoup plus de détails et de contrastes) et de les reporter sur le volume autoradiographique pour obtenir les valeurs d'activité recherchées.

## 3. Analyse

Les deux striata de chaque rat sont délimités manuellement sur chaque coupe formant le volume anatomique, ce sont les volumes d'intérêt. Avec le <sup>14</sup>C-BHB, il y a une très forte accumulation de radioactivité au niveau des ventricules latéraux qui contamine le striatum dans lequel la radioactivité est très faible (**Fig. 5A**). Il est donc nécessaire d'éroder le volume d'intérêt de manière à supprimer le signal (non-spécifique) du ventricule. Cette

étape d'érosion est réalisée de manière standardisée (**Fig. 5A**). A partir de ces volumes d'intérêt érodés, plusieurs types d'analyse sont possibles :

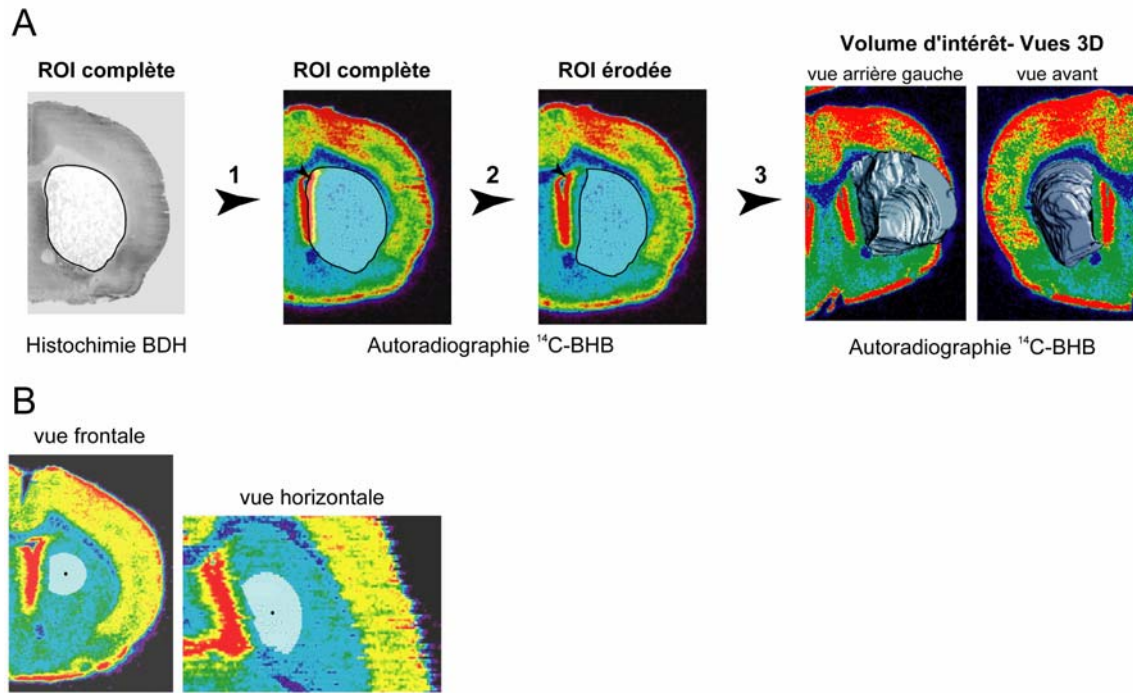
- *Mesures globales dans le volume d'intérêt* : activité moyenne et totale dans le striatum. Ces mesures ne tirent aucun avantage de la reconstruction en 3D.

- *Analyse par seuil de détection dans le volume d'intérêt*. Des critères de taille (volume minimum) et d'activité (activité supérieure à la moyenne + 2 écart-types) sont utilisés pour détecter les zones cohérentes de forte activité. Cette technique est très utile pour la détection automatique et objective de zones d'activation cérébrale (ex: stimulation visuelle et mesure de consommation de glucose dans le colliculus, Herard et al., 2005a). Dans le cas d'une consommation basale d'une molécule marquée le signal radioactif est plutôt homogène et il est difficile de mettre en évidence une telle zone de forte activation.

- *Mesures d'activité dans des zones spatiales restreintes*. Grâce à la reconstruction en 3D et à la mise en correspondance du volume anatomique et du volume autoradiographique, il est possible de positionner une sphère de taille définie à l'intérieur du volume d'intérêt défini plus haut, de la centrer sur le site d'injection du lentivirus et d'en mesurer l'activité (**Fig. 5B**). Etant donné que le striatum est une structure très hétérogène et qui accumule peu le <sup>14</sup>C-BHB, surtout en conditions basales, les différences de consommation de BHB liée à la surexpression du CNTF sont difficiles à mettre en évidence. Cette méthode permet de n'étudier que la partie du striatum qui a le plus reçu de CNTF.

## **N. Analyse statistique**

Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  l'erreur standard (s.e.m.). L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour des comparaisons de moyennes entre groupes expérimentaux, suivie d'un test a posteriori de Scheffé pour comparer les groupes deux à deux. L'effet de plusieurs paramètres sur la même variable est testé à l'aide d'une ANOVA à multiples facteurs (MANOVA). Pour les comparaisons de données appariées (ex : comparaison entre striatum droit et gauche du même individu) un test t apparié a été employé. Lorsque les variables étudiées n'étaient pas paramétriques (ex : pourcentage) le test de Kruskal-Wallis, qui est l'équivalent non-paramétrique de l'ANOVA a été utilisé, suivi d'un test de Mann-Whitney. Pour les données non-paramétriques présentant un appariement, le test des rangs de Wilcoxon a été employé.



**Figure 5. Analyse 3D des autoradiogrammes**

**(A)** Etapes d'analyse: Une région d'intérêt (ROI) correspondant au striatum est tracée manuellement sur les coupes qui ont eu un marquage histochimique de la BDH. Cette ROI est reportée sur la coupe autoradiographique correspondante qui a été co-alignée par recalage (1). Pour éviter la contamination de la ROI par la forte activité du ventricule (flèche), la ROI est érodée automatiquement au niveau des ventricules (2). Ces étapes sont réalisées pour chaque coupe, ce qui permet de reconstruire en 3D un volume d'intérêt (3).

**(B)** Le point d'injection du lentivirus est déterminé par une observation microscopique des coupes histochimiques et il est reporté sur les coupes autoradiographiques (point). Une sphère de 2 mm de diamètre est tracée à l'intérieur du volume d'intérêt érodé. Ce volume d'intérêt restreint permet d'étudier la région du striatum qui a le plus reçu de CNTF.

Les images autoradiographiques sont codées en couleur en fonction de l'activité mesurée (en nCi/g).

# RESULTATS

## **IV. Résultats**

Cette étude a pour but de caractériser le fonctionnement et le rôle des astrocytes activés *in vivo* et plus particulièrement de comprendre en quoi l'activation des astrocytes pourrait être bénéfique à la survie neuronale. Pour cela, nous avons développé un modèle d'activation des astrocytes dans le striatum de rat par transfert lentiviral et surexpression du CNTF (**partie A**). Ce modèle *in vivo* nous a permis de caractériser les effets de l'activation astrocytaire sur deux fonctions cérébrales primordiales et interdépendantes : la régulation du métabolisme énergétique (**partie B**) et de l'homéostasie glutamatergique (**partie C**) et d'évaluer les conséquences de ces changements sur la survie neuronale (**partie D**).

### **A. Caractérisation du modèle d'activation astrocytaire par le CNTF après infection lentivirale**

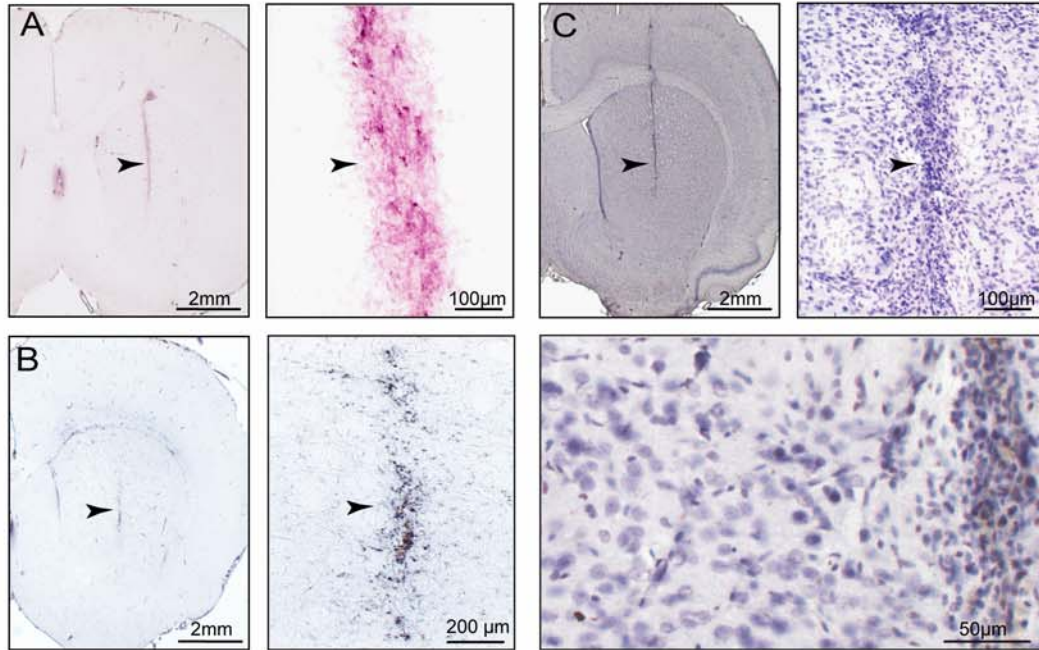
#### **1. L'infection par les lentivirus permet une expression importante, stable et étendue du transgène dans la striatum de rat**

##### *a. Absence de toxicité du lentivirus*

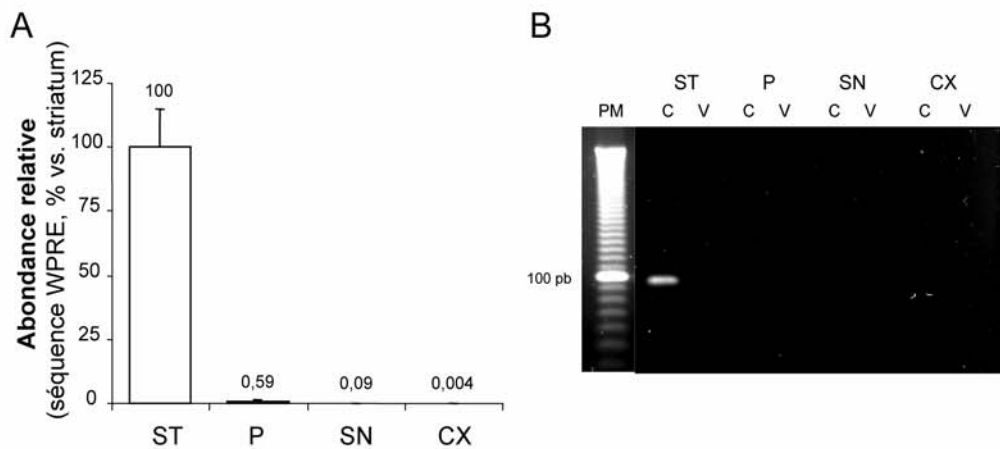
Pour évaluer si l'injection d'un lentivirus dans le parenchyme cérébral induit une réponse inflammatoire ou affecte la survie neuronale, des rats appartenant aux groupes lenti-CNTF, lenti-LacZ et Veh ont été injectés avec trois concentrations de virus (100, 200 et 300 ng p24/  $\mu$ L) et leur cerveaux ont été étudiés à deux semaines ou deux mois post-infection (n=4-5/ groupe). Les rats infectés ne présentent pas d'anomalies visibles (apparence, comportement) et ont une croissance pondérale normale.

Les macrophages et la microglie active sont détectés par des anticorps dirigés contre la protéine Cd-11b (**Fig. 1A**) ou ED1 (**Fig. 1B**); ils ne sont visibles qu'au niveau du site d'injection, quel que soit le groupe considéré. De plus, un marquage ubiquitaire des cellules avec la gallocyanine démontre qu'il n'y a ni perte cellulaire massive ni prolifération microgliale à proximité du site d'injection (**Fig. 1C**).

L'injection de lentivirus ne produit pas, *per se*, de toxicité majeure, de réponse inflammatoire ou de mort neuronale.



**Figure 1. L'infection lentivirale n'induit pas de toxicité majeure ni de phénomènes inflammatoires**  
 La présence de CD-11b (A) et de ED1 (B), deux marqueurs de la microglie active et des macrophages a été mise en évidence par immunohistochimie. Dans tous les groupes expérimentaux étudiés (Veh, lenti-LacZ ou lenti-CNTF, titre viral 100, 200 ou 300 ng p24/µL, étude à 15 jours ou deux mois post infection), seul le trajet de descente de l'aiguille présente un marquage (flèche). (C) La détection ubiquitaire des cellules par la gallocyanine confirme l'absence de prolifération microgliale et de dégénérescence neuronale massive. Images représentatives de l'ensemble des groupes expérimentaux (n=4-5 animaux/ groupe).



**Figure 2. Le lentivirus infecte seulement les cellules dans la structure d'injection, il n'est pas transporté de manière antérograde ou rétrograde**

(A) Les ARNm présents dans le striatum (ST), le pallidum (P), la substance noire (SN) et le cortex moteur (CX) ont été extraits, 'reverse transcrits' et la séquence virale WPRE a été amplifiée par PCR en temps réel. L'abondance de la séquence WPRE dans chaque structure est exprimée par rapport à celle du striatum injecté avec le lenti-CNTF, après normalisation avec le gène de la cyclophiline A. La quantité d'ARNm contenant la séquence WPRE en dehors du striatum est négligeable, ce qui prouve que le virus n'a pas été transporté en dehors de la structure d'injection (n=3/groupe).

(B) L'amplicon obtenu en fin de RT-PCR migre au poids moléculaire attendu (100 paires de base) sur gel d'agarose et il n'est détectable que dans le striatum, et du côté injecté avec lenti-CNTF (C). Dans le contrôle négatif (côté injecté avec Veh, V), l'ARNm viral reste indétectable à la fin des 40 cycles de PCR.

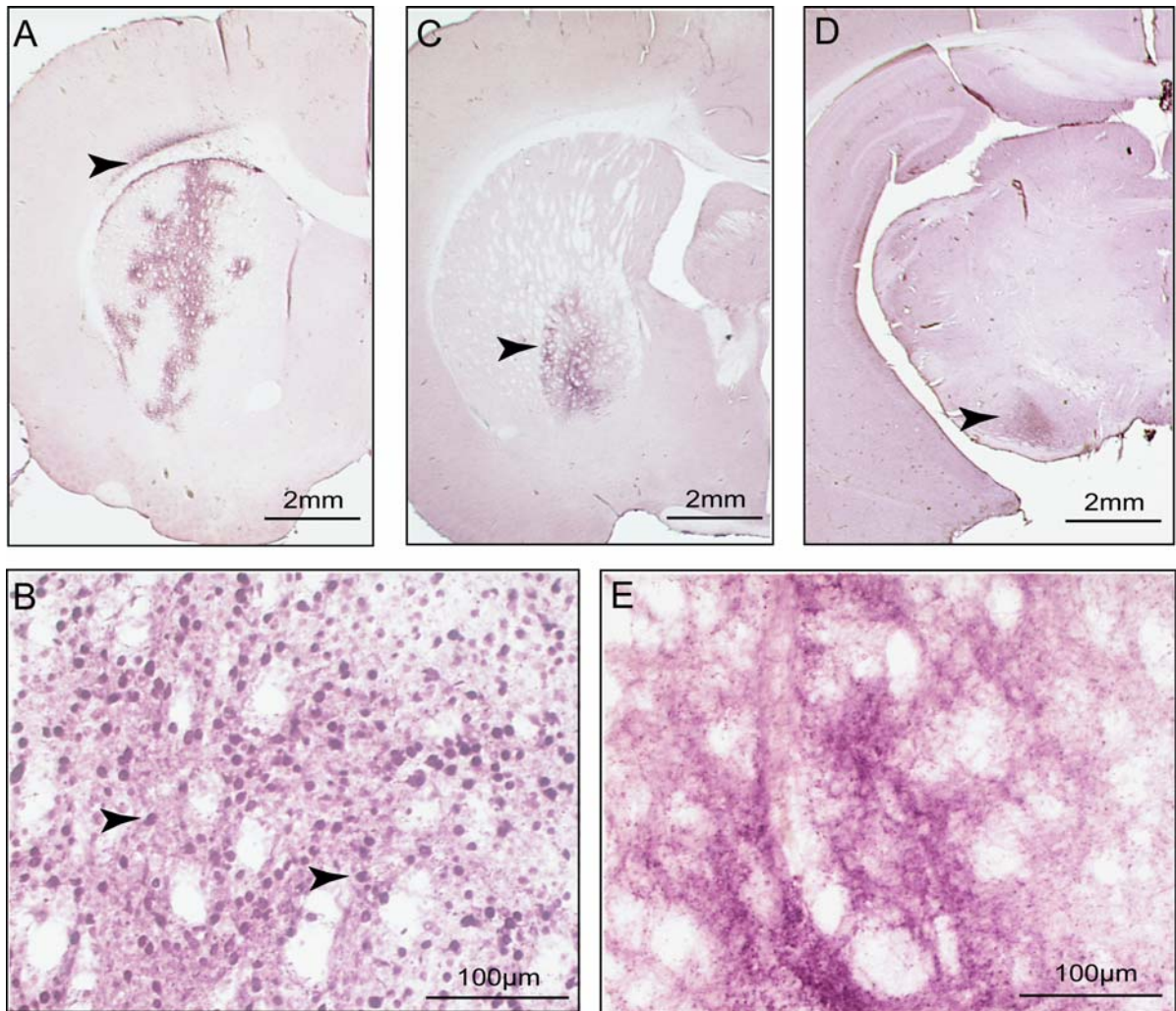


### *b. Localisation des cellules infectées et diffusion de la protéine transgénique*

Des expériences ont démontré que le lentivirus utilisé dans cette étude infecte les neurones à 99% (de Almeida et al., 2001). Le transport du lentivirus et sa diffusion dans d'autres structures cérébrales sont moins bien caractérisés. Pour mettre en évidence les neurones infectés par le lentivirus dans différentes structures cérébrales connectées avec le striatum (pallidum, cortex moteur et substance noire), on utilise la technique de RT-PCR en temps réel qui permet de détecter une séquence spécifique des ARNm d'origine virale et de comparer son abondance relative entre ces structures. Les ARNm présents dans ces structures chez des rats du groupe lenti-CNTF/Veh (n=3) ont été extraits, 'reverse transcrits' et amplifiés. La quantification relative de l'abondance de la séquence transgénique dans l'hémisphère injecté avec lenti-CNTF montre que l'ARNm d'origine virale n'est détectable que dans le striatum (**Fig. 2**). Les structures efférentes au striatum (i.e. pallidum et substance noire réticulée) et les structures afférentes au striatum (i.e. cortex moteur et substance noire compacte) ne produisent pas d'ARNm viral. Ceci démontre que le lentivirus n'a pas été transporté de façon rétrograde, le long des axones vers les neurones projetant sur le striatum, ni de façon antérograde vers les structures de projection. Les cellules striatales sont les seules cellules qui ont été infectées, qui ont intégré le génome viral et qui synthétisent de façon stable l'ARNm transgénique.

Un marquage immunohistochimique de la  $\beta$ -galactosidase permet de mettre en évidence l'expression de la protéine transgénique par les cellules infectées. La majeure partie des cellules infectées se trouve dans le striatum, à proximité du site d'injection (**Fig 3A**). Des cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase sont aussi visibles dans le cortex et dans le striatum le long du corps calleux qui constitue une barrière de diffusion pour les virus. La  $\beta$ -galactosidase, qui est couplée à un signal de localisation nucléaire est principalement exprimée dans le noyau. Du fait du fort niveau d'expression, un marquage neuritique est aussi visible dans le striatum (**Fig 3B**) et dans les structures de projection du striatum comme le globus pallidus (**Fig 3C**) et la substance noire réticulée (**Fig. 3D**). Dans ces structures, seuls les axones des neurones striataux sont marqués et aucun noyau n'est visible (**Fig 3E**). Ceci confirme l'absence d'infection virale directe des cellules appartenant à ces structures.

Ainsi, l'infection lentivirale dans le striatum conduit à une surexpression locale du transgène, associée à une production dans les structures de projection du striatum après transport de la protéine transgénique le long de l'axone.



### Figure 3. Diffusion de la protéine transgénique

(A) De nombreuses cellules exprimant la  $\beta$ -galactosidase transgénique sont visibles dans le striatum après un marquage immunohistochimique. Ces cellules sont réparties autour du site d'injection et le long du corps calleux (flèche).

(B) Le marquage est majoritairement nucléaire (flèche), car le gène LacZ est couplé à une séquence de localisation nucléaire. A cause du fort niveau d'expression du transgène, les neurites contiennent également la protéine transgénique.

Les axones marqués des neurones striataux sont visibles dans les structures de projection : le globus pallidus (C) et la substance noire réticulée (D).

(E) Dans ces structures, un marquage purement neuritique est observé. Ceci confirme l'absence d'infection de cellules appartenant à ces structures.

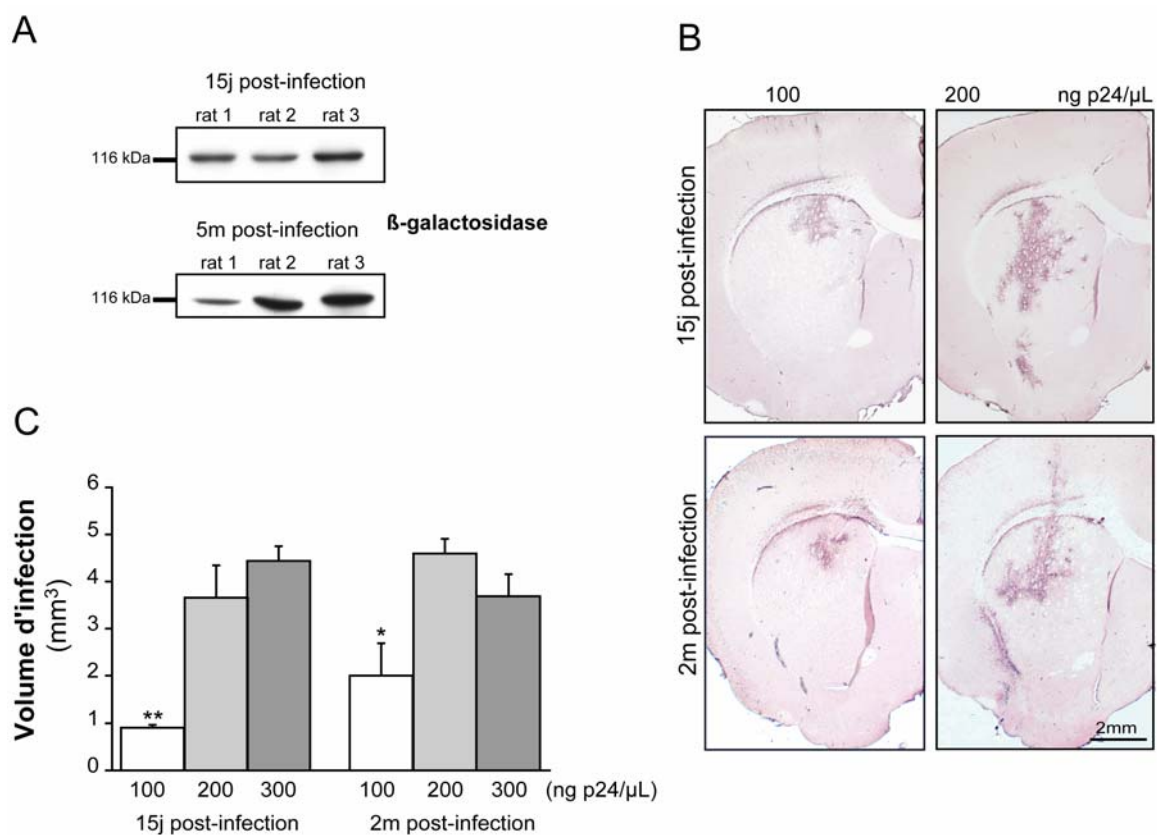
Images issues d'un rat infecté avec lenti-LacZ à 200 ng p24/ $\mu$ L, 15 jours post-infection.

### c. Stabilité de l'expression du transgène dans le temps

La protéine transgénique ( $\beta$ -galactosidase) est détectée par immunoblot dans le striatum des rats infectés avec le lenti-LacZ (titre : 100 ng p24/ $\mu$ L) à des temps post-infection variant de 15 jours à 5 mois (n=3-4/groupe). On détecte la présence de la  $\beta$ -galactosidase dans tous les cas avec un niveau d'expression variable selon les individus. Aucune diminution du niveau d'expression n'est visible jusqu'à 5 mois (Fig. 4A).

Le volume d'infection (i.e. volume  $\beta$ -galactosidase immunopositif) est quantifié de manière à évaluer la stabilité de l'expression du transgène (entre 15 jours et 2-5 mois) et l'effet du titre viral sur l'étendue des cellules infectées. Le volume présentant un marquage représente environ 3 à 10% du volume total du striatum (**Fig. 4B, C**). Le volume contenant des cellules infectées dépend du titre viral ( $p < 0,0001$  pour 'l'effet titre viral', MANOVA) mais il reste stable au cours du temps ( $p = 0,26$  pour 'l'effet temps post-infection', MANOVA). Le volume d'infection est significativement plus réduit avec un titre infectieux de 100 ng p24/ $\mu$ L ( $p < 0,05$ , test de Scheffé) par rapport aux titres 200 et 300 ng p24/ $\mu$ L (**Fig. 4C**).

Ces résultats montrent que l'infection lentivirale permet une surexpression stable du transgène dans le striatum.



**Figure 4. La protéine transgénique est exprimée de façon stable dans une partie importante du striatum**

(A) La  $\beta$ -galactosidase est détectée par immunoblot dans le striatum de rat injecté avec 100 ng p24/ $\mu$ L après 15 jours et 5 mois post-infection sans signe évident de baisse du niveau d'expression. Une certaine variabilité dans le niveau d'expression de la protéine transgénique est visible entre les différents rats.

(B) Le volume occupé par les cellules infectées exprimant le transgène augmente avec le titre infectieux mais reste stable au cours du temps, jusqu'à 2 mois post-infection.

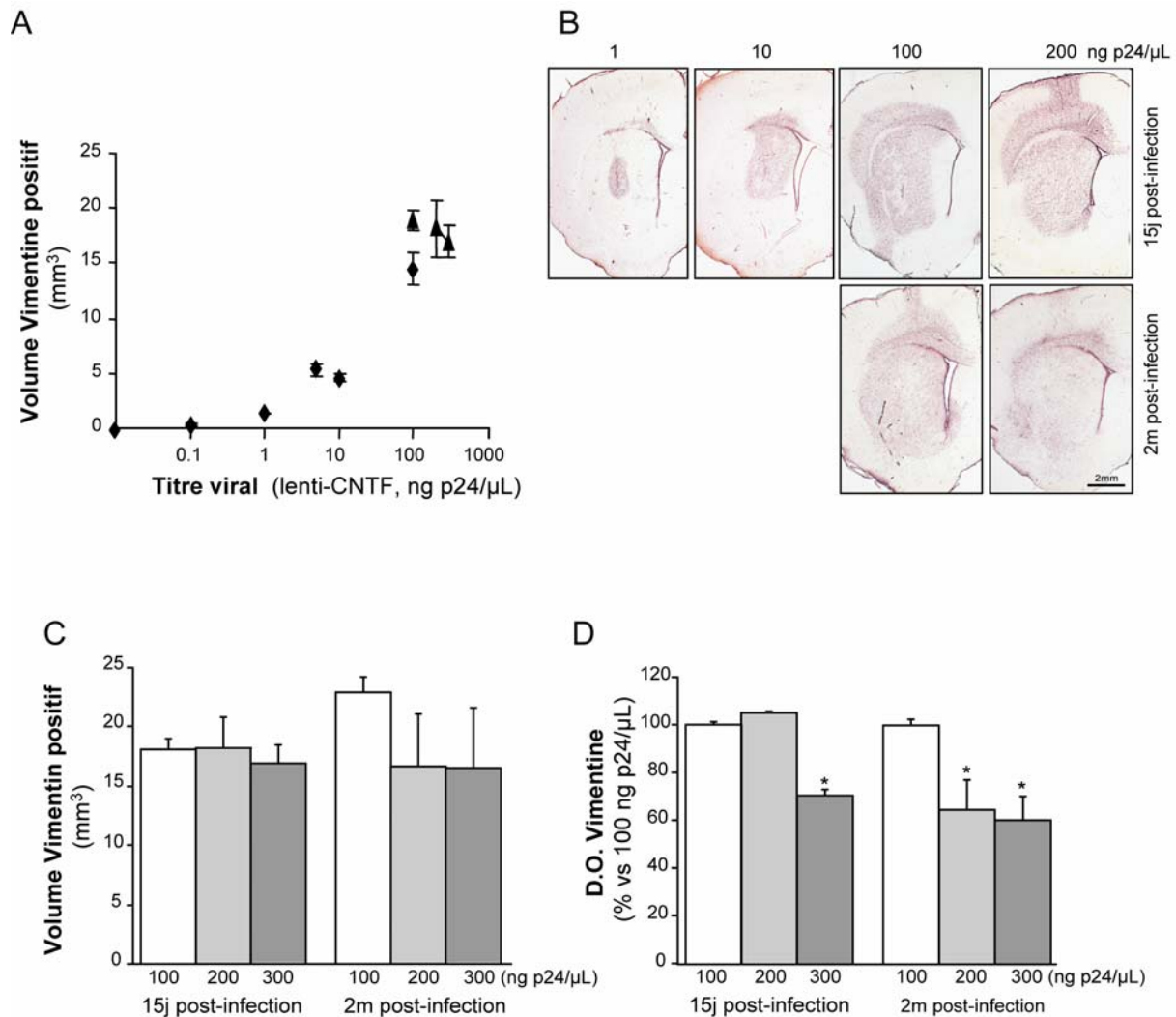
(C) La quantification du volume d'infection (volume marqué pour la  $\beta$ -galactosidase) montre que ce volume représente 1 à 4 mm<sup>3</sup> (soit 3 à 10% environ du volume total du striatum). Le titre infectieux utilisé a un effet significatif sur le volume d'infection ( $p < 0,0001$ , MANOVA). Les injections de virus à un titre de 100 ng p24/ $\mu$ L conduisent à un volume d'infection systématiquement plus faible que les deux autres titres viraux étudiés à 15 jours (\*\*  $p < 0,01$ , test de Scheffé) et deux mois (\*  $p < 0,05$  vs 200 ng p24, test de Scheffé) post-infection. En revanche, le volume d'infection n'est pas modifié au cours du temps ( $p = 0,26$ , MANOVA).  $n = 4-5$ /groupe.

#### *d. Optimisation du modèle d'activation astrocytaire par le CNTF*

Pour étudier les conséquences de l'activation astrocytaire sur le fonctionnement cérébral, il est important que la surexpression du CNTF induise une activation importante, étendue dans le striatum et stable sur plusieurs mois. Des marquages immunohistochimiques de la vimentine, un filament intermédiaire absent dans le striatum adulte et qui est induit par le CNTF (Levison et al., 1996) ont été réalisés 15 jours post-infection sur des rats injectés avec des doses croissantes de virus (0,1; 1; 5; 10; 100; 200; 300 ng p24/ $\mu$ L). Le volume présentant un marquage pour la vimentine augmente avec le titre viral utilisé avec un plateau à partir de 100 ng p24/ $\mu$ L (**Fig. 5A, B**). Ce volume, qui correspond à la zone de diffusion du CNTF, est largement plus important que la zone des cellules infectées estimée avec la  $\beta$ -galactosidase (cf. § précédent). Par exemple, pour un titre de 100 ng p24/ $\mu$ L, le volume d'infection est de 0.9 mm<sup>3</sup> alors que le volume d'activation des astrocytes est de 18 mm<sup>3</sup>, soit les deux tiers du striatum. Ceci est lié au fait que le CNTF est sécrété (le gène du CNTF est fusionné à la séquence signal des immunoglobulines, voir §III-A) et il peut donc diffuser à partir des cellules productrices infectées. Pour les titres les plus élevés, un marquage est également observé dans le cortex, le long du corps calleux du fait de la diffusion limitée des virus au cours de l'injection (**Fig. 5B**). Pour étudier la stabilité de l'effet du CNTF sur les astrocytes, les mêmes marquages ont été réalisés à 2 mois post-infection pour les trois titres les plus élevés. Les volumes d'activation ne sont pas différents entre les trois groupes, comme observé en **5A** ( $p=0,54$ , pour l'effet 'titre infectieux', MANOVA), et sont similaires à ceux mesurés à 15j post-infection ( $p=0,74$  pour l'effet 'temps post-injection', MANOVA, **Fig. 5C**). En revanche, l'intensité du marquage est significativement plus faible pour les titres les plus élevés ( $*p<0,05$  vs 100 ng p24/ $\mu$ L, Mann-Whitney, **Fig. 5D**). En réalité, cette atténuation des effets du CNTF sur l'expression de la vimentine est déjà visible à 15 jours post-infection pour le titre de 300 ng p24/ $\mu$ L (**Fig. 5D**). L'atténuation des effets visibles du CNTF peut être due à une baisse régulée de l'expression du transgène dans les cellules infectées ou à une diminution des effets du CNTF sur les cellules cibles par un phénomène de 'down-regulation' de la voie de signalisation qui est assez bien caractérisé pour les cytokines (Krebs et Hilton, 2000).

L'ensemble de cette caractérisation montre que le titre optimal est de 100 ng p24/ $\mu$ L puisqu'il induit une activation astrocytaire dans une grande partie du striatum qui est maintenue au cours du temps. Les expériences suivantes ont donc été réalisées entre 15 jours et 6 mois après une injection intra-striatale de véhicule (Veh), ou des virus lenti-CNTF ou lenti-LacZ à 100 ng p24/ $\mu$ L.





**Figure 5. Effets dose dépendants du CNTF sur l'expression de la vimentine**

(A) Le volume présentant un marquage pour la vimentine dans le striatum est dépendant du titre viral utilisé. Le volume d'activation astrocytaire atteint un plateau à partir de 100 ng p24/μL, et correspond à environ deux tiers du volume total du striatum.

(B) Marquage immunohistochimique de la vimentine. Le CNTF induit l'expression de la vimentine qui n'est normalement pas exprimée dans le cerveau de rat adulte hormis au niveau des ventricules latéraux. L'étendue de l'activation astrocytaire par le CNTF augmente avec le titre infectieux. Après deux mois post-infection, le marquage de la vimentine apparaît moins fort pour le titre de 200 de p24/μL (les coupes ont été traitées simultanément).

(C) Le volume vimentine-positif mesuré à 2 mois n'est pas significativement différent du volume mesuré à 15 jours ( $p=0,74$ , MANOVA), et il n'y a pas de différence entre les trois titres viraux étudiés ( $p=0,54$ , MANOVA).

(D) La D.O. striatale liée au marquage de la vimentine confirme que l'utilisation de titres viraux élevés conduit à une atténuation significative des effets du CNTF sur l'expression de la vimentine. \* $p<0,05$  vs 100 ng p24, Mann Whitney.  $n=3-5$ /groupe.

## 2. Le CNTF active spécifiquement les astrocytes

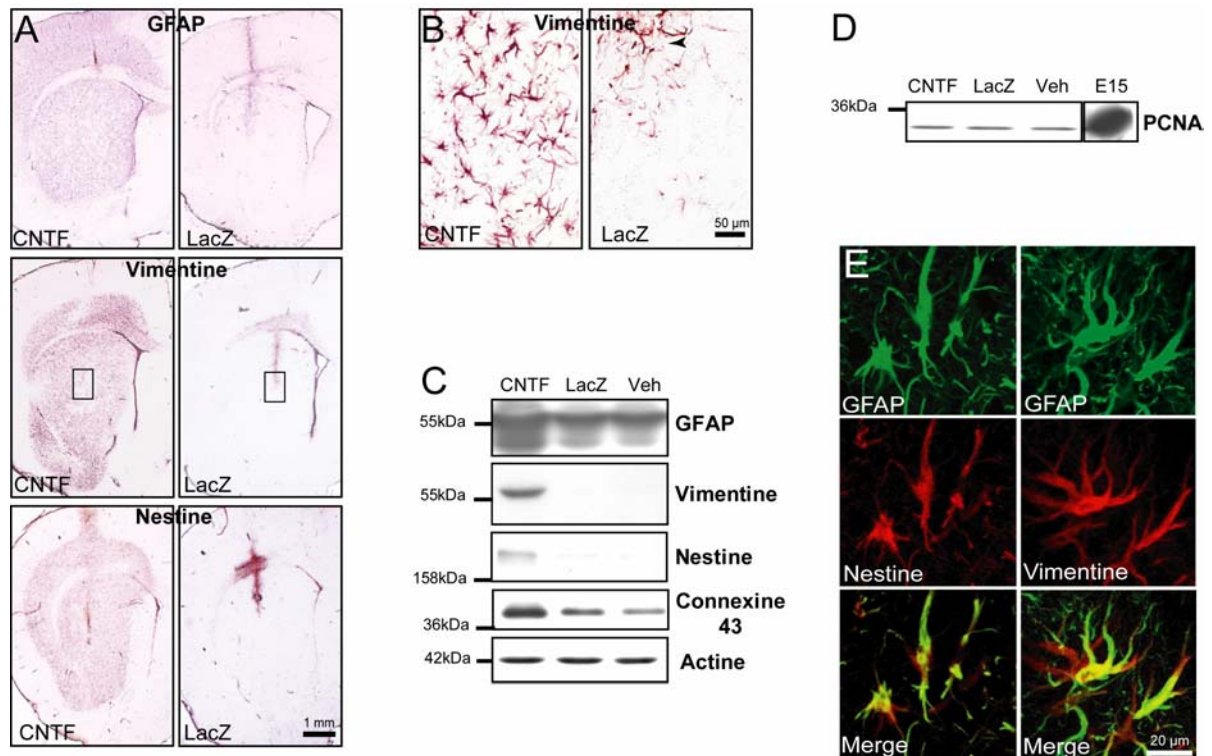
### a. Le CNTF induit un phénotype astrocytaire immature sans prolifération

Les effets de la surexpression du CNTF sur le phénotype astrocytaire ont été étudiés par immunohistochimie et immunoblots. La surexpression du CNTF dans le striatum de rat

modifie le phénotype des astrocytes striataux. Les astrocytes activés par le CNTF surexpriment la GFAP et réexpriment la vimentine et la nestine en comparaison avec les astrocytes du groupe contrôle qui ont été injecté avec le lenti-LacZ (**Fig. 6A**). A plus fort grossissement, les astrocytes activés apparaissent hypertrophiques et ont une morphologie ramifiée avec des prolongements élargis (**Fig. 6B**). Les seuls astrocytes présentant un marquage vimentine ou nestine dans le groupe lenti-lacZ sont situés au niveau de la descente de l'aiguille, du fait de la lésion mécanique locale. Ces astrocytes sont moins gros et plus allongés (**Fig. 6B**). L'augmentation d'expression de ces filaments intermédiaires est aussi visible par western blot (**Fig. 6C**). Le niveau d'expression de la GFAP est augmenté de  $68 \pm 2\%$  dans le groupe lenti-CNTF par rapport aux groupes contrôles lacZ et Veh ( $p < 0,0001$  test de Scheffé). La vimentine et la nestine ne sont détectables que dans le groupe CNTF. La connexine 43, qui forme les jonctions GAP, est aussi significativement surexprimée dans le groupe CNTF ( $+127 \pm 17\%$ ,  $p < 0,01$ , test de Scheffé, **Fig. 6C**).

Ces astrocytes présentant un phénotype de type immature peuvent correspondre à des astrocytes résidents du striatum dont le phénotype est modifié, à des cellules issues de la division des cellules souches progénitrices de la zone sous-ventriculaire ou à des astrocytes ayant migrés vers le striatum (voir § II-B-1). Pour clarifier ce point, l'expression de la cycline proliferating cell nuclear antigen (PCNA), qui est plus fortement exprimée au cours de la mitose, a été évaluée par western blot. Le niveau d'expression de PCNA est similaire dans les trois groupes expérimentaux ( $p = 0,4$ , ANOVA), et il est bas en comparaison avec le contrôle positif qui présente une prolifération cellulaire importante (cerveau d'embryon de 15 jours, **Fig. 6D**). La GFAP est coexprimée avec la vimentine et la nestine par les mêmes astrocytes à 15j post-infection (**Fig. 6E**). C'est toujours le cas après 2 mois d'infection (données non montrées), ce qui prouve que l'état d'activation astrocytaire induit par le CNTF est maintenu et que les astrocytes activés ne se différencient pas au cours du temps. Ainsi la population d'astrocytes striataux activés par le CNTF est homogène et stable. Il n'y a pas de prolifération visible ni de différenciation de progéniteurs, mais plutôt un changement de l'ensemble de la population des astrocytes striataux vers un phénotype activé immature.

Il est important de noter que dans tous les cas, il n'y a pas de différence visible entre les groupes lenti-LacZ et Veh. Ceci montre que l'infection lentivirale et la surexpression d'une protéine transgénique n'ont pas d'effet détectable et que les observations faites dans le groupe lenti-CNTF sont spécifiques et liées à la surexpression du CNTF.



### Figure 6. CNTF modifie profondément le phénotype astrocytaire

(A) La surexpression du CNTF conduit à l'activation des astrocytes dans une grande partie du striatum. Ceci se traduit par la surexpression de la GFAP et la réexpression de la vimentine et de la nestine, deux filaments intermédiaires normalement absents du striatum de rat adulte.

(B) Un agrandissement du rectangle en (A) met en évidence l'hypertrophie des astrocytes activés par le CNTF en comparaison avec les astrocytes marqués pour la vimentine dans le groupe lenti-LacZ, qui sont restreints au niveau du site d'injection (flèche).

(C) Les western blots réalisés à partir des striata des rats injectés avec lenti-CNTF (CNTF), lenti-LacZ (LacZ) ou le véhicule (Veh) confirment la surexpression de GFAP et la réexpression de vimentine et de nestine dans le groupe CNTF. Les astrocytes activés par le CNTF surexpriment également la connexine 43.

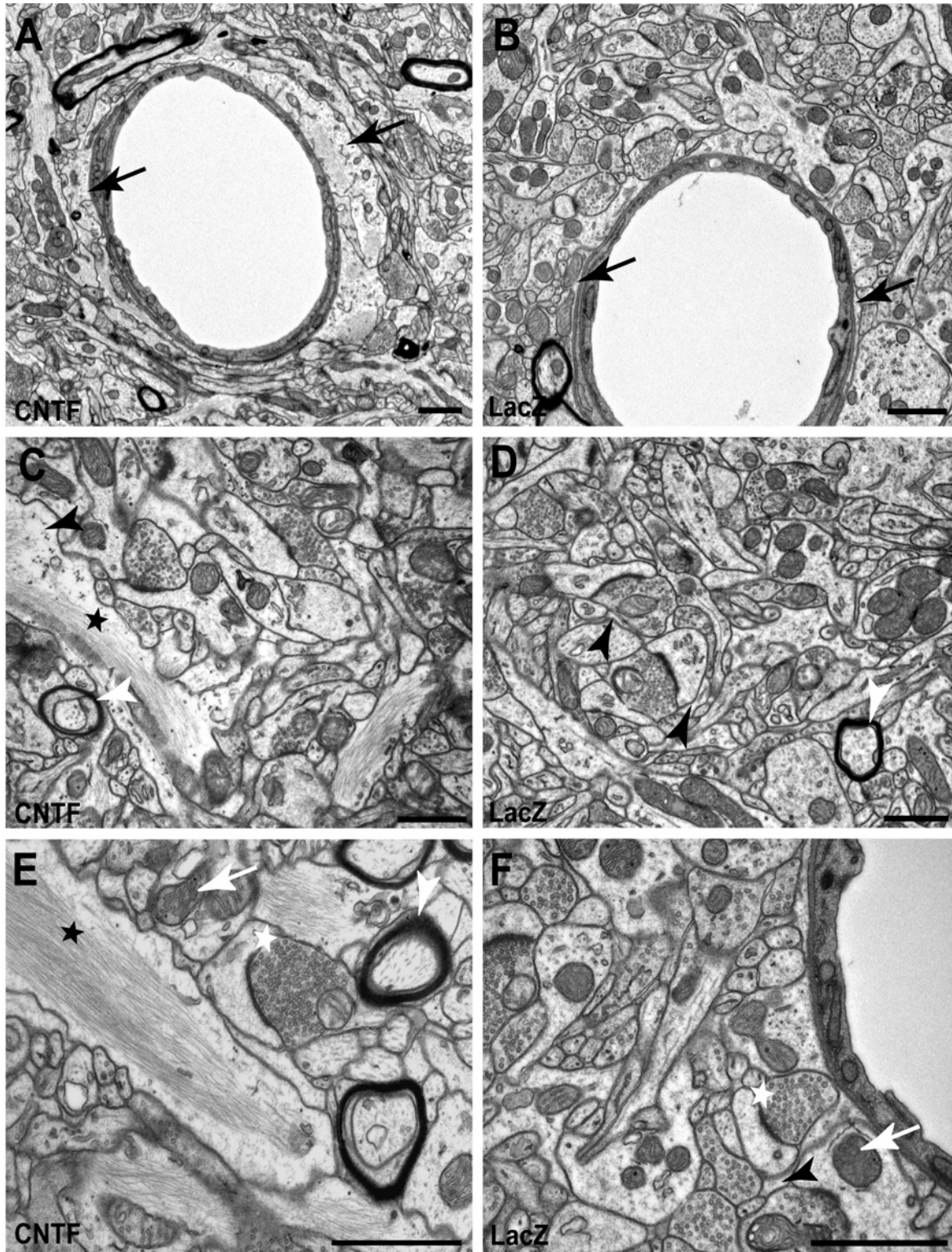
(D) Le niveau d'expression de PCNA, une cycline dont la quantité augmente au cours des divisions cellulaires, est identique dans les trois groupes ( $p=0,4$ , ANOVA). Il est beaucoup plus faible que celui du contrôle positif (cerveau d'embryon de 15 jours, E15). Ainsi, CNTF n'induit pas de prolifération massive dans le striatum.

(E) La GFAP et la nestine d'une part (colonne de gauche) et la GFAP et la vimentine d'autre part (colonne de droite) sont exprimées par les mêmes astrocytes activés par le CNTF.

L'ensemble des images présentées proviennent d'études faites à 15j post-infection ( $n=4-5/$  groupe). Des résultats très similaires ont été obtenus à 2-5 mois post-infection

Pour caractériser les astrocytes activés au niveau ultrastructural, des études en microscopie électronique ont été réalisées. Les astrocytes activés dans le groupe CNTF sont très nettement hypertrophiques et ont des processus remplis de larges faisceaux de filaments intermédiaires. Les astrocytes du groupe contrôle envoient des prolongements très fins autour des synapses et des capillaires sanguins (**Fig. 7**). Les autres éléments ultrastructuraux (mitochondries, axones myélinisés, synapses) n'apparaissent pas modifiés par la surexpression de CNTF.





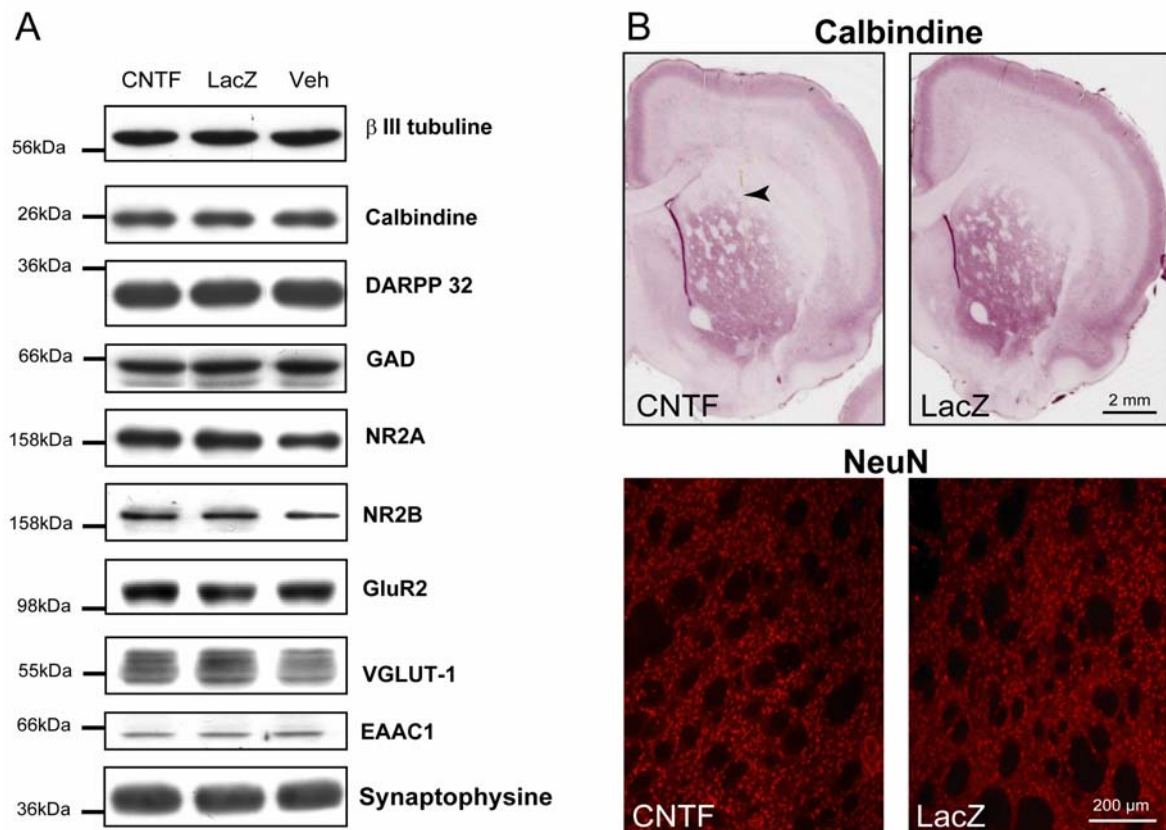
**Figure 7. Caractérisation ultrastructurale des effets de la surexpression du CNTF**

En microscopie électronique, les astrocytes dans le striatum lenti-CNTF (A, C, E) apparaissent hypertrophiques et possèdent des prolongements remplis de faisceaux de filaments comparés avec le striatum contrôlé (B, D, F). (A) Un capillaire sanguin partiellement entouré par un pied astrocytaire élargi (flèche noire) dans le groupe CNTF, (B) alors que les pieds astrocytaires dans le groupe LacZ sont très fins. A plus fort grossissement, les processus astrocytaires (tête de flèche noire) semblent être remplis de filaments (étoile noire) dans le groupe CNTF (C, E). Dans le groupe contrôlé, les processus astrocytaires forment des petites structures qui entourent les synapses (D, F). Les autres éléments ultrastructuraux visibles en microscopie électronique tels que les mitochondries (flèche blanche), les synapses (étoile blanche) ou les axones myélinisés (tête de flèche blanche) ne semblent pas modifiés par la surexpression de CNTF (C-F).



*b. Le CNTF n'a pas d'effet détectable sur les neurones*

Bien que ce soient les neurones qui produisent le CNTF transgénique, aucune modification concernant de nombreuses protéines neuronales n'a été détectée, contrairement au phénotype astrocytaire qui est profondément changé par la surexpression du CNTF (**Fig. 8**). Des protéines spécifiques des neurones en striataux comme la  $\beta$  III tubuline, la calbindine, qui est impliquée dans la régulation calcique, la dopamine et cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP32) qui participe à la signalisation dopaminergique et l'enzyme de synthèse du GABA, la glutamic acid decarboxylase (GAD) ont un niveau d'expression équivalent dans les trois groupes expérimentaux. Il en est de même pour certaines des protéines participant à la neurotransmission glutamatergique comme les sous-unités des récepteurs au glutamate (NR2A, NR2B et GluR2), le transporteur vésiculaire au glutamate VGLUT1, le transporteur membranaire EAAC1 et la synaptophysine (**Fig. 8**).

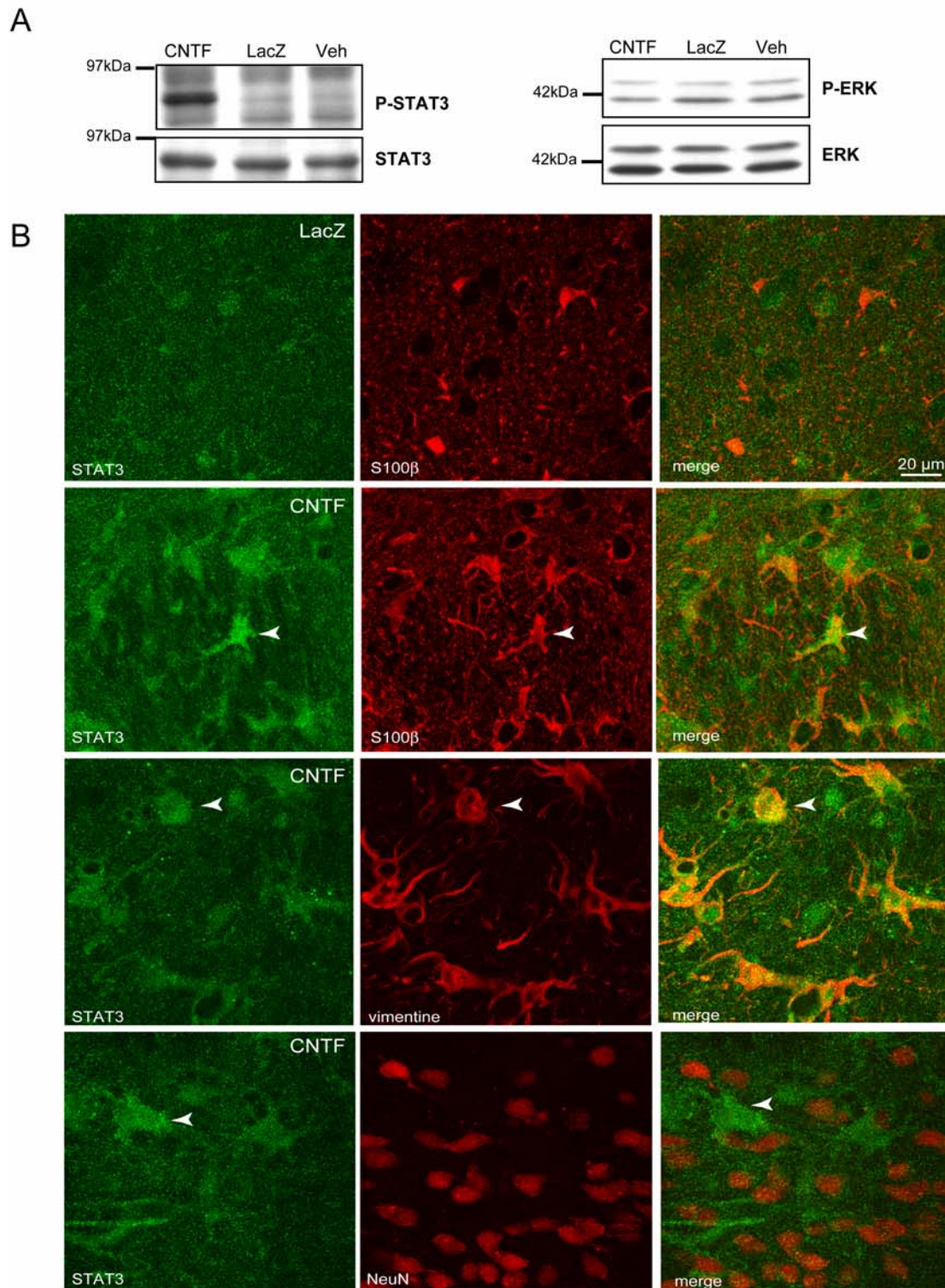


**Figure 8. CNTF n'a pas d'effet détectable sur le phénotype neuronal**

**(A)** Aucune des protéines neuronales étudiées n'est modifiée par la surexpression du CNTF. En particulier, des marqueurs des neurones striataux comme la  $\beta$  III tubuline, la calbindine, DARPP32 et la GAD ou des protéines impliquées dans la transmission glutamatergique comme des sous-unités des récepteurs au glutamate (NR2A, NR2B et GluR2), le transporteur vésiculaire au glutamate VGLUT1, le transporteur membranaire EAAC1 et la synaptophysine restent inchangés.

**(B)** Le marquage immunohistochimique de la calbindine est similaire entre les groupes lenti-CNTF et lenti-LacZ, ce qui confirme que CNTF n'a aucun effet visible sur le phénotype neuronal, même au niveau du site d'injection (flèche). Le même résultat est observé avec un marquage immunofluorescent de NeuN.

Images représentatives de 4-5 animaux/ groupe.



**Figure 9. Signalisation intracellulaire du CNTF**

(A) La forme active phosphorylée de STAT3 (P-STAT3) n'est détectable que dans le groupe CNTF. La quantité de STAT3 totale est identique entre les trois groupes expérimentaux. En revanche, aucune augmentation du niveau de phosphorylation de ERK n'est détectable dans le groupe CNTF. La même activation est visible plusieurs mois, ce qui prouve que CNTF active durablement la voie JAK-STAT dans le striatum mais pas la voie des MAP kinases. Images représentatives de 4-5 animaux/ groupe à 15j post-infection. (B) Le marquage de STAT3 (vert) est relativement homogène dans le groupe lenti-LacZ, alors que des cellules présentant un marquage principalement périnucléaire sont identifiables dans le groupe lenti-CNTF (flèche). Ces cellules coexpriment S100 $\beta$  et la vimentine (rouge). En revanche, il n'y a pas de comarquage entre NeuN et STAT3 dans ce groupe (rangée du bas). Ces doubles marquage montrent que le CNTF induit une relocalisation de STAT3 dans les astrocytes activés, ce qui est en accord avec une activation astrocytaire de la voie JAK-STAT.

### *c. La surexpression du CNTF conduit à l'activation stable de la voie JAK-STAT*

Pour caractériser les voies de signalisation impliquées dans les effets du CNTF, deux voies classiques de transduction (voie JAK-STAT et voie des MAP kinases) ont été étudiées par western blot. La forme phosphorylée de STAT3 (forme active) n'est détectable que dans le groupe CNTF dès 15 jours (**Fig. 9A**) et jusqu'à 5 mois post-infection (données non montrées). La quantité totale de STAT3 n'est en revanche pas modifiée. Le niveau de phosphorylation de ERK, une kinase-clé de la voie des MAP kinases est identique entre les groupes, ainsi que son niveau total d'expression (**Fig. 9A**). Ces résultats montrent que CNTF active de façon stable la voie JAK-STAT, mais n'induit pas n'activation détectable de la voie des MAP kinases. Pour déterminer dans quel type cellulaire a lieu l'activation de la voie, des doubles marquages fluorescents ont été réalisés. L'anticorps anti-phospho-STAT3 ne fonctionne pas dans les nombreuses conditions testées. Cependant, un marquage de l'ensemble des formes de STAT3 (phosphorylé et non phosphorylé) révèle des différences importantes entre le groupe lenti-LacZ et lenti-CNTF. Dans le groupe lenti-CNTF, des cellules apparaissent avec un marquage périnucléaire bien visible, alors que le groupe contrôle présente un marquage du neuropile sans cellules identifiables (**Fig. 9B**). Les cellules présentant un marquage STAT3 périnucléaire, coexpriment S100 $\beta$  et la vimentine mais pas NeuN (**Fig. 9B**). Ces résultats montrent que le CNTF induit une relocalisation de STAT3 dans les astrocytes activés. Comme l'activation de STAT3 par phosphorylation entraîne sa translocation dans le noyau (voir § II-C-1-c), ce changement de marquage peut être considéré comme le reflet de l'activation de la voie JAK-STAT dans les astrocytes activés.

**Notre modèle d'activation astrocytaire stable et étendu dans le striatum de rat offre la possibilité de caractériser et d'étudier *in vivo* des fonctions cérébrales importantes qui pourraient être modifiées par les astrocytes activés.**

## **B. L'activation des astrocytes est associée à une modification de la régulation du métabolisme énergétique**

Nous avons tout d'abord étudié les effets de l'activation astrocytaire sur la régulation du métabolisme énergétique, une fonction cérébrale dans laquelle les astrocytes jouent un rôle majeur.

### **1. L'activation des astrocytes est associée à une diminution de la consommation basale de glucose**

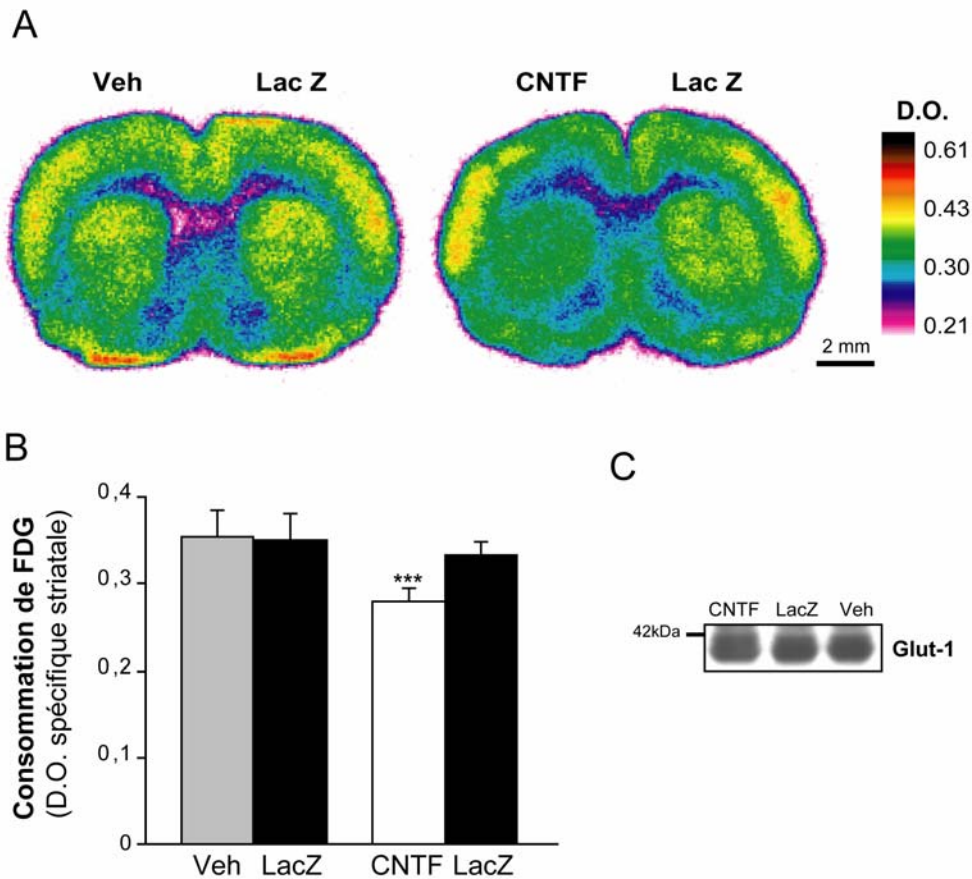
La consommation de glucose, qui est le substrat énergétique majoritaire du cerveau a été le premier index métabolique étudié. Des rats vigiles appartenant aux groupes lenti-CNTF/lenti-LacZ et Veh/lenti-LacZ (n=6/groupe) ont été utilisés pour évaluer la consommation basale de 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) par autoradiographie.

Les autoradiogrammes mettent en évidence une diminution homogène de la consommation de glucose dans le striatum injecté avec lenti-CNTF (**Fig. 10A**). Cette baisse est très significative (-17% vs. Lenti-LacZ, p<0,0001, test t apparié, **Fig. 10B**). En revanche, il n'y a pas de différence entre le striatum injecté avec lenti-LacZ ou Veh (p=0,55, test t apparié, **Fig 10A, B**), ce qui confirme que la diminution observée est bien liée au CNTF et pas au virus.

L'expression du transporteur astrocytaire au glucose (GLUT1) a été étudié par immunoblot. Il n'y a pas de différence de niveau d'expression entre les trois groupes (p=0,92, ANOVA, **Fig. 10C**). La baisse de consommation de glucose dans le groupe lenti-CNTF n'est donc pas liée à une baisse d'expression des transporteurs.

CNTF a des effets similaires à ceux de la leptine au niveau de l'hypothalamus (voir §II-C-4-c). Bien qu'aucune anomalie dans la croissance pondérale des rats n'ait été détectée dans les rats lenti-CNTF au cours du temps, nous avons vérifié que la diminution de consommation de glucose n'était pas liée à une perturbation générale du métabolisme. La glycémie de rats appartenant aux groupes lenti-CNTF (n=6), lenti-LacZ (n=6) et Veh (n=5) et préalablement mis à jeun pendant la nuit a été mesurée. La glycémie a une valeur physiologique et n'est pas différente entre les groupes (lenti-CNTF = 1,71 g/L ± 0,04; lenti-LacZ = 1,68 ± 0,08 et Veh = 1,69 ± 0,07, p=0,95, ANOVA), ce qui confirme que la modification métabolique observée est locale et restreinte au striatum.





**Figure 10. L'activation des astrocytes est associée à une baisse de la consommation de glucose en conditions basales**

**(A)** Les autoradiogrammes mettent en évidence une baisse de consommation de FDG dans l'ensemble du striatum injecté avec lenti-CNTF.

**(B)** La consommation basale de FDG est significativement diminuée de 17% du côté injecté avec lenti-CNTF comparé au striatum contralatéral injecté avec lenti-LacZ. Les striata injectés avec lenti-LacZ et Veh présentent une consommation de glucose similaire. \*\*\*  $p < 0,0001$  test t apparié  $n = 6$ /groupe

**(C)** Le niveau d'expression de l'isoforme de 45 kDa de Glut-1, le transporteur astrocytaire au glucose est identique entre les groupes. Image représentative de 4-5 animaux/groupe.

## 2. L'activation des astrocytes par le CNTF ne produit pas d'hypométabolisme oxydatif généralisé dans le striatum

Pour caractériser plus en détail les changements métaboliques induits par le CNTF, d'autres réactions enzymatiques importantes pour le métabolisme cérébral ont été étudiées par histochimie et immunoblot.

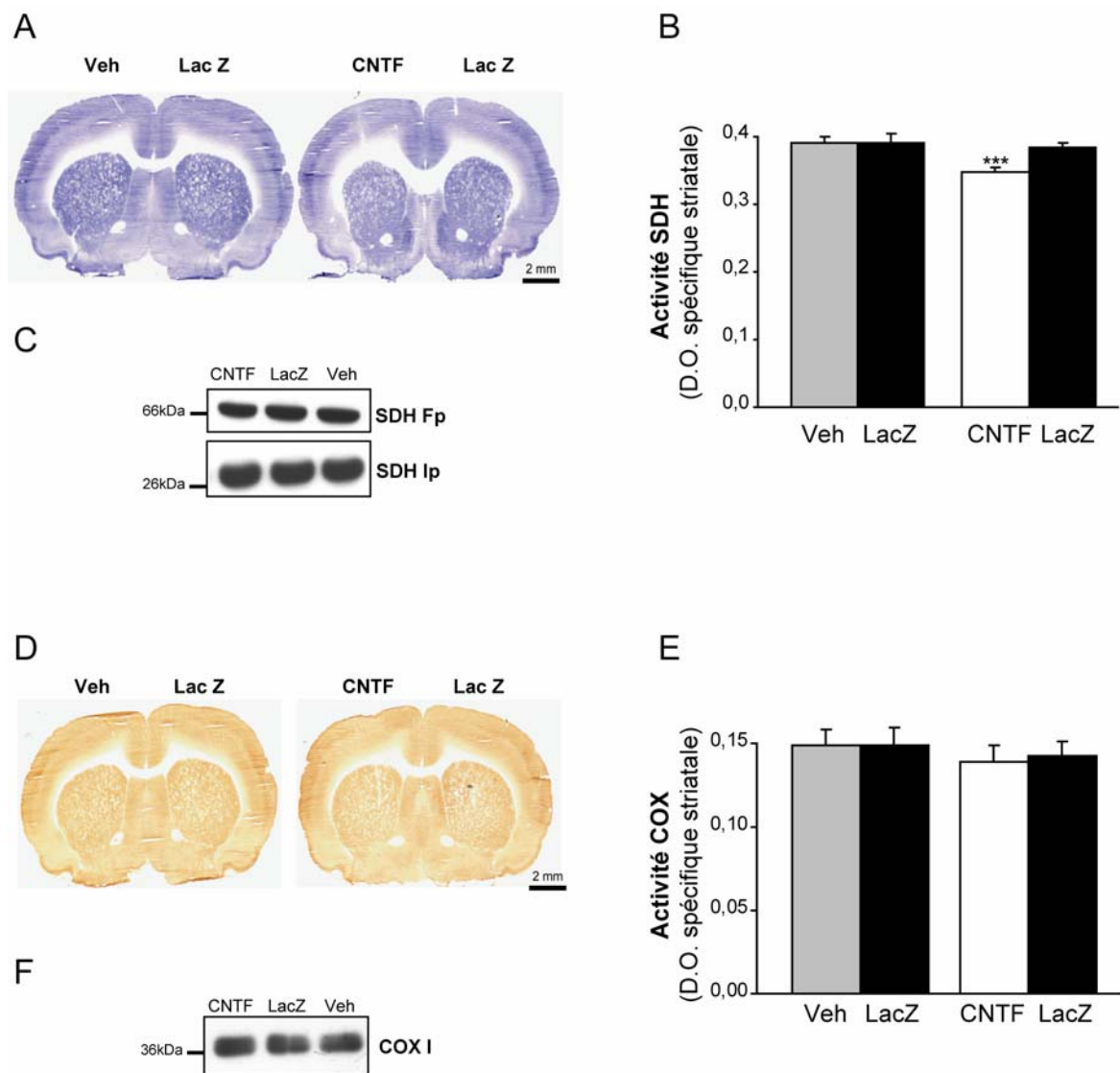
*a. La succinate déshydrogénase (SDH) : une enzyme du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative*

L'activité de la SDH est mesurée semi-quantitativement par histochimie sur des coupes provenant de l'expérience précédente. L'activité de la SDH dans le striatum est légèrement, mais significativement plus faible dans le striatum injecté avec lenti-CNTF par rapport au striatum contralatéral injecté avec lenti-LacZ (-9,6 %,  $p < 0,001$ ,  $n=7$ , test t apparié, **Fig. 11A, B**). Aucune différence d'activité n'est mesurée entre le striatum injecté avec Veh et celui injecté avec lenti-LacZ ( $p=0,73$ ,  $n=7$ , test t apparié). L'activité de la SDH dans le cortex somatosensoriel n'est pas différente entre les groupes (lenti-CNTF=  $0,29 \pm 0,005$ ; lenti-LacZ=  $0,30 \pm 0,007$ ,  $n=7$ ,  $p= 0,22$ , test t apparié), ce qui confirme que la diminution d'activité observée dans le striatum est bien liée à la surexpression locale de CNTF. Le niveau d'expression striatal des sous-unités Fp et Ip de la SDH est semblable entre les trois groupes expérimentaux ( $p=0,68$  et  $0,83$ , ANOVA, **Fig. 11C**), ce qui suggère que la baisse d'activité limitée de la SDH n'est pas associée à une diminution détectable de l'expression de ses sous-unités catalytiques.

*b. La cytochrome oxydase (COX) : une enzyme terminale de la phosphorylation oxydative*

Pour évaluer si l'activité d'autres enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale était aussi affectée par la surexpression du CNTF, nous avons étudié avec les méthodes précédentes, la COX, une enzyme appartenant au complexe IV de la mitochondrie.

L'activité de la COX mesurée par histochimie est identique entre les groupes à la fois dans le striatum ( $p=0,45$  entre lenti-CNTF et lenti-LacZ,  $p=0,93$  entre Veh et lenti-LacZ,  $n=7$ , test t apparié) et dans le cortex ( $p=0,11$  entre lenti-CNTF et lenti-LacZ,  $p=0,38$  entre Veh et lenti-LacZ,  $n=7$ , test t apparié, **Fig. 11D, E**). De même, le niveau d'expression de la sous-unité 1 de la COX est identique entre les groupes ( $p=0,9$ , ANOVA, **Fig. 11F**). Ces résultats montrent que les étapes terminales de la phosphorylation oxydative ne sont pas modifiées de manière détectable par la surexpression du CNTF.



**Figure 11. L'activation des astrocytes ne produit pas d'hypométabolisme oxydatif généralisé**  
**(A)** La mise en évidence histochimique de l'activité de la SDH révèle une très légère baisse dans l'ensemble du striatum injecté avec lenti-CNTF.  
**(B)** L'activité de la SDH est significativement diminuée de 9,6% du côté injecté avec lenti-CNTF par rapport au striatum injecté avec lenti-LacZ. En revanche, les striata injectés avec lenti-LacZ et Veh ne sont pas différents. \*\*\*  $p < 0,001$  test t apparié  $n = 7$ /groupe.  
**(C)** Le niveau d'expression des deux sous-unités catalytiques de la SDH (SDH Fp et SDH Ip) est identique entre les groupes ( $p = 0,68$  et  $0,83$  respectivement, ANOVA). Image représentative de 4-5 animaux/ groupe.  
**(D)** L'activité de la COX, détectée par histochimie, ne met pas en évidence de différence entre les groupes. Ce qui est confirmé par la quantification de l'activité striatale  $n = 7$ /groupe **(E)**.  
**(F)** Le niveau d'expression de la sous-unité centrale de la COX (COX 1) est identique entre les groupes ( $p = 0,9$ , ANOVA). Image représentative de 4-5 animaux/ groupe.

### 3. Les astrocytes activés sont capables d'utiliser la voie des corps cétoniques

Les résultats précédents montrent que même si la consommation de glucose est diminuée, les étapes aval de production d'ATP (i.e. activité du complexe IV de la mitochondrie) ne sont pas modifiées. Ceci suggère qu'une voie métabolique alternative

alimentant la chaîne respiratoire pourrait se mettre en place avec l'activation des astrocytes par le CNTF. Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié la voie d'oxydation des corps cétoniques (CC) qui conduit à la production d'acétyl-CoA et de NADH, H<sup>+</sup> (**Fig. 7 de l'introduction**).

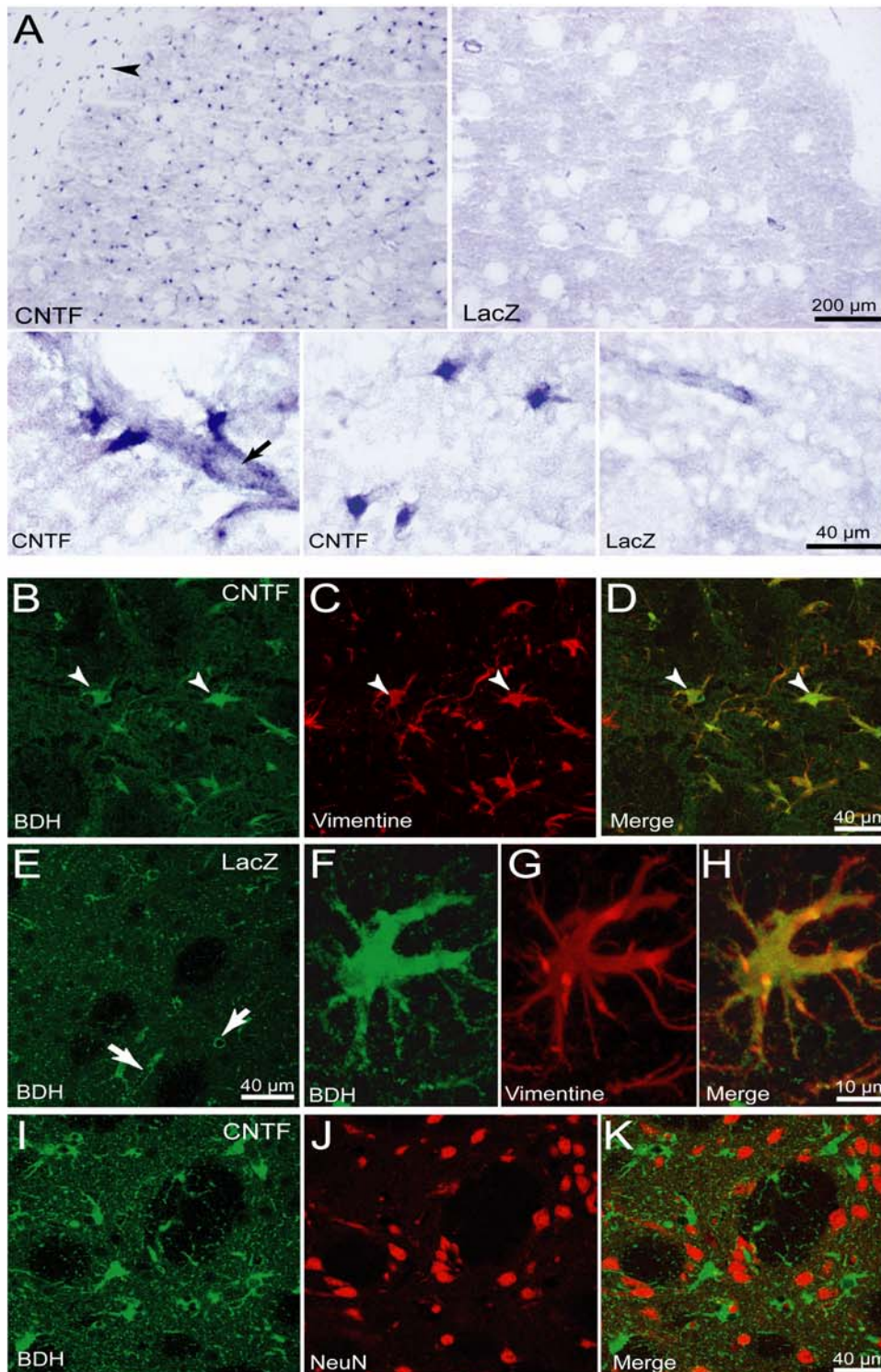
*a. Les astrocytes activés présentent une forte activité BDH*

Nous avons étudié l'activité et l'expression de la  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase (BDH), l'enzyme de la voie des corps cétoniques qui métabolise le  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB).

L'activité de la BDH est étudiée par histochimie sur des coupes de rats lenti-CNTF/lenti-LacZ (n=7) et Veh/lenti-LacZ (n=7). Dans les groupes contrôles, le marquage obtenu est diffus alors que de nombreuses cellules de forme étoilées sont visibles dans le striatum injecté avec lenti-CNTF (**Fig.12A**). Ces cellules ayant une forte activité BDH sont présentes au niveau du corps calleux et autour des vaisseaux, ce qui suggère que ces cellules sont des astrocytes. Pour déterminer sans ambiguïté la nature de ces cellules, un double marquage de la BDH et de la vimentine ou de NeuN a été réalisé. Le marquage de la BDH est diffus dans le striatum et, de nouveau, des cellules fortement marquées n'apparaissent que dans le groupe lenti-CNTF (**Fig. 12B, E**). La BDH et la vimentine sont coexprimées par les mêmes cellules qui sont des astrocytes activés (**Fig. 12B-D et F-H**) alors qu'aucun co-marquage n'est visible entre la BDH et le marqueur neuronal NeuN (**Fig. 12I-K**).

Les astrocytes activés surexpriment la BDH et ont donc le potentiel d'utiliser les CC comme substrat énergétique alternatif. L'utilisation des CC est aussi conditionnée par l'abondance des transporteurs MCT.





**Figure 12. Les astrocytes activés ont une forte activité BDH**

**(A)** De nombreuses cellules présentant une forte activité BDH sont détectées par histochimie dans le striatum injecté avec lenti-CNTF alors qu'aucun marquage cellulaire n'est détectable dans le groupe lenti-LacZ. Ces cellules de forme étoilée sont aussi observées dans le corps calleux (tête de flèche), le long du trajet de l'aiguille, et en contact étroit avec des capillaires sanguins (flèche).

**(B et E)** La BDH présente un marquage immunohistochimique diffus et punctiforme dans le striatum. Seuls les capillaires sanguins sont identifiables dans le groupe lenti-LacZ (flèche), alors que de nombreuses cellules présentent un fort marquage dans le groupe lenti-CNTF (tête de flèche). **(B-D)** Un double marquage de la BDH (vert) et de la vimentine (rouge) montre que ces cellules expriment aussi la vimentine (flèche), ce qui suggère que ce sont des astrocytes activés, qui sont hypertrophiques **(F-G)**. De plus, aucun co-marquage entre la BDH (vert) et le marqueur neuronal NeuN (rouge) n'est visible **(I-J)**, ce qui confirme que les cellules exprimant fortement la BDH sont des astrocytes activés.

*b. Le transporteur aux monocarboxylates MCT-1 est surexprimé dans le groupe lenti-CNTF*

Les CC entrent dans le cerveau par les transporteurs aux monocarboxylates MCT exprimés par les cellules endothéliales et les astrocytes. Pour évaluer si la capacité de transport des CC était modifiée par l'activation des astrocytes, nous avons réalisé un marquage immunohistologique de MCT-1 et MCT-2.

Le marquage de MCT-1 est plus fort dans le groupe lenti-CNTF (**Fig. 13**), dans une zone qui correspond à la zone d'activation des astrocytes par le CNTF obtenue classiquement (cf. **Fig. 6**). A plus fort grossissement, on observe un marquage du neuropile et des capillaires sanguins. Le marquage du neuropile est fortement augmenté dans le groupe lenti-CNTF. Ce type de marquage rend difficile l'analyse de localisation cellulaire (neurone versus astrocyte) ou subcellulaire (membrane plasmique versus mitochondrie) de MCT-1, même par double marquage et microscopie confocale (données non montrées).

L'expression de MCT-2 n'est pas augmentée de manière importante dans le groupe lenti-CNTF, et le marquage fait apparaître très majoritairement des vaisseaux sanguins (données non montrées).

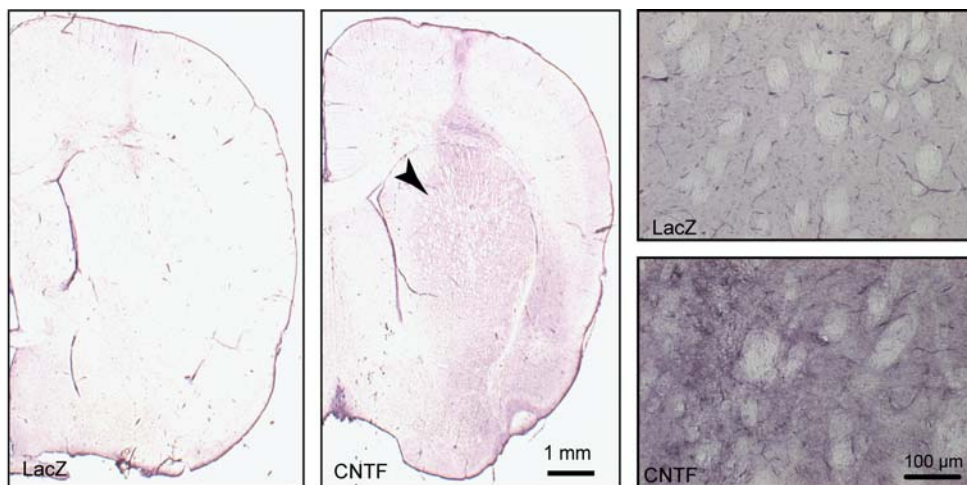
*c. L'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) n'est pas augmentée*

Etant donné que les transporteurs MCT sont aussi responsables du transfert de lactate entre les cellules (Pierre et Pellerin, 2005), nous avons voulu voir si l'augmentation d'expression du transporteur dans le groupe lenti-CNTF était associée à une augmentation de l'activité de la LDH qui oxyde le lactate. Comme pour les autres enzymes étudiées, l'activité de la LDH (dans le sens de l'oxydation du lactate) a été mise en évidence sur des coupes de cerveaux par histochimie.

L'activité spécifique de la LDH est faiblement mais significativement diminuée de 11% dans le striatum injecté avec lenti-CNTF, en comparaison avec le côté contralatéral injecté avec lenti-LacZ ( $p < 0,01$ , test t apparié,  $n=6$ , **Fig. 14A, B**). En revanche, aucune différence n'est observée dans le groupe contrôle entre le striatum injecté avec lenti-LacZ ou Veh ( $p=0,88$ , test t apparié  $n=6$ ). De plus, aucune cellule ayant une forte activité (comme c'était le cas pour la BDH) n'est visible dans le striatum injecté avec lenti-CNTF (données non montrées). Enfin, le niveau d'expression de la sous-unité H de la LDH1 (qui réalise plus facilement la réaction d'oxydation du lactate que la LDH5) n'est pas changée de façon détectable par immunoblot ( $p=0,32$ , ANOVA, **Fig. 14C**).

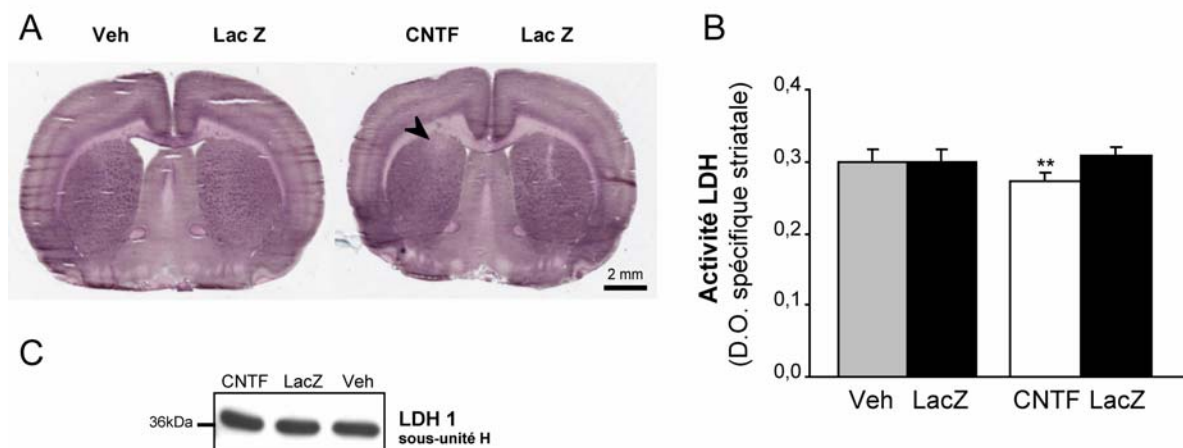
Ces résultats montrent que même si le niveau d'expression de MCT1, qui transporte à la fois les CC et le lactate, est augmenté dans le groupe lenti-CNTF, seule la voie

d'utilisation des CC semble activée. Pour déterminer si l'utilisation des CC est effective dans ce groupe, nous avons évalué l'utilisation striatale de BHB marqué radioactivement.



**Figure 13. Les astrocytes activés surexpriment le transporteur aux monocarboxylates MCT1**

Le marquage immunohistologique de MCT-1 présente une zone de plus forte intensité dans le striatum des rats du groupe lenti-CNTF. Le neuropile et quelques capillaires sanguins sont marqués dans le groupe contrôle, le marquage du neuropile est plus fort dans le groupe lenti-CNTF.



**Figure 14. L'activité de la LDH est légèrement diminuée dans le groupe lenti-CNTF**

(A) La mise en évidence histochimique de l'activité de la LDH (dans le sens de l'oxydation du lactate) révèle une très légère baisse dans le striatum injecté avec lenti-CNTF, en particulier dans la partie dorsale du striatum, près du site d'injection (flèche). (B) L'activité de la LDH est significativement diminuée de 11% du côté injecté avec lenti-CNTF par rapport au striatum injecté avec lenti-LacZ. En revanche, les striata injectés avec lenti-LacZ et Veh ne sont pas différents. \*\*  $p < 0,01$  test t apparié  $n=6$ /groupe. (C) Le niveau d'expression de la sous-unités H de la LDH1 est identique entre les groupes ( $p=0,32$ , ANOVA). Image représentative de 4-5 animaux/ groupe.

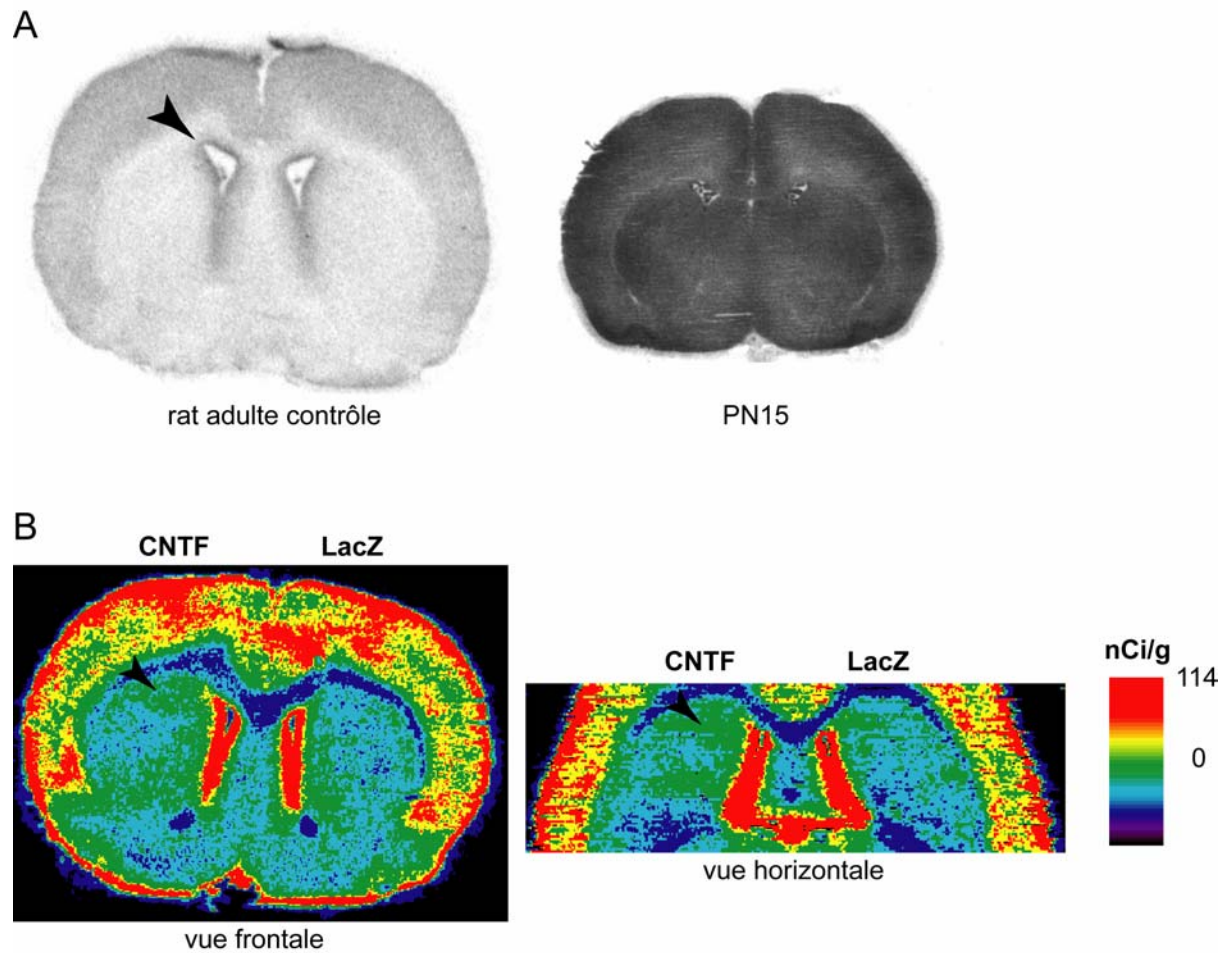
*d. L'activation des astrocytes est associée à une augmentation de la consommation du BHB*

La consommation du BHB a été évaluée par une méthode autoradiographique similaire à celle employée avec le FDG.

Les autoradiogrammes obtenus après injection i.v. de  $^{14}\text{C}$ -BHB révèlent que la consommation de BHB dans le striatum adulte est hétérogène et basse, surtout en comparaison avec un cerveau de rat non sevré (**Fig. 15A**). De plus, les ventricules présentent un marquage très fort qui contamine le striatum. Malgré cela, des légères différences de consommation de BHB sont visibles chez les rats lenti-CNTF/lenti-LacZ (n=8). Des zones de plus forte activité sont visibles autour du site d'injection et le long du corps calleux dans le striatum des rats injectés avec lenti-CNTF (**Fig. 15B**). La quantification de l'activité moyenne dans des sphères centrées sur le point d'injection met en évidence une augmentation limitée mais significative de la consommation de BHB du côté CNTF ( $55,2 \pm 1,6$  nCi/g et  $50,1 \pm 2,1$  nCi/g, +10%,  $p < 0,001$ , test t apparié, sphère de  $2,8 \text{ mm}^3$ ). Dans le groupe contrôle Veh/lenti-LacZ (n=3), aucune différence significative n'est détectée entre les deux côtés ( $p = 0,17$ , test t apparié).

Même si la consommation de BHB par le cerveau des rats lenti-CNTF est limitée, l'ensemble de ces résultats montre que l'activation des astrocytes par le CNTF induit des modifications profondes dans le métabolisme énergétique cérébral. Nous avons par la suite étudié la régulation de l'homéostasie glutamatergique, une autre fonction capitale qui peut potentiellement être modifiée par l'activation des astrocytes.





**Figure 15. L'activation des astrocytes par le CNTF conduit à une augmentation locale de consommation du BHB**

**(A)** La consommation de  $^{14}\text{C}$ -BHB est hétérogène dans le cerveau. Celle-ci est très faible dans le cerveau adulte et en particulier dans le striatum, en comparaison avec un rat âgé de 15 jours (PN15) (injection i.p. de  $^{14}\text{C}$ -BHB à 200  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ). Le bord des ventricules constitue une zone de très forte activité (flèche).

**(B)** Dans le striatum injecté avec lenti-CNTF, des zones de plus forte activité sont visibles le long du corps calleux et au niveau du site d'injection (flèche). Image représentative de 8 animaux. Vue frontale et horizontale après recalage.

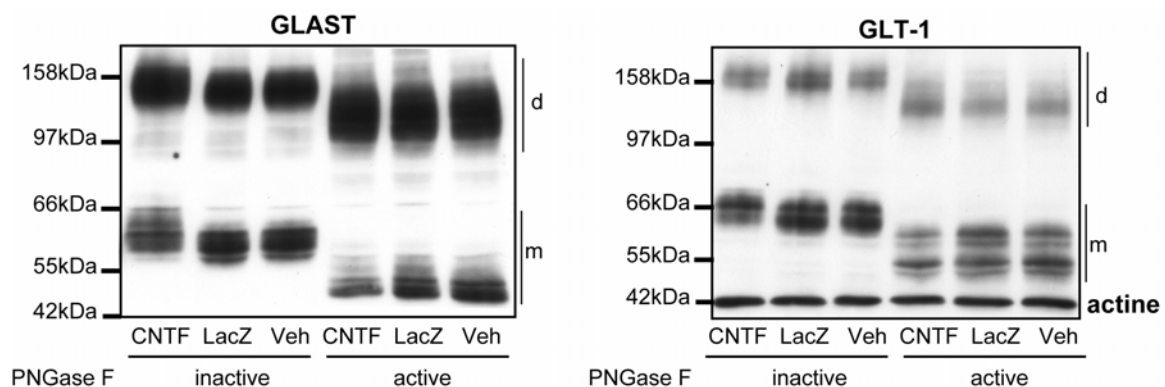
## C. L'activation des astrocytes est associée à un changement dans la régulation de l'homéostasie glutamatergique

### 1. Les astrocytes activés expriment une forme hyperglycosylée des transporteurs au glutamate

Le niveau de glutamate extracellulaire est en large majorité régulé par les transporteurs astrocytaires GLAST et GLT-1. Nous avons donc étudié leur expression par immunoblot.

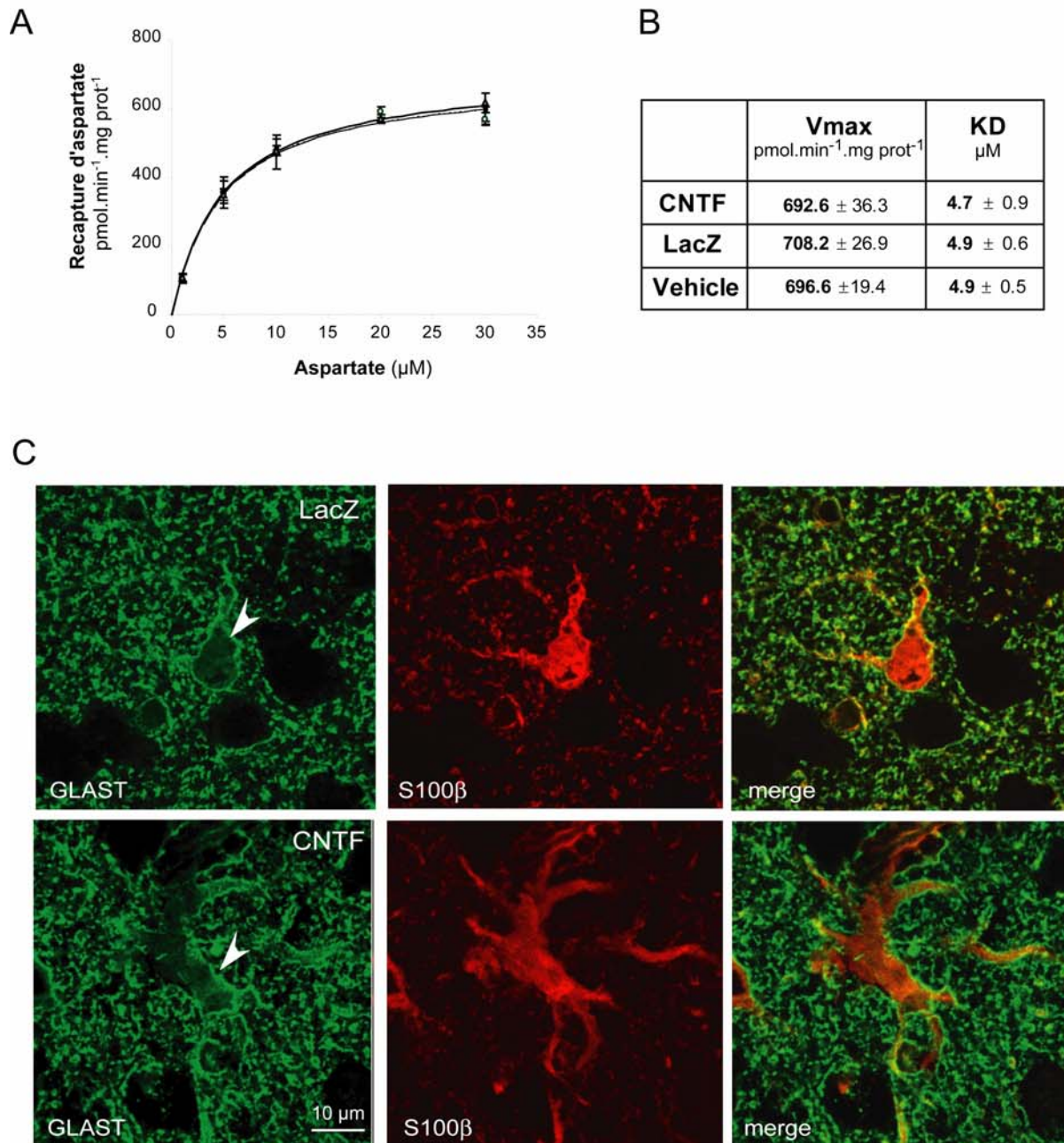
Les transporteurs GLAST et GLT-1 présentent un poids moléculaire apparent supérieur de 5 kDa dans le groupe lenti-CNTF (**Fig. 16A**). Etant donné que les transporteurs au glutamate sont des protéines N-glycosylées, nous avons traité ces extraits cérébraux à la PNGase F pour cliver les N-glycosylation. Après traitement, les deux transporteurs GLAST et GLT-1 présentent des profils de western blot très similaires et leur poids moléculaire apparent est identique dans les trois groupes (**Fig. 16B**). Le niveau d'expression des deux transporteurs n'est pas différents entre les trois groupes ( $p=0,11$  et  $p=0,18$  pour GLT-1 et GLAST respectivement, ANOVA).

Ces résultats montrent, pour la première fois, que les astrocytes activés par le CNTF expriment des formes hyperglycosylées des transporteurs au glutamate, sans changement du niveau total d'expression.



**Figure 16. Les astrocytes activés expriment des formes hyperglycosylées des transporteurs au glutamate**

Dans le groupe lenti-CNTF, les transporteurs GLAST et GLT-1 apparaissent avec un poids moléculaire apparent plus élevé. Les formes monomériques (m) et dimériques (d) des transporteurs sont visibles. Après traitement des extraits cérébraux à la PNGase F qui clive les N-glycosylations, les transporteurs apparaissent avec le même poids moléculaire dans les trois groupes. Le poids moléculaire apparent des formes déglycosylées est réduit d'environ 10 kDa par rapport aux formes natives. Ces résultats suggèrent que les transporteurs au glutamate sont hyperglycosylés dans le groupe lenti-CNTF. Image représentative de 4-5 animaux/groupe.



**Figure 17. L'hyperglycosylation des transporteurs au glutamate ne modifie pas leur capacité de transport et ne perturbe pas leur localisation à la membrane astrocytaire**

**(A)** La cinétique d'accumulation de l'aspartate par les transporteurs présents à la surface des synaptosomes est identique dans les trois groupes expérimentaux. Lenti-CNTF : cercle blanc, lenti-LacZ : carré noir et Veh : triangle gris ( $n=4$ /groupe).

**(B)** Ces courbes permettent d'estimer les paramètres du transport : Vmax qui reflète le nombre de transporteurs total et Kd qui représente l'affinité pour le substrat. Ces valeurs ne sont pas différentes entre les groupes, ce qui montre que l'hyperglycosylation du transporteur, en soit, ne modifie pas les propriétés de recapture. Valeurs estimées à partir de la moyenne de 4 expériences indépendantes par groupe, exprimées  $\pm$  s.e.m.

**(C)** Le co-marquage de GLAST (vert) et de S100 $\beta$  (rouge), une protéine astrocytaire cytosolique met en évidence une localisation du transporteur au niveau de la membrane (flèche) La marquage de GLAST est punctiforme. La localisation de GLAST n'est pas notablement modifiée par l'hyperglycosylation dans le groupe lenti-CNTF, malgré le changement morphologique très net des astrocytes dans ce groupe (i.e. hypertrophie).

## **2. L'hyperglycosylation des transporteurs n'altère pas leur localisation à la membrane ni l'affinité pour leur substrat**

Pour évaluer si l'hyperglycosylation de GLAST et GLT-1 altérerait leur capacité de transport, nous avons mesuré les paramètres de recapture de [<sup>3</sup>H]-D-aspartate (un analogue transportable, non métabolisable du glutamate) *ex vivo* sur des synaptosomes. L'accumulation d'aspartate dans les synaptosomes de rat des groupes lenti-CNTF, lenti-LacZ et Veh (n=4/groupe) se fait selon une cinétique de type Michaelis-Menten (**Fig. 17A**). Les courbes de recapture d'aspartate sont très similaires. Les paramètres de transport estimés à partir de ces courbes : la recapture maximale V<sub>max</sub> et l'affinité pour le substrat K<sub>d</sub>, ne sont pas différents entre les groupes (**Fig. 17B**).

Pour évaluer si l'augmentation du niveau de glycosylation des transporteurs au glutamate perturbait leur adressage à la membrane des astrocytes, nous avons réalisé des doubles marquages de GLT-1 ou GLAST avec la protéine astrocytaire S100 β. Les transporteurs sont localisés à la membrane des astrocytes et ils forment des 'clusters' (**Fig. 17C**). Mise à part la forte hypertrophie des astrocytes dans le groupe lenti-CNTF, aucune altération majeure du marquage et de la localisation des transporteurs ne peut être mise en évidence.

Ainsi, l'hyperglycosylation des transporteurs dans les astrocytes activés n'altère pas leur propriété intrinsèque de transport du glutamate et ne perturbe pas de manière détectable leur adressage à la membrane.

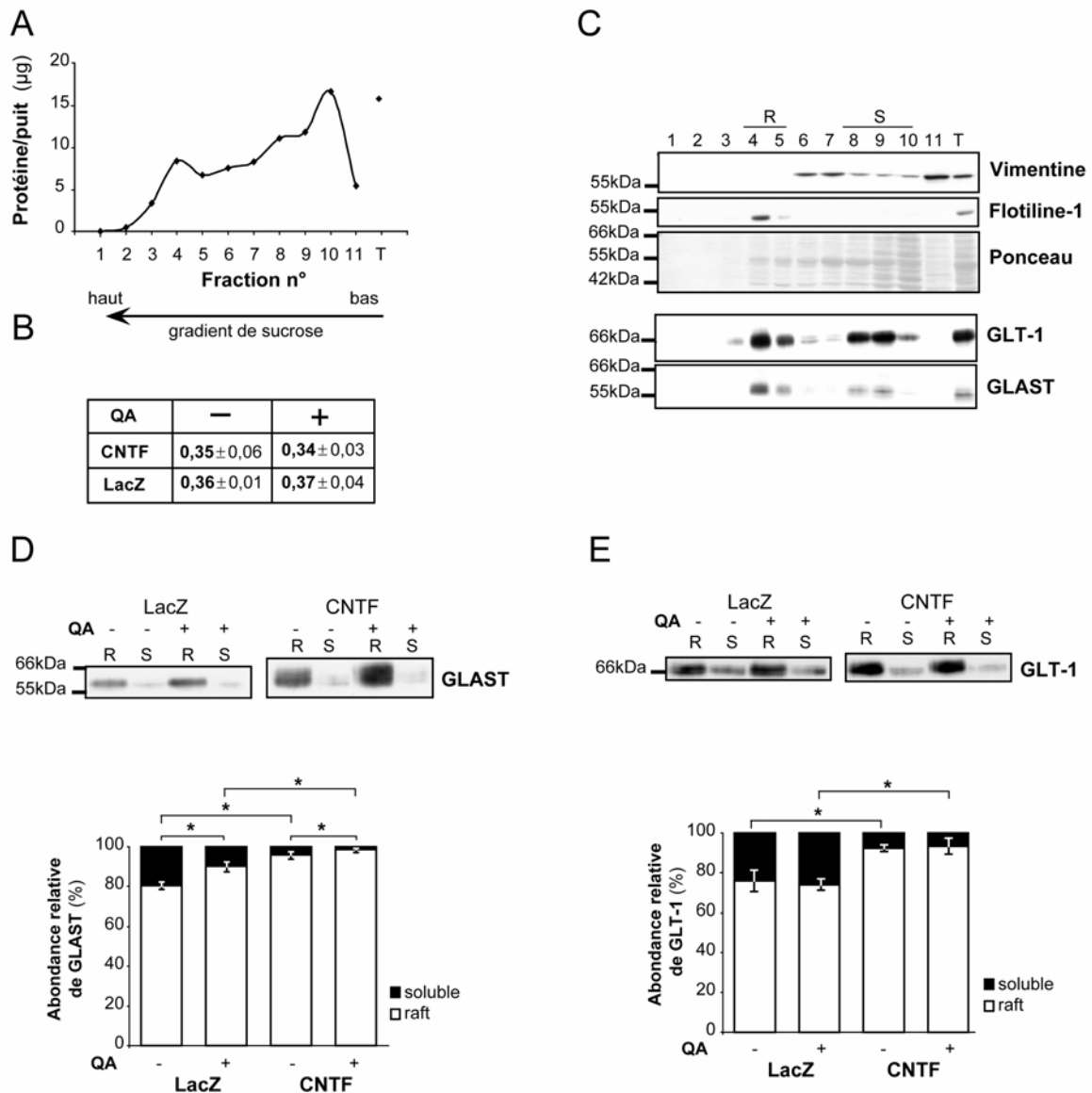
## **3. Les transporteurs au glutamate sont re-localisés dans les rafts des astrocytes activés**

Récemment, l'équipe de Butchbach a montré que la localisation des transporteurs au glutamate dans les rafts était importante pour leur bon fonctionnement (Butchbach et al., 2004, voir §II-E-2-b). Étant donné que les rafts ne sont pas détectables en microscopie optique, nous avons utilisé une méthode biochimique pour les purifier et étudier la répartition des transporteurs entre les rafts et le reste de la membrane (voir méthode au § III-I). Les rats utilisés dans cette étude appartiennent aux groupes lenti-CNTF et lenti-LacZ (n=3/groupe). De plus, pour aussi évaluer l'effet d'une augmentation aiguë de glutamate sur la distribution des transporteurs, chaque rat reçoit une injection de quinolinate (QA) dans le striatum droit, ce qui induit une augmentation massive du glutamate intracellulaire (voir §II-E-3-c).

La majorité des protéines restent dans la partie basse du gradient de sucrose (i.e. fractions n° 8-9-10), ce sont des protéines solubles dans le détergent (**Fig. 18A**). Des protéines sont aussi détectées dans le culot formé au fond du tube (fraction n° 11 après



resuspension), ce qui correspond à du matériel insoluble au détergent mais qui ne flotte pas. Enfin, une partie des protéines se retrouve dans le matériel qui flotte en haut du gradient à l'interface sucrose 5%-sucrose 30% (fractions n° 4-5), ce qui correspond aux rafts. Le fractionnement des extraits striataux est réalisé de façon très reproductible pour tous les rats. Le rapport de quantité de protéines présentes dans les fractions 'rafts' (i.e. fractions 4 et 5) et les fractions 'solubles' (fractions 8-9-10) n'est pas différent entre les 4 groupes expérimentaux ( $p=0,9$ , test de Kruskal-Wallis, **Fig. 18B**). L'étude par immunoblot de ces fractions permet de contrôler la purification des rafts : la flotilline-1, un constituant protéique des rafts, est détectée seulement dans les fractions 4 et 5 (**Fig. 18C**). La vimentine, composant du cytosquelette qui est relativement résistant au détergent mais ne 'flotte' pas dans le gradient, est détectée dans la fraction 11 (culot) mais pas dans les rafts. GLAST et GLT-1 sont présents dans les fractions 'rafts' et dans les fractions 'solubles', mais tous les deux présentent un fort enrichissement dans les rafts, surtout quand on considère la faible quantité totale de protéine dans les rafts par rapport à celle mesurée dans les fractions solubles (**Fig. 18C**, voir coloration au rouge Ponceau et **B**). Pour faciliter l'analyse, les fractions correspondant aux 'rafts' (R) et 'solubles' (S) ont été rassemblées. L'enrichissement de GLAST (**Fig. 18D**) et de GLT-1 (**Fig. 18E**) dans les fractions 'rafts' est visible dans tous les groupes expérimentaux. Dans le groupe lenti-CNTF, les transporteurs forment une bande immunoréactive plus large, plus floue et de poids moléculaire plus élevé, ce qui est en accord avec les observations précédentes d'hyperglycosylation des transporteurs. L'abondance relative de GLAST et GLT-1 dans les rafts est de 80% et 76% respectivement en conditions contrôles (lenti-LacZ sans QA). Dans le groupe lenti-CNTF, GLAST est significativement plus enrichi dans les rafts ( $p<0,05$  par rapport à lenti-LacZ, test de Mann Whitney, **Fig. 18D**). De plus, l'injection de QA induit un recrutement significatif des transporteurs dans les rafts des deux groupes lenti-LacZ et lenti-CNTF ( $p<0,05$  par rapport aux conditions sans QA, test de Mann Whitney). Cependant, même après induction avec du QA, l'abondance relative de GLAST dans les rafts reste significativement plus élevée dans le groupe lenti-CNTF ( $p<0,05$  par rapport à lenti-LacZ, test de Mann Whitney). L'abondance relative de GLT-1 dans les rafts est également significativement plus élevée dans le groupe lenti-CNTF ( $p<0,05$  par rapport à lenti-LacZ, test de Mann Whitney, **Fig. 18E**). En revanche, l'injection de QA n'induit de recrutement supplémentaire de GLT-1 dans les rafts, quel que soit le groupe. Pour contrôler que le recrutement accru des transporteurs dans les rafts était spécifique, nous avons fait la même analyse avec la flotilline-1; un constituant général des rafts. L'abondance relative de la flotilline-1 dans les rafts est de 90% dans le groupe contrôle, elle n'est pas significativement modifiée par l'injection de QA ni par la surexpression de CNTF ( $p=0,44$ , test de Kruskal-Wallis).



**Figure 18. Les transporteurs au glutamate sont préférentiellement localisés dans les rafts des astrocytes activés par le CNTF**

(A) Quantité de protéine présente dans 30 µL de chacune des fractions du gradient, et utilisées pour charger le gel en C. La majorité des protéines restent dans le bas du gradient car elles sont solubles dans le détergent. Le petit pic de protéine dans les fractions 4-5 correspond aux protéines des rafts. T : aliquot de l'homogénéat total utilisé pour charger le gradient. Exemple de profil représentatif de l'ensemble des profils obtenus.

(B) Calcul du ratio entre la quantité de protéines présentes dans les fractions 4-5 (i.e. raft) et la quantité de protéines solubles (fractions 8-9-10) dans chacun des groupes (lenti-CNTF, lenti-LacZ avec ou sans injection de QA). Ce ratio est similaire dans les trois groupes ( $p=0,9$ , test de Kruskal-Wallis,  $n=3$ /groupe).

(C) Profils de distribution de la flotilline-1, de la vimentine, de GLT-1 et GLAST. La distribution des deux premières protéines permet de contrôler la technique de purification : la flotilline-1, constituant des rafts est présente uniquement dans les fractions 4 et 5 (et dans l'homogénéat initial, T). La vimentine, constituant du cytosquelette est très fortement enrichie dans la fraction 11 qui contient le matériel insoluble qui ne flotte pas. GLAST et GLT-1 sont enrichis dans les rafts. Exemple de profil représentatif de l'ensemble des profils obtenus. (Pour la vimentine, le profil provient d'un rat du groupe lenti-CNTF).

(D et E) Immunoblot de GLAST et GLT-1 après avoir rassemblé les fractions 'rafts' (R) et les fractions 'solubles' (S). L'enrichissement des transporteurs dans les rafts est très net. Le calcul de l'abondance relative des transporteurs entre les fractions 'rafts' et 'solubles' montre que GLAST est plus fortement enrichi dans les rafts du groupe lenti-CNTF. Le QA induit un recrutement accru de GLAST dans les rafts. Ainsi, dans le groupe lenti-CNTF après induction avec le QA, GLAST est presque exclusivement présent dans ces domaines. GLT-1 est significativement plus enrichi dans les rafts du groupe lenti-CNTF mais aucun recrutement de GLT-1 n'est observé après injection de QA. \*  $p<0,05$  test de Mann Whitney, ( $n=3$ / groupe).

Ces résultats montrent que les transporteurs sont plus enrichis dans les rafts du groupe lenti-CNTF. De plus, GLAST peut être recruté dans les rafts suite à une augmentation de glutamate extracellulaire induite par le QA. Comme la localisation dans les rafts est importante pour le fonctionnement des transporteurs, nous avons étudié les conséquences de ces redistributions sur la régulation du taux de glutamate extracellulaire *in vivo*.

#### **4. L'activation des astrocytes est associée à une meilleure gestion du glutamate *in vivo***

Pour évaluer le fonctionnement des transporteurs *in vivo*, nous avons réalisé des expériences de microdialyse, ce qui permet d'étudier la régulation du taux extracellulaire de glutamate *in situ*, après une libération massive de glutamate endogène induite par le QA.

Le taux de glutamate extracellulaire est mesuré sur des rats appartenant aux groupes lenti-CNTF/lenti-LacZ (n=5) et Veh/lenti-LacZ (n=4) implantés avec une sonde de microdialyse dans chaque striatum. L'efficacité des sondes de microdialyse est proche de 15% et elle n'est pas différente entre les deux striata. La quantité de QA qui a été perfusée à travers la sonde de microdialyse (et donc le stress excitotoxique initial) est donc comparable dans les deux striata (**Tableau 1A**). Le niveau basal de glutamate (corrigé pour l'efficacité des sondes) est identique entre les groupes (**Tableau 1B**).

La perfusion de QA induit une augmentation rapide et très forte de la concentration de glutamate extracellulaire (+ 900% par rapport au niveau de base) (**Fig. 19A**). Du côté injecté avec lenti-CNTF, l'augmentation induite par le QA est significativement réduite (+ 330% par rapport au niveau de base). Par ailleurs, le retour au niveau de base après la fin de la perfusion de QA est plus rapide du côté 'CNTF', la récupération se fait en 20 min alors que 40 min sont nécessaires du côté LacZ. La même expérience a été réalisée sur des rats contrôles du groupe Veh/lenti-LacZ pour contrôler la spécificité des effets observés. La réponse au QA est très similaire dans les deux striata (et par rapport au côté LacZ des rats précédents) en terme d'augmentation maximale de concentration (Veh : + 800% et LacZ : + 940%) et de cinétique de retour à l'équilibre (**Fig. 19B**). Dans le striatum injecté avec lenti-LacZ, une lésion est visible autour du site d'implantation, 24 h après l'expérience. Du côté injecté avec lenti-CNTF, seule la descente de la sonde de microdialyse est visible (**Fig. 19C**).

Ces résultats montrent qu'*in vivo*, la gestion du glutamate extracellulaire est significativement améliorée dans le groupe lenti-CNTF. Etant donné les modifications des transporteurs astrocytaires au glutamate dans ce groupe, il est très probable que cet effet soit la conséquence d'une augmentation du transport de glutamate. Pour tester cette

hypothèse, nous avons mesuré la consommation de FDG pendant la phase aigue d'activation par le QA. En effet, la consommation de glucose est couplée au transport la astrocytaire de glutamate, et peut donc servir d'index indirect du niveau d'activité des transporteurs.

Efficacité des sondes		Efficacité des sondes	
LacZ	13,6 ± 1,3 %	LacZ	11,5 ± 1,2 %
CNTF	16,2 ± 3,3 %	Veh	21,5 ± 8,4 %
p (test de Wilcoxon)	0,42	p (test de Wilcoxon)	0,47

Tableau 1. Efficacité des sondes de microdialyse

Concentration basale de glutamate		Concentration basale de glutamate	
LacZ	5,26 ± 0,93 µM	LacZ	5,25 ± 1,27 µM
CNTF	7,18 ± 1,72 µM	PBS	8,48 ± 3,30 µM
p (test t apparié)	0,20	p (test t apparié)	0,47

Tableau 2. Concentration basale de glutamate

Le niveau basal de glutamate n'est pas différent entre les groupes. Concentration corrigée par l'efficacité de la sonde de microdialyse.

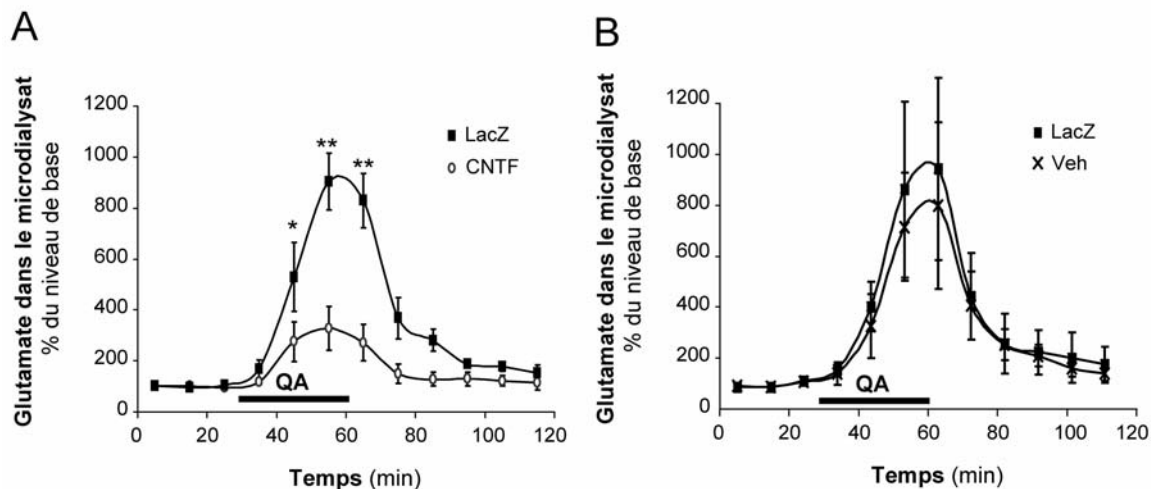
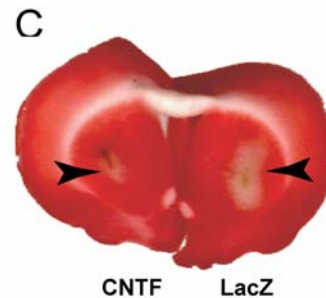


Figure 19. L'activation des astrocytes est associée à une meilleure gestion du taux extracellulaire de glutamate

(A) L'infusion de QA induit une forte augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate du côté injecté avec lenti-LacZ. Dans le striatum injecté avec lenti-CNTF, cette augmentation est aussi visible mais elle significativement réduite et le retour à l'état d'équilibre est plus rapide. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , test t apparié,  $n=5$ . Valeurs exprimées en pourcentage du niveau de base.

(B) Dans les rats contrôles Veh/lenti-LacZ, la cinétique et l'ampleur des effets du QA sont similaires dans les deux striata.  $n=4$ .

(C) L'analyse histologique des cerveaux des rats 24 h après la fin de l'expérience, par un marquage TTC permet de contrôler l'implantation des sondes. Ce marquage permet aussi de mettre en évidence la lésion induite par le QA (zone blanche autour du site, flèche). Cette lésion est seulement visible dans les groupes contrôle. Dans le striatum injecté avec lenti-CNTF, la zone non marquée est très réduite, elle correspond à l'emplacement de la sonde et à la lésion mécanique locale.

## 5. L'activation des astrocytes est associée à une consommation accrue de glucose lors d'un stress excitotoxique

Des rats appartenant aux groupes lenti-CNTF (n=6), lenti-LacZ (n=5) et Veh (n=4) ont reçu une injection de QA dans un striatum et de PBS dans l'autre. Quinze minutes après, les rats reçoivent une injection i.v. de FDG de manière à évaluer les effets aigus du QA sur la consommation de glucose.

Les paramètres physiologiques contrôlés au cours de l'expérience (glycémie,  $P_{O_2}$ ,  $P_{CO_2}$ , pH artériels et température corporelle) sont normaux et ne sont pas différents entre les trois groupes (**Fig. 20A**). En particulier, la température au moment de l'injection du FDG (T 15 min) est identique entre les groupes.

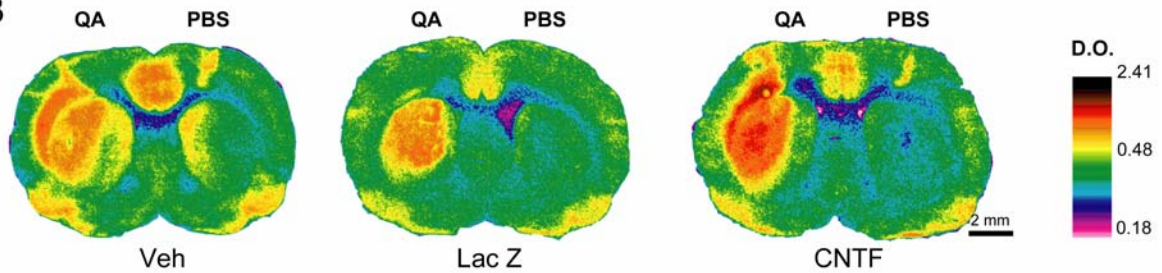
Le QA induit une augmentation de la consommation de glucose, qui est visible dans une grande partie du striatum, autour du site d'injection du QA (**Fig. 20B**). Ainsi, dans le groupe Veh, la consommation de glucose est augmentée de 64% du côté QA par rapport au striatum contralatéral injecté avec du PBS. L'augmentation de consommation de glucose est significativement plus importante dans le groupe lenti-CNTF (+87%,  $p < 0,05$ , test de Mann-Whitney, **Fig. 20C**).

Ainsi, après activation par le QA, la consommation de glucose est plus importante dans le groupe lenti-CNTF, ce qui est en faveur d'un fonctionnement accru des transporteurs au glutamate. Par ailleurs, ce résultat suggère que dans ce groupe l'apport énergétique est amélioré.

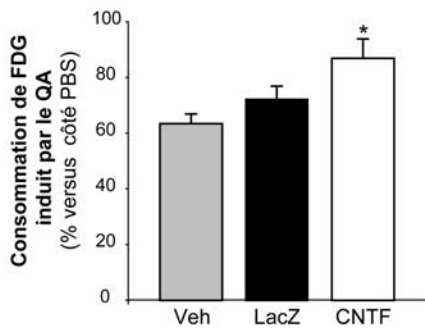
A

	Poids (g)	T 0 min				T 15 min	T 60 min			
		glycémie (g/l)	PO2	PCO2	pH	Température (°C)	glycémie (g/l)	PO2	PCO2	pH
Veh	403 ± 3	1,69 ± 0,09	75,0 ± 1,3	53,8 ± 4,9	7,3 ± 0,01	36,0 ± 0,01	1,66 ± 0,11	80,0 ± 4,3	43,8 ± 0,6	7,4 ± 0,01
LacZ	419 ± 12	1,67 ± 0,10	71,0 ± 0,8	52,8 ± 0,7	7,3 ± 0,01	36,9 ± 0,3	1,82 ± 0,11	83,8 ± 4,4	44,5 ± 1,8	7,4 ± 0,01
CNTF	415 ± 3	1,71 ± 0,04	73,8 ± 1,2	52,7 ± 0,9	7,3 ± 0,01	35,9 ± 0,2	1,69 ± 0,06	80,8 ± 1,8	45,3 ± 1,4	7,4 ± 0,01

B



C



**Figure 20. L'activation des astrocytes est associée à une augmentation de la consommation de glucose pendant un stress excitotoxique**

(A) L'ensemble des paramètres corporels mesurés sont similaires entre les groupes et sont dans une gamme physiologique.

(B) L'injection intrastriatale de QA induit une augmentation massive de la consommation de glucose dans les trois groupes expérimentaux.

(C) L'augmentation de consommation de glucose induite par le QA est significativement plus importante dans le groupe lenti-CNTF. \*  $p < 0,05$  par rapport au groupes lenti-LacZ et  $p < 0,001$  par rapport au groupe Veh, test de Mann-Whitney. N=4-

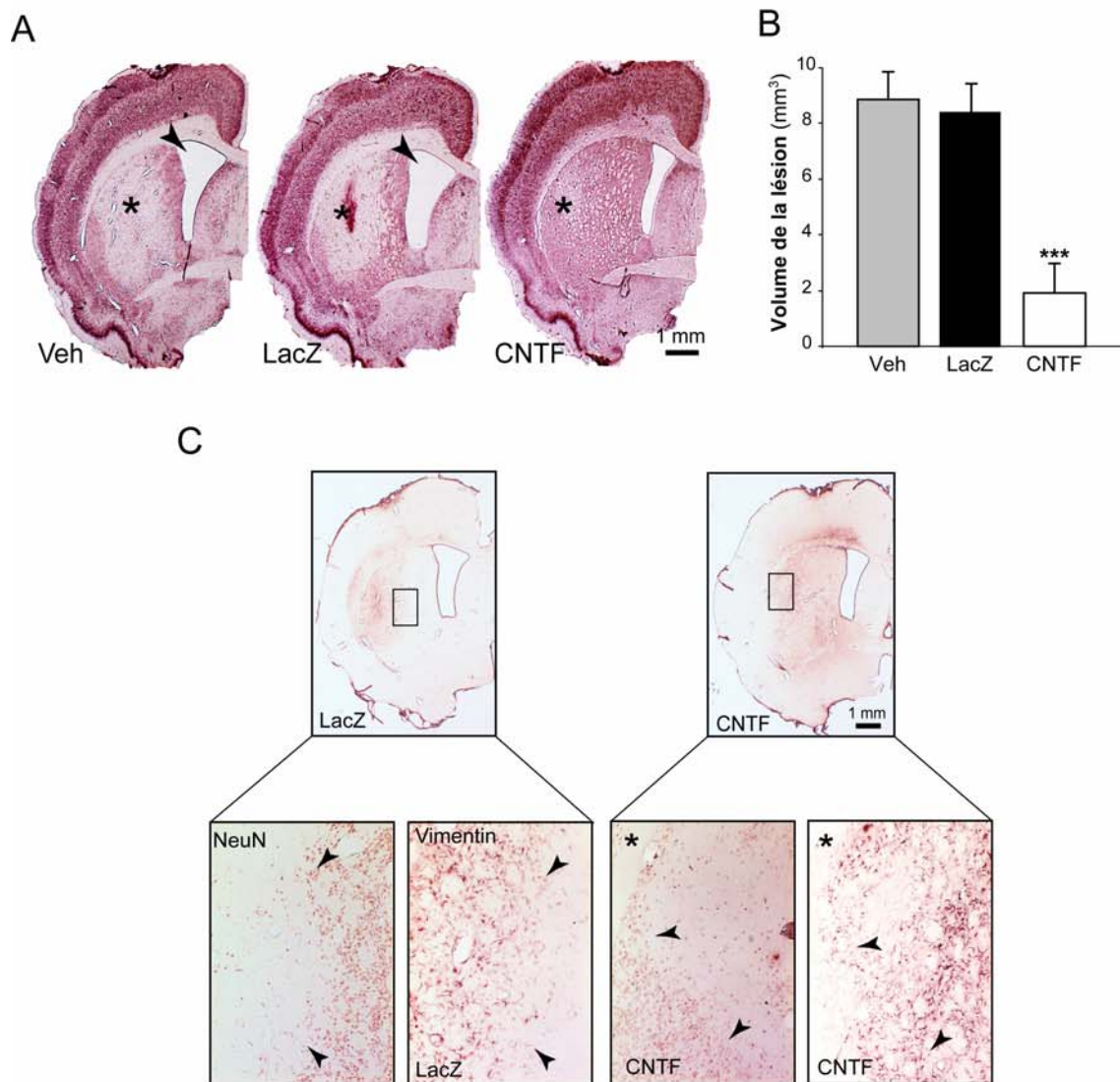
## D. Les modifications du fonctionnement astrocytaire sont associées à de forts effets neuroprotecteurs

Etant donné que l'activation astrocytaire par le CNTF est associée à de profondes modifications du fonctionnement cérébral, en particulier en conditions de stress excitotoxique, nous avons voulu évaluer les conséquences de ces changements sur la survie neuronale.

Les rats des groupes lenti-CNTF (n=7), lenti-LacZ (n=7) et Veh (n=8) ont reçu une injection intrastriatale de QA (80 nmol) et la taille de la lésion excitotoxique a été quantifiée sur des coupes histologiques 15 jours plus tard. Le QA produit une lésion importante au sein de laquelle il y a absence quasi-totale de neurones immunopositifs pour NeuN (**Fig. 21A**). Un élargissement des ventricules accompagne la lésion du fait de l'atrophie striatale à long terme. Cette lésion a un volume important dans les groupes contrôles ( $8,9 \pm 1,0 \text{ mm}^3$  et  $8,4 \pm 0,9 \text{ mm}^3$  pour Veh et lenti-LacZ respectivement) alors qu'elle est réduite à  $1,9 \pm 0,8 \text{ mm}^3$  dans le groupe lenti-CNTF ( $p < 0,0001$ , test de Scheffé, **Fig. 21B**). Pour vérifier que l'activation astrocytaire était toujours présente dans le groupe lenti-CNTF, après le processus de dégénérescence excitotoxique induit par le QA, un marquage immunohistologique de la vimentine a été réalisé. Dans le groupe contrôle, le marquage est visible seulement au niveau de la lésion (**Fig. 21C**). Ainsi, l'atteinte excitotoxique induit elle-même une réponse astrocytaire mais qui reste insuffisante pour protéger les neurones du QA. Dans le groupe CNTF les astrocytes activés sont visibles dans une grande partie du striatum, y compris en dehors de la lésion limitée induite par le QA, ce qui montre que l'activation astrocytaire étendue par le CNTF est maintenue après un processus excitotoxique.

Ces résultats montrent que l'activation des astrocytes dans le groupe CNTF est associée à de forts effets protecteurs pour les neurones soumis à des conditions excitotoxiques.





**Figure 21. L'activation des astrocytes par le CNTF a de forts effets neuroprotecteurs contre des processus excitotoxiques**

**(A)** Les lésions excitotoxiques induites par l'injection intrastriatale de QA sont visibles dans tous les groupes (étoile) après immunomarquage de la protéine neuronale NeuN. La taille de la lésion est fortement réduite dans le groupe lenti-CNTF. Un élargissement du ventricule latéral est visible dans les groupes contrôles qui présentent une lésion importante (flèche). L'élargissement du ventricule apparaît en compensation à l'atrophie du striatum. Images représentative de 7-8 animaux/ groupe.

**(B)** Les lésions induites par le QA occupent environ un tiers du striatum dans les groupes contrôles. La taille de la lésion est significativement réduite de 75% dans le groupe CNTF, ce qui témoigne d'un fort effet neuroprotecteur dans ce groupe. \*\*\*  $p < 0,0001$ , test de Scheffé.

**(C)** Des astrocytes activés immunopositifs pour la vimentine sont visibles au niveau de la lésion dans le groupe contrôle alors qu'ils sont présents dans l'ensemble du striatum dans le groupe lenti-CNTF. A plus fort grossissement dans un animal du groupe lenti-LacZ, les astrocytes réactifs (vimentine positifs) sont présents seulement au cœur de la lésion (délimitée par les flèches), où la quasi-totalité des neurones sont morts (marquage NeuN). Dans le groupe lenti-CNTF les astrocytes vimentine positifs s'étendent au delà de la lésion (flèches). L'étoile localise le corps calleux.



# **DISCUSSION**

## V. Discussion

Cette étude a abouti à la mise au point et à la caractérisation d'un nouveau modèle d'activation astrocytaire par transfert lentiviral du gène du CNTF *in vivo*. Ce modèle qui a de nombreux avantages et certaines limites (**partie A**), nous a permis de mettre en évidence des modifications marquées du métabolisme énergétique cérébral (**partie B**) et de l'homéostasie glutamatergique (**partie C**) en présence de CNTF. Ces résultats soulignent le potentiel neuroprotecteur des astrocytes activés et offrent également une meilleure compréhension des effets du CNTF, qui est un candidat thérapeutique pour différentes pathologies cérébrales (**partie D**). Mais ces résultats posent tout de même plusieurs questions qui seront abordées au cours de la discussion : les astrocytes sont-ils les seuls médiateurs des effets observés en présence de CNTF ? En quelle mesure chacun des changements observés dans les astrocytes activés par le CNTF participe t'il à la neuroprotection? Les effets bénéfiques de l'activation des astrocytes par le CNTF sont-ils applicables à d'autres situations pathologiques ?

### A. Intérêts et limites du modèle d'activation astrocytaire par tranfert lentiviral de CNTF

#### 1. L'utilisation des vecteurs lentiviraux

Notre modèle d'activation astrocytaire s'est révélé extrêmement robuste : 100% des animaux injectés avec lenti-CNTF ont présenté une réponse astrocytaire, avec des caractéristiques très reproductibles en terme de volume d'activation astrocytaire et de stabilité. Ainsi, les changements induits par le CNTF (niveau d'expression, activité enzymatique, degré de glycosylation ...) ont systématiquement été observés dans l'ensemble des animaux. Les lentivirus et la construction du plasmide utilisée ici (pSIN-W-PGK contenant la séquence WPRE et le promoteur ubiquitaire de la PGK, voir §III-A) apparaissent comme des vecteurs performants pour induire une surexpression importante, reproductible et stable du transgène. En utilisant ce lentivirus, la surexpression du CNTF transgénique est maintenue jusqu'à un an après l'infection (Zala et al., 2004), et l'activation des astrocytes est encore visible (résultats obtenus récemment au laboratoire). Plusieurs équipes ont utilisé des adénovirus comme vecteurs du gène du CNTF dans le SNC *in vivo* (Gravel et al., 1997; Lisovoski et al., 1997; Mittoux et al., 2002; van Adel et al., 2005). Cependant les effets du CNTF n'ont pas été étudiés à plus de trois mois post-infection (Mittoux et al., 2002) et les effets sont parfois transitoires (van Adel et al., 2005). Ceci est lié

au fait que le vecteur adénoviral, contrairement aux lentivirus, ne permet pas l'intégration du transgène dans le génome de l'hôte. Le transgène reste sous forme d'épisome qui peut être progressivement perdu ou inactivé, ce qui compromet son expression à long terme (Hermens et Verhaagen, 1998).

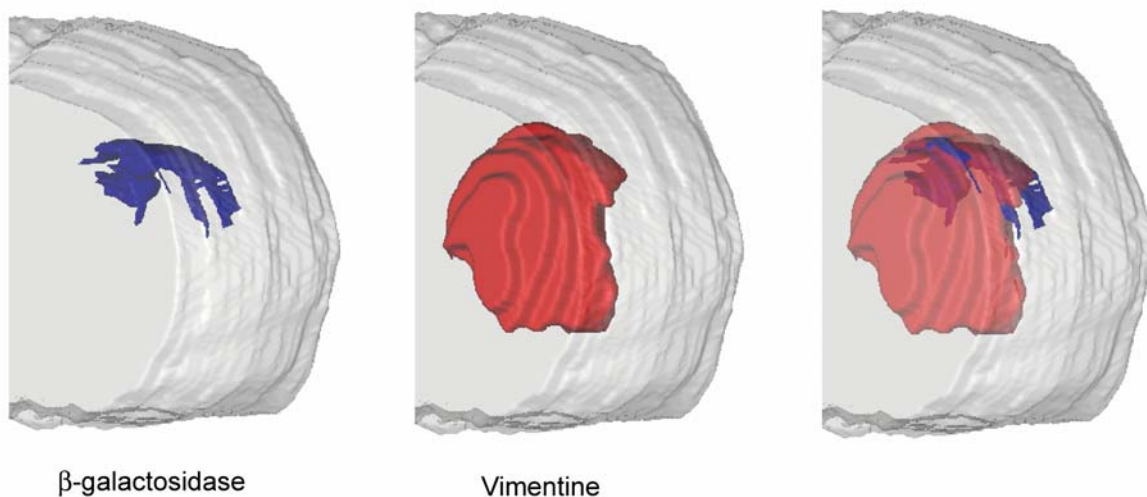
Les vecteurs lentiviraux ont aussi l'avantage d'être très peu immunogènes par rapport aux adénovirus. Comme ils sont dépourvus des gènes viraux sauvages, aucune protéine d'origine virale qui pourrait induire une réaction immunitaire à long terme n'est synthétisée chez l'hôte. L'absence de réponse immunitaire participe aussi à maintenir une expression stable sans effet secondaire.

Les lentivirus sont capables d'infecter des cellules post-mitotiques comme les neurones et lorsqu'ils sont injectés dans le cerveau, ils présentent un fort tropisme neuronal (99% des cellules infectées sont des neurones, de Almeida et al., 2001). Ce sont donc les neurones qui vont libérer le CNTF transgénique alors que normalement ce sont les astrocytes qui le produisent (voir § II-C-1-b). Cependant dans la construction utilisée, le gène du CNTF est fusionné à un peptide signal, il est donc sécrété et se retrouve *in fine* dans le milieu extracellulaire où il peut exercer ses effets biologiques en se liant à son récepteur.

Le CNTF sécrété peut diffuser dans une grande partie du striatum. Ainsi, à partir d'un nombre restreint de cellules infectées au niveau du site d'injection, les deux tiers du striatum présentent une activation astrocytaire (soit 10 à 20 fois plus que le volume d'infection, **Fig. 1**). De plus, avec un titre infectieux supérieur à 100 ng p24/μL, le volume d'activation astrocytaire atteint un plateau et des mécanismes de 'down-regulation' semblent se mettre en place. Finalement, pour obtenir un effet de grande ampleur, il n'est pas nécessaire d'utiliser beaucoup de particules infectieuses ni d'infecter beaucoup de cellules. C'est un grand avantage car cela permet de produire des effets étendus qui facilitent les analyses tout en limitant le nombre de cellules infectées qui 'doivent assurer' la surexpression du transgène.

En plus d'une simple diffusion du CNTF transgénique, il est possible qu'un mécanisme d'amplification se mette en place, où les astrocytes activés par le CNTF transgénique se mettent eux-mêmes à produire du CNTF et participent ainsi à la propagation de l'activation. En effet, l'application de CNTF recombinant sur des cultures d'astrocytes active leur propre production de CNTF, ce qui augmente leur contenu en CNTF (Monville et al., 2001). *In vivo*, quand les cellules du striatum sont infectées avec un adénovirus contenant le gène du CNTF, deux régions immunopositives pour le CNTF sont détectées (Lisovoski et al., 1997). Une zone restreinte, centrée sur le site d'injection présentant un marquage intense est entourée d'une deuxième zone plus étendue et nettement moins marquée, ce qui suggère que les quelques cellules infectées dans la zone centrale induisent l'expression du CNTF endogène à leur périphérie (voir la discussion de Mittoux et al., 2002).

La démonstration définitive d'un tel mécanisme pourrait se faire par l'utilisation de virus codant pour le gène du CNTF couplé à l'hémagglutinine (ou 'tag HA') de manière à identifier le CNTF d'origine transgénique et de comparer son volume de diffusion au volume d'activation astrocytaire. Le fait que l'activation astrocytaire soit massive et étendue à la quasi-totalité du striatum facilite l'utilisation de nombreuses techniques (immunoblot, microdialyse, consommation de métabolites marqués) qui ne seraient pas assez sensibles pour détecter des changements ne concernant qu'une partie des cellules de la structure.



**Figure 1. Volume d'infection et volume d'activation astrocytaire**

A partir d'un nombre restreint de cellules infectées (immunopositives pour la  $\beta$ -galactosidase, bleu), on obtient un volume d'activation astrocytaire très important (immunopositif pour la vimentine, rouge) qui permet de mener des analyses fonctionnelles à l'échelle du striatum.

Image 3D composite obtenue après recalage des coupes provenant d'un rat injecté avec 100 ng24/ $\mu$ L de lenti-LacZ (immunomarquage de la  $\beta$ -galactosidase) et de coupes provenant d'un rat injecté avec 100 ng24/ $\mu$ L de lenti-CNTF (immunomarquage de la vimentine). Les zones présentant un marquage ont été segmentées manuellement, reconstruite en un volume 3D et recalées dans un 'bloc' de cerveau de rat (gris).

Bien que la production du CNTF soit étendue, elle reste localisée au sein de la structure injectée et des structures de projection. Il est donc possible, dans le même animal, de conserver des structures 'contrôles' sans astrocytes réactifs. Par exemple, il est possible d'avoir dans le même animal un striatum témoin et un striatum avec des astrocytes réactifs. Cela est d'une grande utilité pour l'étude de certains paramètres (activité métabolique, consommation de glucose, régulation du taux extracellulaire de glutamate) qui sont relativement sensibles à l'état de l'animal. C'est un des grands avantages de l'utilisation de vecteurs viraux qui offrent beaucoup de souplesse pour contrôler le moment et la zone d'expression du transgène.

## 2. L'utilisation du CNTF

Dans notre modèle *in vivo*, l'activation astrocytaire a été induite par transfert lentiviral du gène du CNTF, qui est un activateur endogène des astrocytes (voir §II-C-2). Ainsi, notre modèle reproduit -du moins en partie- les mécanismes d'activation des astrocytes qui ont lieu en conditions pathologiques. En cela, notre modèle d'activation astrocytaire *in vivo* nous semble plus pertinent qu'un modèle d'induction par des stimuli non spécifiques comme l'agent bactérien lipopolysaccharide (LPS), des agents toxiques chimiques comme certains métaux ou même des lésions traumatiques, qui vont induire un ensemble de cascades d'activation non contrôlables. De plus, ce type d'induction peut activer les cellules microgliales et même parfois engendrer une rupture de la BHE et un recrutement des cellules du système immunitaire. Ces modèles ne permettent donc pas de 'disséquer' finement les changements qui sont spécifiquement liés à l'état réactif des astrocytes.

Notre modèle permet aussi de dissocier les processus de neurodégénérescence de l'activation des astrocytes. C'est un outil extrêmement utile pour évaluer le fonctionnement des astrocytes activés, indépendamment des modifications profondes qui se produisent dans un tissu lésé. Mais il est également possible d'induire des processus pathologiques (dans notre cas des phénomènes excitotoxiques) et d'étudier comment les astrocytes réactifs y répondent et s'y adaptent.

Une limite de l'utilisation du CNTF comme facteur d'activation des astrocytes est son large spectre d'action sur les cellules du cerveau (voir §II-C-3 et 4). Le CNTF a le potentiel d'agir sur les neurones, les cellules microgliales et les oligodendrocytes. Cependant, ces effets sont fréquemment rapportés sur des cellules en culture qui ne sont pas complètement différenciées. Ces conditions expérimentales sont loin de refléter notre situation expérimentale (cerveau de rat normal adulte), où tous les types cellulaires sont présents dans un état différencié et interagissent entre eux. Dans notre modèle, l'étude de nombreuses protéines neuronales par des techniques d'immunoblot et immunohistologie n'a révélé aucune altération dans le groupe lenti-CNTF. De même, l'observation en microscopie électronique du striatum de rats infectés n'a pas mis en évidence de changements majeurs dans l'ultrastructure des cellules non-astrocytaires, en tout cas pas du niveau de ceux observés sur les astrocytes. Evidemment, ces données ne donnent pas d'information sur le fonctionnement des neurones. Des expériences d'électrophysiologie vont être entreprises en collaboration avec le laboratoire de L. Kerkérian-LeGoff afin de caractériser le fonctionnement électrique neuronal et d'évaluer si le CNTF a des effets plus fins sur les neurones, qui seraient indétectables par nos techniques d'analyse. En définitive, le CNTF, en tant qu'activateur endogène des astrocytes est un agent pertinent pour induire l'astrogliose et en étudier les conséquences. Car même si le CNTF peut avoir des effets

parallèles sur les autres types cellulaires du striatum, ceux-ci n'ont pas l'ampleur des modifications observées dans les astrocytes.

Notre modèle d'activation astrocytaire par transfert lentiviral du CNTF, pourrait aussi permettre de caractériser les conséquences de la réactivité astrocytaire sur certaines fonctions émergentes attribuées aux astrocytes (voir § II-A-3). A titre d'exemple, il serait très intéressant de voir comment l'activation des astrocytes modifie leur effet modulateur sur la neurotransmission ou leur contrôle du débit sanguin cérébral. L'équipe de Nedergaard a montré très récemment en culture, sur des tranches et *in vivo*, que la libération astrocytaire de glutamate provoquait des dépolarisations massives paroxystiques caractéristiques de l'épilepsie (Tian et al., 2005). Un modèle d'activation stable des astrocytes comme le nôtre, permettrait d'en évaluer les effets sur l'apparition des crises d'épilepsie.

Dans cette étude, nous nous sommes consacrés à la caractérisation de deux fonctions capitales régulées par les astrocytes : le métabolisme énergétique et l'homéostasie glutamatergique.

## **B. Le métabolisme énergétique est profondément modifié lorsque les astrocytes sont activés par le CNTF**

### **1. L'activation des astrocytes est associée à des modifications de plusieurs voies métaboliques**

Notre étude montre que l'activation astrocytaire par le CNTF modifie profondément le métabolisme cérébral du striatum (voir le bilan en **Fig. 2**). L'utilisation du glucose est diminuée alors que l'entrée et la capacité d'utilisation des corps cétoniques (i.e. enzymes et transporteurs) sont augmentées.

#### *a. Les astrocytes activés par le CNTF sont capables d'utiliser les CC*

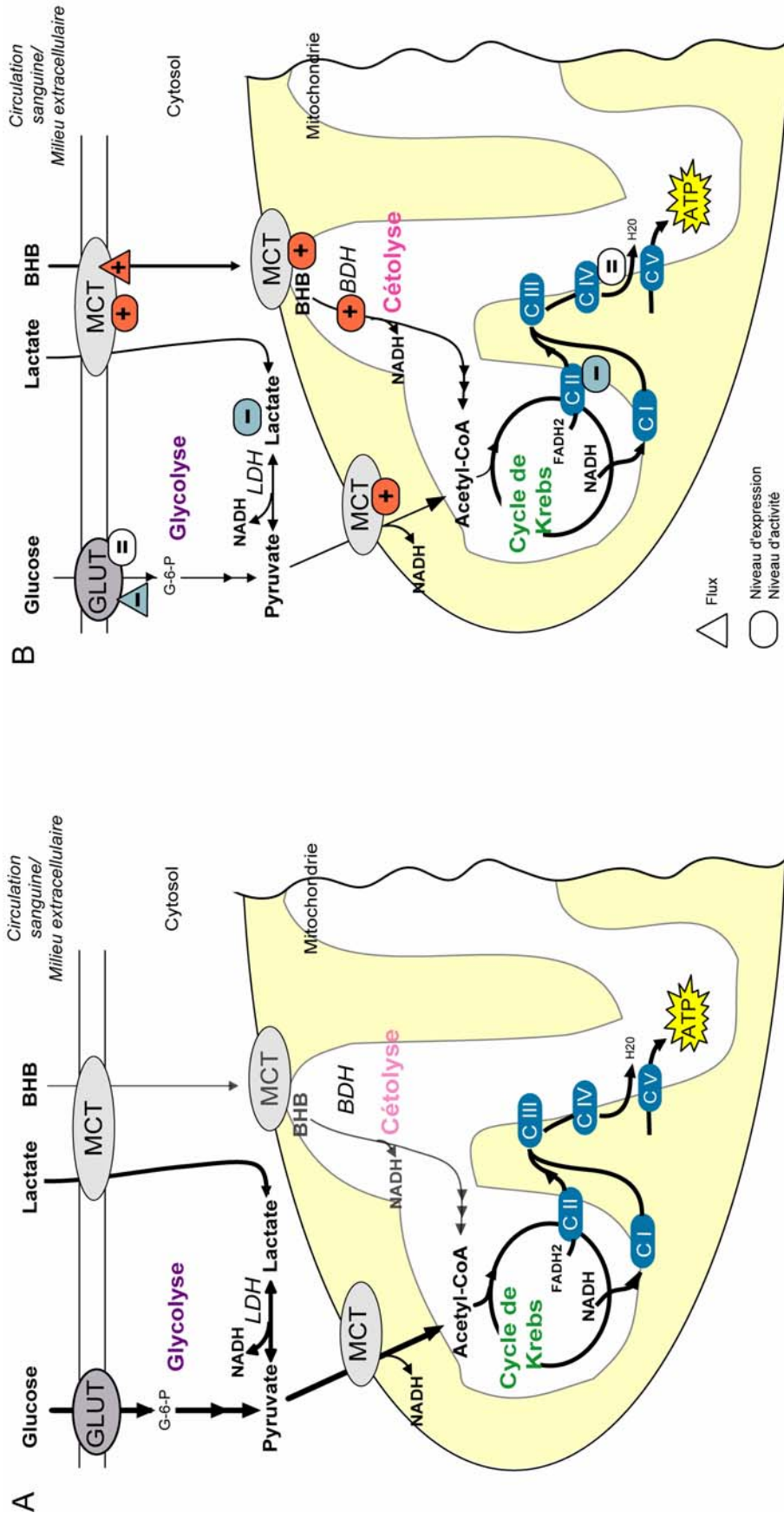
Nous observons une augmentation du niveau d'expression astrocytaire d'une des enzymes de la voie de cétolyse (la BDH) et des transporteurs membranaires aux CC, ce qui est exceptionnel dans le cerveau de rat adulte normal (**Fig. 2**). Normalement, ces enzymes restent à un niveau bas d'expression même en conditions de céto-genèse (voir §II-D-2-d). Seul l'article de Tieu a rapporté une augmentation transitoire de l'expression de la BDH dans la substance noire au début de l'intoxication de souris au 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) (voir § 2-c, Tieu et al., 2003). L'augmentation du transporteur

astrocytaire MCT1 a été observée une fois en conditions cétogéniques (Leino et al., 2001), et ce sont principalement les transporteurs endothéliaux qui sont soumis à une régulation (voir §II-D-2-d). Le CNTF a donc une capacité unique à induire l'expression des éléments de la voie d'utilisation des CC.

Dans le cerveau adulte, le facteur limitant pour l'utilisation des CC semble être leur concentration sanguine et leur disponibilité dans le parenchyme cérébral (voir §II-D-2-d-2 et Blomqvist et al., 1995; Blomqvist et al., 2002). Cependant, si l'apport en CC est important, l'activité des enzymes de la cétolyse peut devenir limitante chez le rat adulte (Wada et al., 1997; Izumi et al., 1998). De toutes les enzymes de la voie, c'est la BDH qui impose le rythme de dégradation des CC (Lopes-Cardozo et Klein, 1982). Ainsi, le fait de surexprimer les transporteurs astrocytaires MCT et l'enzyme limitante de la voie peut favoriser l'utilisation accrue des CC. Pour démontrer que les CC étaient effectivement consommés dans le cerveau des rats du groupe lenti-CNTF, nous avons mesuré l'utilisation du BHB marqué en conditions basales (i.e. sans activation cérébrale spécifique ni mise à jeun). Nos résultats montrent que les modifications de la 'machinerie' de la cétolyse dans les astrocytes du groupe lenti-CNTF sont associées à une augmentation limitée de l'utilisation des CC. Dans nos conditions expérimentales, cette utilisation reste relativement faible, mais il est possible qu'elle soit plus importante en condition d'activation cérébrale ou quand le taux de CC circulant est plus élevé (par exemple si la dernière prise alimentaire est éloignée dans le temps). Enfin, comme les astrocytes sont des cellules cétogéniques (Auestad et al., 1991; Guzman et Blazquez, 2001), il est possible que les CC soient produits localement par les astrocytes. Cette production locale est indétectable par la technique utilisant le BHB radioactif injecté en périphérie. Pour tester cette hypothèse, il faudrait mesurer la production de  $^{14}\text{CO}_2$  par des tranches de striatum à partir d'acides gras marqués. Il serait aussi intéressant de mesurer l'activité cérébrale d'enzymes clé de la cétogénèse comme la mHS (voir § II-D-2-a).

Même si l'utilisation des CC dans le groupe lenti-CNTF ne devient pas massive, elle représente tout de même une voie alternative de production d'énergie qui pourrait se substituer au glucose, dont la consommation diminue en conditions basales.





**Figure 2. Bilan des changements métaboliques associés à l'activation astrocytaire par le CNTF**

(A) Dans un cerveau 'normal', l'oxydation du glucose à travers la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne d'oxydation mitochondriale est la voie très largement majoritaire pour produire de l'ATP. Ces réactions sont compartimentées entre les neurones et les astrocytes (voir § II-D-3) mais par souci de lisibilité, une seule cellule été représentée.

(B) Plusieurs modifications des voies métaboliques sont observées dans le groupe lenti-CNTF. La consommation de glucose diminue même si l'expression du transporteur astrocytaire GLUT1 n'est pas modifiée. Les transporteurs MCT1 sont surexprimés, l'activité BDH est augmentée et l'utilisation des corps cétoniques est plus importante. En revanche les modifications au niveau de la chaîne de transport d'électrons sont limitées (baisse de l'activité du complexe II-SDH). Une légère baisse de l'activité LDH est aussi observée, ce qui est en accord avec la baisse de consommation de glucose.

Les ovales représentent des changements d'expression (évalués par immunoblot) et/ou d'activité (évalués par immunoblot) et les triangles des changements de flux (évalués par autoradiographique, voir les résultats exposés au §IV-B).

### *b. Le CNTF induit une baisse de l'utilisation striatale de glucose*

Nous avons observé, de façon très reproductible une baisse de la consommation de glucose dans le groupe lenti-CNTF. Cette baisse de 17% peut sembler limitée mais en conditions 'basales' et en l'absence de lésion, une telle diminution a nécessairement des répercussions physiologiques et suggère que la régulation du métabolisme énergétique est modifiée.

La diminution d'utilisation du glucose n'est pas associée à un hypométabolisme oxydatif général puisque le niveau d'activité de la COX est maintenu. Seule l'activité de la SDH est significativement diminuée de 10% (**Fig. 2**). Contrairement à la COX, la SDH ne représente pas une étape obligatoire dans la chaîne de transport d'électron mitochondrial. En effet le complexe II/SDH est une voie d'entrée alternative pour le FADH<sub>2</sub> dans la chaîne, alors que le complexe I est le point d'entrée du NADH, H<sup>+</sup> qui est majoritairement produit par la glycolyse, le cycle de Krebs et la cétolyse (voir **Fig. 7** de l'introduction). Ainsi, même si l'activité de la SDH est diminuée, cela ne remet pas en question l'efficacité de la chaîne mitochondriale. Les mécanismes impliqués dans cette légère baisse d'activité (i.e. de V<sub>max</sub>) de la SDH mais aussi de la LDH n'ont pas été caractérisés, il s'agit peut-être d'une adaptation aux modifications des voies métaboliques présentes dans le groupe lenti-CNTF (baisse d'utilisation de glucose au profit des CC).

Le fait que les enzymes impliquées dans les étapes terminales de la production d'ATP n'étaient pas -ou peu- modifiées, suggérerait que l'activité métabolique était maintenue et qu'un substrat énergétique alternatif pouvait se substituer au glucose. Nous avons privilégié l'étude des CC car ils forment une voie caractéristique du cerveau immature, et les astrocytes réactifs retrouvent certaines propriétés de cellules immatures. De plus, cette voie est indépendante de la glycolyse et alimente directement et rapidement le cycle de Krebs. Nos résultats montrent que cette voie peut effectivement servir de voie énergétique alternative (cf. § précédent), mais il est possible que ce ne soit pas la seule. On peut également imaginer que la production de glucose-6-phosphate à partir du glycogène soit augmentée dans les astrocytes activés. Cependant, cette voie n'est pas indépendante du glucose et ne peut pas expliquer une baisse chronique de la consommation de glucose. Il est aussi peu probable que le lactate extracellulaire, qui est très abondant, soit plus fortement utilisé dans le groupe lenti-CNTF, car même si le niveau d'expression des transporteurs MCT augmente, l'activité de la LDH diminue légèrement dans le groupe CNTF, ce qui compromet une oxydation efficace du lactate. Enfin, il est envisageable que les astrocytes réactifs oxydent le glutamate en plus grande quantité pour produire l' $\alpha$ -cétoglutarate. La mise en évidence histochimique de l'activité de la glutamate déshydrogénase est difficile parce

que c'est une enzyme cytoplasmique qui diffuse dans le bain d'incubation (Lojda et al., 1979). Pour aller plus loin dans la caractérisation des voies métaboliques des astrocytes activés et confirmer les changements observés du niveau d'activité de certaines enzymes, il serait intéressant de réaliser des expériences de perfusion de métabolites marqués au  $^{13}\text{C}$  (glucose, CC, acétate) et de suivre leur devenir métabolique par spectroscopie par résonance magnétique (Shulman et al., 2004). Cette technique, qui reste complexe surtout pour les analyses cinétiques, permet de mettre en évidence les flux métaboliques principaux et offre une vision générale du fonctionnement métabolique cérébral.

Il est intéressant de noter que des mécanismes de régulation croisée de l'utilisation relative des CC et du glucose existent, et pourraient être à l'origine de la baisse de consommation de glucose observée. Les CC sont connus pour réprimer l'utilisation de glucose *in vitro* (Ide et al., 1969; Roeder et al., 1984b; Roeder et al., 1984a) et *in vivo* (Miller et al., 1982). En conditions cétogéniques, on observe une augmentation de la concentration cérébrale de glucose, de glucose-6-phosphate et de pyruvate, ce qui témoigne d'une réduction des flux à travers l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate déshydrogénase (voir les références dans Nehlig, 2004). L'acétyl-CoA produit par la cétolyse exerce une inhibition rétrograde sur la pyruvate déshydrogénase (Booth et Clark, 1981). Il est possible aussi que les CC entraînent une diminution de la concentration mitochondriale de pyruvate issu de la glycolyse en entrant en compétition avec lui pour le transport dans la mitochondrie par les MCT ou en favorisant la sortie de pyruvate de la mitochondrie par hétéroéchange (Nehlig, 2004). L'ensemble de ces mécanismes permet d'expliquer comment l'utilisation accrue de CC peut induire une baisse d'utilisation de glucose.

Notre étude *in situ* de l'activation astrocytaire par le CNTF met donc en évidence une nouvelle particularité des astrocytes réactifs qui possèdent la 'machinerie' nécessaire pour utiliser plus efficacement les CC. En conditions basales, l'utilisation des CC est légèrement, mais significativement augmentée, tandis que l'utilisation du glucose est diminuée. Ceci suggère que l'activation des astrocytes par le CNTF est associée à un transfert de la glycolyse vers la cétolyse, un phénomène inattendu chez le rat adulte en condition de normoglycémie. Quels sont les conséquences et les avantages potentiels de ces changements du fonctionnement métabolique?

## 2. Quels sont les intérêts potentiels à l'utilisation des corps cétoniques ?

### *a. Une voie de production d'énergie alternative*

La possibilité d'utiliser les CC pour produire de l'énergie, indépendamment du glucose a l'avantage de fournir une 'voie de secours', si l'apport de glucose devient insuffisant ou si la demande énergétique est très importante. Dans nos conditions, le striatum devient donc moins dépendant du glucose, pour peu que les CC soient disponibles en quantité suffisante. Ainsi, une partie du fonctionnement basal du cerveau peut être alimenté par les CC, ce qui laisse un potentiel plus important de réponse en conditions de forte demande énergétique. Dans ces conditions, la production d'énergie à partir de glucose pourra être plus importante avant de saturer l'héxokinase ou le transporteur GLUT1 puisque le niveau de consommation de glucose est plus bas (Barros *et al.*, 2005). Lors de l'hyperactivation induite par le QA la consommation de glucose augmente plus fortement dans le groupe lenti-CNTF. Le mécanisme sous-jacent sera discuté au § 2-b, mais cette observation montre que l'accroissement de l'utilisation de glucose peut effectivement être plus important dans le groupe lenti-CNTF. Dans ces conditions d'hyperactivation, il est possible que la consommation de CC soit aussi augmentée et participe à la production énergétique. Il serait donc intéressant d'étudier comment la consommation des CC évolue après une injection de QA.

Si ce sont les astrocytes réactifs qui métabolisent les CC (car ce sont eux qui présentent la forte activité BDH), comment les neurones profitent-ils de cette voie métabolique alternative ? Les neurones pourraient être alimentés par des métabolites dérivés de la cétolyse astrocytaire, comme l' $\alpha$ -cétoglutarate et le citrate, des intermédiaires du cycle de Krebs dont la concentration augmente avec une cétolyse active (Sato *et al.*, 1995) et qui sont échangés entre les deux types cellulaires (Shank *et Campbell*, 1984; Schousboe *et al.*, 1997).

### *b. Une voie de production d'énergie efficace*

La voie des CC peut être considérée comme une voie plus performante de production d'énergie que la voie classique de la glycolyse. La dégradation des CC est rapide, il ne faut que trois réactions pour former de l'acétyl-CoA, contre 10 par la glycolyse. La cétolyse est mitochondriale, ainsi une fois le BHB entré dans la mitochondrie, il peut subir sans interruption l'ensemble des réactions d'oxydation qui fournissent du NADH, H<sup>+</sup> pour alimenter la chaîne de transport d'électron. Il n'y a pas de ségrégation spatiale entre les étapes de la voie, contrairement à la glycolyse qui a lieu dans le cytoplasme alors que le cycle de Krebs a lieu dans la mitochondrie, ce qui impose l'import mitochondrial des produits de la glycolyse

(pyruvate, lactate et NADH, H<sup>+</sup>). Enfin, la cétolyse ne nécessite pas d'investissement en ATP comme pour la première et la troisième étape de la glycolyse, ce qui constitue un avantage non négligeable en conditions de déficit métabolique.

La production d'énergie semble être plus efficace à partir des CC qu'à partir de glucose. Des expériences réalisées avec un cœur entier perfusé ont montré que pour une consommation égale d'O<sub>2</sub>, l'énergie mécanique développée était plus importante à partir de CC que de glucose (Sato *et al.*, 1995). Selon les auteurs, cette amélioration aurait plusieurs origines : la baisse du potentiel de membrane mitochondrial, ce qui diminue la fuite des protons hors de la mitochondrie, l'amélioration de l'efficacité de transfert d'électrons entre le complexe I et le coenzyme Q et l'augmentation du  $\Delta G'$  de l'ATP, c'est-à-dire de l'énergie libre produite par l'hydrolyse de l'ATP (pour plus de détails sur les mécanismes impliqués voir, Veech *et al.*, 2001).

Ainsi, en plus de représenter une voie de production d'énergie alternative, la cétolyse représente une voie métabolique performante, ce qui peut être bénéfique au fonctionnement et à la survie des neurones qui sont très dépendants de l'apport énergétique.

### *c. Une voie de production d'énergie à potentiel neuroprotecteur*

Les CC ont des effets neuroprotecteurs dans des conditions pathologiques variées, dont évidemment les situations d'atteinte métabolique.

Ainsi, le BHB rallonge le temps de survie de neurones d'hippocampe en culture soumis à une hypoxie (Masuda *et al.*, 2005) et maintient le fonctionnement électrique de neurones d'hippocampe en condition d'hypoglycémie, mais seulement si les tranches proviennent de rats âgés de moins de 30 jours (Izumi *et al.*, 1998). Enfin, le traitement avec du BHB diminue les conséquences délétères d'une hypoxie et d'une anoxie chez la souris, même en étant administré après leur déclenchement : il réduit l'augmentation du taux de lactate extracellulaire à l'origine de l'acidose, empêche l'accumulation de sodium et d'eau dans les cellules et maintient un taux d'ATP élevé (Suzuki *et al.*, 2001). Le 1,3-butanediol, qui est métabolisé par le foie en CC, a aussi des effets neuroprotecteurs *in vivo* contre l'ischémie (Marie *et al.*, 1987).

Dans toutes ces conditions, l'effet neuroprotecteur des CC est lié au fait qu'ils offrent une voie alternative de production d'énergie qui permet de contourner le déficit métabolique primaire, qui peut se situer à toutes les étapes entre l'entrée de glucose et la formation d'acétyl-CoA. Le régime cétogénique est d'ailleurs utilisé pour le traitement des déficiences chroniques du transporteur au glucose GLUT1 et de la pyruvate déshydrogénase (syndrome de Leigh) (Morris, 2005). Ce contournement peut aussi se faire plus en aval dans la chaîne de production d'énergie. L'équipe de Tieu a montré que l'infusion chronique sous cutanée de BHB chez la souris protégeait les neurones nigraux vis-à-vis du MPTP en restaurant la

phosphorylation oxydative inhibée au niveau du complexe I (Tieu *et al.*, 2003). Cette restauration n'était pas due à l'augmentation de NADH, H<sup>+</sup> mais passait par un accroissement du taux de succinate, qui permettait de contourner le blocage du complexe I en alimentant le complexe II.

Les CC ont aussi des effets neuroprotecteurs dans des modèles qui n'impliquent pas directement des déficits métaboliques. Le BHB protège les neurones d'hippocampe *in vitro* vis-à-vis de la toxicité du peptide A $\beta$ <sub>1-42</sub> (Kashiwaya *et al.*, 2000). Les CC ont un effet antioxydant car ils diminuent la quantité de coenzyme Q réduit qui participe à la formation de l'ion superoxyde (Veech *et al.*, 2001).

Enfin, il faut noter qu'historiquement, les CC ont été utilisés pour le traitement des formes graves et résistantes d'épilepsie chez l'enfant. La cétogenèse permanente obtenue par un régime alimentaire adapté, induit une réduction majeure voire une disparition des crises d'épilepsies (Vining, 1999). Les mécanismes impliqués sont encore mal compris, ils pourraient s'agir d'effets anticonvulsivants directs, d'une baisse d'excitabilité des neurones par l'augmentation de la synthèse du GABA (Daikhin *et al.*, 1998), ou des effets indirects du régime (pH cérébral, niveau d'hydratation., Morris, 2005). Il ne s'agit pas là d'effet neuroprotecteurs à proprement parler mais ces observations suggèrent que l'utilisation des CC peut induire des changements profonds dans le fonctionnement cérébral.

Ainsi, le fait que les astrocytes activés par le CNTF soient capables d'utiliser les CC apparaît comme une modification globalement bénéfique. Le métabolisme énergétique n'est cependant pas la seule fonction profondément modifiée dans les astrocytes activés : il en est de même pour une autre grande fonction cérébrale : l'homéostasie glutamatergique.

## C. Le système de régulation du glutamate est plus performant avec le CNTF : rôle des astrocytes activés

### 1. Mise en évidence de nouveaux mécanismes de régulation des transporteurs au glutamate *in vivo*

Les mécanismes classiques de régulation de l'efficacité du transport du glutamate incluent le changement du niveau d'expression des transporteurs, la modulation de leur activité par phosphorylation, leur interaction avec des protéines régulatrices et leur recrutement à la membrane (voir § II-E-2-e). Nous rapportons ici deux nouveaux mécanismes de régulation post-traductionnelle impliquant le niveau de glycosylation des transporteurs et leur localisation dans des sous-domaines membranaires, les rafts.

#### *a. Hyperglycosylation des transporteurs : mécanismes et conséquences*

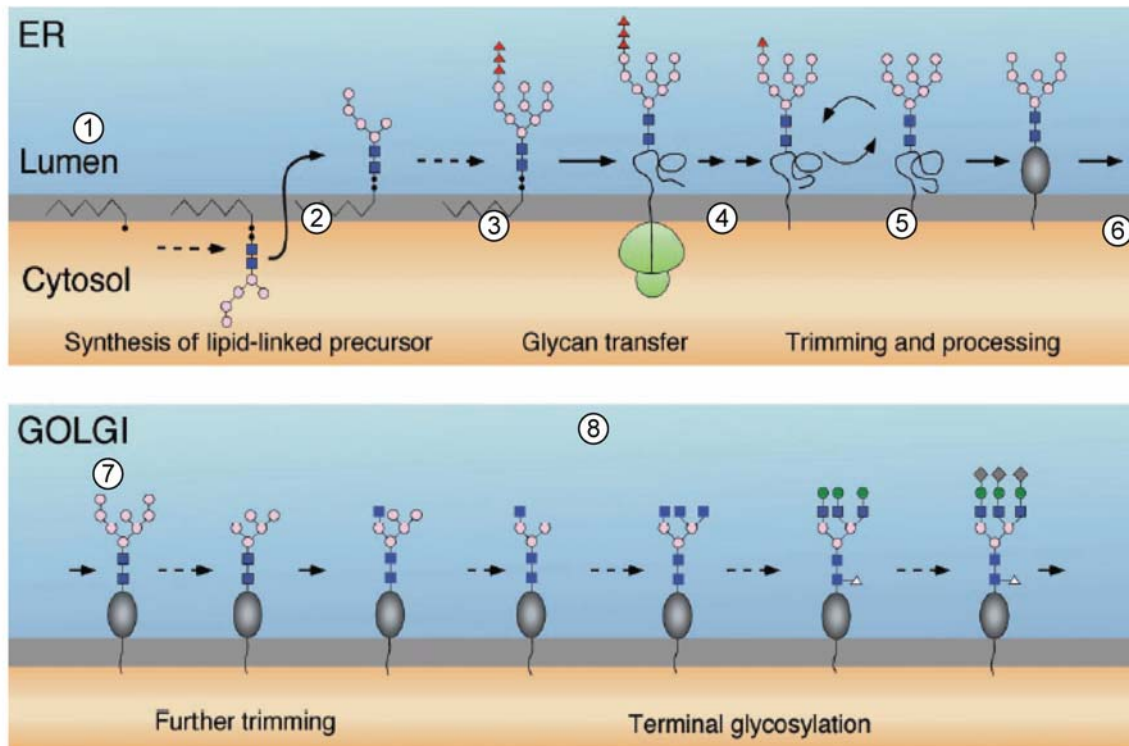
*- les transporteurs au glutamate des astrocytes activés par le CNTF sont hyperglycosylés*

Les astrocytes activés par le CNTF expriment une forme hyperglycosylée des transporteurs au glutamate. Cette hyperglycosylation est spécifique puisque par exemple, le transporteur neuronal EAAC1 et le transporteur astrocytaire au glucose GLUT1 présentent un poids moléculaire identique dans tous les groupes. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle modification post-traductionnelle est rapportée. Il peut exister une perte de site de glycosylation sur les transporteurs au glutamate par mutation (Trotti *et al.*, 2001). Pour d'autres protéines, l'inverse peut se produire, avec l'apparition après mutation d'un site de glycosylation sur lequel sera greffé une chaîne glycosylée (Vogt *et al.*, 2005). Dans notre cas, l'apparition d'un nouveau site de glycosylation à la fois sur le gène de GLAST et de GLT-1 est hautement improbable, il s'agit vraisemblablement d'un changement de la structure des chaînes glycosylées. Il est d'ailleurs connu que les résidus de polysaccharides des protéines présentent une hétérogénéité intrinsèque (Helenius *et Aebi*, 2001)(voir **Fig. 3**).

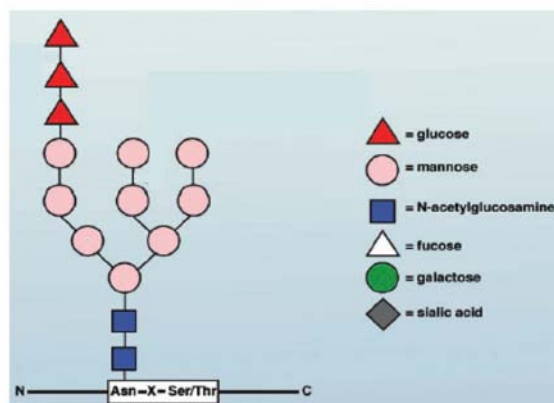
Des changements du niveau de glycosylation des transporteurs au glutamate ont été rapportés au cours du développement et de la maturation de la protéine lors de sa synthèse. Ainsi, GLAST apparaît avec un poids moléculaire plus faible de 6 kDa chez le nouveau-né, car les résidus glucidiques sont de types 'high mannose' et non pas hybride, ce qui témoigne d'une maturation limitée à l'étape du réticulum endoplasmique (**Fig. 3** et § suivant). Une observation similaire a été faite avec GLT-1 qui est présent dans les cellules de la lignée C6 sous une forme 'immature' d'un poids de 60 kDa et une forme 'mature' de 75 kDa (Kalandadze *et al.*, 2004). Seule l'équipe de Furuta avait mis en évidence une forme de plus



haut poids moléculaire de GLAST chez le rat qui persiste jusqu'à P16. Mais selon eux, cette forme correspond à un dimère de GLAST sous forme non glycosylé (Furuta et al., 1997a). Enfin, l'équipe de Rothstein a rapporté (à l'occasion d'un congrès) que la protéine GTRAP<sub>3-18</sub> diminuait le degré de glycosylation de EAAC1 au niveau du réticulum (Ruggiero et al., 2003), ce qui constitue la première mise en évidence d'une régulation 'physiologique' chez l'adulte du profil de glycosylation d'un transporteur au glutamate.



Helenenius et Aebi (2001) *Science* **291** 2364-2369.



### Figure 3. Mécanismes de glycosylation des protéines

(1) La synthèse des chaînes sucrées commence au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique (ER) par l'ajout de 7 sucres sur une molécule de dolichylpyrophosphate incluse dans la membrane. (2) Ce résidu est transféré sur la face interne du réticulum, (3) d'autres sucres sont ajoutés, (4) et le résidu est greffé sur le polypeptide en cours de synthèse, au niveau d'une asparagine par une oligosaccharyltransferase. (5) La chaîne sucrée est maturée par différentes glycosidases qui clivent certains sucres et (6) la protéine acquiert sa structure tridimensionnelle (ovale gris). A ce stade, la chaîne sucrée est très homogène pour toutes les protéines et elle est de type 'high mannose'. Au niveau du Golgi, la maturation de la chaîne sucrée se poursuit : (7) des mannoses sont retirés par des mannosidases et (8) de nouveaux types de sucres sont ajoutés par des glycosyltransférases spécifiques. Ceci crée une grande diversité avec des chaînes de type 'hybride' (composées de mannose et de N-acétylglucosamine) et des chaînes de type 'complexe' (comme illustré ici, composées d'acide sialique, de fucose et de galactose).

#### *- mécanismes impliqués dans l'hyperglycosylation des transporteurs*

Les chaînes glycosylées sont greffées sur les polypeptides au cours de leur synthèse, au niveau du réticulum endoplasmique puis de l'appareil de Golgi (Helenius et Aebi, 2001). L'appareil de Golgi ne possède pas de mécanisme strict de contrôle des chaînes glycosylées, ce qui autorise une grande diversité de structure des chaînes de polysaccharides produites (Helenius et Aebi, 2001). Les mécanismes responsables de la spécificité de la glycosylation (i.e. spécificité du type de chaîne selon le peptide) sont très mal compris (Munro, 2001). De plus, le potentiel de glycosylation du Golgi est dépendant de nombreux facteurs, comme le pH interne, la concentration des substrats (i.e. les monosaccharides couplés à des nucléotides) et l'abondance relative de chaque type de glycosyltransférase (il en existe plusieurs centaines, Varki, 1998). Au final, il est donc difficile de prédire quels sont les mécanismes impliqués dans l'hyperglycosylation spécifique des transporteurs astrocytaires par le CNTF. Il est possible que de légères modifications de certains de ces paramètres favorisent la formation de chaînes glycosylées plus complexes sur les transporteurs. Même si les mécanismes de contrôle des glycosylations restent mal caractérisés, on connaît en partie le rôle des glycosylations.

#### *- conséquences potentielles de l'hyperglycosylation des transporteurs*

De manière générale, au niveau du RE, les glycosylations jouent un rôle dans l'acquisition de la structure tridimensionnelle des protéines, car elles participent à un système de contrôle du repliement (Helenius et Aebi, 2001). Les glycosylations participent aussi à l'adressage des protéines en se liant à des lectines qui les reconnaissent spécifiquement (récepteur au mannose-6-phosphate, VIP36 et ERGIC-53) et agissent comme des cargos qui amènent les protéines vers leur destination subcellulaire (Helenius et Aebi, 2001). Ces résidus de sucres hautement ramifiés et diversifiés introduisent une grande complexité à partir des protéines formées d'une chaîne linéaire d'acides aminés. Ils renferment potentiellement une quantité d'information importante que l'on n'a assurément pas fini de découvrir (Drickamer et Taylor, 1998; Schachter, 2005).

Dans le cas des transporteurs, les glycosylations favorisent leur stabilité, leur localisation à la membrane et la formation de multimères (voir § II-E-2-b). La forme de GLT-1 non glycosylée sur l'asparagine 206 fonctionne plus facilement en mode réverse (Trotti et al., 2001) mais les glycosylations n'ont pas d'influence directe sur les propriétés intrinsèques de transport (Conradt *et al.*, 1995; Trotti *et al.*, 2001, et nos résultats). C'est ce que nous observons, avec un maintien de l'affinité des transporteurs pour l'aspartate. L'hyperglycosylation n'induit pas non plus de localisation aberrante des transporteurs hors

de la membrane plasmique. Finalement, il est probable que l'hyperglycosylation ait des effets plus 'subtils' sur les transporteurs (voir § suivant).

Il est important de noter que l'étude du rôle de ces hyperglycosylations, est difficile, voire impossible *in vivo*, car il n'y a pas de moyen d'inhiber spécifiquement l'hyperglycosylation des transporteurs, indépendamment de leur glycosylation normale. L'étude des glycosylations en général, est limitée par le manque d'outils spécifiques pour cibler les glycosylations d'une protéine d'intérêt (Schachter, 2005). Il faudrait d'abord caractériser précisément la composition des chaînes hyperglycosylées des transporteurs et utiliser en culture des inhibiteurs des glycosyltransférases impliquées dans la formation de ces chaînes. Malgré cela, ce sont toutes les protéines qui possèdent ce type de chaîne glycosylée qui vont être affectées et le rôle spécifique des hyperglycosylations des transporteurs risque d'être masqué. Cette approche nécessite aussi de disposer d'un modèle *in vitro* d'activation astrocytaire par le CNTF, que nous développons actuellement.

Même si nous n'avons pas pu attribuer un rôle précis à l'hyperglycosylation des transporteurs dans les astrocytes activés, ces changements sont suffisamment reproductibles et intrigants pour justifier une caractérisation plus précise des transporteurs. Sachant que les glycosylations sont des signaux de localisation, nous avons fait l'hypothèse que le changement de glycosylation pouvait induire des modifications subtiles de localisation subcellulaire et nous nous sommes intéressés aux domaines membranaires rafts, qui par ailleurs, sont connus pour améliorer le transport de glutamate.

#### *b. Localisation préférentielle dans les rafts : mécanismes et conséquences*

*- les transporteurs sont plus enrichis dans les rafts des astrocytes activés par le CNTF*

Dans le groupe lenti-CNTF, nous observons une redistribution de GLT-1 et de GLAST dans les rafts. L'enrichissement des transporteurs dans les rafts constitue une nouvelle voie de régulation du transport, différente du mécanisme classique de recrutement à la membrane puisqu'il s'agit d'une distribution différentielle au sein même de la membrane. De plus, le recrutement accru de GLAST en présence du QA qui induit une libération massive de glutamate endogène, représente une réponse adaptative puissante pour faire face à l'excès de glutamate extracellulaire

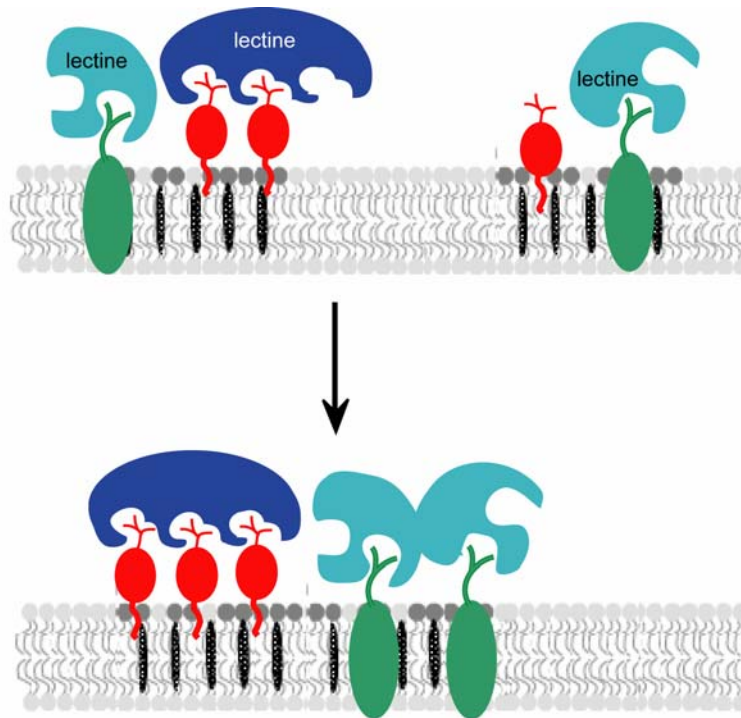
*- mécanismes impliqués dans le recrutement des transporteurs dans les rafts*

Les rafts commencent à se différencier du reste de la membrane au niveau de l'appareil de Golgi et s'enrichissent progressivement en cholestérol et en sphingolipides. Les protéines semblent déjà associées aux rafts à ce stade de leur maturation (Brown et Rose, 1992). Plusieurs mécanismes d'adressage des protéines dans les rafts ont été décrits

(Lucero et Robbins, 2004; Martens et al., 2004), mais il faut garder à l'esprit que les rafts ne sont pas des domaines figés, ils sont au contraire dynamiques et leur composition protéique et leur taille évoluent constamment (Simons et Toomre, 2000). Certaines modifications post-traductionnelles (ancres GPI, palmitoylation et myristoylation N-terminale) permettent une inclusion dans la membrane plasmique et favorisent la localisation des protéines dans les rafts (Lucero et Robbins, 2004)(voir **Fig. 11 de l'introduction**). Des motifs protéiques spécifiques sont aussi responsables d'une interaction directe de la protéine avec certaines protéines résidentes des rafts comme la cavéoline (Okamoto et al., 1998). Enfin, d'autres mécanismes sont proposés pour les protéines intégrales de la membrane (i.e. qui possèdent des domaines transmembranaires). La membrane plasmique serait légèrement plus épaisse au niveau des rafts, ce qui pourrait favoriser thermodynamiquement certaines protéines spécifiques qui ont des segments transmembranaires d'une longueur adaptée (Lee, 2003). Une hypothèse alternative est que certaines protéines s'entourent de lipides qui forment une sorte de 'coquille' (lipid shell) et favorisent leur localisation dans l'environnement lipidique propre aux rafts (Anderson et Jacobson, 2002).

Ces deux derniers mécanismes semblent les plus probables pour expliquer la localisation des transporteurs au glutamate dans les rafts en conditions basales. En effet, les transporteurs sont des protéines transmembranaires et l'existence sur les transporteurs de modifications post-traductionnelles de type ancre GPI, palmitoylation ou myristoylation n'ont jamais été décrites. Cependant, on ne peut pas exclure complètement la présence de certaines de ces modifications comme la palmitoylation car elle est réversible et n'a jamais été directement étudiée sur les transporteurs, alors que c'est une modification relativement fréquente (Bijlmakers et Marsh, 2003). Il n'existe pas de site consensus clairement établi pour les palmitoylations, on sait seulement qu'elles se produisent sur des cystéines proches de la membrane plasmique. GLT-1 a quatre cystéines intracellulaires qui peuvent donc potentiellement être palmitoylées. Il faut admettre que les mécanismes de localisation des transporteurs dans les rafts en conditions basales sont loin d'être connus, que dire alors des mécanismes de recrutement accru dans les astrocytes activés ?

Les glycosylations pourraient participer au recrutement des transporteurs dans les rafts des astrocytes activés. En effet, dans les cellules épithéliales polarisées, le profil de glycosylation des protéines est impliqué dans leur adressage au niveau de la membrane apicale où sont situés les rafts (Simons et Ikonen, 1997). Selon Fullekrug et Simons, des lectines spécifiques (voir § 1-a) qui interagissent avec plusieurs chaînes glycosylées au niveau du Golgi, pourraient rassembler et stabiliser les protéines au sein du même raft (Fullekrug et Simons, 2004)(**Fig. 4**).



Adapté de Fullekrug et Simons (2004) *Ann N Y Acad Sci* **1014**:164-169.

#### Figure 4. Les glycosylations, les rafts et le rôle des lectines

Certaines lectines pourraient avoir un rôle déterminant dans la formation et la maturation des rafts. Les lectines qui possèdent plusieurs sites de liaison pour des motifs glycosylés pourraient se lier à plusieurs protéines qui ont une affinité pour les rafts, les rassembler et augmenter leur stabilité dans les rafts. Les lectines peuvent aussi se lier les unes aux autres ou être incluses dans les rafts (non représenté ici), ce qui favorise l'apparition de raft matures de plus grande taille et de composition protéique définie.

Une autre façon de modifier la répartition des transporteurs entre les domaines rafts et non-rafts de la membrane pourrait faire intervenir le cytosquelette. En effet, les rafts sont associés au cytosquelette (Ikonen, 2001), et constituent des sites de polymérisation de l'actine (Rozelle et al., 2000). Le cytosquelette augmente la stabilité des rafts, restreint leur mobilité latérale et peut modifier l'affinité d'une protéine pour les rafts (Golub et al., 2004). Le réseau d'actine régule par exemple l'association du récepteur aux immunoglobulines FcεRI avec d'autres constituants des rafts (Holowka et al., 2000). Comme la composition et la forme du cytosquelette sont fortement modifiées dans les astrocytes activés (surexpression de la GFAP et réexpression des filaments intermédiaires immatures vimentine et nestine), l'ancrage des transporteurs au glutamate dans les rafts pourrait être amélioré. Malheureusement, l'implication du profil de glycosylation et/ou du cytosquelette dans la redistribution des transporteurs dans les rafts ne sont pas testables *in vivo*. En revanche, cela est envisageable *in vitro* en utilisant des techniques peu spécifiques de perturbation du cytosquelette ou de déglycosylation générale.

Comment expliquer le recrutement rapide (15 min) de GLAST induit par la libération massive de glutamate endogène ? Les rafts sont des domaines très dynamiques, qui peuvent coalescer entre eux et favoriser le recrutement d'un plus grand nombre de protéines (Fullekrug et Simons, 2004). La redistribution de protéines de signalisation dans les rafts a été observée dans différents systèmes expérimentaux en réponse à la liaison du ligand à son récepteur (Simons et Toomre, 2000) ou par l'activation de certaines kinases (Pi3kinase, PKC, PKAC $\beta$ ) (Lucero et Robbins, 2004). Le recrutement rapide d'une protéine 'activée' (par son ligand, par phosphorylation) dans les rafts semble être un phénomène assez général de régulation, qui pourrait là encore, faire intervenir le cytosquelette (Golub et al., 2004).

En définitive, une meilleure caractérisation des rafts et de leur dynamique est nécessaire avant de comprendre les mécanismes impliqués dans le recrutement des transporteurs au glutamate dans les rafts des astrocytes activés par le CNTF. Pourtant, même si on ne connaît pas précisément les mécanismes impliqués dans ce recrutement préférentiel, on peut avancer quelques hypothèses sur ses conséquences.

*- conséquences potentielles du recrutement des transporteurs dans les rafts*

La recapture du glutamate est plus de dix fois plus importante dans les rafts que dans les autres domaines membranaires (Butchbach *et al.*, 2004). De plus, la destruction des rafts par le méthyl- $\beta$ -cyclodextrine réduit la capacité de transport du glutamate de 70% en culture et de 25% sur des vésicules membranaires purifiées (Butchbach *et al.*, 2004). Ces résultats montrent que les rafts sont primordiaux pour le bon fonctionnement des transporteurs au glutamate. Les auteurs n'ont pas caractérisé les mécanismes sous-jacents, mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées (voir, par exemple, les mécanismes proposés pour la régulation du fonctionnement des canaux ioniques, Martens et al., 2004). (1) au niveau des rafts les propriétés biophysiques et biochimiques de la membrane pourraient être plus favorables au fonctionnement des transporteurs, (2) les rafts faciliteraient le rapprochement des transporteurs et la formation de multimères, (3) les rafts serviraient de 'plateforme de rencontre' entre les transporteurs et des molécules régulatrices, (4) les rafts occuperaient des sites stratégiques à la membrane des astrocytes (près des sites de libération de glutamate) qui optimiseraient la capacité de recapture. En faveur de la première hypothèse, on sait que les rafts sont enrichis en cholestérol qui est nécessaire pour le transport. En effet, il est impossible de reconstituer un transport du glutamate fonctionnel sur des membranes artificielles en l'absence de cholestérol, qui semble avoir une action directe sur les transporteurs (Shouffani et Kanner, 1990). Concernant les hypothèses 2 et 3, on sait que même si les rafts contiennent relativement peu de protéines, ils favorisent la formation de complexes supramoléculaires en rapprochant spécifiquement des protéines d'interaction régulatrices (Simons et Ikonen, 1997). Le rassemblement des transporteurs dans les rafts,

au cours de la synthèse au niveau du Golgi et à la membrane plasmique, pourrait augmenter la formation des homomultimères qui représentent la forme active (voir § II-E-2-b). De plus, les rafts contiennent de nombreuses protéines de signalisation dont des phosphatases et des phosphorylases (Foster et al., 2003), qui peuvent réguler l'activité des transporteurs (voir § II-E-2-e). A l'inverse, les rafts excluent des protéines inhibitrices et créent des environnements 'privilégiés' qui pourraient favoriser le fonctionnement des transporteurs (Simons et Toomre, 2000; Golub et al., 2004). Enfin, les rafts pourraient améliorer l'efficacité de recapture du glutamate en permettant un adressage spécifique des transporteurs près des sites de libération du glutamate. En effet, dans les neurones, les rafts ont une localisation très spécifique, au niveau de l'élément pré-synaptique (Ledesma et al., 1998) et dans les vésicules synaptiques (Martin, 2000). De nombreux récepteurs et constituants de l'élément post-synaptique sont aussi dans les rafts (Hering et al., 2003). Les domaines rafts enrichis en cholestérol sont donc étroitement liés à la synapse (voir, Pfrieger, 2003). Rien de tel n'a encore été démontré pour les astrocytes, dont on a assez peu étudié les rafts. Mais il est fort probable que dans les astrocytes également, les rafts ne soient pas localisés aléatoirement et occupent des positions stratégiques. D'ailleurs, quand des astrocytes en culture sont traités avec du méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, GLT-1 perd sa distribution en 'clusters' à la membrane, ce qui est en accord avec une localisation spécifique des transporteurs au glutamate situés dans les rafts (Butchbach et al., 2004). Il faut noter que les hypothèses 3 et 4 impliquent aussi que l'amélioration du transport du glutamate n'est pas mesurable par la technique des synaptosomes. En effet, au cours de la préparation relativement 'artificielle' des synaptosomes, certaines interactions moléculaires et la spécificité de la localisation subcellulaire sont perdues. Il faut donc considérer que cette technique permet d'évaluer les propriétés intrinsèques des transporteurs mais pas la capacité réelle de recapture du glutamate *in situ*, qui elle semble être augmentée dans le groupe lenti-CNTF (voir § 2).

Il est intéressant de noter que le contrôle de l'activité par une relocalisation dans les rafts est un mécanisme général de régulation qui a été rapporté pour d'autres protéines comme certains canaux ioniques et les récepteurs aux facteurs neurotrophiques (Paratcha et Ibanez, 2002; Golub et al., 2004; Lucero et Robbins, 2004; Martens et al., 2004). Par exemple, le transporteur au glucose GLUT1 est recruté dans les rafts des adipocytes en condition d'hypoglycémie ce qui augmente l'efficacité de transport de glucose dans la cellule (Kumar et al., 2004).

Enfin, le fait que GLAST soit rapidement recruté en réponse à l'augmentation du taux extracellulaire de glutamate représente un mécanisme performant pour promouvoir l'homéostasie glutamatergique. Trois articles ont rapporté une augmentation de la capacité de transport *in vitro* induite par le glutamate indépendamment des récepteurs au glutamate. Duan *et al.* ont mis en évidence un recrutement accru de GLAST à la membrane par



mécanisme dépendant du cytosquelette (Duan *et al.*, 1999). Les équipes de Rauen et de Robinson ont aussi observé cette augmentation du transport induite par le glutamate lui-même, indépendamment des récepteurs mais sans établir réellement les mécanismes sous-jacents. L'équipe de Rauen a rapporté la formation d'amas de transporteurs en réponse au glutamate mais n'a pas mesuré leur recrutement à la membrane (Poitry-Yamate *et al.*, 2002). L'équipe de Robinson a montré qu'aucun des mécanismes classiques de régulation des transporteurs (phosphorylation, recrutement à la membrane, voir § II-E-2-e) n'était impliqué (Munir *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent qu'il existe des mécanismes alternatifs de régulation de l'activité des transporteurs, avec des relocalisations potentielles au sein de la membrane. Le recrutement de GLAST dans les rafts en réponse au glutamate constitue un mécanisme unique de régulation du transport, que l'on met en évidence pour la première fois *in vivo*.

*- et si les rafts n'existaient pas ?*

Il est tout de même important de signaler que les rafts constituent un sujet de controverse. Cela est principalement lié au fait que les rafts sont de trop petite taille pour être observés par des techniques de microscopie optique classique et sont purifiés par des méthodes biochimiques (extraction différentielle par des détergents) qui peuvent produire des artefacts. De plus, des études sur des membranes artificielles qui reproduisent la composition de la membrane plasmique remettent en question l'idée que des domaines différenciés de composition spécifique puissent se former (pour une revue du sujet, voir Munro, 2003). Des techniques innovantes de microscopie et d'imagerie ont quand même permis de mettre en évidence une ségrégation des protéines à la membrane de différents types cellulaires, dans des domaines de taille variable (40 à 500 nm, Lucero et Robbins, 2004). Récemment, il a été proposé que des interactions protéine-protéine (et non lipide-lipide ou lipide-protéine) étaient à l'origine de la formation de sous-domaines membranaires (Douglass et Vale, 2005).

Ainsi, il est très probable que les rafts soit fort différents de ce que l'on imagine avec les modèles actuels. Cependant, le fait que les rafts soient isolables par différentes techniques -même imparfaites- reflète une organisation particulière de la membrane avec des domaines spécifiques et qui a des répercussions fonctionnelles observables.

## **2. L'activation des astrocytes est associée à une meilleure gestion du glutamate extracellulaire lors d'un stress excitotoxique *in vivo***

La technique de microdialyse nous a permis de mettre en évidence une amélioration très nette de la gestion du glutamate extracellulaire dans le groupe lenti-CNTF. Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la réduction du taux extracellulaire de glutamate en conditions excitotoxiques dans le groupe lenti-CNTF : (1) le CNTF agit directement sur les neurones qui deviennent moins sensibles à la stimulation 'primaire' par le QA, (2) le CNTF réduit la libération de glutamate induite par le QA (par les neurones et/ou les astrocytes) (3) la recapture de glutamate par les astrocytes activés par le CNTF est plus efficace.

### *a. Les effets primaires du QA sur les neurones sont-ils modifiés en présence de CNTF ?*

Le niveau d'expression des sous-unités des récepteurs NMDA (NR<sub>2A</sub> et NR<sub>2B</sub>), n'est pas modifié par le CNTF, ce qui suggère que les neurones conservent leur capacité de réponse au QA. On observe une augmentation importante d'utilisation de FDG induite par le QA dans tous les groupes expérimentaux (§ IV-C-5). Or la consommation de glucose est dépendante de l'activité électrique des neurones et correspond pour un tiers à l'énergie nécessaire à la restauration des gradients post-synaptiques (Attwell et Iadecola, 2002, voir § II-D-3) et reflète donc la stimulation du QA (et/ou du glutamate libéré) sur les neurones. Ce résultat montre donc que les effets primaires du QA ont eu lieu dans tous les groupes et qu'ils ne sont pas moins importants dans le groupe lenti-CNTF.

### *b. La libération de glutamate induite par le QA est-elle moins importante en présence de CNTF ?*

L'un des effets majeurs du QA est d'induire une libération massive de glutamate endogène. Même si la libération primaire de glutamate induit par le QA est d'origine neuronale, l'implication des astrocytes dans cet afflux de glutamate n'a jamais été évaluée directement. Les astrocytes peuvent libérer du glutamate par les récepteurs P<sub>2</sub>X, par des hémicanaux formés de connexines, par les transporteurs au glutamate fonctionnant en mode reverse, par des canaux VRAC, et par exocytose dépendante du calcium (voir § II-A-3-b). Les deux premiers mécanismes paraissent improbables car ils requièrent des conditions ioniques très particulières (faible concentration extracellulaire de calcium et de magnésium, Evanko et al., 2004) qui sont peu susceptibles de se produire avec le QA. L'inversion des transporteurs est également assez peu probable car elle se produit en conditions de déplétion énergétique profonde (i.e. ischémie, Seki et al., 1999), ce qui n'est pas le cas dans les étapes précoces de l'injection de QA. Les deux derniers mécanismes (libération par

exocytose  $\text{Ca}^{2+}$ -dépendante ou des canaux sensibles au volume cellulaire) doivent être considérés avec plus d'attention. Qu'est-ce qui pourrait provoquer une augmentation de calcium intracellulaire dans les astrocytes ? Bien que les astrocytes expriment certains composants du récepteur NMDA, la fonctionnalité de ces récepteurs astrocytaires n'a jamais été mise en évidence *in vivo* (voir, Nedergaard et al., 2002), le QA n'agit donc probablement pas directement sur les astrocytes en induisant un influx calcique. Les astrocytes expriment aussi certains récepteurs métabotropiques dont mGluR5 qui provoquent une augmentation intracellulaire de calcium (Porter et McCarthy, 1997; Gallo et Ghiani, 2000). Ainsi, les astrocytes pourraient être activés secondairement par le glutamate extracellulaire d'origine neuronale et libérer eux-mêmes du glutamate par exocytose. Alternativement, le QA produit des dérégulations ioniques qui pourraient provoquer un gonflement des cellules et favoriser l'ouverture des canaux VRAC. Dans les deux cas, la libération astrocytaire de glutamate agirait comme une amplification d'un évènement d'origine neuronale. La participation relative des mécanismes de libération astrocytaire de glutamate est difficile à évaluer car les outils pharmacologiques restent trop peu spécifiques (Evanko et al., 2004). Ainsi, il est probable que les astrocytes participent à l'afflux de glutamate, mais dans une moindre mesure que les neurones qui possèdent un stock plus conséquent de glutamate rapidement libérable (voir § II-E-1-b).

Quelle que soit l'origine du glutamate libéré, nos résultats montrent qu'il existe une recapture accrue plutôt qu'une plus faible libération de glutamate. En effet, nous observons une augmentation significative de l'utilisation de FDG induite par le QA dans le groupe lenti-CNTF. Or, en conditions d'activation, la recapture de glutamate astrocytaire est couplée à l'entrée de glucose (Pellerin et Magistretti, 1994), selon une stoechiométrie proche de 1:1 (Sibson et al., 1998, voir § II-D-3-a). L'utilisation de FDG représente donc un index de la recapture de glutamate et nos résultats suggèrent qu'il existe un transport accru de glutamate après l'injection de QA. Pour établir plus directement le rôle des transporteurs dans la réduction du taux extracellulaire de glutamate avec le QA dans le groupe lenti-CNTF, il serait intéressant de les bloquer spécifiquement avec des inhibiteurs pharmacologiques ou de reproduire ces expériences dans des animaux invalidés pour les transporteurs, mais la réponse au QA risque d'être fortement perturbée. Une autre approche, plus indirecte, que nous sommes en train de mettre en place, consiste à mesurer par HPLC le taux extracellulaire d'autres acides aminés non transportables. Si leur concentration augmente autant en présence de QA dans les deux groupes expérimentaux, cela suggère que la réduction du taux extracellulaire de glutamate dans le groupe lenti-CNTF est bien due à l'amélioration de la recapture. Enfin, les techniques d'électrophysiologie offrent la possibilité d'évaluer *in situ* le fonctionnement des transporteurs par le biais des courants induits par la

recapture de glutamate. Cette étude qui est l'objet d'une collaboration avec L. Kerkérian Le Goff et P. Gubellini, est en cours.

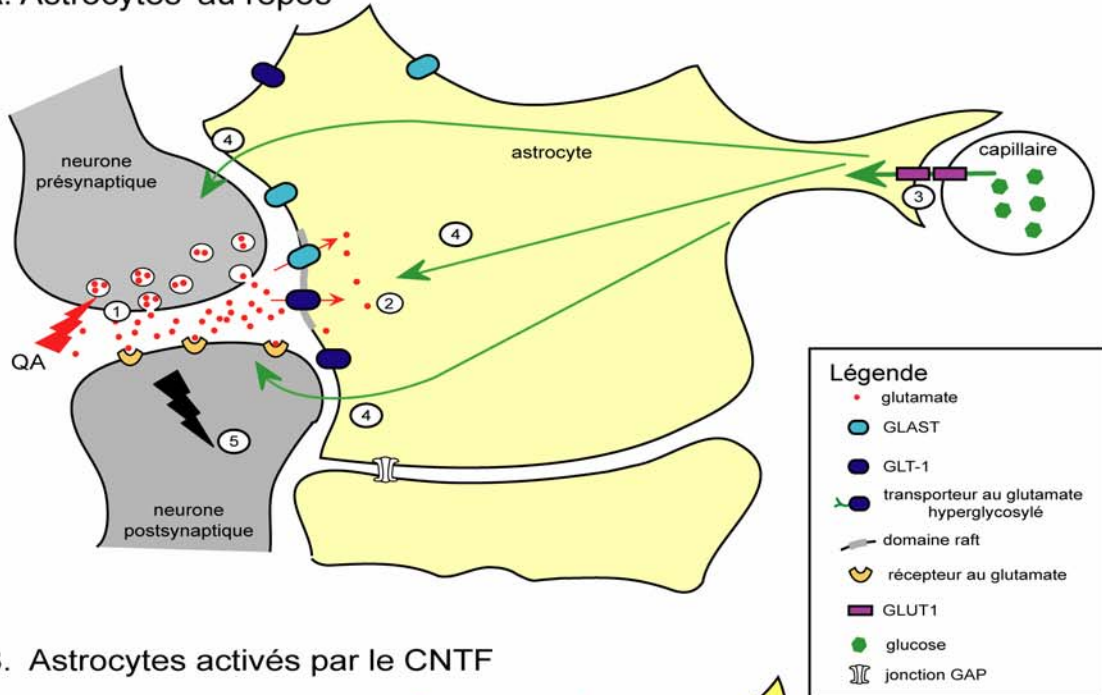
Au final, avec les données d'utilisation de FDG, l'explication la plus probable pour la baisse de glutamate extracellulaire après injection de QA observée dans le groupe lenti-CNTF est donc une recapture plus efficace.

### *c. Mécanismes impliqués dans l'amélioration de la recapture du glutamate*

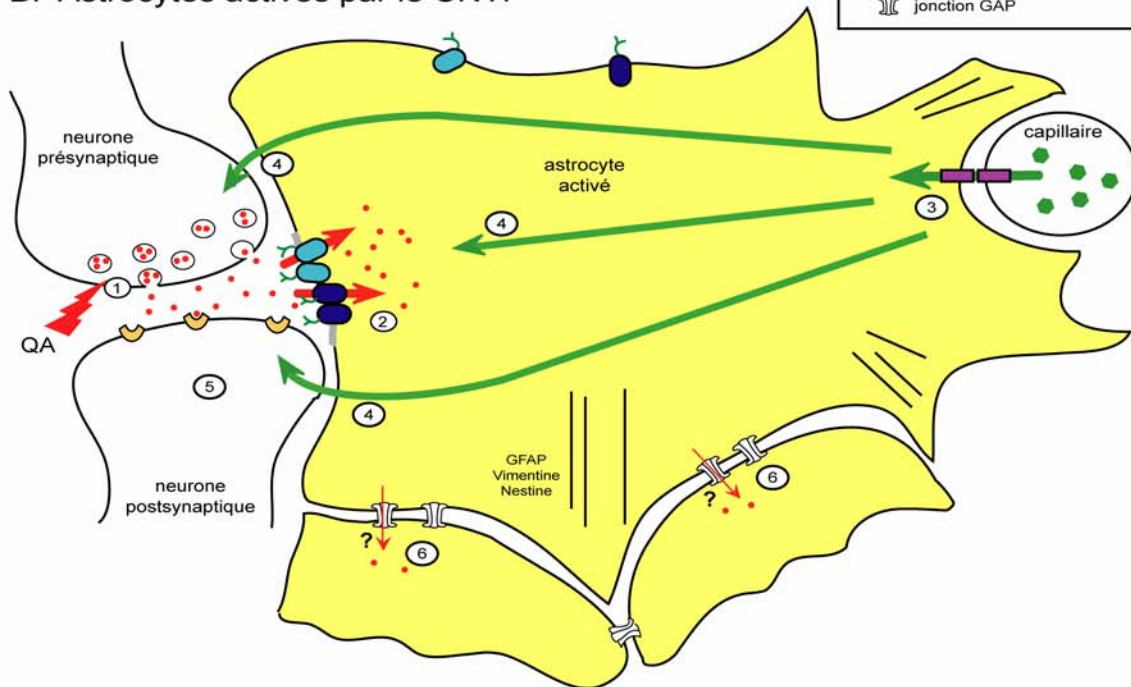
Cette meilleure recapture du glutamate pourrait s'expliquer par la localisation préférentielle des transporteurs astrocytaires dans les rafts (voir § C-b). De plus, comme GLAST est rapidement recruté dans les rafts en présence de QA, l'efficacité de recapture pourrait être rapidement augmentée. Il est aussi possible que l'augmentation d'expression des connexines induisent une plus forte connectivité des astrocytes et permettent une redistribution du glutamate en excès dans le réseau (Giaume et McCarthy, 1996; Theis et al., 2005). Cette redistribution (ou 'buffering spatial') optimise le fonctionnement des transporteurs en évitant une inhibition de la recapture du glutamate ou une saturation de la glutamine synthase (Ozog et al., 2002).

Ainsi, même si nous ne faisons pas la démonstration directe que ce sont les transporteurs astrocytaires qui fonctionnent plus efficacement, nous avons de nombreux arguments en ce sens. Une réduction par un facteur trois du taux extracellulaire de glutamate en conditions excitotoxiques doit être hautement favorable à la survie des neurones qui sont vulnérables à ce type d'atteinte. C'est ce que nous observons avec une réduction de 75% du volume de lésion dans le groupe lenti-CNTF. Au final, l'ensemble des modifications de la machinerie de recapture du glutamate dans les astrocytes activés par le CNTF (voir **Fig. 5**), a des effets bénéfiques pour les neurones, ce qui souligne l'intérêt de l'activation des astrocytes pour la survie neuronale.

### A. Astrocytes 'au repos'



### B. Astrocytes activés par le CNTF



**Figure 5. Bilan des changements de régulation de l'homéostasie glutamatergique dans les astrocytes activés**

(A) L'injection de QA induit une libération massive de glutamate endogène (1). Les transporteurs astrocytaires recapturent le glutamate (2), ce qui augmente l'entrée de glucose dans le parenchyme cérébral (3), selon le mécanisme de couplage décrit en figure 8 de l'introduction. Le glucose fournit de l'énergie nécessaire pour la recapture du glutamate et pour les besoins importants des neurones qui doivent activer de nombreux mécanismes de défense (4). Cependant, ces mécanismes sont insuffisants et les neurones dégénèrent dans ces conditions excitotoxiques (éclair, 5). (B) Dans les astrocytes activés du groupe lenti-CNTF, les transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1 sont hyperglycosylés et sont préférentiellement localisés dans les rafts. Quand les astrocytes sont activés, (2) les transporteurs recapturent plus efficacement le glutamate, ce qui évite son accumulation dans le milieu extracellulaire. L'entrée de glucose est plus importante (3) et permet d'alimenter les neurones et les astrocytes (4). Ces deux phénomènes favorisent la survie des neurones (5). Il est possible que la recapture du glutamate soit facilitée par la redistribution du glutamate dans le réseau astrocytaire, à travers les jonctions GAP (6). NB. Les neurones sont aussi capables de récupérer du glucose directement depuis la circulation sanguine (voir § II-D-3-a), mais cela n'a pas été représenté par souci de clarté.

## **D. L'activation astrocytaire : une réponse adaptée pour protéger les neurones ?**

### **1. La controverse autour des astrocytes réactifs**

Notre étude montre que le métabolisme énergétique et l'homéostasie glutamatergique, deux fonctions cérébrales primordiales sont modifiées quand les astrocytes sont activés par le CNTF. L'activation des astrocytes est associée à la mise en place d'une voie alternative de production d'énergie et à des modifications de la machinerie de recapture du glutamate. En conditions d'excitotoxicité induite par le QA, on observe une optimisation très nette de l'apport énergétique et de la gestion du glutamate extracellulaire. Ces changements sont associés à la meilleure survie des neurones dans notre modèle pathologique (exposition au QA), ce qui confirme les études antérieures où le CNTF était injecté sous forme recombinante dans le striatum (Anderson et al., 1996), produit par des cellules encapsulées (Emerich et al., 1997a) ou exprimé localement par des cellules infectées par différents virus (de Almeida et al., 2001; Régulier et al., 2002). Plus généralement, comme les atteintes énergétiques et les dérégulations glutamatergiques sont impliquées dans des pathologies cérébrales variées (voir § II-D-4 et II-E-3), de telles modifications ont un potentiel neuroprotecteur très important. En effet, par des mécanismes d'excitotoxicité indirecte, les déficits métaboliques aggravent les effets du glutamate (voir § II-E-3-a, Beal, 1992; Greene et Greenamyre, 1996). A l'inverse, le glutamate constitue un signal métabolique qui est impliqué dans les phénomènes de couplage neurométabolique et neurovasculaire, (voir § II-D-3, Bonvento et al., 2002). En conséquence, des anomalies du système glutamatergique peuvent entraîner des perturbations de l'apport énergétique aux neurones.

Comme une astrogliose est visible dans la quasi-totalité des situations pathologiques et que le degré d'activation astrocytaire reflète l'intensité de la souffrance neuronale, les astrocytes activés sont les suspects idéaux pour la dégénérescence neuronale observée. Certains auteurs rapportent le rôle délétère de l'activation des astrocytes sur la survie des neurones dans la SLA (Barbeito et al., 2004), la sclérose en plaque (De Keyser et al., 2003), la MA et la démence associée à l'infection par le VIH (Minagar et al., 2002) par des mécanismes pro-inflammatoires, excitotoxiques et une libération de molécules neurotoxiques. Nos résultats soulignent au contraire le potentiel neuroprotecteur des astrocytes activés dans les processus pathologiques. Ainsi, au cœur du débat sur les

conséquences de l'astroglie (voir § II-B-3), nos résultats donnent des arguments forts en faveur d'un rôle bénéfique des astrocytes lorsqu'ils sont activés par le CNTF.

## **2. Les astrocytes réactifs et le CNTF**

### *a. Les astrocytes activés sont-ils les seuls médiateurs des effets neuroprotecteurs du CNTF ?*

Est-il possible que les effets neuroprotecteurs observés soient également dus à un effet direct du CNTF sur les neurones ? En effet, le CNTF a d'abord été mis en évidence pour son potentiel neuroprotecteur à large spectre (voir § II-C-3). Sur des cultures primaires de neurones hippocampiques dites 'pures', le CNTF, contrairement au BDNF ou au NGF, n'a pas d'effet neuroprotecteur vis à vis du glutamate (Mattson et al., 1995) mais des résultats contradictoires ont été rapportés (Skaper et al., 1992; Sun et al., 2002). Enfin, le CNTF a des effets protecteurs vis-à-vis de la toxicité du NMDA sur des neurones striataux (Petersen et Brundin, 1999). Dans ces expériences, le CNTF exerce ses effets s'il est appliqué rapidement après la mise en culture (entre 1 et 2 jours) mais perd 50% de son efficacité si le traitement a lieu après 5 jours (Skaper et al., 1992) ou juste avant l'exposition à la toxine (Petersen et Brundin, 1999). Le pourcentage de cellules GFAP positives augmente avec le CNTF (Petersen et Brundin, 1999), ce qui suggère que le CNTF pourrait avoir un effet de différenciation des précurseurs selon le lignage astrocytaire (Bonni et al., 1997). Dans ces cultures, les astrocytes représentent de 1 à 10% des cellules, et il n'est pas possible de réellement considérer ces cultures comme purement neuronale et d'exclure un effet neuroprotecteur du CNTF *via* les astrocytes.

Ainsi, même en culture il est difficile de dissocier les effets directs du CNTF sur les neurones et des effets indirects qui passent par un changement du phénotype des astrocytes. Dans nos conditions, il n'est pas non plus possible d'exclure un effet trophique direct du CNTF sur les neurones, même si nous n'avons pas mis en évidence de changement du phénotype neuronal contrairement à de très nombreuses caractéristiques astrocytaires. De plus, l'activation de la voie JAK-STAT par le CNTF est détectée dans les astrocytes mais pas les neurones, ce qui suggère que le CNTF agit principalement sur les astrocytes. Cela dit, même si le CNTF a un effet neuroprotecteur direct sur les neurones (par l'activation de voie anti-apoptotique ou pro-survie par exemple), les modifications mises en évidence dans les astrocytes activés participent forcément à la meilleure survie des neurones. La question est de savoir en quelle mesure l'activation des astrocytes participe à la survie des neurones. Pour cela, il faudrait inhiber spécifiquement certaines fonctions



astrocytaires potentiellement neuroprotectrices. Il s'agirait par exemple, d'inhiber la cétolyse ou d'interférer avec les transporteurs au glutamate par des techniques d'invalidation ou d'interférence ARN, et de voir si le CNTF conserve ses effets neuroprotecteurs. Ces approches ne sont pas toutes faciles à réaliser, cependant nous évaluons actuellement le rôle du transporteur GLAST dans les effets neuroprotecteurs du CNTF vis-à-vis du QA en utilisant des souris invalidées pour ce transporteur.

### *b. Le CNTF : un facteur neurotrophique ou gliotrophique ?*

Notre étude souligne pour la première fois l'importance et l'étendue des effets fonctionnels du CNTF sur les astrocytes. En effet, si l'activation des astrocytes par le CNTF était connue (voir § II-C-2), les conséquences fonctionnelles n'ont jamais été évaluées. Ainsi, il n'a été suggéré que très récemment que les astrocytes pouvaient intervenir dans les effets protecteurs du CNTF vis-à-vis de l'axotomie (van Adel et al., 2005). Il est aussi possible que les astrocytes activés participent à la neuroprotection offerte par le CNTF dans des situations d'ischémie (Wen et al., 1995) ou d'atteinte métabolique (Mittoux et al., 2002). L'étude approfondie des modifications d'autres paramètres importants pour la survie neuronale (gestion du stress oxydatif, régulation ionique...) devrait permettre d'avoir un tableau plus complet (et complexe) des conséquences de l'activation astrocytaire par le CNTF.

Finalement le CNTF ne serait-il pas un facteur gliotrophique plutôt qu'un facteur neurotrophique ? Cette idée n'est pas si révolutionnaire, car le CNTF n'est de toute façon pas un facteur neurotrophique au sens 'classique' comme le NGF (expression par la structure cible et libération dans le milieu extracellulaire en quantité limitante pour sélectionner les neurones et les synapses efficaces, expression au cours du développement embryonnaire ..., voir § II-C-1-d). CNTF apparaît plutôt comme un facteur de lésion et il est directement associé aux situations pathologiques qui activent les astrocytes (voir § II-C-2).

La bonne connaissance des effets et des cibles du CNTF est primordiale car le CNTF (ou son dérivé l'axokine) est/a été l'objet d'essais cliniques pour la SLA, la MH et l'obésité (voir § II-C-3 et 4).

### *c. Comprendre les effets du CNTF pour optimiser son utilisation clinique*

La première utilisation clinique du CNTF concernait une cinquantaine de malades de la SLA, qui ont reçu des injections sous-cutanées de CNTF recombinant. Les effets secondaires ont été assez graves pour les plus fortes doses (voir § II-C-4-d) et les injections ont été interrompues au bout de 2 semaines (Cedarbaum et al., 1995a). Les essais cliniques entrepris ensuite dans la SLA (Aebischer et al., 1996) et la MH (Bachoud-Levi et al., 2000) se sont appuyés sur la technologie innovante des cellules génétiquement modifiées

encapsulées dans des polymères biocompatibles. Les résultats ont été assez décevants (Bloch et al., 2004), mais la production de CNTF par les cellules encapsulées et la quantité de CNTF qui parvenait aux cellules vulnérables étaient très certainement insuffisantes (Escartin et al., sous presse).

En effet, dans le cadre des essais cliniques pour des pathologies du SNC, il s'agit de trouver un mode d'apport des molécules thérapeutiques qui permette de toucher un grand nombre de cellules, à l'échelle du cerveau humain. Dans ce contexte, les vecteurs viraux apparaissent comme des agents performants pour diffuser dans le parenchyme et induire une surexpression dans une partie importante de la structure ciblée (Déglon et Hantraye, 2005). L'utilisation de virus (en particulier de lentivirus) pour des pathologies cérébrales n'en est qu'à ses débuts et de nombreuses validations sont encore à faire. Il ne faudrait pas, par exemple, que les vecteurs viraux induisent une trop forte production du transgène qui compromette les effets thérapeutiques attendus. Notre étude met en évidence des phénomènes relativement bien connus de 'down-régulation' des effets du CNTF, lorsqu'il est présent en quantité trop importante et/ou pendant trop longtemps (voir § IV-A-1 et Krebs et Hilton, 2000). C'est donc un véritable défi que de trouver les conditions optimales pour alimenter les cellules avec la bonne concentration de CNTF. Nos résultats apportent de nouveaux arguments en faveur de l'utilisation du CNTF comme agent thérapeutique pour ces maladies qui ont chacune une forte composante énergétique et excitotoxique (voir § II-E-3 et II-D-4) et devraient encourager ces mises au point difficiles. Enfin, il faut noter que dans notre étude comme dans la majorité des cas, le CNTF est administré avant l'apparition des processus pathologiques, ce qui fait une différence de taille par rapport à la situation clinique. Cependant, le CNTF a démontré des effets 'restaurateurs' dans un modèle primate de la MH. Ainsi, le CNTF a significativement réduit les symptômes moteurs et cognitifs présents et a protégé les neurones striataux de la dégénérescence en cours, ce qui est très encourageant pour l'utilisation clinique de CNTF (Mittoux et al., 2000).

Notre caractérisation des effets du CNTF souligne aussi certaines difficultés liées à son utilisation en clinique. Dans les essais cliniques pour la MH, la consommation striatale de glucose est l'un des index de l'efficacité du traitement, en tant que reflet de l'activité et de l'intégrité neuronale (Gaura et al., 2004). Or l'interprétation risque d'être biaisée si le CNTF diminue cette consommation en modifiant le métabolisme cérébral. De plus, l'astrogliose reste considérée comme un témoin de souffrance neuronale et un index du degré de dégénérescence neuronale. Il est important pour les études post-mortem de garder en tête que l'agent thérapeutique lui-même induit une activation astrocytaire.

En effet, promouvoir l'activation des astrocytes pour protéger les neurones peut apparaître comme une stratégie thérapeutique assez peu 'orthodoxe'. Pourtant, les

astrocytes qui contrôlent un si grand nombre de fonctions cérébrales ne sont-ils pas les mieux placés pour favoriser la survie neuronale?

### **3. L'activation astrocytaire comme stratégie thérapeutique ?**

Etant donné que nos résultats illustrent la capacité des astrocytes activés à faire face à une atteinte excitotoxique, faut-il considérer que l'astrogliose est, par définition, bénéfique ?

Même si l'activation astrocytaire est stéréotypique (voir § II-B-1), il existe probablement plusieurs types d'astrocytes activés (comme il existe déjà plusieurs classes d'astrocytes, voir § II-A-3-b). Il sera d'abord important d'étudier d'autres modèles d'activation astrocytaire, par transfert lentiviral du gène de l'IL-1, de l'IL-6 ou du TNF- $\alpha$  par exemple pour voir si les changements fonctionnels observés avec le CNTF représentent des traits caractéristiques de l'astrogliose. Même si les effets observés ne sont pas complètement universels et caractéristiques de toutes les situations d'astrogliose, ils posent tout de même la question de l'intérêt de ces cellules comme agents thérapeutiques.

La question est d'autant plus pertinente que des traitements anti-inflammatoires sont donnés dans de nombreuses conditions pathologiques cérébrales dans le but de diminuer la réponse gliale (Marchetti et Abbracchio, 2005). Pourtant, quand on s'oppose à l'activation astrocytaire par l'ablation des astrocytes réactifs, les conséquences d'une lésion mécanique sont beaucoup plus sévères (Bush et al., 1999 et voir § II-B-3-a). Ceci suggère que la réponse astrocytaire a un effet bénéfique mais qui est partiel. En effet, la réponse astrocytaire endogène accompagne les processus dégénératifs mais ne semble pas assez efficace pour complètement protéger les neurones. Ainsi, dans nos conditions, nous observons une activation astrocytaire en réponse au QA (§ IV-D) qui n'empêche pas l'installation de processus délétères qui mènent à la mort du tiers des neurones striataux. Il s'agit donc de déterminer les conditions d'activation optimale des astrocytes sans déclencher un recrutement des cellules microgliales et immunitaires.

Le fort potentiel neuroprotecteur des astrocytes réside dans leur capacité à gérer de nombreuses fonctions d'importance pour les neurones. Ainsi, faire intervenir des cellules pléiotropes comme les astrocytes pourrait s'avérer plus efficace que le ciblage spécifique d'une cascade délétère ou d'un récepteur neuronal particulier, comme cela a été le cas dans de nombreux essais cliniques récents pour l'AVC (Lo et al., 2003), la MH (Beal et Ferrante, 2004) et la SLA (Hurko et Walsh, 2000). Ainsi, plutôt que d'inhiber 'artificiellement' les processus délétères, ne faut-il pas mieux essayer d'améliorer les mécanismes de défense endogènes en activant les astrocytes ?

## VI. Conclusion générale

L'ensemble de cette étude menée sur un modèle *in vivo* d'activation astrocytaire original et pertinent permet de mettre en évidence le fonctionnement très particulier des astrocytes activés par le CNTF. Pour la première fois, nos résultats montrent que l'activation astrocytaire est associée à des changements profonds et stables du métabolisme énergétique cérébral et des transporteurs au glutamate, éléments clés de promotion de l'homéostasie glutamatergique. Nous mettons ainsi en évidence deux nouveaux types de régulation post-traductionnelles des transporteurs par le biais du profil de glycosylation et de la localisation préférentielle dans les domaines membranaires rafts. A ces modifications observées en conditions 'basales', s'ajoutent une optimisation significative de la gestion du glutamate extracellulaire, de l'apport énergétique et de la survie neuronale en conditions excitotoxiques.

Le rôle des glycosylations des transporteurs au glutamate et de leur localisation dans les rafts mérite d'être étudié plus en détail. La mise au point d'un modèle d'activation astrocytaire *in vitro*, le plus proche possible de notre modèle *in vivo*, représente assurément une étape importante dans ce but. Ce modèle constituera un outil très utile pour avoir une meilleure compréhension de la régulation des transporteurs au glutamate et du métabolisme énergétique en conditions d'activation astrocytaire.

Nos résultats apportent une caractérisation plus précise du fonctionnement des astrocytes activés, qui est en faveur d'un rôle bénéfique de ces cellules pour les neurones. Nos résultats permettent aussi de mieux comprendre les effets et le potentiel neuroprotecteur à large spectre du CNTF, qui finalement apparaît plus comme un agent gliotrophique qu'un agent neurotrophique direct.

# REFERENCES

## VII. Références

- Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions et blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200:629-638.
- Abraham CR (2001) Reactive astrocytes and alpha1-antichymotrypsin in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 22:931-936.
- Acarin L, Gonzalez B, Castellano B (2000) STAT3 and NFkappaB activation precedes glial reactivity in the excitotoxically injured young cortex but not in the corresponding distal thalamic nuclei. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:151-163.
- Adler R (1993) Ciliary neurotrophic factor as an injury factor. *Curr Opin Neurobiol* 3:785-789.
- Adler R, Landa KB, Manthorpe M, Varon S (1979) Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 204:1434-1436.
- Aebischer P, Schluep M, Deglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, Goddard M, Hammang JP, Zurn AD, Kato AC, Regli F, Baetge EE (1996) Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2:696-699.
- Al-Ali SY, Robinson N (1982) Ultrastructural study of enzymes in reactive astrocytes: clarification of astrocytic activity. *Histochem J* 14:311-321.
- Albrecht PJ, Dahl JP, Stoltzfus OK, Levenson R, Levison SW (2002) Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Exp Neurol* 173:46-62.
- Alderson RF, Pearsall D, Lindsay RM, Wong V (1999) Characterization of receptors for ciliary neurotrophic factor on rat hippocampal astrocytes. *Brain Res* 818:236-251.
- Alexander GM, Deitch JS, Seeburger JL, Del Valle L, Heiman-Patterson TD (2000) Elevated cortical extracellular fluid glutamate in transgenic mice expressing human mutant (G93A) Cu/Zn superoxide dismutase. *J Neurochem* 74:1666-1673.
- Alonzi T, Middleton G, Wyatt S, Buchman V, Betz UA, Muller W, Musiani P, Poli V, Davies AM (2001) Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 18:270-282.
- Amara SG, Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313-318.
- Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E, Rosicarelli B, Serafini B, Lande R, Aloisi F, Coccia EM (2005) Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:706-715.
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14.
- Anderson KD, Panayotatos N, Corcoran TL, Lindsay RM, Wiegand SJ (1996) Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7346-7351.
- Anderson RG, Jacobson K (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296:1821-1825.
- Angulo MC, Kozlov AS, Charpak S, Audinat E (2004) Glutamate released from glial cells synchronizes neuronal activity in the hippocampus. *J Neurosci* 24:6920-6927.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Aronica E, Catania MV, Geurts J, Yankaya B, Troost D (2001) Immunohistochemical localization of group I and II metabotropic glutamate receptors in control and amyotrophic lateral sclerosis human spinal cord: upregulation in reactive astrocytes. *Neuroscience* 105:509-520.
- Aronica E, van Vliet EA, Mayboroda OA, Troost D, da Silva FH, Gorter JA (2000) Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 12:2333-2344.
- Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease--an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol* 56:440-454.
- Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1133-1145.
- Attwell D, Iadecola C (2002) The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci* 25:621-625.

- Aubert A, Costalat R, Magistretti PJ, Pellerin L (2005) Brain lactate kinetics: Modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16448-16453.
- Auestad N, Korsak RA, Morrow JW, Edmond J (1991) Fatty acid oxidation and ketogenesis by astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 56:1376-1386.
- Auld DS, Robitaille R (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron* 40:389-400.
- Bachoo RM, Kim RS, Ligon KL, Maher EA, Brennan C, Billings N, Chan S, Li C, Rowitch DH, Wong WH, DePinho RA (2004) Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8384-8389.
- Bachoud-Levi AC, Deglon N, Nguyen JP, Bloch J, Bourdet C, Winkel L, Remy P, Goddard M, Lefaucheur JP, Brugieres P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M, Aebischer P (2000) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* 11:1723-1729.
- Balasingam V, Yong VW (1996) Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci* 16:2945-2955.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P (2005) Cleavage of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120:275-285.
- Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 47:263-274.
- Barbin G, Manthorpe M, Varon S (1984) Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 43:1468-1478.
- Barres BA, Burne JF, Holtmann B, Thoenen H, Sendtner M, Raff MC (1996) Ciliary neurotrophic factor enhances the rate of oligodendrocyte generation. *Mol Cell Neurosci* 8:146-156.
- Barros LF, Porras OH, Bittner CX (2005) Why glucose transport in the brain matters for PET. *Trends Neurosci* 28:117-119.
- Bazan JF (1991) Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7:197-208.
- Beal MF (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 31:119-130.
- Beal MF (1998) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366:211-223.
- Beal MF (2000) Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 23:298-304.
- Beal MF, Ferrante RJ (2004) Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:373-384.
- Beal MF, Finn SF, Brouillet E (1993) Evidence for the involvement of metabotropic glutamate receptors in striatal excitotoxin lesions in vivo. *Neurodegeneration* 2:81-91.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Bechmann I, Nitsch R (1997) Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia* 20:145-154.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-1308.
- Bennett MV, Barrio LC, Bargiello TA, Spray DC, Hertzberg E, Saez JC (1991) Gap junctions: new tools, new answers, new questions. *Neuron* 6:305-320.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 330:585-591.
- Bijlmakers MJ, Marsh M (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol* 13:32-42.
- Bilger A, Nehlig A (1992) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. II. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and beta-hydroxybutyrate dehydrogenase. *Int J Dev Neurosci* 10:143-152.
- Bizat N, Hermel J, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E (2003) Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23:5020-5030.



- Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, Nguyen JP, Bourdet C, Gaura V, Remy P, Brugieres P, Boisse MF, Baudic S, Cesaro P, Hantraye P, Aebischer P, Peschanski M (2004) Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 15:968-975.
- Blomqvist G, Thorell JO, Ingvar M, Grill V, Widen L, Stone-Elander S (1995) Use of R-beta-[1-11C]hydroxybutyrate in PET studies of regional cerebral uptake of ketone bodies in humans. *Am J Physiol* 269:E948-959.
- Blomqvist G, Alvarsson M, Grill V, Von Heijne G, Ingvar M, Thorell JO, Stone-Elander S, Widen L, Ekberg K (2002) Effect of acute hyperketonemia on the cerebral uptake of ketone bodies in nondiabetic subjects and IDDM patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E20-28.
- Bonni A, Frank DA, Schindler C, Greenberg ME (1993) Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science* 262:1575-1579.
- Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science* 278:477-483.
- Bonvento G, Sibson N, Pellerin L (2002) Does glutamate image your thoughts? *Trends Neurosci* 25:359-364.
- Booth RF, Clark JB (1981) Energy metabolism in rat brain: inhibition of pyruvate decarboxylation by 3-hydroxybutyrate in neonatal mitochondria. *J Neurochem* 37:179-185.
- Brouillet E, Conde F, Beal MF, Hantraye P (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59:427-468.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D (2005) 3-nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* in press.
- Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A, Kowall NW, Beal MF (1995) Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7105-7109.
- Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Conde F, Palfi S, Hantraye P (1998) Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J Neurochem* 70:794-805.
- Brown AM (2004) Brain glycogen re-awakened. *J Neurochem* 89:537-552.
- Brown AM, Baltan Tekkok S, Ransom BR (2004) Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochem Int* 45:529-536.
- Brown DA, Rose JK (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68:533-544.
- Browne SE, Beal MF (2004) The energetics of Huntington's disease. *Neurochem Res* 29:531-546.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME (2001) Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin Neurobiol* 11:297-305.
- Buchsacher GL, Jr., Wong-Staal F (2000) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* 95:2499-2504.
- Burnashev N (1996) Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6:311-317.
- Burst J (1985) Stroke: Diagnostic, Anatomical and Physiological Considerations. In: *Principles of Neural Science*, 2nd Edition (Kandel E, Schwartz J, eds), pp 853-861. Amsterdam: Elsevier.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297-308.
- Bushong EA, Martone ME, Ellisman MH (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci* 22:73-86.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CL (2004) Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J Biol Chem* 279:34388-34396.
- Canolle B, Masméjean F, Melon C, Nieoullon A, Pisano P, Lortet S (2004) Glial soluble factors regulate the activity and expression of the neuronal glutamate transporter EAAC1: implication of cholesterol. *J Neurochem* 88:1521-1532.

- Carboni S, Melis F, Vaccari A, Rossetti ZL (1990) NMDA receptor activation mediates glutamate and aspartate release from rat striatum: prevention by MK-801. *Pharmacol Res* 22 Suppl 3:49.
- Cataldo AM, Broadwell RD (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. II. Choroid plexus and ependymal epithelia, endothelia and pericytes. *J Neurocytol* 15:511-524.
- Cedarbaum JM, Chapman C, Charatan M, Stambler N, Andrews L, Zhan C, Radka S, Morrissey D, Lakings D, Brooks BR, Sanjak M, Pestronk A, Florence J, Mitsumoto H, Szirony K, Bittle L, Neville H, Ringel S, Brinkmann J, Wittes J (1995a) A phase I study of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. *Clin Neuropharmacol* 18:515-532.
- Cedarbaum JM, Chapman C, Charatan M, Stambler N, Andrews L, Zhan C, Radka S, Morrissey D, Lakings D, Brooks BR, Sanjak M, Pestronk A, Florence J, Mitsumoto H, Szirony K, Bittle L, Neville H, Ringel S, Brinkmann J, Wittes J (1995b) The pharmacokinetics of subcutaneously administered recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to parameters of the acute-phase response. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. *Clin Neuropharmacol* 18:500-514.
- Chao CC, Hu S, Sheng WS, Bu D, Bukrinsky MI, Peterson PK (1996) Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia* 16:276-284.
- Chatton JY, Pellerin L, Magistretti PJ (2003) GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12456-12461.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15:711-720.
- Chaum E (2003) Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem* 88:57-75.
- Chechik T, Roeder L, Tildon J, Podulso S (1987) Ketone body enzyme activities in purified neurons astrocytes and oligodendroglia. *Neurochem Int* 10:95-99.
- Chen LW, Wei LC, Qiu Y, Liu HL, Rao ZR, Ju G, Chan YS (2002a) Significant up-regulation of nestin protein in the neostriatum of MPTP-treated mice. Are the striatal astrocytes regionally activated after systemic MPTP administration? *Brain Res* 925:9-17.
- Chen W, Aoki C, Mahadomrongkul V, Gruber CE, Wang GJ, Blitzblau R, Irwin N, Rosenberg PA (2002b) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci* 22:2142-2152.
- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger UV, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg PA (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:1136-1148.
- Chen Z, Gibson TB, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, Wright A, Vanderbilt C, Cobb MH (2001) MAP kinases. *Chem Rev* 101:2449-2476.
- Chesler M (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol Rev* 83:1183-1221.
- Chih CP, Lipton P, Roberts EL, Jr. (2001) Do active cerebral neurons really use lactate rather than glucose? *Trends Neurosci* 24:573-578.
- Choi DW (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634.
- Choi JS, Kim SY, Park HJ, Cha JH, Choi YS, Chung JW, Chun MH, Lee MY (2004) Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus in response to kainic acid-induced excitotoxicity. *Mol Cells* 17:292-296.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, Lawler J, Mosher DF, Bornstein P, Barres BA (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421-433.
- Clarke DD, Sokoloff L (1999) Circulation and energy metabolism of the brain. In: *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 6th Edition (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SKU, Uhler MD, eds), p 637-669. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE (1993) Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2222-2226.
- Coggeshall RE (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15:9-13.
- Connick JH, Stone TW (1988) Quinolinic acid effects on amino acid release from the rat cerebral cortex in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 93:868-876.

- Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ (1992) A histochemical study of iron, transferrin, and ferritin in Alzheimer's diseased brains. *J Neurosci Res* 31:75-83.
- Conradt M, Storck T, Stoffel W (1995) Localization of N-glycosylation sites and functional role of the carbohydrate units of GLAST-1, a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter. *Eur J Biochem* 229:682-687.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Cremer JE (1982) Substrate utilization and brain development. *J Cereb Blood Flow Metab* 2:394-407.
- Cross AJ, Slater P, Reynolds GP (1986) Reduced high-affinity glutamate uptake sites in the brains of patients with Huntington's disease. *Neurosci Lett* 67:198-202.
- Daikhin Y, Yudkoff M (1998) Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev Neurosci* 20:358-364.
- Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD (2002) CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 37:374-378.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD, Robinson MB (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18:2475-2485.
- Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59-63.
- Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, et al. (1993) Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259:1736-1739.
- de Almeida LP, Zala D, Aebischer P, Deglon N (2001) Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 8:433-446.
- De Keyser J, Zeinstra E, Frohman E (2003) Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch Neurol* 60:132-136.
- DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Yancopoulos GD (1995) Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83:313-322.
- Deglon N, Tseng JL, Bensadoun JC, Zurn AD, Arsenijevic Y, Pereira de Almeida L, Zufferey R, Trono D, Aebischer P (2000) Self-inactivating lentiviral vectors with enhanced transgene expression as potential gene transfer system in Parkinson's disease. *Hum Gene Ther* 11:179-190.
- Dégion N, Hantraye P (2005) Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *J Gene Med* 7:530-539.
- Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F, Perret D, Diveu C, Guillet C, Preisser L, Dumont A, Barbado M, Morel A, deLapeyriere O, Gascan H, Chevalier S (2004) Neuropeitin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4827-4832.
- Doetsch F (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci* 6:1127-1134.
- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703-716.
- Dolcet X, Soler RM, Gould TW, Egea J, Oppenheim RW, Comella JX (2001) Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Cell Neurosci* 18:619-631.
- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.
- Douglass AD, Vale RD (2005) Single-molecule microscopy reveals plasma membrane microdomains created by protein-protein networks that exclude or trap signaling molecules in T cells. *Cell* 121:937-950.
- Dragunow M, Hughes P (1993) Differential expression of immediate-early proteins in non-nerve cells after focal brain injury. *Int J Dev Neurosci* 11:249-255.
- Drickamer K, Taylor ME (1998) Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem Sci* 23:321-324.
- Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biol Chem* 384:505-516.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 267:4912-4916.

- Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 19:10193-10200.
- Duff E, Baile CA (2003) Ciliary neurotrophic factor: a role in obesity? *Nutr Rev* 61:423-426.
- Dufour F, Koning E, Nehlig A (2003) Basal levels of metabolic activity are elevated in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS): measurement of regional activity of cytochrome oxidase and lactate dehydrogenase by histochemistry. *Exp Neurol* 182:346-352.
- Dunlop J, Beal Mcllvain H, She Y, Howland DS (2003) Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23:1688-1696.
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M (1996) Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem J* 320 (Pt 2):345-357.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
- Elson GC, Lelievre E, Guillet C, Chevalier S, Plun-Favreau H, Froger J, Suard I, de Coignac AB, Delneste Y, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Gascan H (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3:867-872.
- Emerich DF, Cain CK, Greco C, Saydoff JA, Hu ZY, Liu H, Lindner MD (1997a) Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease. *Cell Transplant* 6:249-266.
- Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen EY, Chu Y, McDermott P, Baetge EE, Kordower JH (1997b) Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 386:395-399.
- Escartin C, Hantraye P, Déglon N (sous presse) Transplants of CNTF producing cells for Huntington's disease. In: *Cellular Transplantation: from Laboratory to Clinic* (Haleberstadt C, Emerich DF, eds). San-Diego: Elsevier.
- Evanko DS, Zhang Q, Zorec R, Haydon PG (2004) Defining pathways of loss and secretion of chemical messengers from astrocytes. *Glia* 47:233-240.
- Fagg GE, Foster AC (1983) Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system. *Neuroscience* 9:701-719.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci* 24:2143-2155.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF (1993) Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 119:46-71.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante KL, Jenkins BG, Hersch SM, Beal MF (2002) Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 22:1592-1599.
- Ferrante RJ, Andreassen OA, Jenkins BG, Dedeoglu A, Kuemmerle S, Kubilus JK, Kaddurah-Daouk R, Hersch SM, Beal MF (2000) Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 20:4389-4397.
- Figiel M, Engele J (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci* 20:3596-3605.
- Figiel M, Maucher T, Rozyczka J, Bayatti N, Engele J (2003) Regulation of glial glutamate transporter expression by growth factors. *Exp Neurol* 183:124-135.
- Fiskum G, Murphy AN, Beal MF (1999) Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:351-369.
- Foster LJ, De Hoog CL, Mann M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5813-5818.
- Fox PT, Raichle ME, Mintun MA, Dence C (1988) Nonoxidative glucose consumption during focal physiologic neural activity. *Science* 241:462-464.
- Fridovich I (1999) Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893:13-18.
- Fukao T, Lopaschuk GD, Mitchell GA (2004) Pathways and control of ketone body metabolism: on the fringe of lipid biochemistry. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:243-251.
- Fullekrug J, Simons K (2004) Lipid rafts and apical membrane traffic. *Ann N Y Acad Sci* 1014:164-169.
- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997a) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363-8375.

- Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD (1997b) Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* 81:1031-1042.
- Gallo V, Ghiani CA (2000) Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends Pharmacol Sci* 21:252-258.
- Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM (2005) Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Res Brain Res Rev* 48:273-286.
- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci* 7:1233-1241.
- Gaura V, Bachoud-Levi AC, Ribeiro MJ, Nguyen JP, Frouin V, Baudic S, Brugieres P, Mangin JF, Boisse MF, Palfi S, Cesaro P, Samson Y, Hantraye P, Peschanski M, Remy P (2004) Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain* 127:65-72.
- Gegelashvili G, Schousboe A (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15.
- Gegelashvili G, Danbolt NC, Schousboe A (1997) Neuronal soluble factors differentially regulate the expression of the GLT1 and GLAST glutamate transporters in cultured astroglia. *J Neurochem* 69:2612-2615.
- Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int* 37:163-170.
- Gegelashvili G, Robinson MB, Trotti D, Rauen T (2001) Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Prog Brain Res* 132:267-286.
- Gendreau S, Voswinkel S, Torres-Salazar D, Lang N, Heidtmann H, Detro-Dassen S, Schmalzing G, Hidalgo P, Fahlke C (2004) A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. *J Biol Chem* 279:39505-39512.
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319-325.
- Gibson CL, Coughlan TC, Murphy SP (2005) Glial nitric oxide and ischemia. *Glia* 50:417-426.
- Giffard RG, Swanson RA (2005) Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia* 50:299-306.
- Gladden LB (2001) Lactic acid: New roles in a new millennium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:395-397.
- Golub T, Wacha S, Caroni P (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14:542-550.
- Gonzalez MI, Robinson MB (2004a) Neurotransmitter transporters: why dance with so many partners? *Curr Opin Pharmacol* 4:30-35.
- Gonzalez MI, Robinson MB (2004b) Protein KINASE C-Dependent Remodeling of Glutamate Transporter Function. *Mol Interv* 4:48-58.
- Gonzalez MI, Kazanietz MG, Robinson MB (2002) Regulation of the neuronal glutamate transporter excitatory amino acid carrier-1 (EAAC1) by different protein kinase C subtypes. *Mol Pharmacol* 62:901-910.
- Gonzalez MI, Bannerman PG, Robinson MB (2003) Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase C $\alpha$  and the neuronal glutamate transporter EAAC1. *J Neurosci* 23:5589-5593.
- Gonzalez RG, Cheng LL, Westmoreland SV, Sakaie KE, Becerra LR, Lee PL, Masliah E, Lackner AA (2000) Early brain injury in the SIV-macaque model of AIDS. *Aids* 14:2841-2849.
- Goss JR, O'Malley ME, Zou L, Styren SD, Kochanek PM, DeKosky ST (1998) Astrocytes are the major source of nerve growth factor upregulation following traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol* 149:301-309.
- Gravel C, Gotz R, Lorrain A, Sendtner M (1997) Adenoviral gene transfer of ciliary neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor leads to long-term survival of axotomized motor neurons. *Nat Med* 3:765-770.
- Greene JG, Greenamyre JT (1995) Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 64:430-436.
- Greene JG, Greenamyre JT (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48:613-634.
- Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R (2004) Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 17:455-461.

- Guillet BA, Velly LJ, Canolle B, Masméjean FM, Nieoullon AL, Pisano P (2005) Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int* 46:337-346.
- Guzman M, Blazquez C (2001) Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol Metab* 12:169-173.
- Haas SJ, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J Anat* 204:271-281.
- Hagg T, Varon S (1993) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6315-6319.
- Hagg T, Varon S, Louis JC (1993) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) promotes low-affinity nerve growth factor receptor and CD4 expression by rat CNS microglia. *J Neuroimmunol* 48:177-187.
- Hagg T, Quon D, Higaki J, Varon S (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents neuronal degeneration and promotes low affinity NGF receptor expression in the adult rat CNS. *Neuron* 8:145-158.
- Halliwell B (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623.
- Harjes P, Wanker EE (2003) The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 28:425-433.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.
- Hawkins RA, Biebuyck JF (1979) Ketone bodies are selectively used by individual brain regions. *Science* 205:325-327.
- Hawkins RA, Williamson DH, Krebs HA (1971) Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem J* 122:13-18.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- Heath PR, Shaw PJ (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26:438-458.
- Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291:2364-2369.
- Helms JB, Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic* 5:247-254.
- Herard AS, Dubois A, Escartin C, Tanaka K, Delzescaux T, Hantraye P, Bonvento G (2005a) Decreased metabolic response to visual stimulation in the superior colliculus of mice lacking the glial glutamate transporter GLT-1. *Eur J Neurosci* 22:1807-1811.
- Herard AS, Besret L, Dubois A, Dauguet J, Delzescaux T, Hantraye P, Bonvento G, Moya K (2005b) siRNA targeted against amyloid precursor protein impairs synaptic activity in vivo. *Neurobiol Aging* in press.
- Hering H, Lin CC, Sheng M (2003) Lipid rafts in the maintenance of synapses, dendritic spines, and surface AMPA receptor stability. *J Neurosci* 23:3262-3271.
- Hermens WT, Verhaagen J (1998) Viral vectors, tools for gene transfer in the nervous system. *Prog Neurobiol* 55:399-432.
- Hertz L (2004) The astrocyte-neuron lactate shuttle: a challenge of a challenge. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1241-1248.
- Hertz L, Zielke HR (2004) Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci* 27:735-743.
- Hewett SJ, Csernansky CA, Choi DW (1994) Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS. *Neuron* 13:487-494.
- Hirrlinger J, Hulsmann S, Kirchhoff F (2004) Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur J Neurosci* 20:2235-2239.
- Holowka D, Sheets ED, Baird B (2000) Interactions between Fc(epsilon)RI and lipid raft components are regulated by the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 113 (Pt 6):1009-1019.
- Honig LS, Chambliss DD, Bigio EH, Carroll SL, Elliott JL (2000) Glutamate transporter EAAT2 splice variants occur not only in ALS, but also in AD and controls. *Neurology* 55:1082-1088.
- Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36:557-565.
- Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* 20:5587-5593.

- Hu Y, Wilson GS (1997) A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor. *J Neurochem* 69:1484-1490.
- Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
- Hughes EG, Maguire JL, McMinn MT, Scholz RE, Sutherland ML (2004) Loss of glial fibrillary acidic protein results in decreased glutamate transport and inhibition of PKA-induced EAAT2 cell surface trafficking. *Brain Res Mol Brain Res* 124:114-123.
- Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M (1988) Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335:70-73.
- Humbert S, Saudou F (2001) Neuronal death in Huntington's disease: multiple pathways for one issue? In: *Neuronal death by accident or by design* (Christen HGM, ed). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hurko O, Walsh FS (2000) Novel drug development for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 180:21-28.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.
- Ide T, Steinke J, Cahill GF, Jr. (1969) Metabolic interactions of glucose, lactate, and beta-hydroxybutyrate in rat brain slices. *Am J Physiol* 217:784-792.
- Ikonen E (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13:470-477.
- Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS (1993a) Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 5:25-33.
- Ip NY, McClain J, Barrezueta NX, Aldrich TH, Pan L, Li Y, Wiegand SJ, Friedman B, Davis S, Yancopoulos GD (1993b) The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* 10:89-102.
- Izumi Y, Ishii K, Katsuki H, Benz AM, Zorumski CF (1998) beta-Hydroxybutyrate fuels synaptic function during development. Histological and physiological evidence in rat hippocampal slices. *J Clin Invest* 101:1121-1132.
- Jabaudon D, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (2000) Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5610-5615.
- Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC, Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410:89-93.
- Jacquard C, Escartin C, Trioulier Y, Bizat N, Hantraye P, Bonvento G, Brouillet E (soumis) Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca<sup>2+</sup>] rise and neurodegeneration but not Ca<sup>2+</sup> entry during NMDA receptor activation.
- Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-257.
- Jenkins BG, Koroshetz WJ, Beal MF, Rosen BR (1993) Evidence for impairment of energy metabolism in vivo in Huntington's disease using localized 1H NMR spectroscopy. *Neurology* 43:2689-2695.
- John GR, Lee SC, Brosnan CF (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9:10-22.
- John GR, Lee SC, Song X, Riviello M, Brosnan CF (2005) IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49:161-176.
- John GR, Chen L, Riviello MA, Melendez-Vasquez CV, Hartley A, Brosnan CF (2004) Interleukin-1beta induces a reactive astroglial phenotype via deactivation of the Rho GTPase-Rock axis. *J Neurosci* 24:2837-2845.
- Justicia C, Gabriel C, Planas AM (2000) Activation of the JAK/STAT pathway following transient focal cerebral ischemia: signaling through Jak1 and Stat3 in astrocytes. *Glia* 30:253-270.
- Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23:1-10.
- Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, de Vellis J (1995) CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 685:55-67.
- Kahn MA, Huang CJ, Caruso A, Barresi V, Nazarian R, Condorelli DF, de Vellis J (1997) Ciliary neurotrophic factor activates JAK/Stat signal transduction cascade and induces transcriptional expression of glial fibrillary acidic protein in glial cells. *J Neurochem* 68:1413-1423.

- Kalandadze A, Wu Y, Robinson MB (2002) Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem* 277:45741-45750.
- Kalandadze A, Wu Y, Fournier K, Robinson MB (2004) Identification of motifs involved in endoplasmic reticulum retention-forward trafficking of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. *J Neurosci* 24:5183-5192.
- Kalman M (2004) Glial reaction and reactive glia. In: *Non neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction* (Hertz L, ed), pp 787-835. Amsterdam: Elsevier.
- Kalman M, Hajos F (1989) Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in the rat brain. I. Forebrain. *Exp Brain Res* 78:147-163.
- Kashiwaya Y, Takeshima T, Mori N, Nakashima K, Clarke K, Veech RL (2000) D-beta-hydroxybutyrate protects neurons in models of Alzheimer's and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5440-5444.
- Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305:99-103.
- Kehr J (1998) Determination of glutamate and aspartate in microdialysis samples by reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 708:27-38.
- Kelly JF, Elias CF, Lee CE, Ahima RS, Seeley RJ, Bjorbaek C, Oka T, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK (2004) Ciliary neurotrophic factor and leptin induce distinct patterns of immediate early gene expression in the brain. *Diabetes* 53:911-920.
- Kerkerian L, Dusticier N, Nieoullon A (1987) Modulatory effect of dopamine on high-affinity glutamate uptake in the rat striatum. *J Neurochem* 48:1301-1306.
- Kerner JA, Standaert DG, Penney JB, Jr., Young AB, Landwehrmeyer GB (1997) Expression of group one metabotropic glutamate receptor subunit mRNAs in neurochemically identified neurons in the rat neostriatum, neocortex, and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 48:259-269.
- Kielian T, Esen N (2004) Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective. *Neurochem Int* 45:429-436.
- Kimelberg HK (2004) The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int* 45:191-202.
- Kinoshita N, Kimura K, Matsumoto N, Watanabe M, Fukaya M, Ide C (2004) Mammalian septin Sept2 modulates the activity of GLAST, a glutamate transporter in astrocytes. *Genes Cells* 9:1-14.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Krebs DL, Hilton DJ (2000) SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci* 113 (Pt 16):2813-2819.
- Kruttgen A, Grotzinger J, Kurapkat G, Weis J, Simon R, Thier M, Schroder M, Heinrich P, Wollmer A, Comeau M, et al. (1995) Human ciliary neurotrophic factor: a structure-function analysis. *Biochem J* 309 (Pt 1):215-220.
- Kuhlow CJ, Krady JK, Basu A, Levison SW (2003) Astrocytic ceruloplasmin expression, which is induced by IL-1beta and by traumatic brain injury, increases in the absence of the IL-1 type 1 receptor. *Glia* 44:76-84.
- Kumar A, Xiao YP, Laipis PJ, Fletcher BS, Frost SC (2004) Glucose deprivation enhances targeting of GLUT1 to lipid rafts in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E568-576.
- Kuroda H, Sugimoto T, Horii Y, Sawada T (2001) Signaling pathway of ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cell lines. *Med Pediatr Oncol* 36:118-121.
- Kuwert T, Lange HW, Langen KJ, Herzog H, Aulich A, Feinendegen LE (1990) Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 113 (Pt 5):1405-1423.
- Laforet GA, Sapp E, Chase K, McIntyre C, Boyce FM, Campbell M, Cadigan BA, Warzecki L, Tagle DA, Reddy PH, Cepeda C, Calvert CR, Jokel ES, Klapstein GJ, Ariano MA, Levine MS, DiFiglia M, Aronin N (2001) Changes in cortical and striatal neurons predict behavioral and electrophysiological abnormalities in a transgenic murine model of Huntington's disease. *J Neurosci* 21:9112-9123.
- Lapin IP (1978) Stimulant and convulsive effects of kynurenines injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm* 42:37-43.
- LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11249-11253.
- Ledesma MD, Simons K, Dotti CG (1998) Neuronal polarity: essential role of protein-lipid complexes in axonal sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3966-3971.



- Lee AG (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim Biophys Acta* 1612:1-40.
- Lee MY, Deller T, Kirsch M, Frotscher M, Hofmann HD (1997) Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci* 17:1137-1146.
- Lee MY, Kim CJ, Shin SL, Moon SH, Chun MH (1998) Increased ciliary neurotrophic factor expression in reactive astrocytes following spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett* 255:79-82.
- Lee SC, Moore GR, Golenwsky G, Raine CS (1990) Multiple sclerosis: a role for astroglia in active demyelination suggested by class II MHC expression and ultrastructural study. *J Neuropathol Exp Neurol* 49:122-136.
- Lee SH, Magge S, Spencer DD, Sontheimer H, Cornell-Bell AH (1995) Human epileptic astrocytes exhibit increased gap junction coupling. *Glia* 15:195-202.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- Leino RL, Gerhart DZ, Drewes LR (1999) Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study. *Brain Res Dev Brain Res* 113:47-54.
- Leino RL, Gerhart DZ, Duelli R, Enerson BE, Drewes LR (2001) Diet-induced ketosis increases monocarboxylate transporter (MCT1) levels in rat brain. *Neurochem Int* 38:519-527.
- Levison SW, Hudgins SN, Crawford JL (1998) Ciliary neurotrophic factor stimulates nuclear hypertrophy and increases the GFAP content of cultured astrocytes. *Brain Res* 803:189-193.
- Levison SW, Ducceschi MH, Young GM, Wood TL (1996) Acute exposure to CNTF in vivo induces multiple components of reactive gliosis. *Exp Neurol* 141:256-268.
- Leybaert L (2005) Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab* 25:2-16.
- Li SH, Li XJ (2004) Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20:146-154.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-1100.
- Lievens JC, Salin P, Had-Aissouni L, Mahy N, Kerkerian-Le Goff L (2000a) Differential effects of corticostriatal and thalamostriatal deafferentation on expression of the glutamate transporter GLT1 in the rat striatum. *J Neurochem* 74:909-919.
- Lievens JC, Bernal F, Forni C, Mahy N, Kerkerian-Le Goff L (2000b) Characterization of striatal lesions produced by glutamate uptake alteration: cell death, reactive gliosis, and changes in GLT1 and GADD45 mRNA expression. *Glia* 29:222-232.
- Lievens JC, Woodman B, Mahal A, Spasic-Bosovic O, Samuel D, Kerkerian-Le Goff L, Bates GP (2001) Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 8:807-821.
- Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M, Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 410:84-88.
- Lin LF, Mismar D, Lile JD, Armes LG, Butler ET, 3rd, Vannice JL, Collins F (1989) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246:1023-1025.
- Lindenau J, Noack H, Asayama K, Wolf G (1998) Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia* 24:252-256.
- Linker RA, Maurer M, Gaupp S, Martini R, Holtmann B, Giess R, Rieckmann P, Lassmann H, Toyka KV, Sendtner M, Gold R (2002) CNTF is a major protective factor in demyelinating CNS disease: a neurotrophic cytokine as modulator in neuroinflammation. *Nat Med* 8:620-624.
- Lisovoski F, Akli S, Peltekian E, Vigne E, Haase G, Perricaudet M, Dreyfus PA, Kahn A, Peschanski M (1997) Phenotypic alteration of astrocytes induced by ciliary neurotrophic factor in the intact adult brain, As revealed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci* 17:7228-7236.
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003) Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399-415.
- Loaiza A, Porras OH, Barros LF (2003) Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. *J Neurosci* 23:7337-7342.
- Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH (1979) Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

- Lopes-Cardozo M, Klein W (1982) Ketone-body utilization by homogenates of adult rat brain. *Neurochem Res* 7:687-703.
- Louis JC, Magal E, Takayama S, Varon S (1993) CNTF protection of oligodendrocytes against natural and tumor necrosis factor-induced death. *Science* 259:689-692.
- Lucero HA, Robbins PW (2004) Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch Biochem Biophys* 426:208-224.
- Magistretti PJ (1988) Regulation of glycogenolysis by neurotransmitters in the central nervous system. *Diabete Metab* 14:237-246.
- Magistretti PJ (1999) Brain Energy Metabolism. In: *Fundamental Neuroscience* (Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR, eds), pp 389-413. San Diego: Academic Press.
- Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG (1999) Energy on demand. *Science* 283:496-497.
- Mangano RM, Schwarcz R (1983) Chronic infusion of endogenous excitatory amino acids into rat striatum and hippocampus. *Brain Res Bull* 10:47-51.
- Manthorpe M, Skaper S, Adler R, Landa K, Varon S (1980) Cholinergic neuronotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues. *J Neurochem* 34:69-75.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58:365-370.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis* 15:461-473.
- Marcaggi P, Attwell D (2004) Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. *Glia* 47:217-225.
- Marchetti B, Abbracchio MP (2005) To be or not to be (inflamed) - is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci*.
- Marie C, Bralet AM, Bralet J (1987) Protective action of 1,3-butanediol in cerebral ischemia. A neurologic, histologic, and metabolic study. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:794-800.
- Marie H, Billups D, Bedford FK, Dumoulin A, Goyal RK, Longmore GD, Moss SJ, Attwell D (2002) The amino terminus of the glial glutamate transporter GLT-1 interacts with the LIM protein Ajuba. *Mol Cell Neurosci* 19:152-164.
- Martens JR, O'Connell K, Tamkun M (2004) Targeting of ion channels to membrane microdomains: localization of KV channels to lipid rafts. *Trends Pharmacol Sci* 25:16-21.
- Martin A, Hofmann HD, Kirsch M (2003) Glial reactivity in ciliary neurotrophic factor-deficient mice after optic nerve lesion. *J Neurosci* 23:5416-5424.
- Martin TF (2000) Racing lipid rafts for synaptic-vesicle formation. *Nat Cell Biol* 2:E9-11.
- Masson J, Sagne C, Hamon M, El Mestikawy S (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 51:439-464.
- Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365:27-32.
- Masuda R, Monahan JW, Kashiwaya Y (2005) D-beta-hydroxybutyrate is neuroprotective against hypoxia in serum-free hippocampal primary cultures. *J Neurosci Res* 80:501-509.
- Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, Beal MF (1998) Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156-163.
- Mattson MP, Lovell MA, Furukawa K, Markesbery WR (1995) Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 65:1740-1751.
- Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
- McEntee WJ, Crook TH (1993) Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)* 111:391-401.
- Menet V, Prieto M, Privat A, Gimenez y Ribotta M (2003) Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8999-9004.
- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19:151-167.
- Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19:331-338.

- Middleton B (1973) The acetoacetyl-coenzyme A thiolases of rat brain and their relative activities during postnatal development. *Biochem J* 132:731-737.
- Miller AL, Kiney CA, Corrdry DH, Staton DM (1982) Interactions between glucose and ketone body use by developing brain. *Brain Res* 256:443-450.
- Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C (2002) The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 202:13-23.
- Minelli A, Barbaresi P, Reimer RJ, Edwards RH, Conti F (2001) The glial glutamate transporter GLT-1 is localized both in the vicinity of and at distance from axon terminals in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* 108:51-59.
- Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM (1994) Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 265:1107-1110.
- Mittoux V, Ouary S, Monville C, Lisovski F, Poyot T, Conde F, Escartin C, Robichon R, Brouillet E, Peschanski M, Hantraye P (2002) Corticostriatal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 22:4478-4486.
- Mittoux V, Joseph JM, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T, Bloch J, Deglon N, Ouary S, Nimchinsky EA, Brouillet E, Hof PR, Peschanski M, Aebischer P, Hantraye P (2000) Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 11:1177-1187.
- Miyazaki H, Nagashima K, Okuma Y, Nomura Y (2001) Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 922:165-172.
- Monville C, Couplier M, Conti L, De-Fraja C, Dreyfus P, Fages C, Riche D, Tardy M, Cattaneo E, Peschanski M (2001) Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. *Mol Cell Neurosci* 17:373-384.
- Moore TJ, Lione AP, Sugden MC, Regen DM (1976) Beta-hydroxybutyrate transport in rat brain: developmental and dietary modulations. *Am J Physiol* 230:619-630.
- Morris AA (2005) Cerebral ketone body metabolism. *J Inherit Metab Dis* 28:109-121.
- Mucke L, Oldstone MB, Morris JC, Nerenberg MI (1991) Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. *New Biol* 3:465-474.
- Muller HW, Junghans U, Kappler J (1995) Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. *Pharmacol Ther* 65:1-18.
- Mulligan SJ, MacVicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- Munir M, Correale DM, Robinson MB (2000) Substrate-induced up-regulation of Na(+)-dependent glutamate transport activity. *Neurochem Int* 37:147-162.
- Munro S (2001) What can yeast tell us about N-linked glycosylation in the Golgi apparatus? *FEBS Lett* 498:223-227.
- Munro S (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115:377-388.
- Nagy JI, Dudek FE, Rash JE (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47:191-215.
- Nakagawa T, Schwartz JP (2004) Gene expression profiles of reactive astrocytes in dopamine-depleted striatum. *Brain Pathol* 14:275-280.
- Nakagawa T, Yabe T, Schwartz JP (2005) Gene expression profiles of reactive astrocytes cultured from dopamine-depleted striatum. *Neurobiol Dis* 20:275-282.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-267.
- Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50:281-286.
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3:748-755.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26:523-530.
- Nehlig A (2004) Brain uptake and metabolism of ketone bodies in animal models. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70:265-275.
- Nehlig A, Boyet S, Pereira de Vasconcelos A (1991) Autoradiographic measurement of local cerebral beta-hydroxybutyrate uptake in the rat during postnatal development. *Neuroscience* 40:871-878.
- Newman EA (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci* 26:536-542.

- Nichols J, Davidson D, Taga T, Yoshida K, Chambers I, Smith A (1996) Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mech Dev* 57:123-131.
- Nieoullon A, Kerkerian L, Dusticier N (1983) Presynaptic dopaminergic control of high affinity glutamate uptake in the striatum. *Neurosci Lett* 43:191-196.
- Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, Wolf G (1998) Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxically mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitroergic stress. *Glia* 23:285-297.
- Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP (1998) Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273:5419-5422.
- Oliet SH, Piet R, Poulain DA (2001) Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292:923-926.
- Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.
- Olney JW, Sharpe LG (1969) Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166:386-388.
- Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J (1991) Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 251:1616-1618.
- Orlando LR, Alsdorf SA, Penney JB, Jr., Young AB (2001) The role of group I and group II metabotropic glutamate receptors in modulation of striatal NMDA and quinolinic acid toxicity. *Exp Neurol* 167:196-204.
- Ourselin S, Roche A, Subsol G, Pennec X, Ayache N (2001) Reconstructing a 3D structure from serial histological sections. *Image and Vision Computing* 19:25-31.
- Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF, Jr. (1967) Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 46:1589-1595.
- Ozog MA, Siushansian R, Naus CC (2002) Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:132-141.
- Page MA, Williamson DH (1971) Enzymes of ketone-body utilisation in human brain. *Lancet* 2:66-68.
- Palfi S, Ferrante RJ, Brouillet E, Beal MF, Dolan R, Guyot MC, Peschanski M, Hantraye P (1996) Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 16:3019-3025.
- Panov AV, Gutekunst CA, Leavitt BR, Hayden MR, Burke JR, Strittmatter WJ, Greenamyre JT (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5:731-736.
- Paratcha G, Ibanez CF (2002) Lipid rafts and the control of neurotrophic factor signaling in the nervous system: variations on a theme. *Curr Opin Neurobiol* 12:542-549.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310:113-116.
- Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J (1999) Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol* 145:503-514.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2003) Food for thought: challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1282-1286.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2004a) Neuroscience. Let there be (NADH) light. *Science* 305:50-52.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2004b) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* 10:53-62.
- Pellerin L, Pellegrini G, Martin JL, Magistretti PJ (1998) Expression of monocarboxylate transporter mRNAs in mouse brain: support for a distinct role of lactate as an energy substrate for the neonatal vs. adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3990-3995.
- Pentreath VW, Slamon ND (2000) Astrocyte phenotype and prevention against oxidative damage in neurotoxicity. *Hum Exp Toxicol* 19:641-649.
- Pessin JE, Thurmond DC, Elmendorf JS, Coker KJ, Okada S (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J Biol Chem* 274:2593-2596.

- Petersen A, Brundin P (1999) Effects of ciliary neurotrophic factor on excitotoxicity and calcium-ionophore A23187-induced cell death in cultured embryonic striatal neurons. *Exp Neurol* 160:402-412.
- Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ (2000) Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 20:4081-4090.
- Pfrieger FW (2003) Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* 60:1158-1171.
- Pfrieger FW, Barres BA (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science* 277:1684-1687.
- Pierre K, Pellerin L (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *J Neurochem* 94:1-14.
- Poitry-Yamate CL, Vutskits L, Rauen T (2002) Neuronal-induced and glutamate-dependent activation of glial glutamate transporter function. *J Neurochem* 82:987-997.
- Pope A (1978) Neuroglia: quantitative aspects. In: *Dynamic properties of glial cells* (Schoffeniels E, Tower F, eds), pp 13-20: Pergamon Press.
- Popoli P, Minghetti L, Tebano MT, Pintor A, Domenici MR, Massotti M (2004a) Adenosine A2A receptor antagonism and neuroprotection: mechanisms, lights, and shadows. *Crit Rev Neurobiol* 16:99-106.
- Popoli P, Pintor A, Tebano MT, Frank C, Pepponi R, Nazzicone V, Grieco R, Pezzola A, Reggio R, Minghetti L, De Berardinis MA, Martire A, Potenza RL, Domenici MR, Massotti M (2004b) Neuroprotective effects of the mGlu5R antagonist MPEP towards quinolinic acid-induced striatal toxicity: involvement of pre- and post-synaptic mechanisms and lack of direct NMDA blocking activity. *J Neurochem* 89:1479-1489.
- Porras OH, Loaiza A, Barros LF (2004) Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:9669-9673.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev* 30:77-105.
- Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 26:520-522.
- Rao MS, Tyrrell S, Landis SC, Patterson PH (1992) Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons. *Dev Biol* 150:281-293.
- Rao SD, Weiss JH (2004) Excitotoxic and oxidative cross-talk between motor neurons and glia in ALS pathogenesis. *Trends Neurosci* 27:17-23.
- Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ (2001) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21:1876-1883.
- Raunser S, Haase W, Bostina M, Parcej DN, Kuhlbrandt W (2005) High-yield expression, reconstitution and structure of the recombinant, fully functional glutamate transporter GLT-1 from *Rattus norvegicus*. *J Mol Biol* 351:598-613.
- Régulier E, Pereira de Almeida L, Sommer B, Aebischer P, Deglon N (2002) Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 13:1981-1990.
- Reiness CG, Seppa MJ, Dion DM, Sweeney S, Foster DN, Nishi R (2001) Chick ciliary neurotrophic factor is secreted via a nonclassical pathway. *Mol Cell Neurosci* 17:931-944.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
- Rivière D, Régis J, Cointepas Y, Papadopoulos-Orfanos D, Cachia A, Mangin JF (2003) A freely available Anatomist/BrainVISA package for structural morphometry of the cortical sulci. In: *9th HBM, NeuroImage*, p 934.
- Robbins DS, Shirazi Y, Drysdale BE, Lieberman A, Shin HS, Shin ML (1987) Production of cytotoxic factor for oligodendrocytes by stimulated astrocytes. *J Immunol* 139:2593-2597.
- Robinson MB (2002) Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem* 80:1-11.

- Roeder LM, Tildon JT, Stevenson JH, Jr. (1984a) Competition among oxidizable substrates in brains of young and adult rats. Whole homogenates. *Biochem J* 219:125-130.
- Roeder LM, Tildon JT, Holman DC (1984b) Competition among oxidizable substrates in brains of young and adult rats. Dissociated cells. *Biochem J* 219:131-135.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362:59-62.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW (1992) Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 326:1464-1468.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 38:73-84.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.
- Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 344:1688-1700.
- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol* 10:311-320.
- Rudge JS, Li Y, Pasnikowski EM, Mattsson K, Pan L, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Lindsay RM, Ip NY (1994) Neurotrophic factor receptors and their signal transduction capabilities in rat astrocytes. *Eur J Neurosci* 6:693-705.
- Ruggiero AM, Vidensky S, Rothstein J (2003) GTRAP3-18 protein is able to regulate the activity of excitatory amino acid transporters (EAAT) through alterations in Asn linked glycosyl processing. In: Society For Neuroscience. Washington.
- Ryan RM, Vandenberg RJ (2005) A channel in a transporter. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32:1-6.
- Saadat S, Sendtner M, Rohrer H (1989) Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1807-1816.
- Sanchez-Pernaute R, Garcia-Segura JM, del Barrio Alba A, Viano J, de Yébenes JG (1999) Clinical correlation of striatal 1H MRS changes in Huntington's disease. *Neurology* 53:806-812.
- Sato K, Kashiwaya Y, Keon CA, Tsuchiya N, King MT, Radda GK, Chance B, Clarke K, Veech RL (1995) Insulin, ketone bodies, and mitochondrial energy transduction. *Faseb J* 9:651-658.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95:55-66.
- Sawa A, Wiegand GW, Cooper J, Margolis RL, Sharp AH, Lawler JF, Jr., Greenamyre JT, Snyder SH, Ross CA (1999) Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat Med* 5:1194-1198.
- Schachter H (2005) The search for glycan function: Fucosylation of the TGF- $\beta$ 1 receptor is required for receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15721-15722.
- Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16:6125-6133.
- Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zelenia OA, Rothstein JD, Robinson MB (1998) Regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol* 53:355-369.
- Schmitt A, Asan E, Puschel B, Jons T, Kugler P (1996) Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience* 71:989-1004.
- Schon EA, Manfredi G (2003) Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest* 111:303-312.
- Schousboe A, Westergaard N, Waagepetersen HS, Larsson OM, Bakken IJ, Sonnewald U (1997) Trafficking between glia and neurons of TCA cycle intermediates and related metabolites. *Glia* 21:99-105.

- Schubert P, Morino T, Miyazaki H, Ogata T, Nakamura Y, Marchini C, Ferroni S (2000) Cascading glia reactions: a common pathomechanism and its differentiated control by cyclic nucleotide signaling. *Ann N Y Acad Sci* 903:24-33.
- Schulte S, Stoffel W (1995) UDP galactose:ceramide galactosyltransferase and glutamate/aspartate transporter. Copurification, separation and characterization of the two glycoproteins. *Eur J Biochem* 233:947-953.
- Schwarcz R, Pellicciari R (2002) Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1-10.
- Seal RP, Amara SG (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:431-456.
- Seki Y, Feustel PJ, Keller RW, Jr., Tranmer BI, Kimelberg HK (1999) Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433-440.
- Sendtner M, Kreutzberg GW, Thoenen H (1990) Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345:440-441.
- Sendtner M, Gotz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17:6999-7006.
- Sendtner M, Arakawa Y, Stockli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H (1991) Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl* 15:103-109.
- Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, Thoenen H (1994) Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 25:1436-1453.
- Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358:502-504.
- Seniuk NA, Henderson JT, Tatton WG, Roder JC (1994) Increased CNTF gene expression in process-bearing astrocytes following injury is augmented by R(-)-deprenyl. *J Neurosci Res* 37:278-286.
- Sepkuty JP, Cohen AS, Eccles C, Rafiq A, Behar K, Ganel R, Coulter DA, Rothstein JD (2002) A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J Neurosci* 22:6372-6379.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21:7153-7160.
- Shank RP, Campbell GL (1984) Alpha-ketoglutarate and malate uptake and metabolism by synaptosomes: further evidence for an astrocyte-to-neuron metabolic shuttle. *J Neurochem* 42:1153-1161.
- Shao Y, McCarthy KD (1994) Plasticity of astrocytes. *Glia* 11:147-155.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45:250-265.
- Shin J, Yu Z, Fang C, Wang S, Li S, Li X (2004) Expression of huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. In: Society For Neuroscience. San Diego.
- Shouffani A, Kanner BI (1990) Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J Biol Chem* 265:6002-6008.
- Shulman RG, Hyder F, Rothman DL (2001) Cerebral energetics and the glycogen shunt: neurochemical basis of functional imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6417-6422.
- Shulman RG, Rothman DL, Behar KL, Hyder F (2004) Energetic basis of brain activity: implications for neuroimaging. *Trends Neurosci* 27:489-495.
- Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:316-321.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
- Simard M, Nedergaard M (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896.
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu QS, Nedergaard M (2003) Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* 23:9254-9262.
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.
- Sims KD, Robinson MB (1999) Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol* 13:169-197.

- Sims KD, Straff DJ, Robinson MB (2000) Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:5228-5237.
- Skaper SD, Negro A, Dal Toso R, Facci L (1992) Recombinant human ciliary neurotrophic factor alters the threshold of hippocampal pyramidal neuron sensitivity to excitotoxin damage: synergistic effects of monosialogangliosides. *J Neurosci Res* 33:330-337.
- Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (2000) The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74:265-272.
- Slezak M, Pfrieger FW (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 26:531-535.
- Smith B (1963) Dehydrogenase activity in reactive and neoplastic astrocytes. *Brain* 86:89-94.
- Sofroniew MV (2005) Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 11:400-407.
- Sokoloff L (1973) Metabolism of ketone bodies by the brain. *Annu Rev Med* 24:271-280.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28:897-916.
- Somjen GG (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1:2-9.
- Song C, Zhang Y, Parsons CG, Liu YF (2003) Expression of polyglutamine-expanded huntingtin induces tyrosine phosphorylation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 278:33364-33369.
- Song MR, Ghosh A (2004) FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7:229-235.
- Sontheimer H (1992) Astrocytes, as well as neurons, express a diversity of ion channels. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S223-238.
- Spacek J (1985) Relationships between synaptic junctions, puncta adhaerentia and the spine apparatus at neocortical axo-spinous synapses. A serial section study. *Anat Embryol (Berl)* 173:129-135.
- Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP (2004) Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J Biol Chem* 279:19936-19947.
- Stahl N, Yancopoulos GD (1994) The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J Neurobiol* 25:1454-1466.
- Stankoff B, Aigrot MS, Noel F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C (2002) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 22:9221-9227.
- Steinhauser C, Gallo V (1996) News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 19:339-345.
- Stockli KA, Lottspeich F, Sendtner M, Masiakowski P, Carroll P, Gotz R, Lindholm D, Thoenen H (1989) Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342:920-923.
- Stockli KA, Lillien LE, Naher-Noe M, Breitfeld G, Hughes RA, Raff MC, Thoenen H, Sendtner M (1991) Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115:447-459.
- Stone TW, Behan WM, MacDonald M, Darlington LG (2000) Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Amino Acids* 19:275-281.
- Stout AK, Raphael HM, Kanterewicz BI, Klann E, Reynolds IJ (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1:366-373.
- Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, Fisher PB (2003) Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1955-1960.
- Sun Y, Savanenin A, Reddy PH, Liu YF (2001) Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 276:24713-24718.
- Sun Y, Marz P, Otten U, Ge J, Rose-John S (2002) The effect of gp130 stimulation on glutamate-induced excitotoxicity in primary hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 295:532-539.



- Suzuki M, Sato K, Dohi S, Sato T, Matsuura A, Hiraide A (2001) Effect of beta-hydroxybutyrate, a cerebral function improving agent, on cerebral hypoxia, anoxia and ischemia in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 87:143-150.
- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193-205.
- Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA, Longuemare MC (1997) Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932-940.
- Takahata K, Katsuki H, Kume T, Nakata D, Ito K, Muraoka S, Yoneda F, Kashii S, Honda Y, Akaike A (2003) Retinal neuronal death induced by intraocular administration of a nitric oxide donor and its rescue by neurotrophic factors in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1760-1766.
- Takano T, Lin JH, Arcuino G, Gao Q, Yang J, Nedergaard M (2001) Glutamate release promotes growth of malignant gliomas. *Nat Med* 7:1010-1015.
- Takano T, Kang J, Jaiswal JK, Simon SM, Lin JH, Yu Y, Li Y, Yang J, Dienel G, Zielke HR, Nedergaard M (2005) Receptor-mediated glutamate release from volume sensitive channels in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Alves LB, Porciuncula LO, Emanuelli T, Souza DO (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40:621-627.
- TheHuntingtonstudygroup (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 72:971-983.
- Theis M, Sohl G, Eiberger J, Willecke K (2005) Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci* 28:188-195.
- Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1046-1050.
- Tian GF, Azmi H, Takano T, Xu Q, Peng W, Lin J, Oberheim N, Lou N, Wang X, Zielke HR, Kang J, Nedergaard M (2005) An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med* 11:973-981.
- Tieu K, Perier C, Caspersen C, Teismann P, Wu DC, Yan SD, Naini A, Vila M, Jackson-Lewis V, Ramasamy R, Przedborski S (2003) D-beta-hydroxybutyrate rescues mitochondrial respiration and mitigates features of Parkinson disease. *J Clin Invest* 112:892-901.
- Tong G, Jahr CE (1994) Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* 13:1195-1203.
- Trotti D, Danbolt NC, Volterra A (1998) Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci* 19:328-334.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA (1999) SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter. *Nat Neurosci* 2:427-433.
- Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto O, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A (1997) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci* 9:1236-1243.
- Trotti D, Aoki M, Pasinelli P, Berger UV, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem* 276:576-582.
- Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2002) Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* 25:412-417.
- Turnley AM, Bartlett PF (2000) Cytokines that signal through the leukemia inhibitory factor receptor-beta complex in the nervous system. *J Neurochem* 74:889-899.
- Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1997) Differential developmental expression of the two rat brain glutamate transporter proteins GLAST and GLT. *Eur J Neurosci* 9:1646-1655.
- Unger JW (1998) Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech* 43:24-28.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y (1997) Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett* 416:312-316.
- van Adel BA, Arnold JM, Phipps J, Doering LC, Ball AK (2005) Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis via modulation of retinal glia in vivo. *J Neurobiol* 63:215-234.

- Varki A (1998) Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends Cell Biol* 8:34-40.
- Veech RL, Chance B, Kashiwaya Y, Lardy HA, Cahill GF, Jr. (2001) Ketone bodies, potential therapeutic uses. *IUBMB Life* 51:241-247.
- Vermeiren C, Najimi M, Vanhoutte N, Tilleux S, de Hemptinne I, Maloteaux JM, Hermans E (2005) Acute up-regulation of glutamate uptake mediated by mGluR5a in reactive astrocytes. *J Neurochem* 94:405-416.
- Vining EP (1999) Clinical efficacy of the ketogenic diet. *Epilepsy Res* 37:181-190.
- Vogt G, Chappier A, Yang K, Chuzhanova N, Feinberg J, Fieschi C, Boisson-Dupuis S, Alcais A, Filipe-Santos O, Bustamante J, de Beaucoudrey L, Al-Mohsen I, Al-Hajjar S, Al-Ghonaium A, Adimi P, Mirsaedi M, Khalilzadeh S, Rosenzweig S, de la Calle Martin O, Bauer TR, Puck JM, Ochs HD, Furthner D, Engelhorn C, Belohradsky B, Mansouri D, Holland SM, Schreiber RD, Abel L, Cooper DN, Soudais C, Casanova JL (2005) Gains of glycosylation comprise an unexpectedly large group of pathogenic mutations. *Nat Genet* 37:692-700.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.
- Wada H, Okada Y, Nabetani M, Nakamura H (1997) The effects of lactate and beta-hydroxybutyrate on the energy metabolism and neural activity of hippocampal slices from adult and immature rat. *Brain Res Dev Brain Res* 101:1-7.
- Wadiche JI, Amara SG, Kavanaugh MP (1995) Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* 15:721-728.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291-300.
- Walz W (2002) Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia* 40:1-10.
- Wang J, Campbell IL (2002) Cytokine signaling in the brain: putting a SOCS in it? *J Neurosci Res* 67:423-427.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K, Tanaka K (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10:976-988.
- Wen TC, Matsuda S, Yoshimura H, Kawabe T, Sakanaka M (1995) Ciliary neurotrophic factor prevents ischemia-induced learning disability and neuronal loss in gerbils. *Neurosci Lett* 191:55-58.
- White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16:5688-5697.
- Wiesinger H, Hamprecht B, Dringen R (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* 21:22-34.
- Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci* 24:5016-5021.
- Williamson DH, Bates MW, Page MA, Krebs HA (1971) Activities of enzymes involved in acetoacetate utilization in adult mammalian tissues. *Biochem J* 121:41-47.
- Wilson JX (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75:1149-1163.
- Winter CG, Saotome Y, Levison SW, Hirsh D (1995) A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5865-5869.
- Wu BY, Yu AC (2000) Quercetin inhibits c-fos, heat shock protein, and glial fibrillary acidic protein expression in injured astrocytes. *J Neurosci Res* 62:730-736.
- Wu VW, Schwartz JP (1998) Cell culture models for reactive gliosis: new perspectives. *J Neurosci Res* 51:675-681.
- Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.
- Wyss-Coray T, Loike JD, Brionne TC, Lu E, Anankov R, Yan F, Silverstein SC, Husemann J (2003) Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ. *Nat Med* 9:453-457.

- Xia XG, Hofmann HD, Deller T, Kirsch M (2002) Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats. *Mol Cell Neurosci* 21:379-392.
- Ye ZC, Rothstein JD, Sontheimer H (1999) Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction-mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J Neurosci* 19:10767-10777.
- Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I, Penney JB (1988) NMDA receptor losses in putamen from patients with Huntington's disease. *Science* 241:981-983.
- Zala D, Bensadoun JC, Pereira de Almeida L, Leavitt BR, Gutekunst CA, Aebischer P, Hayden MR, Déglon N (2004) Long-term lentiviral-mediated expression of ciliary neurotrophic factor in the striatum of Huntington's disease transgenic mice. *Exp Neurol* 185:26-35.
- Zala D, Benchoua A, Brouillet E, Perrin V, Gaillard MC, Zurn AD, Aebischer P, Déglon N (2005) Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vectors coding for a mutant huntingtin fragment. *Neurobiol Dis* in press.
- Zerangue N, Arriza JL, Amara SG, Kavanaugh MP (1995) Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *J Biol Chem* 270:6433-6435.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P, Hayden MR, Raymond LA (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 33:849-860.
- Zhou J, Sutherland ML (2004) Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J Neurosci* 24:6301-6306.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.
- Zschocke J, Bayatti N, Behl C (2005) Caveolin and GLT-1 gene expression is reciprocally regulated in primary astrocytes: association of GLT-1 with non-caveolar lipid rafts. *Glia* 49:275-287.
- Zufferey R, Donello JE, Trono D, Hope TJ (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73:2886-2892.
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72:9873-9880.

# **ANNEXES**

## VIII. Annexes

### A. Liste des abréviations

3NP: acide 3 nitropropionique  
AMPA: alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate  
ANOVA: analysis of variance  
AVC: accident vasculaire cérébral  
BCA: acide bincinchonique  
BDH:  $\beta$ -hydroxybutyrate déshydrogénase  
BET: bromure d'éthidium  
BHB:  $\beta$ -hydroxybutyrate  
BHE: barrière hématoencéphalique  
BSA : albumine bovine sérique  
CC : corps cétoniques  
CLC : cardiotrophin like cytokine  
CLF : cytokine-like factor 1  
CMV : cytomégalovirus  
CNTF: ciliary neurotrophic factor  
CPT : carnityl palmityl transférase  
COX: cytochrome oxydase  
DAB: diaminobenzamidine  
DARPP32: dopamine et cAMP-regulated phosphoprotein  
DHK: dihydroxykaïnate  
EAAC1: excitatory amino acid carrier 1  
EAAT: excitatory amino acid transporter  
EGF: epidermal growth factor  
ELISA: enzyme linked immunosorban assay  
GAD: glutamic acid decarboxylase  
GDNF: glial cell line derived neurotrophic factor  
GDH: glutamate déshydrogénase  
GFAP: glial fibrillary acidic protein  
GLAST: Glutamate/ Aspartate transporter  
GLT-1: glutamate transporter 1  
GluR2: AMPA/kainite receptor subunit 2  
GLUT: glucose transporter  
GPI: glycosyl-phosphatidylinositol  
GTRAP: glutamate transporter associated protein  
HBS: HEPES Buffer Saline  
HMG-CoA: hydroxy-3-méthylglutarate CoA  
HPLC: Chromatographie liquide à haute performance  
HRP: Horse radish peroxidase  
Htt: huntingtine  
IEG: immediate early genes  
IFN : interféron  
IL: interleukine  
i.p.: injection intrapéritonéale  
i.v.: injection intraveineuse  
JAK: Janus kinase  
LIF: leukemia inhibitory factor  
LIFR $\beta$ : récepteur  $\beta$  au LIF  
LTR : long terminal repeat  
LPS : lipopolysaccharide  
MA: maladie d'Alzheimer

MANOVA: multiple ways ANOVA  
MAP kinase: mitogen activated protein kinase  
MB: MES Buffer Saline  
MCT: transporteur aux monocarboxylates  
MH: maladie de Huntington  
mHS: HMG-CoA synthase mitochondriale  
MP : maladie de Parkinson  
MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine  
NAD<sup>+</sup>: nicotinamide adénine dinucléotide  
NBT: nitroblue tétrazolium  
NeuN: neuronal nuclei protein  
NGS: sérum normal de chèvre  
NGF : nerve growth factor  
nls: nuclear localisation sequence  
NMDA: N-méthyl-D-aspartate  
NR2A / B: NMDA receptor subunit 2A / B  
PB: phosphate buffer  
PBS: phosphate buffer saline  
PCNA: proliferating cell nuclear antigen  
PCR: polymerase chain reaction  
PDGF : platelet-derived growth factor  
PFA: paraformaldéhyde  
PGK: phosphoglycérate kinase  
PiPLC: phosphatidyl inositol phospholipase C  
PK : protéine kinase  
QA: quinolinate  
RE : réticulum endoplasmique  
ROI: région d'intérêt  
ROS: espèces réactives oxydantes  
RSV: rous sarcoma virus  
SCOT: succinyl CoA : 3-oxoacid-CoA transférase  
SLA: sclérose latérale amyotrophique  
SNC: système nerveux central  
SNP: système nerveux périphérique  
SOD: superoxyde dismutase  
STAT: signal transducers et activators of transcription  
SVZ: zone sous-ventriculaire  
TEP: tomographie par émission de positon  
TBS-T: Tris Buffer Saline Tween  
TGF  $\beta$  : transforming growth factor  $\beta$   
THF: tétrahydrofuran  
Tm: température de fusion  
TNF  $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$   
VGLUT-1: vesicular glutamate transporter 1  
VSV-G: vesicular stomatitis virus G protein  
WPRE: woodchuck hepatitis post-regulatory element

## B. Publications

- Mittoux V, Ouary S, Monville C, Lisovoski F, Poyot T, Conde F, **Escartin C**, Robichon R, Brouillet E, Peschanski M, Hantraye P (2002) Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 22:4478-4486.
- Bizat N, Hermel J, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, **Escartin C**, Hantraye P, Krajewski S, Brouillet E (2003) Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced *in vivo* by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23:5020-5030.
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C, **Escartin C**, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E (2003) In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 278:43245-43253.
- Escartin C**, Boyer F, Bemelmans AP, Hantraye P, Brouillet E (2004) Insulin growth factor-1 protects against excitotoxicity in the rat striatum. *Neuroreport* 15:2251-2254.
- Herard AS, Dubois A, **Escartin C**, Tanaka K, Delzescaux T, Hantraye P, Bonvento G (2005) Decreased metabolic response to visual stimulation in the superior colliculus of mice lacking the glial glutamate transporter GLT-1. *Eur J Neurosci* 22:1807-1811.
- Escartin C**, Hantraye P, Déglon N. (*sous presse*) Transplants of CNTF producing cells for Huntington's disease. In: Cellular Transplantation: from Laboratory to Clinic (Haleberstadt C, Emerich DF, eds). San-Diego: Elsevier.
- Jacquard C, **Escartin C**, Trioulier Y, Bizat N, Hantraye P, Bonvento G, Brouillet E (*en révision à FASEB J.*) Brain mitochondrial defects amplify intracellular  $[Ca^{2+}]$  rise and neurodegeneration but not  $Ca^{2+}$  entry during NMDA receptor activation.
- Escartin C**, Brouillet E, Jacquard C, Mauger G, Hermel JM, Smadja C, Knott G, Déglon N, Hantraye P, Bonvento G (*en révision à J. Neurosci.*) CNTF-induced activation of astrocytes improves glutamate homeostasis and neuronal survival *in vivo*.

## **Article 1**

Escartin C, Boyer F, Bemelmans AP, Hantraye P, Brouillet E  
(2004) Insulin growth factor-1 protects against excitotoxicity in the rat striatum.



# Insulin growth factor-I protects against excitotoxicity in the rat striatum

Carole Escartin, Frédéric Boyer, Alexis-Pierre Bemelmans,<sup>1</sup> Philippe Hantraye and Emmanuel Brouillet<sup>CA</sup>

Unité de Recherche Associée 2210 Commissariat à l'Energie Atomique-Centre National de la Recherche Scientifique, and Program ImaGene, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Département de Recherche Médicale, Direction des Sciences du Vivant, 4 place du Général Leclerc, 91401 Cedex, Orsay, France; <sup>1</sup>Laboratoire d'oculogénétique, Hôpital Ophtalmique Jules Gonin, Avenue de France 15, 1004 Lausanne, Switzerland

<sup>CA</sup>Corresponding Author: Brouille@shfj.cea.fr

Received 17 May 2004; accepted 20 July 2004

Recent findings demonstrated the neuroprotective effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) in a cultured cell model of Huntington's disease. In the present study, we examined the potential neuroprotective effect of IGF-I *in vivo*, in a rat model of Huntington's disease using the NMDA receptor agonist quinolinate. Continuous intracerebroventricular infusion of recombinant IGF-I (0.25 µg/h for 2 days) in the rat brain, produced a significant 8-fold

increase in striatal levels of the growth factor. Histological evaluation after intrastriatal injection of quinolinate showed that IGF-I treatment significantly attenuated striatal degeneration. These results further support the therapeutic interest of IGF-I in Huntington's disease. *NeuroReport* 15:2251–2254 © 2004 Lippincott Williams & Wilkins.

**Key words:** Excitotoxicity; Huntington's disease; IGF-I; Neuroprotection; Quinolinate; Striatum

## INTRODUCTION

Huntington's disease is an inherited neurodegenerative disorder characterized by involuntary abnormal movements, cognitive impairment and psychiatric disturbance [1]. The most striking neuropathological change in Huntington's disease is preferential atrophy of the striatum [1]. Huntington's disease is caused by an expansion of a polyglutamine stretch in the N-terminal part of the high mol. wt protein huntingtin (Htt) [2]. The mechanisms leading to striatal atrophy are probably multifactorial [3]. Several observations suggest that excitotoxicity may play a role in Huntington's disease pathogenesis. Intrastratial injection of quinolinate, an agonist of the NMDA subtype of glutamate receptors, produces in rodent [4] and non-human primates [5] histological and neurochemical changes that are highly reminiscent of Huntington's disease. Recent studies have shown that normal Htt is associated with NMDA receptors via interaction with post-synaptic density 95 protein (PSD95) and that polyglutamine expansion in mutant Htt decreases this interaction, rendering NMDA receptors more sensitive to glutamate [6]. In line with this, neurons are more vulnerable to NMDA receptor activation in a transgenic mouse model of the disorder [7].

There is currently no effective therapy for Huntington's disease. However, protection of GABAergic striatal neurons by trophic factors such as ciliary neurotrophic factor (CNTF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF) is a promising prospect for slowing down the pathological process of Huntington's disease (for review see [8]). Another trophic factor, insulin-like growth factor 1 (IGF-1) protects against

different neurodegenerative conditions and thus may also be of interest for the treatment of Huntington's disease (for review see [9]). A recent study demonstrated that IGF-1 protects cultured striatal neurons against the toxicity of mutated Htt [10]. Akt, a kinase involved in IGF-1 signaling pathways appeared to have a key role in this neuroprotective effect. Interestingly, IGF-1 significantly reduced the formation of intranuclear inclusions of mutant Htt in this model, an effect that was not seen with BDNF or CNTF [11]. These observations confirmed the interest of IGF-1 as a potential neuroprotective agent for Huntington's disease. However, IGF-1-mediated neuroprotection remains to be demonstrated *in vivo* in animal models of this neurodegenerative disorder.

Here we examined whether intracerebroventricular infusion of recombinant IGF-1 attenuated striatal degeneration in a rat model of Huntington's disease using the excitotoxin quinolinate.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals and chemical reagents:** Four-month-old male Sprague-Dawley rats (weighing ~500 g, IFFA Credo, France) were used in this study. For surgical procedure, animals were anesthetized with a mixture of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (1.5 mg/kg). All experimental procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the EEC (86/609/EEC) for the care and use of laboratory animals. All chemicals were purchased

from Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France) unless specified otherwise.

**Experimental design:** To determine whether exogenous IGF-1 infusion could increase brain concentrations of IGF-1, rats were implanted with an intracerebroventricular (i.c.v.) canula for continuous delivery of IGF-1 (0.25 µg/h, 1 µl/h,  $n=3$ ) or vehicle ( $n=4$ ). Control animals were sham-operated ( $n=4$ ). Animals were killed 48 h after surgery for measurement of IGF-1 brain concentrations.

To evaluate the potential neuroprotective effects of IGF-1, rats were infused with either IGF-1 (0.25 µg/µl,  $n=8$ ) or vehicle ( $n=9$ ) or were sham-operated (i.e. without cannula,  $n=8$ ). Intrastratial injection of quinolinate was performed 48 h later. Histological evaluation was performed 48 h after quinolinate injection.

**Intracerebroventricular infusion of IGF-1:** Lyophilized recombinant human IGF-1 (R&D system, Lille, France) was dissolved in 10 mM acetic acid with 0.1% bovine serum albumin (BSA) to final concentration of 0.25 µg/µl. Continuous i.c.v. delivery of IGF-1 was made using an osmotic minipump (1003 model, Alzet, USA) connected to a stereotaxically implanted cannula (anteroposterior -1.6 mm; lateral 2.0 mm left from bregma; ventral 3.5 mm from dura with tooth bar set at -3.3 mm; brain infusion kit, Alzet) that was secured to the skull bone with dental cement as previously described [12].

**Determination of brain IGF-1 concentrations:** The lateral striatum and the surrounding cerebral (somatosensory) cortex were rapidly dissected out from fresh slices (2 mm) cooled on ice made in the coronal plane using a steel rat-brain matrix. Tissue samples were homogenized using a 1 ml glass-Teflon homogenizer (900 r.p.m., 20 strokes) in 300 µl buffer (25 mM Hepes pH 7.6, 0.1% Triton X-100, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.3 mM EDTA, 1 mM EGTA, with complete protease inhibitor cocktail, Roche, Meylan, France). Homogenates were centrifuged at 10 000 × g for 30 min at 4°C. Supernatant and pellet fractions were collected and stored at -80°C until biochemical analysis. IGF-1 concentrations in the supernatant of striatal and cortical homogenates were measured with the Quantikine Human IGF-1 colorimetric Sandwich ELISA kit (R&D system) using a standard curve of recombinant IGF-1 according to the manufacturer's instruction. IGF-1 values were normalized to protein concentrations in each sample using the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA).

**Quinolinate injection:** Quinolinate (180 mM) was dissolved in phosphate-buffered saline (0.1 M PB, 150 mM NaCl, pH 7.4). Intrastratial injections of 1 µl quinolinate (180 nmol) or PBS were made in one site in the left and right striatum respectively using a blunt tipped 25 gauge Hamilton syringe. The injection was made over 1 min and the needle was left in place for 2 min before being slowly withdrawn (stereotaxic coordinates: AP +0.8 mm from bregma; L 3 mm from bregma; V 5 mm from dura).

**Evaluation of lesion severity using cytochrome oxidase histochemistry:** The severity of striatal lesions was determined 48 h after intrastratial injection of quinolinate using a semi-quantitative measurement of the loss of cytochrome

oxidase activity associated with neurodegeneration [13]. Loss of cytochrome oxidase activity after striatal lesioning is related to the extent of neurodegeneration [12]. At this early time point after quinolinate injection, striatal cell death is associated with excitotoxic cell swelling and tissue oedema. Collapse of degenerating striatal tissue (atrophy) occurs 1–4 weeks later [14]. Brains were removed from the skull and rapidly frozen in isopentane (-30°C). Frozen brains were cut serially into 40 µm sections using a cryostat. Sections were mounted onto SuperFrost Plus slides and stored at -20°C for few days before histochemistry. Cytochrome oxidase histochemistry was performed using cytochrome c and DAB as chromogene. For determination of DAB staining unrelated to cytochrome oxidase activity (non specific staining), the reaction was performed by incubating adjacent sections with DAB in absence of cytochrome c. For each animal, images of 10–12 stained sections kept in series and encompassing the striatum (with 400 µm between sections) were digitally acquired and analyzed using an image analysis system (IMSTAR, Paris, France).

Cytochrome oxidase activity was determined by measuring the mean optical density (OD) of the entire striatum in each section. The non-specific staining OD was subtracted from total striatal OD to calculate an OD corresponding to specific cytochrome oxidase activity. Non-specific staining was not significantly modified by quinolinate lesioning (data not shown).

The volume of striatal lesions that appeared as a very pale area was assessed on blind-coded images of cytochrome oxidase stained sections as previously used [12,13]. For each coronal brain section, the lesioned area was measured by manually delineating the external border of the lesion seen as a pale staining on digitized images. From these areas, the volume V of the striatal lesion was determined for all animals using the Cavalieri method formula,  $V=S \times k \times n$ , where S is the mean value of measured areas in each section, k the interval between sections (40 µm) and n the number of sections with detectable lesion [15].

We used the same approach to determine the volume of the entire striatum which in case of acute lesioning indicates the extent of excitotoxic cell swelling and as such is an indirect index of lesion severity.

**Statistics:** Results are expressed as mean values ± s.e.m. Statistical comparisons were made on raw data (and not data expressed as percentage of control values). Statistical analysis included one-way ANOVA followed by a *post-hoc* PLSD Fischer test. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

Pilot experiments in mice suggested that it was difficult to increase the cerebral concentration of IGF-1 by systemic administration of the trophic factor. Here, we chose to deliver IGF-1 directly into the rat brain using cannulae implanted in the lateral ventricle to overcome biodistribution limitation due to the blood brain barrier and to limit peripheral side effects. I.c.v. administration with osmotic minipumps was used to deliver IGF-1 at a rate of 0.25 µg/h for 3 days. Before starting the neuroprotection study, we measured IGF-1 concentrations in the solution left in the minipumps 48 h after implantation surgery to examine the

**Table 1.** Intracerebroventricular infusion of IGF-1 increases striatal and cortical IGF-1 concentrations.

	Control	Vehicle	IGF-1 0.25 µg/µl
	[IGF-1] pg/mg total protein		
Striatum	64.8 ± 4.6	74.6 ± 5.4	591.4 ± 238.9*
Cortex	52.0 ± 1.3	53.0 ± 5.3	175.7 ± 34.5**

ELISA measurement of IGF-1 in striatal and cortical extracts was made 48 h after intracerebral implantation of a canula delivering either IGF-1 (0.25 µg/µl,  $n=3$ ) or vehicle ( $n=4$ ). Rats in the control group were not implanted ( $n=4$ ). IGF-1 concentration was significantly increased in the IGF-1 group compared with other groups. Values are expressed as mean ± s.e.m.

\* $p < 0.05$ ,

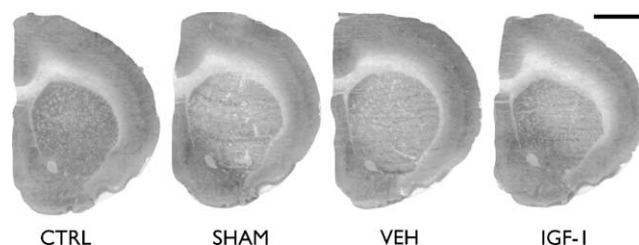
\*\* $p < 0.001$  vs control and vehicle groups.

stability of IGF-1. Measured concentration of IGF-1 was 0.284 µg/µl, indicating that IGF-1 degradation in the implanted minipump was minimal over 48 h. We next examined whether the i.c.v. infusion of IGF-1 could produce a detectable increase in concentrations of IGF-1 in the striatum and adjacent cerebral cortex. We analyzed brain extracts prepared from unlesioned rats that had received IGF-1 over 48 h. We detected a significant 8-fold increase in IGF-1 concentration in striatal extracts of IGF-1-treated rats compared with control animals and rats receiving only the vehicle (Table 1). A significant 3-fold increase was also detected in cortical extracts from the IGF-1 group. These results showed that delivering IGF-1 at a constant rate using i.c.v. infusion produced a substantial increase in the striatal concentrations of the trophic factor, compatible with a study of its neuroprotective potential.

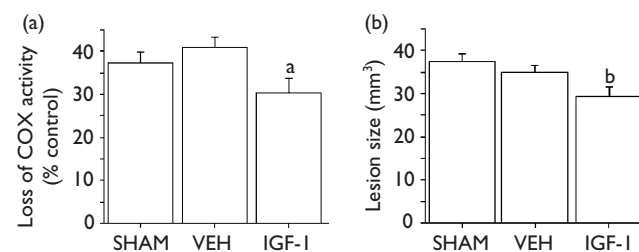
We next examined whether increasing cerebral concentrations of IGF-1 could have neuroprotective effects against quinolinate. Analysis of sections stained by cytochrome oxidase histochemistry 48 h after intrastriatal injection of quinolinate showed that cytochrome oxidase activity values measured in the left striatum (side contralateral to the side injected with quinolinate) were not significantly different between groups suggesting that infusion of IGF-1 did not modify the basal activity of cytochrome oxidase compared to sham or vehicle. Quinolinate produced a significant loss of cytochrome oxidase activity in the striatum (Fig. 1). This loss was significantly reduced by 26% in the IGF-1-treated group compared with vehicle (Fig. 2a). Quinolinate-induced lesions affected ~70–80% of the striatum (Fig. 1). The volume of striatal lesion was significantly reduced in the IGF-1 group compared with those of the vehicle group (–16%,  $p < 0.03$ ) and the sham group (–22%,  $p < 0.004$ ; Fig. 2b). In the vehicle and sham groups, quinolinate produced an excitotoxic oedema as evidenced by a significant 36–40% increase of the volume of the entire striatum complete control ( $p < 0.0001$ ). In IGF-1 treated rats, the oedema was significantly reduced to 22% ( $p < 0.002$  vs sham and  $p < 0.02$  vs vehicle). These data demonstrate that IGF-1 partially reduces the severity of striatal neurodegeneration produced by quinolinate.

## DISCUSSION

The present results show that i.c.v. infusion of recombinant IGF-1 leads to a significant increase in IGF-1 concentration in the striatum and the cerebral cortex. This demonstrates



**Fig. 1.** IGF-1 protects the striatum against quinolinate toxicity. Striatal lesions were detected using cytochrome oxidase histochemistry 48 h after quinolinate injection. Representative coronal brain sections from rats injected with PBS showing an intact striatum (CTRL), quinolinate without intracerebroventricular canula (SHAM), quinolinate and intracerebroventricular infusion of vehicle (VEH), or quinolinate and IGF-1. Note the presence of a lesion which appears as a pale area in the striatum of animals injected with quinolinate. Bar=2 mm.



**Fig. 2.** Quantification of the effects of IGF-1 against quinolinate toxicity. Striatal lesions were assessed using cytochrome oxidase histochemistry 48 h after quinolinate injection. (a) Quinolinate-induced loss of cytochrome oxidase activity was determined in rats without intracerebroventricular canula (SHAM), or canula delivering vehicle (VEH), or IGF-1. Results were expressed as percentage of activity loss compared with the unlesioned contralateral striatum. Statistical comparisons were made on absolute values of cytochrome oxidase activity. (b) The volume of striatal lesions was determined as described in Materials and Methods. Note that lesion severity is significantly reduced by IGF-1 treatment. Data are means ± s.e.m. determined in 8–9 animals in each group. <sup>a</sup> $p < 0.03$  vs VEH; <sup>b</sup> $p < 0.03$  vs VEH,  $p < 0.004$  vs SHAM.

that IGF-1 can diffuse from the ventricle into the brain parenchyma, and can accumulate within surrounding structures such as the striatum. Thus, i.c.v. infusion of IGF-1 is a valid mode of delivery to study its neuroprotective effects *in vivo*.

Our data demonstrate that 48 h after stereotaxic injection of quinolinate the striatum shows detectable lesions, significant loss of cytochrome oxidase activity and oedema, consistent with excitotoxic tissue swelling and cell death [12,13]. In animals treated with IGF-1, the lesions were smaller, the oedema was reduced and the loss of cytochrome oxidase was attenuated. In previous studies of the neuroprotective effects of CNTF, we showed that histological markers of early striatal neurodegeneration, in particular lesion volume, are inversely related to the long-term atrophy of the striatum associated with actual neuronal loss quantitated by unbiased stereological counts [16]. Higher the lesion volume at early time points, more profound the striatal atrophy and actual neuronal loss. Thus the neuroprotective effects of IGF-1 seen 48 h after injection of quinolinate likely lead to long-term reduction of striatal atrophy. However, the unequivocal demonstration that IGF-1 treatment could also protect the striatum in the long-term awaits further studies. The neuroprotective effect

of IGF-1 against quinolinate is consistent with previous experiments demonstrating the neuroprotective efficacy of IGF-1 *in vivo*, in models of brain ischemia [17,18], cerebellar ataxia [19] or amyotrophic lateral sclerosis [20]. However, our results are the first *in vivo* evidence for a neuroprotective effect of IGF-1 in an animal model of Huntington's Disease. The IGF-1 amino-terminal tripeptide GPE has been shown to protect striatal cells from quinolinate toxicity when injected daily in the striatum [21] but it is unknown whether GPE binds to the IGF-1 receptor [22]. The mechanisms involved in GPE neuroprotective effect may be unspecific and unrelated to IGF-1 signaling pathways.

IGF-1 intracellular signaling involves the mitogen activated protein (MAP) kinase and phosphatidylinositol 3 (Pi3) kinase pathways [23]. Activation of these cascades leads to the phosphorylation of Erk and Akt that has pro-survival effects for the cell [24,25]. It is interesting to note that Akt is abnormally cleaved in the brain of Huntington's disease and that stimulation of the Pi3 kinase-Akt pathway reduces both the toxicity of mutant Htt and the formation of intranuclear inclusions *in vitro* [10]. Therefore, Pi3 kinase-Akt pathway may have a key role in Huntington's disease. Further studies will help evaluate the contribution of this pathway in IGF-1 effect against quinolinate in the striatum.

Excitotoxicity is believed to be part of the complex etiology of Huntington's disease as excitotoxin injection in the striatum produces neurochemical alterations and histological lesions that closely mimic Huntington's disease pathology [4]. Recently, a closer link between excitotoxic process and Htt mutation has been demonstrated. NMDA receptors interact with Htt via PSD 95 and the polyglutamine stretch of mutated Htt decreases this interaction [6]. In a transgenic model of Huntington's disease, neurons have been shown to be more vulnerable to NMDA receptor activation [7]. The demonstration of a direct link between Htt mutation and excitotoxicity supports the view that the quinolinate model of striatal degeneration is likely to be relevant to Huntington's disease for testing new therapeutic strategies.

## CONCLUSION

Intracerebral administration of recombinant IGF-1 leads to a significant increase in the striatal concentration of the factor and is associated with neuroprotection against quinolinate. After *in vitro* demonstration of IGF-1 neuroprotective effect against mutated Htt toxicity [10], the present results, obtained *in vivo*, support the possible use of IGF-1 for slowing striatal degeneration in Huntington's disease.

## REFERENCES

- Harper P (ed.). Huntington's Disease. London: WB Saunders Company Ltd; 1991.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 1993; **72**:971-983.
- Humbert S and Saudou F. Neuronal death in Huntington's disease: multiple pathways for one issue? In: Christen HGM (ed.). *Neuronal Death by Accident or by Design*. Berlin: Springer-Verlag; 2001, pp. 137-152.

- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ and Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 1986; **321**:168-171.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E and Beal MF. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 1993; **119**:46-71.
- Sun Y, Savanenin A, Reddy PH and Liu YF. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *J Biol Chem* 2001; **276**:24713-24718.
- Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P *et al*. Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* 2002; **33**:849-860.
- Alberch J, Perez-Navarro E and Canals JM. Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog Brain Res* 2004; **146**:195-229.
- Dore S, Kar S and Quirion R. Rediscovering an old friend, IGF-I: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 1997; **20**:326-331.
- Humbert S, Bryson EA, Cordelieres FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S *et al*. The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell* 2002; **2**:831-837.
- Saudou F, Finkbeiner S, Devys D and Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998; **95**:55-66.
- Bizat N, Hermel J-M, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S *et al*. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced *in vivo* by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 2003; **23**:5020-5030.
- Greene JG and Greenamyre JT. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 1995; **64**:430-406.
- Roberts RC and DiFiglia M. Short- and long-term survival of large neurons in the excitotoxic lesioned rat caudate nucleus: a light and electron microscopic study. *Exp Neurol* 1989; **3**:363-367.
- Coggeshall RE. A consideration of neuronal counting methods. *Trends Neurosci* 1992; **15**:9-13.
- Mittoux V, Ouary S, Monville C, Lisovski F, Poyot T, Conde F *et al*. Corticostriatal pallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 2002; **22**:4478-4486.
- Guan J, Williams C, Gunning M, Mallard C and Gluckman P. The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J Cerebr Blood Flow Metab* 1993; **13**:609-616.
- Zhu CZ and Auer RN. Intraventricular administration of insulin and IGF-1 in transient forebrain ischemia. *J Cerebr Blood Flow Metab* 1994; **14**:237-242.
- Fernandez AM, de la Vega AG and Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:1253-1258.
- Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD and Gage FH. Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. *Science* 2003; **301**:839-842.
- Alexi T, Hughes PE, van Roon-Mom WM, Faull RL, Williams CE, Clark RG *et al*. The IGF-I amino-terminal tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 1999; **159**:84-97.
- Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Drakenberg K, Giacobini MB, Hakansson L, Mirmiran N *et al*. The biological role of truncated insulin-like growth factor-1 and the tripeptide GPE in the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 1993; **692**:183-191.
- Nystrom FH and Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal* 1999; **11**:563-574.
- Ballif BA and Blenis J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Diff* 2001; **12**:397-408.
- Franke TF, Kaplan DR and Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 1997; **88**:435-437.

Acknowledgements: We thank Dr Kenneth L. Moya for critical reading of the manuscript. We are grateful to Drs Sandrine Humbert and Frédéric Saudou for sharing their expertise on IGF-I and their enthusiasm in our pilot experiments. This work was supported by CEA and CNRS.

## **Article 2**

Escartin C, Brouillet E, Jacquard C, Mauger G, Hermel JM, Smadja C, Knott G, Deglon N, Hantraye P, Bonvento G (en revision à J. Neuroscience) CNTF-induced activation of astrocytes improves glutamate homeostasis and neuronal survival *in vivo*.

**Section: Development/Plasticity/Repair Neuroscience**  
**Senior Editor: Dr. Pat Levitt**

**Title: CNTF-induced activation of astrocytes improves glutamate homeostasis and neuronal survival *in vivo***

**Abbreviated title:** Improved glutamate handling by reactive astrocytes

**Authors:** Carole Escartin<sup>1</sup>, Emmanuel Brouillet<sup>1</sup>, Carine Jacquard<sup>1</sup>, Gweltas Mauger<sup>1</sup>, Jean-Michel Hermel<sup>1</sup>, Claire Smadja<sup>4</sup>, Graham Knott<sup>5</sup>, Nicole Déglon<sup>2,3</sup>, Philippe Hantraye<sup>1,2,3</sup> and Gilles Bonvento<sup>1</sup>

**Addresses:** <sup>1</sup>CEA CNRS URA 2210, <sup>2</sup>UIIBP and <sup>3</sup>ImaGene Program, Service Hospitalier Frédéric Joliot, Orsay, France. <sup>4</sup>EA 3545, CEP-Université Paris XI, Châtenay-Malabry, France. <sup>5</sup>Institut de Biologie Cellulaire et Morphologie, Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland.

**Corresponding author:**

Gilles Bonvento, PhD  
Service Hospitalier Frédéric Joliot  
CEA CNRS URA 2210  
4 place du général Leclerc  
91401 Orsay. France  
Tel: 331 6986 7758  
Fax: 331 6986 7745  
Mail: [bonvento@shfj.cea.fr](mailto:bonvento@shfj.cea.fr)

**Number of figures:** 8

**Number of pages:** 27

**Keywords:** Activated astrocytes, CNTF, glutamate transporters, rafts, excitotoxicity, neuroprotection

**Acknowledgments**

We thank Dr. P. Gervais for providing 2-[<sup>18</sup>F]-deoxy-D-glucose, A. Christophe and A. Lambrechts for participating in raft and neuroprotection experiments. We thank Dr. J.Y. Thuret for providing technical advice on confocal analysis, Dr. L. Rouquier on microdialysis, Drs. M. Taverna and T. Tran on HPLC. We are grateful to Pr. M. Pechanski for providing access to the safety level 3 laboratory. We acknowledge Pr. K. Tanaka for sharing GLAST and C-ter GLT-1 antibodies, Pr. P. Rosenberg for N-ter GLT-1 antibody and Pr. S. El Mestikawy for VGLUT-1 antibody. We thank Dr. L. Pellerin for critical reading of the manuscript.

**Abstract**

Astrocytes are activated in response to acute brain damage and in the course of chronic neurodegenerative diseases. The functional consequences of this activation are still unclear. While it is well documented that astrocytes play a pivotal role in promoting glutamate homeostasis through their transporters GLAST and GLT-1 in physiological conditions, little is known about their ability to control extracellular glutamate levels when they get activated. To address this question *in vivo*, we used a model of sustained astrocytic activation in the rat striatum through lentiviral gene delivery of ciliary neurotrophic factor (CNTF), an endogenous activator of astrocytes. CNTF-activated astrocytes were hypertrophic and expressed immature intermediate filament proteins throughout the striatum. These activated glial cells also expressed highly glycosylated forms of GLAST and GLT-1, and biochemical purification showed that both these transporters were preferentially redistributed into raft functional membrane micro-domains, which are important for glutamate uptake. GLAST was further recruited into these rafts following an excitotoxic challenge. This marked alteration in the glutamate uptake machinery was associated with improved glutamate handling *in vivo* as assessed by microdialysis and increased glucose uptake during an excitotoxic process. This improvement in glutamate homeostasis and energetic supply protected striatal neurons from excitotoxicity. Together, these data demonstrate that activation of astrocytes *in vivo* leads to marked functional changes that are beneficial for neuronal survival. These pleiotropic cells are, therefore, promising therapeutic targets for several pathological conditions involving defects in glutamate homeostasis.

## Introduction

Astrocytes are involved in several key brain functions such as neurotransmitter recycling, synaptic transmission, energy metabolism regulation and ionic homeostasis (Ransom et al., 2003). Astrocytes clear the excitatory neurotransmitter glutamate from the synapse through their transporters GLAST and GLT-1, a function that is crucial to optimize glutamatergic transmission and to prevent a rise in extracellular concentrations that can trigger excitotoxic cascades (Danbolt, 2001). Indeed, glutamate homeostasis dysfunction is a common feature of several brain disorders such as stroke, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Huntington's disease (HD) (Gegelashvili et al., 2001). While the prominent role of astrocytes in controlling glutamate levels in basal conditions is well documented, the function of activated astrocytes in pathological conditions is still a matter of debate (Kalman, 2004).

Activated astrocytes, defined as hypertrophic cells that overexpress glial fibrillary acidic protein (GFAP) or vimentin, have been observed both after acute insults such as brain trauma, spinal cord injury or ischemia/hypoxia and during chronic neurodegenerative disorders such as HD or Alzheimer's disease (Kalman, 2004). Activated astrocytes could have detrimental effects by forming a glial scar that hampers axonal re-growth through the lesion site (Silver and Miller, 2004) or by producing pro-inflammatory cytokines or toxic molecules (Aschner, 1998). On the other hand, activated astrocytes could favour neuronal survival by secreting trophic factors, regulating ionic concentrations or providing energetic substrates (Eddleston and Mucke, 1993; Liberto et al., 2004; Swanson et al., 2004). The molecular events leading to astrocytic activation following an acute lesion or during chronic degeneration are not fully understood and several members of the cytokine family may be involved, such as ciliary neurotrophic factor (CNTF).

Increase in CNTF concentration leads to astrocyte hypertrophy and GFAP overexpression *in vitro* (Levison et al., 1998) and *in vivo* (Kahn et al., 1995; Winter et al., 1995). In addition, the levels of endogenous CNTF, which lacks a signal peptide sequence and is released after membrane disruption, are increased in conditions associated with astrocytic activation such as mechanical injury (Ip et al., 1993) or excitotoxic lesion (Haas et al., 2004). The induction of CNTF receptor and the activation of the CNTF intracellular signaling pathway (the JAK-STAT pathway) are also observed in activated astrocytes following axotomy (Xia et al., 2002) or



neurochemical insult (Sriram et al., 2004). Finally, astrocyte response to injury is altered in CNTF-knock out mice, despite compensation by other cytokines (Martin et al., 2003). These data support the view that CNTF is involved, among other potential cytokines, in astrocytic activation following brain damage.

To delineate the functional role of activated astrocytes regarding glutamate homeostasis, we have developed an *in vivo* model of astrocytic activation using lentivirus-mediated CNTF overexpression in the rat striatum. CNTF-activated astrocytes were hypertrophic, had an immature phenotype and expressed up-glycosylated forms of both GLAST and GLT-1. These transporters were preferentially localized in raft micro-domains. During an excitotoxic challenge, astrocytic activation was associated with a more efficient recruitment of GLAST into these domains, an improved handling of extracellular glutamate, an increased energetic supply and strong neuroprotective effects *in vivo*.

## Materials and methods

### *Animals and products*

Three-month-old male Lewis rats (weight ~ 300 g, IFFA Credo, France) were used in this study. All experimental procedures were carried out in strict accordance with the recommendations of the EEC (86/609/EEC) for care and use of laboratory animals. All products were purchased from Sigma (Saint-Louis, MO), unless otherwise specified.

### *Injection of lentiviruses*

We used self-inactivated (SIN) lentiviruses that encode either the human CNTF gene (lenti-CNTF) with the export sequence of immunoglobuline or the  $\beta$ -galactosidase gene (lenti-LacZ) under the control of the phosphoglycerate kinase promoter. The production of these lentiviruses has been described elsewhere (Hottinger et al., 2000). Lentiviruses were diluted in vehicle (Veh, 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) with 1% bovine serum albumin) at a final concentration of  $10^5$  ng p24/ml. Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (15 mg/kg) and xylazine (1.5 mg/kg). Suspensions of lenti-CNTF, lenti-LacZ or vehicle were injected stereotaxically in the striatum using a 10  $\mu$ l-Hamilton syringe with a 28 gauge blunt needle (stereotaxic coordinates AP +0.5 mm, L  $\pm$ 3.0 mm from bregma, V -4.5 mm from the dura, with tooth bar set at -3.3 mm). Rats received a total volume of 2  $\mu$ l per striatum at a rate of 0.2  $\mu$ l/min. Rats were either injected bilaterally with the same virus ('Lenti-CNTF', 'Lenti-LacZ' or 'Veh' rats) or were injected with lenti-CNTF and lenti-LacZ in the left and right striatum respectively (lenti-CNTF/lenti-LacZ rats). Control rats received Veh and lenti-LacZ in the left and right striatum respectively (Veh/lenti-LacZ rats). At the end of injection, the needle was left in place for 1 min before being slowly removed. The skin was sutured and rats were allowed to recover. Subsequent experiments were performed two to six months post-infection except for immunoblot and immunohistological experiments that were also done at two weeks post infection.

### *Biochemical analysis*

The striatum of lenti-CNTF, lenti-LacZ or Veh rats was rapidly dissected out on ice from fresh slices (2 slices, 2 mm thick) made in the coronal plane using a steel rat-brain matrix. Tissue samples were homogenized using a glass potter (400 rpm,

20 strokes) in 300  $\mu$ l of buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM orthovanadate with phosphatase inhibitor cocktail 1 (1:100) and protease inhibitor cocktail (Roche, Indianapolis, IN). Western blots were made as described before using ECL detection (Bizat et al., 2003). The antibodies used were raised against actin (1:10,000), connexin 43 (1:250, BD Biosciences, San Jose, CA), dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein (DARPP-32, 1:1,000, Chemicon, Temacula, CA), excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1, 1:1,000, Alpha Diagnostic Int., San Antonio, TX), flotilin-1 (1:500, BD Biosciences), GFAP (1:2,000, Dako, Carpinteria, CA), glutamic acid decarboxylase (GAD, 1:3,000, Chemicon), nestin (1:1,000, BD Biosciences), NMDA receptor subunit 2A (NR2A, 1:500, Santa Cruz, Santa Cruz, CA), NR2B (1:500, Santa Cruz), AMPA/kainate receptor subunit 2 (GluR2, 1:500, Chemicon), Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, 1:1,000), STAT3 (1:1,000, Cell Signaling, Beverly, MA), phospho-STAT3 (Tyr705; 1:1,000, Cell Signaling), vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1, 1:1,000, a kind gift from Pr. El Mestikawy) and vimentin (1:200, Dako). Antibodies directed to the C terminus of GLAST and GLT-1 were a kind gift from Pr. Tanaka (dilution 1:10,000), the antibody directed to the N-terminus of GLT-1 was a kind gift from Pr. Rosenberg (dilution 1:1,000).

*In vitro* deglycosylation of proteins by peptide N-glycosylase F (PNGase F) was made following manufacturer's instructions (New England Biolabs, Ipswich, MA). All reactions were made on ice to avoid aggregation of glutamate transporters.

### *Rafts preparation*

Rafts were purified to evaluate the enrichment of GLAST and GLT-1 in these functional domains in basal conditions and after stimulation with the excitotoxin quinolinate (QA). Rats infected bilaterally with lenti-CNTF or lenti-LacZ (n=3/group) were injected stereotaxically with 40 nmol of QA or PBS (1  $\mu$ l) in the right and left striatum respectively. Fifteen minutes later, the striata were dissected out and rafts were purified by 1h incubation in 1% Brij-58 at 4°C and fractionation through a discontinuous sucrose gradient following the protocol of Butchbach *et al.* (2004). We quantified protein abundance in each fraction collected from the gradient and 30  $\mu$ l of each fraction diluted in a loading buffer was used for immunoblotting as described before. Fractions corresponding to raft micro-domains (fractions n°4 and 5) and

fractions corresponding to detergent-soluble material (fractions n° 8, 9 and 10) were pooled before loading on the same acrylamide gel.

#### *Western blots quantification*

Films were scanned and optical density (O.D.) was measured using the Total Lab image analysis software (3.1 version, Amersham, Piscataway, NJ). Specific O.D. were normalized to actin abundance for experiments on total homogenates. For raft experiments, specific O.D. was normalized according to the amount of protein (in  $\mu\text{g}$ ) loaded on the corresponding lane. A partition ratio was calculated as the ratio of normalized abundance of the transporter in raft fractions to the normalized abundance in raft and soluble fractions (i.e. total abundance) and was expressed as a percentage.

#### *Immunohistochemistry*

Brains from lenti-CNTF, lenti-LacZ and Veh rats (n=5-6/group) were post-fixed in paraformaldehyde 4% in 0.1 M phosphate buffer for one week, and cryoprotected in sucrose solutions. Coronal brain sections (40  $\mu\text{m}$  thick) were cut on a freezing microtome, collected serially (interspace 400  $\mu\text{m}$ ) and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Brain sections were processed for immunohistochemistry with tyramine amplification, as described elsewhere (Mittoux et al., 2002). The primary antibodies used in this study were directed against CD-11b (1:5,000, Serotec, Oxford, UK), GFAP (1:100,000), nestin (1:1,000), Neuronal Nuclei protein (NeuN, 1:10,000, Chemicon), PCNA (1:5,000) and vimentin (1:5,000, Calbiochem).

Some sections were processed for double labeling and studied with confocal microscopy using a Zeiss confocal microscope. After blocking, both primary antibodies were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ : GFAP (1:1,000) and vimentin (1:1,000) or GFAP and nestin (1:500). Fluorescent secondary antibodies were then incubated for 1 h at room temperature at a dilution of 1:200 (anti rabbit AlexaFluor 488, anti mouse AlexaFluor 594, Molecular Probes, Eugene, OR).

#### *Electron microscopy*

Lenti-CNTF and lenti-LacZ rats (n=1/group) were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital and perfused immediately with 0.2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4,

followed by 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in the same buffer. One hour after perfusion, the brains were removed and stored overnight in PBS at 4°C. Sixty  $\mu\text{m}$  vibratome (Leica VT100) sections were cut through the striatal region spanning the lesion site by approximately 1 mm. After washing in cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) the sections were postfixed for 40 min in 1.5% potassium ferrocyanide and 1% osmium tetroxide; then 1 h in 1% osmium tetroxide alone, followed by 40 min in 1% uranyl acetate in 70% ethanol. They were then dehydrated through increasing concentrations of ethanol and finally embedded in Durcupan resin. In both the experimental and control brains, serial thin sections, of 50 nm thickness, were taken at a position approximately 600  $\mu\text{m}$  lateral to the ventralmost extent of the needle track. Sections were contrasted with lead citrate and images captured digitally on a CCD camera inside a Philips CM12 electron microscope at a filament voltage of 80kV.

#### *[<sup>3</sup>H]-D-Aspartate uptake in synaptosomes*

Glutamate transporter function was evaluated by measuring [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate uptake into striatal synaptosomes. The method of Dunlop *et al.* (2003) was followed with slight modifications. Fresh synaptosomes were prepared from lenti-CNTF, lenti-LacZ or Veh striata (n=4/group). These (75  $\mu\text{g}$  protein) were incubated for 6.5 min at room temperature in presence of five concentrations of aspartate (1, 5, 10, 20, 30  $\mu\text{M}$ , made in duplicate) and 0.25  $\mu\text{Ci}$  [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate (16.2 Ci/mmol, Perkin Elmer, Boston, MA). Incorporation of [<sup>3</sup>H]-D-Aspartate in synaptosomes was measured after filtration on glass fiber filters (GF/C, Whatman, Florham Park, NJ) and scintillation counting using Optiphase Hisafe scintillant (Perkin Elmer) and liquid scintillation analyzer (Packard, Meriden, CT). Non-specific uptake was assessed for each aspartate concentration in duplicate with a specific inhibitor of glutamate transporters (L-trans-2,4-PDC, 200  $\mu\text{M}$ , Tocris, Ellisville, MO).  $K_d$  and  $V_m$  were determined by non-linear regression analysis of experimental curves (mean values from four independent experiments/group) following Michaelis-Menten equation using Prism software (Amersham).

#### *Microdialysis and HPLC*

The effects of QA on the extracellular levels of glutamate were assessed *in vivo* with a microdialysis study according to the protocol of Popoli *et al.* (2004) with

some modifications. Lenti-CNTF/lenti-LacZ rats (n=5) or Veh/lenti-LacZ rats (n=4) were placed in a stereotaxic frame under isoflurane anesthesia. The body temperature was maintained at 37°C throughout the experiment with a thermostatic blanket. Rats were implanted with a microdialysis probe (CMA/12, 4mm, cutoff 20 kDa, CMA Microdialysis, North Chelmsford, MA) in each striatum (coordinates : AP +0.8 mm, L  $\pm$  3.5 mm from Bregma, V -6.5 mm from dura). Probes were perfused with artificial cerebrospinal fluid (aCSF, composition in mM: NaCl: 147, KCl: 2.7, CaCl<sub>2</sub>: 1.2, MgCl<sub>2</sub>: 0.85) at a rate of 2  $\mu$ l/min. Rats recovered for 2 h and then, microdialysates were collected every 10 min into a refrigerated fraction collector and frozen at -80°C until analysis. After 30 min of baseline measurement, the probe was perfused with QA (5 mM in aCSF) for 30 min and with aCSF for an additional 60 min to return to baseline. For each rat, the probe location inside the striatum was controlled at the end of the experiment. The glutamate content of samples was determined by reverse-phase high performance liquid chromatographic coupled to a fluorometric detector. Each standard solution or microdialysis sample was pre-column derivatized with o-phthalaldehyde before being injected into a 20  $\mu$ l sample loop (Rheodyne, Rohnert Park, CA). The HPLC system included a solvent delivery pump (Spectra-Physics, Mountain View, CA), a C18, 5  $\mu$ m, 125 x 4 mm column (Macherey-Nagel, Easton, PA) and a fluorescent detector (Jasco, Easton, MD) set at  $\lambda_{ex}$ = 340 nm and  $\lambda_{em}$ = 460 nm. Separation was performed using a fast binary gradient elution according to the method of Kehr (1998). Conditions used were: 0.1 M sodium acetate pH 6.95, methanol, tetrahydrofuran (92.5:5:2.5) as solvent A, and methanol, tetrahydrofuran (97.5:2.5) as solvent B.

### *2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake after quinolinate injection*

Lenti-CNTF, lenti-LacZ or Veh rats (n=4-6/group) were used to evaluate FDG uptake after QA injection. Rats were anesthetized and a catheter implanted in both the femoral artery and vein. Then after being placed in a stereotaxic frame, they were injected with 40 nmol of QA in the right striatum and PBS in the left. Fifteen minutes later, they received an intravenous injection of FDG (1 to 1.5 mCi in 700  $\mu$ l of normal saline) and after a further 45 min, a lethal dose of pentobarbital. The brains were then rapidly removed, frozen in isopentane at -40°C, cut coronally into 20  $\mu$ m sections with a cryostat (interspace 100  $\mu$ m) and dried on a 60°C hot plate. Slides were then processed for autoradiography on BIOMAX MR films (Kodak) for 6 hours

at room temperature. Autoradiograms were digitized and striatal O.D. were measured in both striata for each animal using an image analysis system (Total Lab). The QA-induced increase in FDG uptake was expressed as a percentage of the contralateral, PBS-injected striatum for each section. For each animal, the mean percentage from 20 successive sections that correspond to the maximum QA-induced increase in FDG uptake was calculated.

Rats' temperature was maintained at 37°C throughout the experiment using a thermostatic blanket. Arterial blood samples were taken before and 60 min after QA injection to measure blood glucose level using a Onetouch glucose meter (Lifescan Inc., Milpitas, CA, USA) and arterial pH, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> (ABL5, Radiometer, Copenhagen, Denmark). All these physiological parameters were in the physiological range during the experiment and were not significantly different between groups (data not shown).

#### *Quinolinat lesions*

Lenti-CNTF, lenti-LacZ and Veh (n=7-8/group) were anesthetized with a mixture of ketamine-xylazine, placed in a stereotaxic frame and injected with 80 nmol of QA in the right striatum. Two weeks later, rats were then transcardially perfused with paraformaldehyde 4% (150 ml per animal over 8 min) under deep pentobarbital anesthesia. Brains were processed for NeuN immunohistochemistry (see corresponding paragraph). Determination of the lesion size was made on digitized sections (interspace 200µm) by manually delineating the border of the lesion on each section. The total volume was calculated according to the Cavalieri method (Coggeshall, 1992).

#### *Statistical analysis*

Results are expressed as mean values ± s.e.m. Statistical analysis included one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a *post-hoc* F Scheffé's test. Student paired t-test was performed for left-right comparisons. When considering non parametric variables, we used Kruskal-Wallis test for multiple comparisons followed by Mann-Whitney test for comparisons between pair of groups. The significance level was set at p<0.05.

## Results

### *CNTF overexpression induces a sustained activation of astrocytes*

We first characterized the effect of lentiviral-mediated CNTF overexpression on striatal cells. Injection of the lentiviruses (lenti-CNTF or lenti-LacZ) did not produce any detectable lesion or microglial activation as seen with galloxyanin staining and CD-11b immunolabeling, except for the needle track due to the local mechanical disruption (data not shown). The constitutive release of CNTF by transduced cells induced a noticeable change in astrocyte phenotype in a large part of the striatum, at 2-3 mm from the injection site. This change was visible 15 days post infection and lasted for several months without any sign of diminishing. GFAP immunolabeling was more intense in the lenti-CNTF infected striatum compared to control rats injected with lenti-LacZ (Fig. 1A). CNTF overexpression also led to the re-expression of vimentin and nestin, two intermediate filament proteins that are characteristic of immature astrocytes (Fig. 1B, C). Nestin or vimentin positive astrocytes were absent from the striatum of lenti-LacZ rats except in the vicinity of the needle track and the border of the lateral ventricle while they were present at very high density in the lenti-CNTF group (Fig. 1B, C). CNTF-activated astrocytes appeared hypertrophic with enlarged soma and numerous processes compared to lenti-LacZ rats (Fig. 1D). Immunoblot experiments confirmed that GFAP was overexpressed ( $+68 \pm 2\%$ ,  $p < 0.0001$ , Scheffé's test) and that the expression of vimentin and nestin was induced in the lenti-CNTF infected striatum (Fig. 1E). Activated astrocytes also overexpressed the gap junction-forming connexin 43 as compared to control groups ( $+127 \pm 17\%$ ,  $p < 0.003$ , Scheffé's test, Fig. 1E). Importantly, we did not observe any difference between rats injected with lenti-LacZ or its vehicle (Veh), demonstrating that lentiviral infection and transgenic protein overexpression had no intrinsic effect on the phenotype of astrocytes.

While the total level of expression of STAT3 was the same in all groups, we detected the active, phosphorylated form of STAT3 only in the lenti-CNTF group (Fig. 1F), demonstrating the activation of a CNTF-specific signaling pathway in this group.

To evaluate whether activated astrocytes were new astrocytes originating from progenitor cell proliferation, we studied the cyclin PCNA, whose level of expression is increased during mitosis. We could not detect any rise in PCNA levels in the lenti-CNTF group, contrary to the positive control consisting of embryonic E15 brain (Fig.



1G) and we did not observe any PCNA-positive cells in the lenti-CNTF striatum by immunohistochemistry (data not shown). Dual-label confocal microscopy also demonstrated that vimentin or nestin proteins were co-expressed with GFAP in the same astrocytes at all time points considered (Fig. 1H). These results suggested that activated astrocytes observed in the lenti-CNTF infected striatum did not result from the proliferation of progenitor cells that would progressively differentiate into new astrocytes but rather corresponded to a sustained transformation of the majority of resident striatal astrocytes towards a more immature and activated phenotype. “Figure 1 “

We then used electron microscopy to characterize CNTF-induced changes in astrocyte morphology at the ultrastructural level. CNTF-activated astrocytes were hypertrophic, filled with bundles of intermediate filaments that occupied a large part of cytoplasm (Fig. 2). All capillaries were found to be wrapped with prominent and enlarged astrocytic endfeet in the lenti-CNTF group. Other structures within the striatum appeared normal at this level of resolution with no discernible changes in the ultrastructure (Fig. 2). “Figure 2 “

The expression of all neuronal proteins studied appeared to be unchanged by CNTF overexpression at all time points considered. In particular, CNTF had no effect on the level of expression of several neuron associated proteins particularly found in the striatum such as DARPP-32, a protein involved in striatal dopamine signaling and GAD, the GABA producing enzyme. Similarly, we detected no difference between groups regarding the expression of neuronal proteins involved in the glutamatergic system such as glutamate receptors subunits (NR2A, NR2B, GluR2), the vesicular glutamate transporter VGLUT1 and the neuronal glutamate transporter EAAC1 (Fig. 3). We then evaluated the effect of this sustained astrocytic activation on glutamate homeostasis, a crucial function regulated by astrocytes. “Figure 3 “

#### *Activated astrocytes express highly glycosylated forms of glutamate transporters*

Astroglial glutamate transporters GLAST and GLT-1 are responsible for the majority of glutamate removal from the extracellular space. Immunoblots using specific antibodies directed against these transporters showed a different immunoblot pattern in lenti-CNTF striata compared to control groups. Both proteins had a higher apparent molecular weight of approximately 5 kDa without any significant change in their total level of expression (Fig. 4A). Since glutamate transporters are

glycosylated, we tested if the higher apparent molecular weight of GLT-1 and GLAST was due to a change in their level of glycosylation. After *in vitro* PNGaseF treatment, deglycosylated glutamate transporters from the three experimental groups presented a similar immunoblot pattern, indicating that CNTF overexpression increased the level of glycosylation of GLAST and GLT-1 (Fig. 4B). “Figure 4 “

We evaluated the effects of GLAST and GLT-1 up-glycosylation on the uptake properties of [<sup>3</sup>H]-D-aspartate -a transportable glutamate analogue- in fresh synaptosomes. We found very similar K<sub>d</sub> values in the three experimental groups (4.7 ± 0.9, 4.9 ± 0.6 and 4.9 ± 0.5 μM for lenti-CNTF, lenti-LacZ and Veh respectively, non significant), demonstrating that increased glycosylation of glutamate transporters did not change their affinity for the substrate. In addition, estimated V<sub>max</sub> (693 ± 36, 708 ± 27 and 697 ± 19 pmol.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup> for lenti-CNTF, lenti-LacZ and Veh respectively) were not different between groups, consistent with a similar level of expression of glutamate transporters in all groups.

Given that the pattern of protein glycosylation is often involved in protein targeting (van Vliet et al., 2003), we studied the sub-cellular localization of these highly glycosylated transporters.

#### *Up-glycosylated glutamate transporters are redistributed into raft micro-domains of activated astrocytes*

A recent report suggested that glial transporters, particularly GLT-1, are found predominantly in lipid rafts (Butchbach et al., 2004). Rafts are functional membrane micro-domains enriched in cholesterol that are involved in molecular sorting, membrane trafficking and signal transduction (Simons and Toomre, 2000). The direct association of glutamate transporters with cholesterol-enriched domains is determinant for a proper activity (Shouffani and Kanner, 1990; Butchbach et al., 2004). We evaluated whether up-glycosylation of transporters was associated with a change in their distribution between raft and non-raft membrane domains in basal conditions. Since glutamate exposure induces a rapid increase in cell-surface expression of GLAST (Duan et al., 1999), we also studied transporters dynamic regulation in conditions of acute rise in glutamate levels. We used the excitotoxin quinolinate (QA) that induces a rapid increase in endogenous extracellular glutamate (Popoli et al., 2004).

Raft purification is based on their properties of resistance to non-ionic detergent at low temperature and their floatability in low density fractions during gradient centrifugation. Rafts were prepared from the striatum of lenti-CNTF and lenti-LacZ rats 15 min after an intrastriatal injection of QA or PBS (n=3/group). Fractionation profiles were obtained and the majority of proteins were recovered in fractions corresponding to detergent-soluble material (Fig. 5A, B). The ratio between the amount of total proteins in raft fractions and those in soluble fractions was not different between groups ( $0.36 \pm 0.04$ ,  $0.36 \pm 0.01$  for lenti-LacZ treated or not with QA and  $0.34 \pm 0.03$ ,  $0.35 \pm 0.06$  for lenti-CNTF treated or not with QA respectively,  $p=0.9$ , Kruskal-Wallis test). Both GLAST and GLT-1 were recovered in low-density fractions corresponding to the raft domains (R), as confirmed by the presence of the protein flotilin-1 (Fig. 5A). Immunoblots using pooled fractions corresponding to rafts and detergent-soluble material clearly showed that a large majority of both GLAST and GLT-1 were found in raft fractions (Fig. 5C, E). Bands in the lenti-CNTF group were fuzzy and had a higher molecular weight, suggestive of highly glycosylated forms (Fig. 5C, E). The partition ratio calculated for each transporter (see methods), indicated that 80% of GLAST and 76% of GLT-1 were in raft fractions in control conditions (Fig. 5D, F). We found that GLAST enrichment into raft fractions was significantly increased in the lenti-CNTF group compared to lenti-LacZ in basal conditions ( $p<0.05$ , Mann Whitney, Fig. 5D). In addition, QA induced a redistribution of GLAST into raft domains in both lenti-LacZ and lenti-CNTF groups ( $p<0.05$  versus basal conditions, Mann Whitney). However, GLAST partition ratio was still significantly higher after QA injection in the lenti-CNTF group than in the lenti-LacZ group, with a nearly complete recruitment into rafts ( $p<0.05$ , Mann Whitney). Up-glycosylated GLT-1 in lenti-CNTF groups was also significantly enriched into raft domains compared to lenti-LacZ ( $p<0.05$ , Mann Whitney Fig. 5F). However, in contrast to GLAST, QA did not produce any further effect on GLT-1 recruitment into rafts in both groups. "Figure 5 "

These results demonstrate that, in CNTF-activated astrocytes, glutamate transporters are redistributed into raft micro-domains where they have a higher ability to take up glutamate (Butchbach et al., 2004). In addition, GLAST is nearly exclusively located into rafts upon QA stimulation. We thus evaluated whether glutamate transporters redistribution into raft domains altered glutamate handling *in vivo* during an exposure to QA.

*CNTF-activation of astrocytes is associated with an improved handling of glutamate*

Microdialysis experiments were performed to measure extracellular glutamate concentrations *in vivo*. Lenti-CNTF/lenti-LacZ rats were implanted with a microdialysis probe in each striatum. After recovery, they were perfused with QA for thirty minutes to evoke glutamate release. QA induced a steep rise in extracellular glutamate levels. While the concentration of glutamate increased by 900% in the lenti-LacZ injected striatum, it was only increased by 330% in the lenti-CNTF injected striatum ( $p < 0.03$ , paired t-test, Fig. 6). After the end of QA infusion, glutamate levels returned to baseline more rapidly in the lenti-CNTF striatum (20 min compared to 40 min in the lenti-LacZ injected striatum). In control animals (Veh/lenti-LacZ rats,  $n=4$ ), both striata showed a similar response to QA infusion in terms of kinetics and maximum glutamate increase (+800% and +940% respectively, not significant, data not shown). “Figure 6 ”

Our results show that astrocytic activation is associated with an improved ability to cope with an increase in extracellular glutamate *in vivo*. Such improvement is likely to be mediated by an enhanced glutamate uptake by glial transporters localized into rafts. Since glutamate uptake by glial transporters is coupled to glucose uptake (Pellerin and Magistretti, 1994), we next evaluated 2-[<sup>18</sup>F]fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake following QA injection in the lenti-CNTF striatum, as an *in vivo* index of glutamate transporter function.

*CNTF-activation of astrocytes is associated with an increased glucose uptake during an excitotoxic process*

To evaluate glucose uptake during the early events of an excitotoxic insult, rats injected bilaterally with lenti-CNTF, lenti-LacZ or Veh received an injection of QA in the right striatum and of PBS in the left with a concomitant intravenous injection of FDG. QA induced a rapid increase in striatal FDG uptake as compared to PBS. This increase was observed in all groups, in a large part of the striatum (Fig. 7A). QA-induced increase in FDG uptake was similar between lenti-lacZ and Veh groups ( $72 \pm 4\%$  and  $64 \pm 4\%$  respectively). In the lenti-CNTF group, this increase was significantly higher ( $87 \pm 7\%$ ,  $p < 0.03$ , Mann-Whitney test, Fig. 7B). Therefore, after QA injection, striatal glucose uptake was more important in the lenti-CNTF group,

possibly reflecting an increased reuptake of excess glutamate by transporters during the excitotoxic process. “Figure 7 “

We evaluated how such improvement in glutamate homeostasis coupled to increased energetic supply could impact long-term neuronal survival after an excitotoxic challenge.

*Activation of astrocytes and improvement in glutamate handling are associated with strong neuroprotective effects against excitotoxicity*

Lenti-CNTF, lenti-LacZ and Veh rats received an intrastriatal injection of QA and the size of the lesion was quantified 15 days later. QA-induced lesions, which appeared as a pale area devoid of NeuN-immunolabeling, were observed in all groups (Fig. 8A). In Veh and lenti-LacZ groups the lesion encompassed nearly one third of the striatum ( $8.9 \pm 1.0$  and  $8.4 \pm 0.9$  mm<sup>3</sup> respectively, Fig. 8B). The lesion size was significantly reduced by more than 75% in the lenti-CNTF group ( $1.9 \pm 0.8$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0.0005$  Scheffé's test), demonstrating that activation of astrocytes by CNTF is associated with strong neuroprotective effects. “Figure 8 ”

## Discussion

### *In vivo model of sustained astrocytic activation by CNTF*

We have developed a model of astrocytic activation using lentivirus-mediated CNTF overexpression in the rat striatum to explore the functional role of activated astrocytes *in vivo*. We used the cytokine CNTF which is an endogenous activator of astrocytes. In several experimental paradigms of brain insults, increase in CNTF levels associated with activation of CNTF signaling pathways has been observed in activated astrocytes (Ip et al., 1993; Xia et al., 2002; Haas et al., 2004; Sriram et al., 2004). We found a robust activation of STAT3 in the lenti-CNTF group, confirming that our *in vivo* model is relevant to astrocytic activation occurring after brain insults since it involves similar molecular mechanisms.

CNTF-activated astrocytes were hypertrophic and expressed a different set of glial proteins as compared to control groups. In the conditions used, there was no evidence of an effect of CNTF overexpression on neuronal phenotypes, suggesting that astrocytes are the primary target of CNTF. Alteration of astrocytes phenotype was stable and lasted for several months without obvious proliferation, demonstrating CNTF's ability to sustain astrocytes in an immature and activated state. This alteration was associated with an increased expression of connexin 43, the main constituent of immature glial gap junctions (Nagy and Rash, 2000), suggesting that CNTF overexpression may also have modified the functional characteristics of astrocytic networks involved in the spatial buffering of glutamate (Giaume and McCarthy, 1996). Part of these phenotypic changes has recently been reported using adenoviral vectors-induced CNTF overexpression in the rat retina, leading to GFAP, GLAST and connexin 43 overexpression, although CNTF effects were not long-lasting (van Adel et al., 2005). Our model of sustained astrocytic activation in the whole striatum offers the possibility to study *in vivo* several complex brain functions that are regulated by astrocytes, such as glutamate homeostasis.

### *CNTF-activated astrocytes express highly glycosylated forms of glutamate transporters that are preferentially localized in rafts*

We found that, in CNTF-activated astrocytes, GLAST and GLT-1 were up-glycosylated without any alteration in their total level of expression or their affinity for their substrate as assessed *ex vivo* on synaptosomes. In contrast, the neuronal glutamate transporter EAAC1 was not altered by CNTF. We also demonstrated that

in activated astrocytes, GLAST and GLT-1 were redistributed into raft micro-domains and that GLAST was even more recruited into rafts upon stimulation with QA. Our data report a new post-translational mechanism of regulation of glutamate transporters through their re-localization into functional raft micro-domains where glutamate uptake is more efficient (Butchbach et al., 2004). Regulatory mechanisms of glutamate uptake reported so far include modulation of mRNA and protein levels of glutamate transporters by several agents such as growth factors, AMPc analogues or neuron-derived factors and modulation of uptake activity by phosphorylation or recruitment to plasma membrane (Danbolt, 2001; Gegelashvili et al., 2001; Robinson, 2002). We speculate that glutamate transporters re-distribution could be mediated by a change in their pattern of glycosylation since N-linked glycans play a pivotal role in protein sorting (van Vliet et al., 2003) and possibly targeting to raft domains (Simons and Ikonen, 1997). Mutagenesis removal of a glycosylation site on GLT-1 leads to its mislocalisation inside cells, consistent with a role of N-glycosylations in the targeting of glutamate transporters (Trotti et al., 2001).

A recent report has demonstrated that association of glutamate transporters with cholesterol enriched rafts is necessary for their proper function (Butchbach et al., 2004). In purified raft fractions, glutamate uptake is more than ten times higher than in non-raft membranes and when these are disrupted after cholesterol removal, uptake is significantly reduced both in cortical culture and purified plasma membrane vesicles, suggesting that glutamate transporter localization in cholesterol-enriched micro-domains is determinant for glutamate uptake (Butchbach et al., 2004). Rafts are highly specialized dynamic domains involved in signal transduction, protein clustering and membrane targeting (Simons and Toomre, 2000). In addition to the presence of cholesterol that is required for glutamate uptake (Shouffani and Kanner, 1990), other mechanisms could improve it. Localization of transporters in rafts could facilitate formation of transporter multimers. GLAST and GLT-1 are known to form homodimers *in vivo* which appear to be the active functional form of these transporters (Haugeto et al., 1996; Gendreau et al., 2004). Finally, rafts serve as signaling platforms that could promote contact between transporters and others potential regulatory proteins such as phosphatases, phosphorylases or glutamate interacting proteins (Gonzalez and Robinson, 2004).

We showed a significant increase in GLAST (and not GLT-1) abundance in raft domains after QA injection *in vivo*, suggesting that GLAST can be rapidly (15

min) recruited to these membrane micro-domains after stimulation. *In vitro* experiments have shown that glutamate exposure induces a rapid increase in cell-surface expression of GLAST through a cytoskeleton-dependent mechanism (Duan et al., 1999). The cytoskeleton, which is markedly altered in CNTF-activated astrocytes (i.e. overexpression of GFAP, nestin and vimentin) and is directly associated with rafts (Golub et al., 2004), could be involved in the almost complete recruitment of GLAST into rafts after QA injection *in vivo*.

Our *in vivo* demonstration that activated astrocytes express up-glycosylated forms of GLT-1 and GLAST, which are enriched in raft micro-domains and can be recruited upon stimulation, constitutes a novel and powerful regulatory mechanism to promote glutamate homeostasis.

#### *Activated astrocytes are more efficient to handle the excitatory neurotransmitter glutamate*

We evaluated the consequence of transporters enrichment in raft domains on glutamate handling *in vivo* using microdialysis. Microdialysis constitutes a useful tool to functionally evaluate glutamate uptake *in situ*, maintaining the spatial organization between raft micro-domains in astrocytic processes and neuronal terminals, an organization that is disrupted when synaptosomes are prepared *ex vivo*. We found that the rise in extracellular glutamate during QA perfusion was significantly reduced when astrocytes were activated. QA triggers excitotoxic processes by over-activating postsynaptic glutamate NMDA receptors and by inducing a massive glutamate outflow through stimulation of presynaptic terminals (Popoli et al., 2004). Several mechanisms could be involved in the reduction in extracellular glutamate rise. CNTF overexpression and/or astrocytic activation could (1) alter NMDA receptors sensitivity to QA, (2) decrease glutamate release from pre-synaptic terminals or (3) increase glutamate clearance by transporters. Our data argue against the two first hypotheses. First, the expression of several neuronal proteins involved in the glutamatergic neurotransmission was not changed by CNTF. Second, QA produced a significant increase in FDG uptake in all groups, suggesting that the early effects of QA on neuronal activity have indeed occurred (i.e. receptor over-stimulation, ionic disturbance and glutamate release). Third, the increase in FDG uptake after QA injection was significantly more important in the lenti-CNTF group. This is a key observation in the context of brain energy metabolism. Glutamate uptake by glial



transporters, which accounts for 80% of total uptake in the striatum (Rothstein et al., 1996), is a metabolic signal since it is coupled to glucose uptake from blood stream and lactate transfer to neurons to sustain their increased energy needs (Pellerin and Magistretti, 1994; Voutsinos-Porche et al., 2003). Therefore, the higher FDG uptake during QA injection in the lenti-CNTF group may reflect an enhanced glutamate uptake by activated astrocytes. In addition, this increase in glucose uptake should help neurons cope with the excitotoxic challenge by providing more energetic substrates. Therefore, our data support the idea that activated astrocytes increase glutamate removal through their transporters enriched in rafts *in vivo*.

#### *The neuroprotective potential of activated astrocytes*

Deregulation of extracellular glutamate levels and excitotoxicity are involved in many acute or chronic neurological disorders such as stroke and neurodegenerative diseases (ALS, HD and Alzheimer's disease). Alterations in glutamate transporters expression or decrease in glutamate uptake have been observed in rodent models of these diseases as well as in patients' brains (Gegelashvili et al., 2001). Activated astrocytes, which have an improved glutamate uptake machinery, may be more efficient in protecting neuronal cells from various insults involving glutamate deregulation. Therefore, activation of astrocytes should be regarded as a potent protective mechanism rather than a deleterious response for brain recovery. We found that CNTF-induced astrocytic activation was associated with marked neuroprotective effects against excitotoxicity. It remains to be determined whether activated astrocytes are also involved in the neuroprotective effects of CNTF in animals models of HD (Mittoux et al., 2002) or in models of motoneuron death that are reminiscent of ALS (Sendtner et al., 1994).

We have demonstrated that CNTF-induced astrocytic activation *in vivo* leads to marked changes in glutamate transporters function and trafficking associated with an increased efficiency in glutamate handling and strong protective effects for striatal neurons. Targeting astrocytes in addition to neurons may constitute a powerful neuroprotective strategy since these pleiotropic cells control several key brain functions that are crucial for neuronal survival and recovery.

## Figure legends

### Figure 1

#### Anatomical and biochemical characterization of CNTF-activated astrocytes

GFAP (A), vimentin (B) and nestin (C) immunohistochemical staining of rat brain sections following intrastriatal injection of lentiviruses encoding either CNTF or LacZ. CNTF increased the level of expression of GFAP (A) and induced the expression of both vimentin (B) and nestin (C) as compared to the control striatum, injected with lenti-LacZ. (D) Enlargement of boxes in B shows that CNTF-activated vimentin-positive astrocytes were hypertrophic and had numerous large processes as compared to labeled astrocytes in the lenti-LacZ striatum that were only visible along the needle track (arrow). (E) Immunoblot analysis confirmed that the level of expression of GFAP was significantly increased in the lenti-CNTF striatum as compared with striata of rats injected with lenti-LacZ or vehicle (Veh) ( $+68 \pm 2\%$   $p < 0.0001$ , Sheffé's test). Vimentin and nestin were only detected in the lenti-CNTF group. CNTF-activated astrocytes also significantly overexpressed connexin 43 ( $+127 \pm 17\%$ ,  $p < 0.001$ , ANOVA and Sheffé's test). (F) The phosphorylated form of STAT3 was only detected in the lenti-CNTF group, while total STAT3 levels were similar in all groups, demonstrating an activation of CNTF-specific signaling pathways. (G) The level of expression of the cyclin PCNA was low and unchanged between groups. By comparison, the embryonic E15 brain (positive control) showed a high level of expression of PCNA due to active proliferation. (H, left panel), Confocal analysis of immunofluorescent double labeling of nestin (red) and GFAP (green) in the lenti-CNTF striatum showed that both filaments were co-expressed in the same cell. (H, right panel) Vimentin (red) and GFAP (green) were also colocalized in the same astrocytes. These results suggest that CNTF alters the phenotype of the vast majority of striatal astrocytes without inducing major proliferation or formation of new astroglial cells. Similar results were obtained at all time points considered (from 2 weeks to 5 months post infection), demonstrating the sustained effect of CNTF. Images are representative of 4-5 animals/ group.

Scale bar: in A, B, C : 1 mm, in D : 50  $\mu\text{m}$  and in H : 20  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2****Ultrastructural characterization of CNTF-activated astrocytes**

Electron micrographs show enlarged astrocytic elements containing an abundance of filaments in the lenti-CNTF striatum (A, C, E), compared with the lenti-LacZ striatum (B, D, F). (A) The blood capillary is partially surrounded by a large astrocytic endfoot (black arrow) compared with that observed in lenti-LacZ striatum (B). At higher magnification, large astrocytic processes (black arrowhead) filled with bundles of filaments (black star) were visible only in the lenti-CNTF striatum (C, E), whereas astrocytic processes appeared as small elements surrounding synapses in the control striatum (D, F). Qualitative assessment of other ultrastructural elements such as synapses (white star), mitochondria (white arrow) or myelin sheets (white arrowhead) did not evidence any change between groups.

Scale bar: 1  $\mu$ m.

**Figure 3****The level of expression of several neuronal markers is not altered by CNTF**

Immunoblots were performed to compare the level of expression of several neuronal proteins in the lenti-CNTF, lenti-LacZ and Veh groups. DARPP-32 and GAD were all expressed at the same level in all groups. Similarly, glutamate receptor subunits NR2A, NR2B and GluR2, the vesicular glutamate transporter VGLUT-1 and the neuronal glutamate transporter EAAC1, which are all involved in glutamatergic neurotransmission were unaltered by CNTF overexpression. Blots are representative of 4-5 animals/group.

**Figure 4****CNTF-activated astrocytes express highly glycosylated glutamate transporters**

(A) Immunoblots show that the two main glial glutamate transporters, GLT-1 and GLAST, present a higher apparent molecular weight of approximately 5 kDa in the lenti-CNTF group compared to the two control groups. This effect was observed with two different GLT-1 antibodies directed against the N and C-terminal parts of the protein respectively. Note that the 66 kDa sharp band detected with the GLT-1 N-ter antibody is not specific. (B) This higher molecular weight was due to a higher level of glycosylation, as demonstrated after treatment with PNGase F, which cleaved N-glycosylation. Deglycosylated forms of GLAST and GLT-1 presented a reduced

molecular weight (due to the loss of glycosylated chains) and had a similar pattern in all groups. Blots are representative of 4-5 animals/ group.

## Figure 5

### Glutamate transporters are preferentially redistributed in raft domains of CNTF-activated astrocytes

(A) Fractionation profiles for GLT-1 and GLAST representative of a control rat. Raft domains (R) are recovered in low-density fractions 4 and 5 which are enriched in flotilin-1, a component of lipid rafts. Fractions 8, 9 and 10 correspond to detergent-soluble material (S) and fraction 11 is made of detergent-insoluble, non-raft, pellet material. An aliquot of total homogenate (T) used to load the discontinuous gradient is also shown on the same gel. (B) Protein content in each fraction was determined. The majority of proteins are found in 'detergent-soluble' fractions even if a detectable amount of proteins is observed in raft fractions (see Ponceau staining). Both GLAST and GLT-1 were enriched in raft domains. (C, E) Pooled fractions corresponding to raft domain membranes (R) and detergent-soluble material (S) were loaded on the same gel. Immunoreactive bands for GLAST (C) and GLT-1 (E) in raft fractions appeared with a fuzzy pattern suggestive of highly glycosylated forms. (D, F) Partition ratio of GLAST and GLT-1: transporter levels were quantified in raft and soluble fractions, normalized according to the protein content in the lane and were used to calculate a partition ratio (normalized abundance in raft to the abundance in raft plus soluble fractions). Both transporters were preferentially localized in raft fractions. (D) GLAST enrichment into raft domains was significantly increased in the lenti-CNTF group. In addition, quinolinate (QA) injection induced a significant re-localization of GLAST into rafts in both lenti-LacZ and lenti-CNTF groups. However, GLAST abundance in raft fractions remained higher in the lenti-CNTF group. (F) GLT-1 was also significantly enriched in rafts of the lenti-CNTF group, but its distribution was not significantly modified by QA injection. Data are mean  $\pm$  s.e.m. n=3/group. \*  $p < 0.05$ , Kruskal Wallis test followed by Mann-Whitney test.

## Figure 6

### QA-induced glutamate increase is reduced in the lenti-CNTF group

Microdialysis experiments were performed on lenti-CNTF/lenti-LacZ rats (n=5) to evaluate extracellular glutamate handling during an excitotoxic challenge with

quinolinate (QA) *in vivo*. QA perfusion through the microdialysis probe (between 30 to 60 min after the beginning of the experiment, black bar) induced a strong increase (+900%) in microdialysate glutamate concentrations in the lenti-LacZ striatum (black square). The QA-induced increase was significantly reduced (+330%) in the lenti-CNTF striatum (open circle). Data are mean  $\pm$  s.e.m., expressed as percentage versus baseline levels. \*  $p < 0.03$ , \*\*  $p < 0.007$ , paired t-test.

### Figure 7

#### **Increase in FDG uptake during an excitotoxic challenge is enhanced in the lenti-CNTF group**

Measurement of FDG uptake *in vivo* was performed by autoradiography after intrastriatal injection of quinolinate (QA). (A) QA injection induced a marked increase in FDG uptake in a large part of the striatum and along the needle track in all groups compared to PBS. (B) In the lenti-CNTF group (n=6), QA-induced increase in FDG uptake was significantly higher as compared to control groups. Data are mean  $\pm$  s.e.m. \*  $p < 0.03$  versus lenti-LacZ (n=5) and  $p < 0.01$  versus Veh groups (n=4), Kruskal-Wallis test followed by Mann Whitney test. Scale bar: 2 mm.

### Figure 8

#### **Astrocytic activation by CNTF is associated with marked neuroprotective effects against quinolinate *in vivo***

Lenti-CNTF (n=7), lenti-LacZ (n=7) or Veh (n=8) rats were injected with QA and long-term neuronal survival was evaluated. (A) A striatal lesion devoid of NeuN labelling was observed in all groups (star). Scale bar: 1 mm. (B) While the size of this lesion was not different between LacZ and Veh groups, it was dramatically reduced in the lenti-CNTF group by more than 75% (\*\* $p < 0.0005$  versus LacZ and Veh, ANOVA and Sheffé's test). Data are mean  $\pm$  s.e.m.

## References

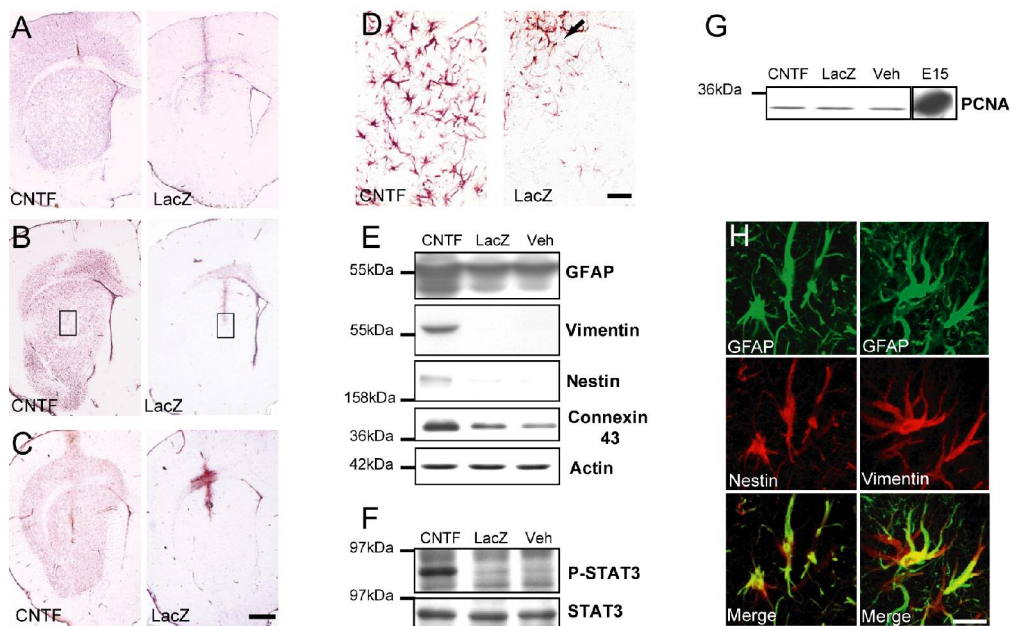
- Aschner M (1998) Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in the CNS. *Neurotoxicology* 19:269-281.
- Bizat N, Hermel J, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E (2003) Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci* 23:5020-5030.
- Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CL (2004) Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J Biol Chem* 279:34388-34396.
- Coggeshall RE (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15:9-13.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 19:10193-10200.
- Dunlop J, Beal Mcllvain H, She Y, Howland DS (2003) Impaired spinal cord glutamate transport capacity and reduced sensitivity to riluzole in a transgenic superoxide dismutase mutant rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 23:1688-1696.
- Eddleston M, Mucke L (1993) Molecular profile of reactive astrocytes-implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54:15-36.
- Gegelashvili G, Robinson MB, Trotti D, Rauen T (2001) Regulation of glutamate transporters in health and disease. *Prog Brain Res* 132:267-286.
- Gendreau S, Voswinkel S, Torres-Salazar D, Lang N, Heidtmann H, Detoro-Dassen S, Schmalzing G, Hidalgo P, Fahlke C (2004) A trimeric quaternary structure is conserved in bacterial and human glutamate transporters. *J Biol Chem* 279:39505-39512.
- Giaume C, McCarthy KD (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19:319-325.
- Golub T, Wacha S, Caroni P (2004) Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts. *Curr Opin Neurobiol* 14:542-550.
- Gonzalez MI, Robinson MB (2004) Neurotransmitter transporters: why dance with so many partners? *Curr Opin Pharmacol* 4:30-35.
- Haas SJ, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, Wree A (2004) Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J Anat* 204:271-281.
- Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.
- Hottinger AF, Azzouz M, Deglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci* 20:5587-5593.
- Ip NY, Wiegand SJ, Morse J, Rudge JS (1993) Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 5:25-33.

- Kahn MA, Ellison JA, Speight GJ, de Vellis J (1995) CNTF regulation of astrogliosis and the activation of microglia in the developing rat central nervous system. *Brain Res* 685:55-67.
- Kalman M (2004) Glial reaction and reactive glia. In: *Non neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction* (Hertz L, ed), pp 787-835. Amsterdam: Elsevier.
- Kehr J (1998) Determination of glutamate and aspartate in microdialysis samples by reversed-phase column liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 708:27-38.
- Levison SW, Hudgins SN, Crawford JL (1998) Ciliary neurotrophic factor stimulates nuclear hypertrophy and increases the GFAP content of cultured astrocytes. *Brain Res* 803:189-193.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092-1100.
- Martin A, Hofmann HD, Kirsch M (2003) Glial reactivity in ciliary neurotrophic factor-deficient mice after optic nerve lesion. *J Neurosci* 23:5416-5424.
- Mittoux V, Ouary S, Monville C, Lisovoski F, Poyot T, Conde F, Escartin C, Robichon R, Brouillet E, Peschanski M, Hantraye P (2002) Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 22:4478-4486.
- Nagy JI, Rash JE (2000) Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 32:29-44.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
- Popoli P, Pintor A, Tebano MT, Frank C, Pepponi R, Nazzicone V, Grieco R, Pezzola A, Reggio R, Minghetti L, De Berardinis MA, Martire A, Potenza RL, Domenici MR, Massotti M (2004) Neuroprotective effects of the mGlu5R antagonist MPEP towards quinolinic acid-induced striatal toxicity: involvement of pre- and post-synaptic mechanisms and lack of direct NMDA blocking activity. *J Neurochem* 89:1479-1489.
- Ransom B, Behar T, Nedergaard M (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 26:520-522.
- Robinson MB (2002) Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem* 80:1-11.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Sendtner M, Dittrich F, Hughes RA, Thoenen H (1994) Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci* 124 Suppl:77-83.
- Shouffani A, Kanner BI (1990) Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J Biol Chem* 265:6002-6008.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 5:146-156.
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31-39.
- Sriram K, Benkovic SA, Hebert MA, Miller DB, O'Callaghan JP (2004) Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J Biol Chem* 279:19936-19947.
- Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 4:193-205.
- Trotti D, Aoki M, Pasinelli P, Berger UV, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *J Biol Chem* 276:576-582.
- van Adel BA, Arnold JM, Phipps J, Doering LC, Ball AK (2005) Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis via modulation of retinal glia in vivo. *J Neurobiol* 63:215-234.
- van Vliet C, Thomas EC, Merino-Trigo A, Teasdale RD, Gleeson PA (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Prog Biophys Mol Biol* 83:1-45.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.
- Winter CG, Saotome Y, Levison SW, Hirsh D (1995) A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5865-5869.
- Xia XG, Hofmann HD, Deller T, Kirsch M (2002) Induction of STAT3 signaling in activated astrocytes and sprouting septal neurons following entorhinal cortex lesion in adult rats. *Mol Cell Neurosci* 21:379-392.

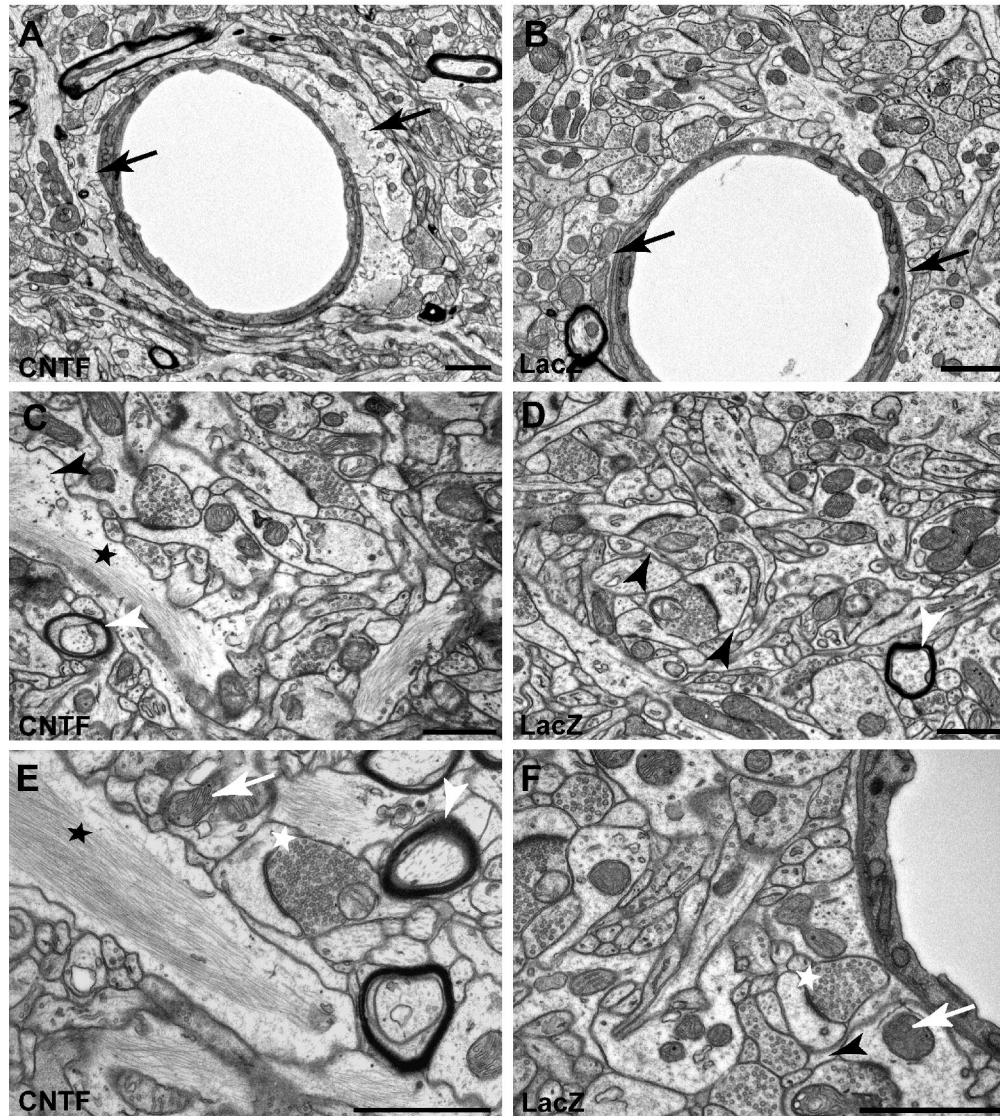


Figure 1



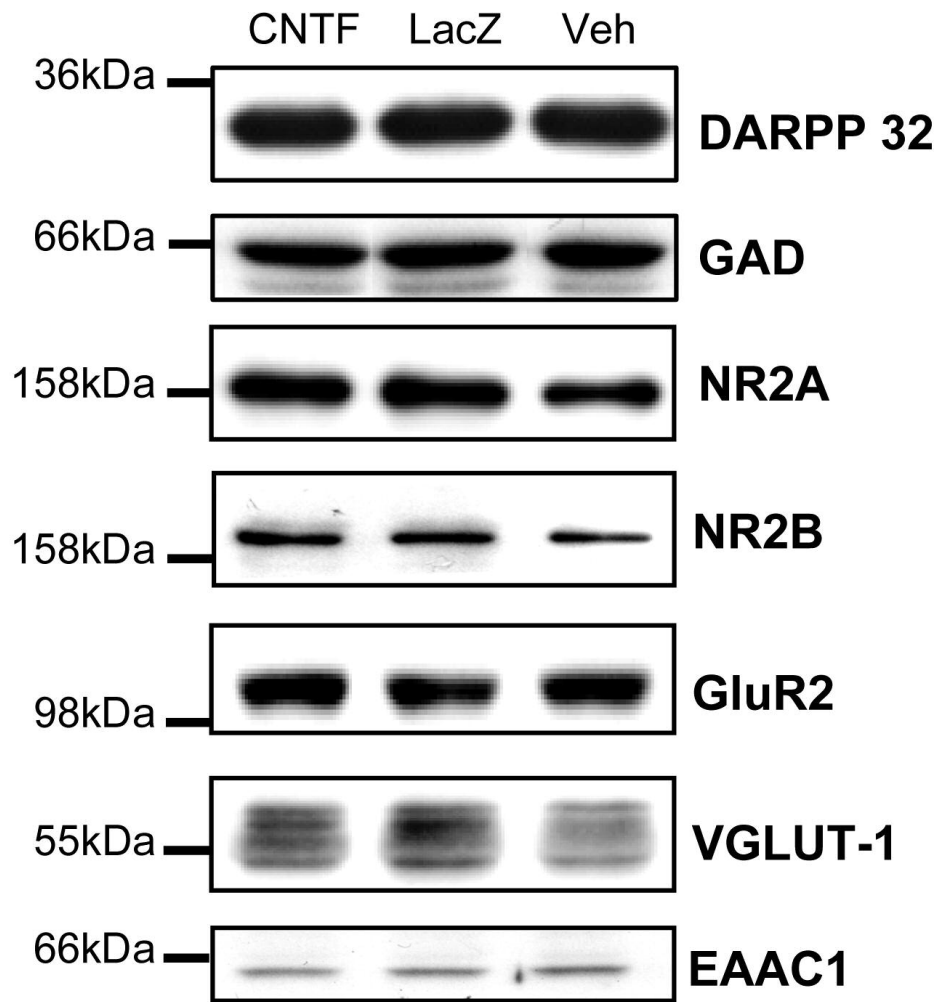
160x110mm (300 x 300 DPI)

Figure 2



154x179mm (600 x 600 DPI)

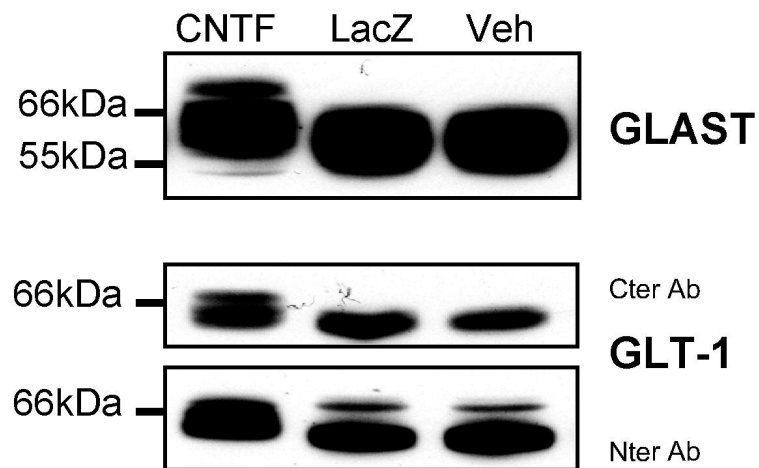
# Figure 3



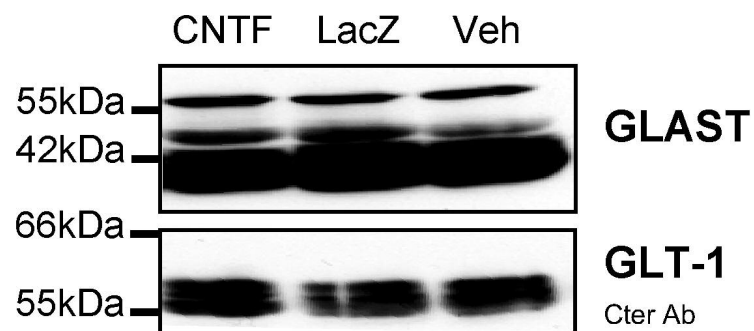
54x70mm (600 x 600 DPI)

## Figure 4

### A

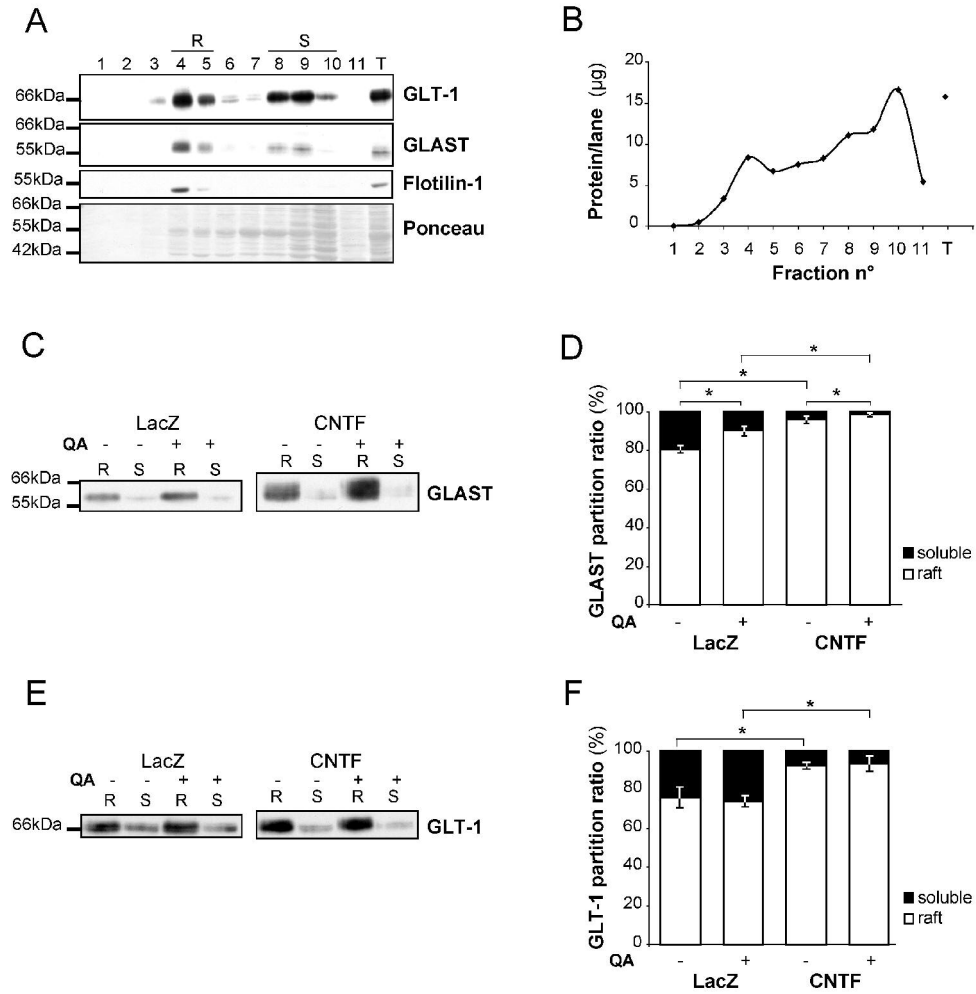


### B



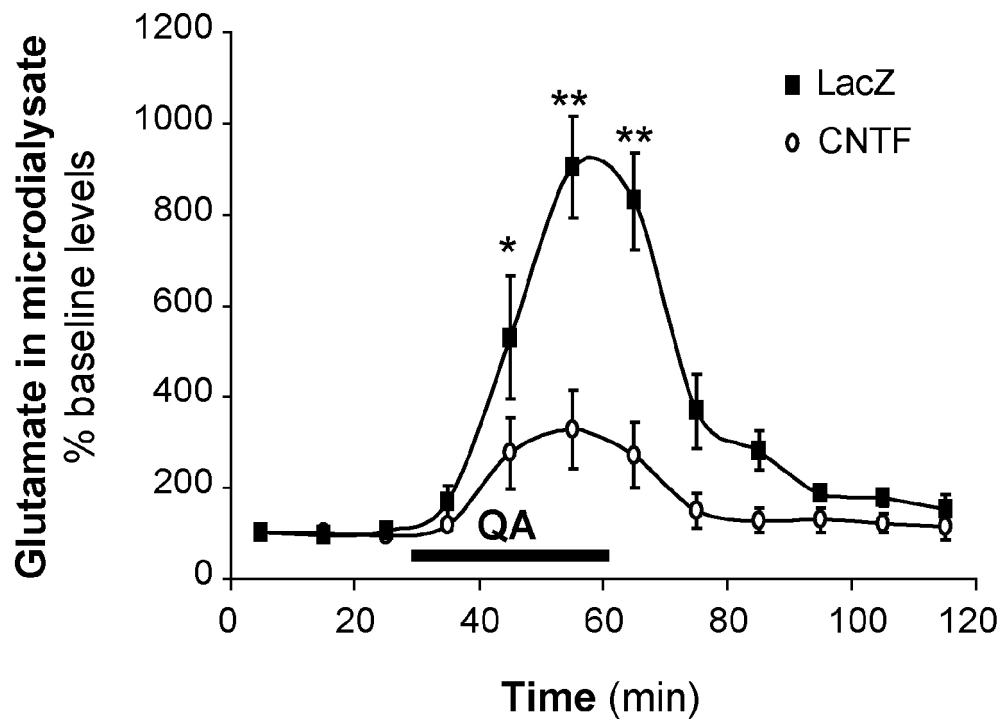
51x78mm (600 x 600 DPI)

Figure 5



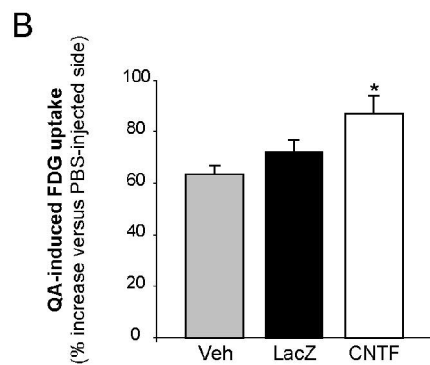
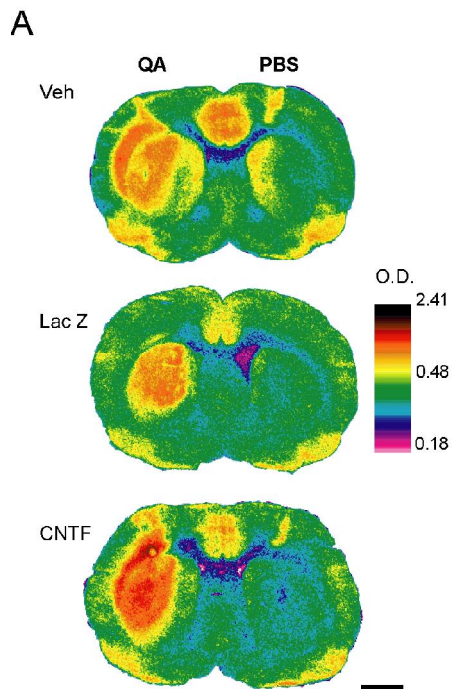
143x153mm (600 x 600 DPI)

Figure 6



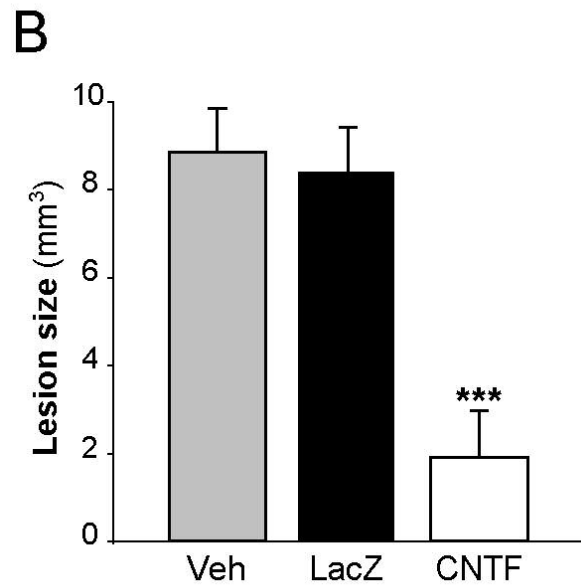
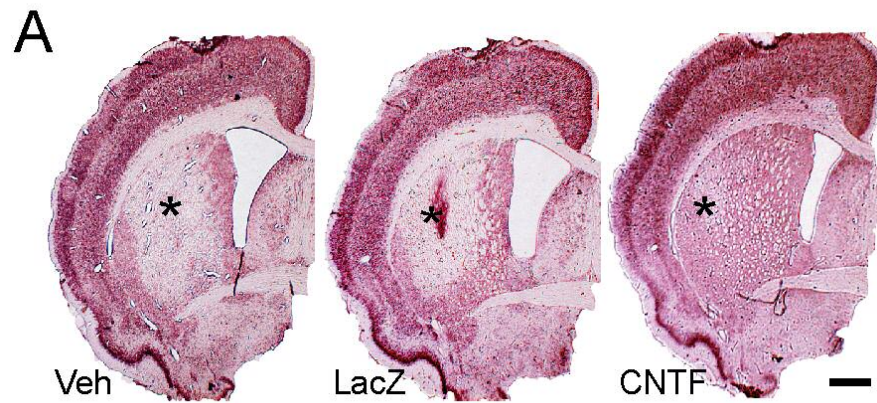
68x65mm (600 x 600 DPI)

Figure 7



66x175mm (300 x 300 DPI)

Figure 8



75x102mm (300 x 300 DPI)



## **Article 3**

Escartin C, Hantraye P, Déglon N. (*sous presse*) Transplants of CNTF producing cells for Huntington's disease. In: Cellular Transplantation: from Laboratory to Clinic

# Transplants of CNTF-producing cells for the treatment of Huntington's disease

Carole Escartin<sup>1</sup>, Philippe Hantraye<sup>1,2</sup> and Nicole Déglon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Atomic Energy Commission, CEA CNRS URA 2210 Unit and ImaGene Program, <sup>2</sup>Isotopic Imaging, Biochemical and Pharmacological Unit, Service Hospitalier Frederic Joliot, CEA, 91401 Orsay, France.

## I. Introduction

## II. Huntington's Disease

### A. Description

1. Clinical features
2. Neuropathological features
3. Aetiology of Huntington's disease

### B. Models of Huntington's disease

1. Phenotypic HD models
2. Genetic HD models

### C. Therapeutic strategies for Huntington's disease

1. Pharmacological approach
2. Cell grafting
3. Neurotrophic factors

## III. Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)

### A. Discovery of CNTF

### B. Neuroprotective effects of CNTF in HD models

1. Neuroprotective effects of CNTF in phenotypic models of HD
2. Neuroprotective effects of CNTF in genetic models of HD

### C. Strategies for CNTF delivery to the brain

1. Osmotic pumps
2. *In vivo* gene therapy
3. Cellular delivery

## IV. Cellular vectors for CNTF delivery in HD

- A. Production and testing of engineered cells
- B. Pre-clinical studies in HD animal models
- V. Clinical phase I trial for encapsulated cells in HD
  - A. Results of the trial
  - B. Perspectives
    - 1. Improving CNTF delivery to patients
    - 2. Other delivery strategies: towards *in vivo* gene therapy
- VI. Conclusions
- References

## **I. Introduction**

Cell grafting provides an efficient and valuable therapeutic solution for several pathologies caused by the dysfunction and/or degeneration of cells or whole organs such as the heart, liver and kidney (see other chapters). Cell grafting also shows great promise for treating several brain disorders, in particular neurodegenerative diseases in which specific neuronal populations die. Among these diseases, Huntington's disease (HD) is a fatal neurological disorder that has no efficient treatment. HD is a genetic disease that is caused by the progressive degeneration of striatal neurons and is accompanied by severe motor and cognitive symptoms (for review see, *1*). In the absence of a specific agent to block disease progression, an alternative therapeutic approach may be to graft embryonic neurons in the striatum to restore the functional integrity of the cortico-striato-pallidal circuitry. Cell grafting may also provide a way to deliver therapeutic molecules locally to vulnerable neurons. The idea here is to help the host neurons fight against disease progression rather than simply grafting new neurons that will be subjected to a deleterious environment. The grafted cells are engineered to release a neurotrophic factor that promotes neuronal function and survival. These cells are implanted in the vicinity of the cells suffering from the disease. This chapter will illustrate this original therapeutic strategy, which has recently been tested in HD patients. The treatment uses encapsulated genetically engineered cells overexpressing ciliary neurotrophic factor (CNTF), a trophic factor for striatal neurons.

## II. Huntington's Disease

### A. Description

#### 1. Clinical features

Huntington's disease is an autosomal dominant genetic neurodegenerative disorder that affects one person in 10 000 in Europe and North America (1). Symptoms first appear around the age of forty years and slowly worsen, leading to death fifteen to twenty years later. The principal clinical features of Huntington's disease are choreiform movements, dyskinesia and dystonia. These movement disorders are associated with frontal-type cognitive deficits and psychiatric disturbances. In addition, patients often suffer mood disorders, depression and personality changes. As the disease progresses, the cognitive alterations aggravate and evolve towards dementia (1).

#### 2. Neuropathological features

Post-mortem studies of HD brains have indicated that this pathology is associated with a severe atrophy of the striatum (caudate and putamen), accompanied by an enlargement of the cerebral ventricles. Within the caudate-putamen complex, the prominent neuronal striatal loss mainly affects GABAergic spiny projection neurons, whereas the striatal interneurons are largely unaffected (2). To a lesser extent, neuronal loss is also visible in some cortical areas, pallidal segments, several thalamic nuclei and the *substantia nigra*. Positron emission tomography (PET) studies have demonstrated striatal hypometabolism measured with 2-[<sup>18</sup>F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose as a tracer even before strong clinical symptoms and massive neuronal loss occur (3).

#### 3. Aetiology of Huntington's disease

In 1993, a key step toward the understanding of the disease aetiology was made when the gene and the mutation involved in HD were characterized (4). The mutation responsible for HD consists of an extension of CAG triplets (which encode the amino acid glutamine) in the N-terminal part of a protein called huntingtin (Htt). Htt is a ubiquitously expressed high molecular weight protein. The normal function of Htt is still not fully known, but the protein is involved in transcriptional control, intracellular trafficking and metabolic regulations (5-8). The elongated polyglutamine tract in the mutated form of Htt (muHtt) seems to confer a toxic

gain of function to the protein by altering the strength of the interaction between Htt and its numerous proteic partners (5, 9). For example, the transcription factor CREB binding protein (CBP) is sequestered by muHtt, which leads to transcriptional alterations (10).

However, neuronal dysfunction and death may also be due to a loss of function of normal Htt. Wild type Htt has been shown to exert anti-apoptotic effects on cultured cells submitted to a wide range of challenges (11). Wild type Htt also increases the level of expression of the neurotrophic factor BDNF (12).

Htt is a substrate for several proteases, such as caspases and calpain (13). Proteolysis of muHtt produces N-terminal fragments that tend to aggregate within neurons. These aggregates, which in most cases are ubiquitinated, are found either in the nucleus or in the dystrophic dendrites of the neurons (14). The physiological/pathological role of these aggregates is still a matter of debate. The aggregates may either trigger the pathological accumulation of proteins inside the cell, thus participating in cellular dysfunction, or help sequester muHtt, preventing its abnormal interactions with key proteins inside neurons (15, 16).

Despite the well defined molecular alteration of a single protein (i.e. polyglutamine repeats), the aetiology of the disease remains complex and multifactorial (For review see, 17). Excitotoxicity, metabolic and mitochondrial dysfunction, transcriptional dysregulation, protein aggregation and apoptosis, are all factors that may be involved in neuronal death in HD.

## ***B. Models of Huntington's disease***

### **1. Phenotypic HD models**

Many valuable animal models of Huntington's disease have been developed. The first models of HD were based on intracerebral injections of excitotoxins, such as quinolinic acid, that trigger striatal degeneration through an NMDA receptor-dependant mechanism. Excitotoxic striatal lesions in rats (18) and primates (19-21) reproduce many of the neuropathological and behavioral deficits typical of HD, including preferential degeneration of GABAergic medium size spiny striatal neurons and dopamine agonist-induced dyskinesia and chorea. Then, mitochondrial inhibitor lesion models have been developed. In particular, systemic administration of the succinate dehydrogenase inhibitor 3-nitropropionic acid (3NP)

induces progressive bilateral lesions in the caudate-putamen complex associated with motor and cognitive symptoms reminiscent of HD (22, 23).

These phenotypic models have been extensively used to test therapeutic compounds or to study the mechanisms involved in the selective degeneration of striatal neurons (24).

## **2. Genetic HD models**

With the discovery of the mutation responsible for HD, genetic models have become available. Different strategies (knock-in, YAC, viral gene transfer) have been used to induce the expression of Htt fragments having varying numbers of polyglutamine repeats. Genetic *in vitro* models have been developed using either non-neuronal (HEK, HN33 cells) or neuronal (PC12, neuroblastoma, ST14A) cell lines. These *in vitro* models have all shown that mutation in the Htt protein triggers several cellular dysfunctions and increases the vulnerability of the cells to apoptotic stimuli (for review see, 25). Aside from cell models, several transgenic mice models of HD have also been developed. Depending on the genetic background, the length of the huntingtin fragment and the regulatory sequences, the phenotypes are slightly different but they reproduce some of the key features of Huntington's disease, such as striatal atrophy, gliosis, aggregate formation and motor deficits. However, transgenic mice models of HD usually present limited neuronal degeneration in the striatum and are therefore not well suited to the study of neuroprotective treatments. Other useful genetic models of HD have been created in invertebrates. A fragment of mutated huntingtin has been expressed in the photoreceptors of *Drosophila* (26) and in the sensory neurons of the nematode *C. Elegans* (27). These invertebrate models of HD allow fast screening of genetic factors that may alter the disease process (28). Genetic models are valuable tools for reproducing and understanding the pathogenic mechanisms linked to Htt mutations and for identifying new potential therapeutic targets (29).

### ***C. Therapeutic strategies for Huntington's disease***

As the cellular and molecular mechanisms involved in neuronal death in HD are still not fully characterized, developing efficient therapies remains a challenge. Until now, symptomatic treatments to relieve depression and mood disorders have been mostly offered to patients suffering from HD. Neuroleptics are also given in an attempt to control dyskinesia. However, none of these treatments is fully satisfactory and several alternative therapeutic strategies are being actively pursued. These strategies can be divided into pharmacological,

restorative and neuroprotective approaches. The pharmacological approach is rather selective in that it targets specific cellular dysfunctions and death pathways. The other two approaches are more global and aim at promoting the general function and survival of striatal neurons.

### **1. Pharmacological approach**

Many different pharmacological agents with known effects against excitotoxicity, apoptotic cascades, metabolic dysfunction or protein aggregation have been developed and tested in various animal models of HD (For review see, 29). Riluzole and remacemide are two anti-excitotoxic agents that have been successfully tested in phenotypic and genetic models of HD (30-32). Anti-apoptotic compounds such as caspase 1, 3 and 8 inhibitors have shown beneficial effects on disease progression in transgenic models of HD (33, 34). Creatine and coenzyme Q10 have been tested as alternative energetic substrates to improve brain metabolic status (35). Other strategies aiming at reducing aggregate formation through transglutaminase inhibition reported an increased survival and a reduction of movements disorders in transgenic HD mice (36). However, aggregate formation may well be a cellular defence mechanism against toxic huntingtin fragments. Therefore, interfering with such a cellular response may accelerate disease progression (37).

Despite these encouraging results, all clinical trials performed to date with these compounds have proven unsuccessful, with only minor or non-significant therapeutic effects (38-43).

### **2. Cell grafting**

A very different therapeutic approach consists of replacing dead striatal neurons with grafted embryonic neurons. Many grafting experiments have shown this restorative strategy to be valuable in both rodents and primates (44-46). Based on these data, clinical trials have been initiated in France (47), the USA (48) and the UK (49). In the next chapter, Dunnett *et al.* present a detailed description of this approach which improves motor and cognitive symptoms, as well as striatal and cortical metabolic deficits (47, 50).

### **3. Neurotrophic factors**

The third approach tries to promote the survival of striatal neurons using neurotrophic factors. Rita Levi-Montalcini *et al.* isolated the first neurotrophic factor, nerve growth factor (NGF), in 1968. Since then, many other neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) or CNTF



have been identified and characterized. These proteins act through different transduction pathways to inhibit developmental cell death, improve neuronal survival or induce neuronal differentiation (51, 52). Although their mechanisms of action are not always well understood, neurotrophic factors offer new opportunities in the treatment of neuronal death in HD. Several neurotrophic factors, such as NGF, BDNF, GDNF and CNTF, have all shown significant neuroprotective effects in several HD models both *in vitro* and *in vivo* (For review see, 53). Among these factors, CNTF seems to be particularly interesting as it protects striatal neurons against several toxic challenges, such as excitotoxicity, metabolic impairment or muHtt toxicity, both *in vitro* and *in vivo*.

### **III. Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF)**

#### ***A. Discovery of CNTF***

CNTF was first described by Adler *et al.* (54) as a factor promoting the survival of neurons of the chick ciliary ganglion *in vitro*. CNTF is a 23 kDa protein that belongs to the alpha-helical cytokine family. It is primarily expressed in the nervous system and is most abundant in the peripheral nerves, olfactory bulb and optic nerve (55). CNTF is expressed by astrocytes in the central nervous system, and Schwann cells in the peripheral nervous system. CNTF lacks a classic signal peptide, and is therefore considered as a ‘lesion factor’ that is only released in the extracellular space when astrocytic plasmatic membranes are disrupted (55). CNTF binds to a tripartite receptor comprising gp130, the LIF receptor  $\beta$ , and the CNTF receptor  $\alpha$  (56). CNTF binding to its receptor triggers the activation of the Jak-Stat pathway which activates the phosphorylation cascade of Jak2 and Stat3/Stat1. Phosphorylated dimers of Stat enter the nucleus and act as transcription factors for a subset of genes that contain promoter consensus sequences composed of TTN<sub>(5)</sub>AA (57). Among them, CNTF increases the level of expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) (58), neuropeptides VIP and somatostatin (59), and of immediate early genes such as *tis-11* and *c-fos* (60). CNTF can also signal through the mitogen activated protein (MAP) kinase pathway and the PI3 kinase pathway (61-63) that mediate broad-range effects inside responsive cells.

CNTF is a pleiotropic molecule that acts on numerous cell types. CNTF induces cholinergic differentiation (64), promotes oligodendrocytes maturation and survival, and improves the myelination process (65, 66). CNTF also induces the differentiation of oligodendrocyte-type-2-astrocyte (O-2A) precursor cells into astrocytes (67). In addition,

CNTF exerts strong neuroprotective and neurotrophic effects on several classes of neurons. CNTF improves photoreceptor survival in several models of retinopathy (For review see, 68). CNTF also has neuroprotective effects in the *pmn* and *woobler* mice models of motoneuronal death (69, 70) and protects from the retrograde neuronal death induced by axotomy (71, 72). Above all, CNTF protects striatal neurons in several animal models of HD.

## ***B. Neuroprotective effects of CNTF in HD models***

### **1. Neuroprotective effects of CNTF in phenotypic models of HD**

The neuroprotective effects of CNTF in HD were first demonstrated in the quinolinate phenotypic rat model (73). Rats that received axokine, a CNTF analogue, in the striatum through an osmotic pump had smaller quinolinate-induced lesions than control groups. The neuroprotective effects of CNTF were later demonstrated in non-human primates using the quinolinate-induced striatal lesion model (74). In this study, CNTF not only protected striatal neurons from the excitotoxic challenge, but also protected the cortical afferent neurons and striatal axonal projections to the *pallidum* and the *substantia nigra pars reticulata*. A subsequent study in a primate model of progressive striatal degeneration — the chronic 3NP model — also demonstrated that CNTF had strong neuroprotective and neurorestorative properties on striatal neurons. In this study, CNTF administration was started only after the appearance of the first motor and cognitive symptoms and was found to protect striatal and cortical neurons from degeneration and also to reverse ongoing motor and cognitive deficits (75).

Many experimental results have since confirmed the neuroprotective properties of CNTF in phenotypic HD models using other delivery systems such as viral vectors (76-78).

### **2. Neuroprotective effects of CNTF in genetic models of HD**

As genetic models of HD became available, the neuroprotective effects of CNTF against the pathogenic mechanisms triggered by muHtt were also studied. Saudou *et al.* were the first to demonstrate neuroprotective effects of CNTF against muHtt toxicity in primary striatal cultures transfected with the N-terminal part of muHtt. In this *in vitro* model, neurons accumulate intracellular aggregates of muHtt fragments and undergo a progressive degeneration through apoptosis. Recombinant CNTF significantly improved cell survival without affecting aggregate formation (79). Recently, the neuroprotective effects of CNTF

were also demonstrated by lentiviral gene transfer in primary cultures of striatal neurons transfected with a fragment of muHtt. In this progressive *in vitro* model of HD, CNTF overexpression prevented neuronal death (80).

Finally, the effects of CNTF were studied in a transgenic mice model of HD by lentiviral gene transfer (81). These mice express the full-length muHtt with 72 CAG repeats in a yeast artificial chromosome (YAC). Mice that were six to seven months old had motor hyperactivity that was significantly reduced by treatment with CNTF. Histological examinations showed a significant decrease in the number of dark cells in the striatum. However, due to the lack of significant neuronal death in this transgenic HD model, clear-cut neuroprotective effects of CNTF were difficult to demonstrate.

Nevertheless, these data show that CNTF is a valuable agent for developing a neuroprotective/neurorestorative therapeutic treatment for HD.

### ***C. Strategies for CNTF delivery to the brain***

Although CNTF is a promising trophic factor for HD treatment, delivering it to the brain in a clinical application is a challenge. CNTF cannot cross the blood-brain barrier that isolates the brain from the rest of the body. Moreover, due to its pleiotropic effects, CNTF injection in the periphery causes major side effects such as weight loss, dry cough, asthenia and fever in patients (82, 83). Consequently, CNTF needs to be delivered directly into the brain. Several strategies have therefore been developed to deliver the protein (see Figure 1).

#### **1. Osmotic pumps**

One strategy has been to use a minipump filled with recombinant protein that is connected to a cannula implanted inside the brain parenchyma, close to the targeted neuronal population. This system allows a regular delivery of protein inside the brain. Alternatively, the cannula can be implanted into the lateral cerebral ventricle (intracerebroventricular infusion) leading to a broader diffusion of the protein inside the brain. Trophic factor delivery through a minipump has already been tested in patients suffering from amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease (83-86).

However, there are some limitations to this approach. First, the therapeutic agent must be stable at body temperature and should tolerate long-term storage inside the pump. Second, the pump must be regularly refilled, which may require repeated surgical interventions. Third,

it is necessary to have a high quantity of peptide inside the pump to reach an optimal concentration of the therapeutic protein inside the brain away from the cannula, which makes this therapeutic strategy very costly.

## **2. *In vivo* gene therapy**

Alternatively, the brain cells themselves could be used to produce directly the therapeutic molecule through genetic manipulation. Such an *in vivo* gene therapy approach relies on viral gene transfer to allow stable expression of the transgenic trophic factor in the immediate vicinity of the targeted cells. Gene transfer can be achieved with several types of viral vectors (such as those derived from adeno-associated viruses, from adenoviruses or from lentiviruses) that can infect non-dividing cells and transfer the transgenic sequence into the host genome. Gene therapy for the nervous system has been largely tested in animals (for review see, 87). Over the last few years, the efficacy and safety of viral vectors have been improving and significant therapeutic effects of several transgenic proteins have been demonstrated. However, the transfer of *in vivo* gene therapy from the bench to the clinic is still a challenge. Only a few therapeutic trials for brain diseases have been launched to date (for review see, 88). The major problems of gene therapy are the large size of the human brain and its relative heterogeneity. Above all, safety concerns still limit this approach and additional experiments regarding the immune response, vector recombination with wild type viruses, mutational insertion and the possibility of shutting down transgene expression are still needed.

## **3. Cellular delivery**

The third approach consists of grafting genetically modified cells expressing the protein of interest within the affected brain region. This strategy can thus be regarded as *ex vivo* gene therapy. Genetically-engineered cells can either be implanted directly into the brain parenchyma (89) or be placed in a capsule of biocompatible polymers, to protect them from host immune response, and then implanted (90). The delivery of therapeutic proteins by means of encapsulated cells has several advantages. It allows a high level of transgene expression by transplanted cells without the need of costly recombinant proteins while still being totally reversible, as encapsulated cells can be retrieved if any side effect is observed.

## IV. Cellular vectors for CNTF delivery in HD

### *A. Production and testing of engineered cells*

Cell encapsulation is based on the immunoisolation of exogenous cells by specific permeable polymer membranes (for review see, 91). The membrane is semi-permeable: it allows the bidirectional transport of small molecules, such as oxygen, nutrients and trophic factors, but stops higher molecular weight molecules, such as antibodies, and prevents contact between encapsulated cells and immune system cells. Therefore, xenogeneic cells can be used and immunosuppressant treatment after implantation is not needed. The biocompatibility of polymer capsules has been extensively tested *in vitro* and *in vivo* (92). The capsules induce a very limited glial/immune response and are well tolerated inside the brain irrespective of the encapsulated cells.

The encapsulated cells are selected according to their availability (expansion, growth capacity), their ability to stably express the gene of interest at a high level and their potential to survive in the environment of the brain parenchyma. Several cell lines have been tested: PC12 cells (93, 94), adrenal chromaffin cells (95) or baby hamster kidney (BHK) fibroblasts (90). In the present study, BHK cells were genetically modified and used for the production of CNTF releasing capsules.

The detailed procedure for BHK-hCNTF production and evaluation has been described by Aebischer *et al.* (90). Briefly, BHK cells were transfected with an expression plasmid containing the human CNTF gene fused to the murine immunoglobulin signal peptide under the mouse metallothionein I promoter. The gene expressing thymidine kinase was inserted into this plasmid allowing transfected cells to be destroyed with gancyclovir in case of capsule disruption.

A BHK-hCNTF clone was selected and a cell bank was produced (92). These encapsulated cells have been extensively tested for tumorigenicity in rodents, sheep and primates and for sensitivity to gancyclovir (92). The capsule was also tested to evaluate the retention capacity for several classes of viruses and was found to be an effective barrier against viral diffusion (96). Finally, the toxicity of secreted CNTF was also evaluated and was shown to be minimal. The genetically modified cells were loaded into a capsule made from polyethersulfone polymer and connected to a silicone tether to allow easy manipulation of the capsule. The production of CNTF can be evaluated before implantation using bioassays and ELISA. Typical CNTF production was around 500 ng/day/10<sup>5</sup> cells.

## ***B. Pre-clinical studies in HD animal models***

Genetically modified encapsulated cells that secrete human CNTF were first tested in rodent models of HD (97). Capsules of BHK cells were implanted in the lateral ventricle of rats before ipsilateral striatal injection of the excitotoxin quinolinate. A significant neuroprotective effect of CNTF was demonstrated. The protection was greater for glutamic acid decarboxylase (GAD) or choline acetyltransferase (ChAT) immuno-positive neurons than for NADPH diaphorase-positive neurons. A reduction in quinolinate-induced lesion size was associated with a beneficial effect on apomorphine-induced rotations.

This therapeutic approach was then tested using the same encapsulation technique in a primate model of the disease. CNTF-secreting cells were implanted prior to quinolinic acid injections in the striatum of cynomolgus monkeys (74). The quinolinate-induced lesion in the striatum was significantly reduced by CNTF production from encapsulated cells, with a net preservation of GABAergic, cholinergic and NADPH diaphorase neurons. DARPP32 immunostaining also showed a preservation of GABAergic innervation of the *pallidum* and *substantia nigra pars reticulata*. More interestingly, histological studies also showed a significant reduction of neuronal atrophy in the layer V of the motor cortex. These neurons send axons to striatal neurons and are also affected although to a lesser extent in HD. These results strongly suggested that the implantation of a capsule of CNTF expressing cells in the striatum may protect the whole basal ganglia circuitry.

This therapeutic strategy has also been tested in the 3NP primate model (75). Besides neuropathological alterations, this model also presents the subtle motor and cognitive dysfunctions seen in HD patients (22, 23). Monkeys chronically treated with 3NP (during five months), showed neuronal loss in the caudate-putamen and prefrontal cortex associated with cognitive deficits and hypokinesia. After two months of 3NP treatment, the implantation of two CNTF-releasing capsules in the caudate and putamen, led to a progressive recovery of motor and cognitive symptoms. Moreover, there was a greatly reduced loss of NeuN and calbindin immunopositive neurons in the striatum and neurofilament protein (NFP)-positive neurons of cortical layer V cortex.

Besides the strong neuroprotective potential of CNTF for vulnerable neuronal populations in HD, these experiments also demonstrated the feasibility and safety of the encapsulation technique. Encapsulated cells were viable and expressed significant levels of CNTF even after several months of implantation. Moreover, capsule implantation in either the

ventricle or striatal parenchyma induced no detectable inflammation or immune response, confirming the biocompatibility of the device.

## **V. Clinical phase I trial for encapsulated cells in HD**

### ***A. Results of the trial***

The strong neuroprotective effects of encapsulated CNTF-producing cells in several animal models of HD and the demonstrated safety of this technique has led to a phase I clinical trial. The clinical protocol has been extensively described by Bachoud-Levi *et al.* (96). The CNTF-secreting BHK cells have been previously used in a phase I clinical trial with patients suffering from amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (90). In this trial, there was a sustained production of CNTF for at least 17 weeks by the capsules and a detectable increase in CNTF levels in the cerebrospinal fluid. No immune response or tissue rejection toward the capsule was observed.

Six HD patients (three men, three women, stage 1-2) were enrolled in the HD trial. A capsule of CNTF-secreting BHK cells was stereotaxically implanted in the right ventricle of each patient. Bloch *et al.* recently reported the outcome of this trial (98). The trial was originally designed to last one year with a capsule being exchanged every six months, but was extended to two years on the request of the enrolled patients to continue the trial. The study originally aimed to evaluate the feasibility and tolerability of intraventricular implantation of capsules of CNTF-secreting cells in patients.

Similar to ALS trial (90), no side effects related to CNTF or the surgical procedure were observed during the two-year follow up. This demonstrates that a local delivery of CNTF inside the brain is a suitable method to avoid CNTF-mediated peripheral effects (weight loss, dry cough, fever). There was no detected immune response or inflammation and the capsules could be retrieved easily every six months without any cell adhesion.

The surgical procedures, capsule implantation and retrieval were well tolerated and validated. However, there were some limitations in the use of BHK cells. Before capsule implantation, the level of released CNTF was highly variable (from 47 to 619 ng CNTF/mL/24h) despite a standardized procedure for capsule production. Above all, the level of CNTF production after capsule retrieval was drastically reduced (approximately 10% of CNTF initial production). Of the 24 capsules implanted, only 11 released CNTF at a rate greater than 10 ng/mL/24h. CNTF levels were detectable in cerebrospinal fluid only with four

capsules. A few surviving cells were observed in explanted capsules and the level of CNTF production was directly related to the rate of BHK cell survival. Therefore, the CNTF levels inside the striatum may have been far below a physiological concentration. This may explain the lack of clinical improvement seen during the trial as assessed by motor, neuropsychological, neurological and neurophysiological tests. A potential benefit of CNTF treatment was only detected using electrophysiological recordings in two patients who had received the most active capsules. Patient 3 recovered a detectable median nerve somatosensory evoked potential for at least nine months after implantation. Patient 6 had normalization of the electromyographic silent period to transcranial magnetic stimulation. Although the exact cellular and electrophysiological basis for these recordings is unknown, alterations of these electrophysiological parameters may be a consequence of dysfunction of neuronal cells and synaptic communications. Accordingly, the loss of somatosensory evoked potential is correlated to a decrease in glucose consumption (99) and the duration of the silent period is correlated to the severity of chorea in HD patients (100). A recovery of both parameters has been observed after successful cell transplants in HD patients (101). The recovery of electrophysiological recordings may be related a neurotrophic effect of CNTF on neurons, improving their survival and function, or to a direct effect of CNTF on neuronal synaptic properties.

Importantly, some patients presented psychiatric disturbances, such as depression and mood disorders after the final capsule retrieval. This may be due to the trial ending and the loss of hope for clinical improvement. These emotions need to be taken into account in the design of future trials.

In conclusion, this clinical phase I trial demonstrated the feasibility and tolerability of repeated intraventricular capsule implantation, with no damageable side effects seen after two years. However, several improvements to the technique are needed to increase the probability of seeing a beneficial effect related to CNTF delivery.

## ***B. Perspectives***

### **1. Improving CNTF delivery to patients**

The main limitations of this trial were the poor delivery of CNTF to striatal neurons, which no doubt prevented the detection of significant therapeutic effects. This can be



attributed to several factors: the low survival of BHK cells, the limited number of implanted capsules (i.e. only one) and the location of the device, which was far from the vulnerable neurons.

There are several explanations for the low survival rate of grafted cells inside brain parenchyma. BHK cells are mitotic cells that lack contact inhibition. Therefore, encapsulated BHK cells tend to divide and proliferate inside the capsule, limiting space and nutrient resources. Dying cells may also form cellular debris that accumulate inside the capsule that may be toxic to resident cells. Therefore, it is necessary to find resistant cells that survive better inside the capsule and express a high level of the trophic factor over long period of time. The use of post-mitotic cells may help the survival and function of the cells inside the capsule. An improved survival rate of the cells will also avoid the need of a surgical procedure every six months to replace the capsule.

Additionally, implanting a higher number of capsules and/or implanting them directly into striatal parenchyma, as in the primate experiment (75), may improve the outcome of the approach. This will certainly lead to a higher CNTF concentration around affected striatal neurons and prevent dilution of CNTF inside cerebrospinal fluid. Recent experiments have shown that the neuroprotective effects CNTF were highly dependant on the distance between encapsulated cells and target neurons (102, 103).

## **2. Other delivery strategies: towards *in vivo* gene therapy**

*In vivo* gene therapy could also be used to obtain high levels of CNTF expression that would be appropriate for a significant physiological effect (both on neuronal survival and clinical symptoms). Viral vectors, such as adeno-associated viruses, lentiviruses or adenoviruses, can transduce high number of cells and lead to stable transgene expression. CNTF-encoding lentiviruses have already shown strong neuroprotective effects in rodent models of HD (76, 77, 81), with no inflammatory response or major side effects being observed. The same encouraging results were obtained with CNTF-encoding adenoviruses in the 3NP-rat model of HD (78). A large number of cells are transduced and the level of expression of human CNTF is high (from 2.8 to 15 ng/mg protein depending on the promoter) and stable overtime (77). Moreover, as CNTF is secreted, the volume of the region in the brain where CNTF effects are visible is high and greatly exceeds the volume of transduced cells (104). The use of viruses may prove to be an answer to some of the problems encountered with encapsulated cells, such as low levels of CNTF expression, limited spatial

diffusion of CNTF through the human striatum and a decrease in CNTF delivery over time. However, additional experiments still need to be carried out, in particular in primate models, to determine the feasibility and safety of this approach. Concerns such as long-term inflammation or immune response and the risk of insertional mutagenesis or recombination of vectors with wild type viruses need to be addressed. A few clinical trials involving gene therapy have already been carried out (for review see, 88). Some used a direct gene transfer by adeno-associated viruses (105, 106), whereas another used *ex vivo* gene therapy with implantation of autologous fibroblasts infected with an NGF encoding retroviral vector (107). This clinical trial performed on 8 Alzheimer's disease patients has already reported beneficial effects in terms of clinical symptoms and brain metabolism (89). However, gene therapy is still in its early days and extensive studies in animal models are required to confirm the feasibility, biosafety and therapeutic efficacy of such treatments.

## **VI. Conclusions**

The transplantation of engineered encapsulated cells has opened up a new field in therapeutic applications. For Huntington's disease, which still lacks a treatment, the possibility of transplanting engineered cells over-expressing CNTF to prevent striatal cell death and alleviate clinical symptoms, may lead to new therapies. The transplantation of encapsulated cells has many advantages compared to standard cell grafting: the method is reversible, does not involve immunosuppressive treatments and provides trophic support for resident neurons through CNTF delivery. However, this technology needs to be improved further in terms of capsule location, choice of encapsulated cells and level of CNTF production. Fundamental and clinical research needs to be continued to evaluate better this original therapeutic strategy with regard to other existing strategies, such as *in vivo* gene therapy or fetal cell transplants. The ultimate goal is to offer the best therapeutic solution to HD patients and families.

## References

1. Harper P., *Huntington's disease*. London, WB Saunders Company Ltd, 1991.
2. Kowall N., Ferrante K.L., Martin J.B., Patterns of cell loss in Huntington's disease. *Trends Neurosci* 1987, 10, 24-29.
3. Kuwert T., Lange H.W., Langen K.J., Herzog H., Aulich A., Feinendegen L.E., Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease. *Brain* 1990, 113 (Pt 5), 1405-1423.
4. TheHuntingonstudygroup, A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993, 72, 971-983.
5. Harjes P., Wanker E.E., The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories. *Trends Biochem Sci* 2003, 28, 425-433.
6. Cattaneo E., Dysfunction of wild-type huntingtin in Huntington disease. *News Physiol Sci* 2003, 18, 34-37.
7. Gunawardena S., Goldstein L.S., Polyglutamine diseases and transport problems: deadly traffic jams on neuronal highways. *Arch Neurol* 2005, 62, 46-51.
8. Cha J.H., Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci* 2000, 23, 387-392.
9. Li S.H., Li X.J., Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 2004, 20, 146-154.
10. Nucifora F.C., Jr., Sasaki M., Peters M.F. *et al.*, Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science* 2001, 291, 2423-2428.
11. Rigamonti D., Bauer J.H., De-Fraja C. *et al.*, Wild-type huntingtin protects from apoptosis upstream of caspase-3. *J Neurosci* 2000, 20, 3705-3713.
12. Zuccato C., Ciammola A., Rigamonti D. *et al.*, Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001, 293, 493-498.
13. Wellington C.L., Leavitt B.R., Hayden M.R., Huntington disease: new insights on the role of huntingtin cleavage. *J Neural Transm Suppl* 2000, 1-17.
14. DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O. *et al.*, Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 1997, 277, 1990-1993.
15. Bates G., Huntington aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet* 2003, 361, 1642-1644.
16. Ross C.A., Poirier M.A., Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004, 10 Suppl, S10-17.
17. Humbert S., Saudou F., Neuronal death in Huntington's disease: multiple pathways for one issue? In Christen H.G.M. ed. *Neuronal death by accident or by design*. Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
18. Beal M.F., Ferrante R.J., Swartz K.J., Kowall N.W., Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 1991, 11, 1649-1659.
19. Hantraye P., Riche D., Maziere M., Isacson O., A primate model of Huntington's disease: behavioral and anatomical studies of unilateral excitotoxic lesions of the caudate-putamen in the baboon. *Exp Neurol* 1990, 108, 91-104.
20. Isacson O., Riche D., Hantraye P., Sofroniew M.V., Maziere M., A primate model of Huntington's disease: cross-species implantation of striatal precursor cells to the excitotoxically lesioned baboon caudate-putamen. *Exp Brain Res* 1989, 75, 213-220.
21. Ferrante R.J., Kowall N.W., Cipolloni P.B., Storey E., Beal M.F., Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 1993, 119, 46-71.

22. Brouillet E., Hantraye P., Ferrante R.J. *et al.*, Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, 92, 7105-7109.
23. Palfi S., Ferrante R.J., Brouillet E. *et al.*, Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996, 16, 3019-3025.
24. Brouillet E., Conde F., Beal M.F., Hantraye P., Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 1999, 59, 427-468.
25. Sipione S., Cattaneo E., Modeling Huntington's disease in cells, flies, and mice. *Mol Neurobiol* 2001, 23, 21-51.
26. Warrick J.M., Paulson H.L., Gray-Board G.L. *et al.*, Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* 1998, 93, 939-949.
27. Faber P.W., Alter J.R., MacDonald M.E., Hart A.C., Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96, 179-184.
28. Kazemi-Esfarjani P., Benzer S., Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* 2000, 287, 1837-1840.
29. Beal M.F., Ferrante R.J., Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 2004, 5, 373-384.
30. Guyot M.C., Palfi S., Stutzmann J.M., Maziere M., Hantraye P., Brouillet E., Riluzole protects from motor deficits and striatal degeneration produced by systemic 3-nitropropionic acid intoxication in rats. *Neuroscience* 1997, 81, 141-149.
31. Ferrante R.J., Andreassen O.A., Dedeoglu A. *et al.*, Therapeutic effects of coenzyme Q10 and remacemide in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurosci* 2002, 22, 1592-1599.
32. Schiefer J., Landwehrmeyer G.B., Luesse H.G. *et al.*, Riluzole prolongs survival time and alters nuclear inclusion formation in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Mov Disord* 2002, 17, 748-757.
33. Ona V.O., Li M., Vonsattel J.P. *et al.*, Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature* 1999, 399, 263-267.
34. Chen M., Ona V.O., Li M. *et al.*, Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med* 2000, 6, 797-801.
35. Ferrante R.J., Andreassen O.A., Jenkins B.G. *et al.*, Neuroprotective effects of creatine in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurosci* 2000, 20, 4389-4397.
36. Karpuj M.V., Becher M.W., Steinman L., Evidence for a role for transglutaminase in Huntington's disease and the potential therapeutic implications. *Neurochem Int* 2002, 40, 31-36.
37. Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R., Finkbeiner S., Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 2004, 431, 805-810.
38. Kremer B., Clark C.M., Almqvist E.W. *et al.*, Influence of lamotrigine on progression of early Huntington disease: a randomized clinical trial. *Neurology* 1999, 53, 1000-1011.
39. TheHuntingtonstudygroup, A randomized, placebo-controlled trial of coenzyme Q10 and remacemide in Huntington's disease. *Neurology* 2001, 57, 397-404.
40. TheHuntingtonstudygroup, Minocycline safety and tolerability in Huntington disease. *Neurology* 2004, 63, 547-549.
41. Seppi K., Mueller J., Bodner T. *et al.*, Riluzole in Huntington's disease (HD): an open label study with one year follow up. *J Neurol* 2001, 248, 866-869.

42. Thomas M., Ashizawa T., Jankovic J., Minocycline in Huntington's disease: a pilot study. *Mov Disord* 2004, 19, 692-695.
43. Verhagen Metman L., Morris M.J., Farmer C. *et al.*, Huntington's disease: a randomized, controlled trial using the NMDA-antagonist amantadine. *Neurology* 2002, 59, 694-699.
44. Hantraye P., Riche D., Maziere M., Isacson O., Intrastriatal transplantation of cross-species fetal striatal cells reduces abnormal movements in a primate model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89, 4187-4191.
45. Palfi S., Conde F., Riche D. *et al.*, Fetal striatal allografts reverse cognitive deficits in a primate model of Huntington disease. *Nat Med* 1998, 4, 963-966.
46. Kendall A.L., Hantraye P., Palfi S., Striatal tissue transplantation in non-human primates. *Prog Brain Res* 2000, 127, 381-404.
47. Bachoud-Levi A.C., Remy P., Nguyen J.P. *et al.*, Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 2000, 356, 1975-1979.
48. Freeman T.B., Hauser R.A., Sanberg P.R., Saporta S., Neural transplantation for the treatment of Huntington's disease. *Prog Brain Res* 2000, 127, 405-411.
49. Rosser A.E., Barker R.A., Harrower T. *et al.*, Unilateral transplantation of human primary fetal tissue in four patients with Huntington's disease: NEST-UK safety report ISRCTN no 36485475. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002, 73, 678-685.
50. Gaura V., Bachoud-Levi A.C., Ribeiro M.J. *et al.*, Striatal neural grafting improves cortical metabolism in Huntington's disease patients. *Brain* 2004, 127, 65-72.
51. Thoenen H., Sendtner M., Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 2002, 5 Suppl, 1046-1050.
52. Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M., Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 2004, 10, 1055-1063.
53. Alberch J., Perez-Navarro E., Canals J.M., Neurotrophic factors in Huntington's disease. *Prog Brain Res.* 2004, 146, 195-229.
54. Adler R., Landa K.B., Manthorpe M., Varon S., Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons. *Science* 1979, 204, 1434-1436.
55. Sendtner M., Carroll P., Holtmann B., Hughes R.A., Thoenen H., Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 1994, 25, 1436-1453.
56. Stahl N., Yancopoulos G.D., The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J Neurobiol* 1994, 25, 1454-1466.
57. Bonni A., Frank D.A., Schindler C., Greenberg M.E., Characterization of a pathway for ciliary neurotrophic factor signaling to the nucleus. *Science* 1993, 262, 1575-1579.
58. Clatterbuck R.E., Price D.L., Koliatsos V.E., Ciliary neurotrophic factor stimulates the expression of glial fibrillary acidic protein by brain astrocytes in vivo. *J Comp Neurol* 1996, 369, 543-551.
59. Rao M.S., Tyrrell S., Landis S.C., Patterson P.H., Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and depolarization on neuropeptide expression in cultured sympathetic neurons. *Dev Biol* 1992, 150, 281-293.
60. Kelly J.F., Elias C.F., Lee C.E. *et al.*, Ciliary neurotrophic factor and leptin induce distinct patterns of immediate early gene expression in the brain. *Diabetes* 2004, 53, 911-920.
61. Kuroda H., Sugimoto T., Horii Y., Sawada T., Signaling pathway of ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cell lines. *Med Pediatr Oncol* 2001, 36, 118-121.
62. Dolcet X., Soler R.M., Gould T.W., Egea J., Oppenheim R.W., Comella J.X., Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Cell Neurosci* 2001, 18, 619-631.
63. Alonzi T., Middleton G., Wyatt S. *et al.*, Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 2001, 18, 270-282.

64. Saadat S., Sendtner M., Rohrer H., Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 1989, 108, 1807-1816.
65. Barres B.A., Burne J.F., Holtmann B., Thoenen H., Sendtner M., Raff M.C., Ciliary neurotrophic factor enhances the rate of oligodendrocyte generation. *Mol Cell Neurosci* 1996, 8, 146-156.
66. Stankoff B., Aigrot M.S., Noel F., Wattilliaux A., Zalc B., Lubetzki C., Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 2002, 22, 9221-9227.
67. Hughes S.M., Lillien L.E., Raff M.C., Rohrer H., Sendtner M., Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 1988, 335, 70-73.
68. Chaum E., Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem* 2003, 88, 57-75.
69. Sendtner M., Schmalbruch H., Stockli K.A., Carroll P., Kreutzberg G.W., Thoenen H., Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 1992, 358, 502-504.
70. Mitsumoto H., Ikeda K., Klinkosz B., Cedarbaum J.M., Wong V., Lindsay R.M., Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science* 1994, 265, 1107-1110.
71. Sendtner M., Kreutzberg G.W., Thoenen H., Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 1990, 345, 440-441.
72. Clatterbuck R.E., Price D.L., Koliatsos V.E., Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90, 2222-2226.
73. Anderson K.D., Panayotatos N., Corcoran T.L., Lindsay R.M., Wiegand S.J., Ciliary neurotrophic factor protects striatal output neurons in an animal model of Huntington disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93, 7346-7351.
74. Emerich D.F., Winn S.R., Hantraye P.M. *et al.*, Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 1997, 386, 395-399.
75. Mittoux V., Joseph J.M., Conde F. *et al.*, Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 2000, 11, 1177-1187.
76. de Almeida L.P., Zala D., Aebischer P., Déglon N., Neuroprotective effect of a CNTF-expressing lentiviral vector in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2001, 8, 433-446.
77. Régulier E., Pereira de Almeida L., Sommer B., Aebischer P., Déglon N., Dose-dependent neuroprotective effect of ciliary neurotrophic factor delivered via tetracycline-regulated lentiviral vectors in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 2002, 13, 1981-1990.
78. Mittoux V., Ouary S., Monville C. *et al.*, Corticostriatopallidal neuroprotection by adenovirus-mediated ciliary neurotrophic factor gene transfer in a rat model of progressive striatal degeneration. *J Neurosci* 2002, 22, 4478-4486.
79. Saudou F., Finkbeiner S., Devys D., Greenberg M.E., Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 1998, 95, 55-66.
80. Zala D., Benchoua A., Brouillet E. *et al.*, Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vectors coding for a mutant huntingtin fragment. *Neurobiol Dis* 2005, in press.

81. Zala D., Bensadoun J.C., Pereira de Almeida L. *et al.*, Long-term lentiviral-mediated expression of ciliary neurotrophic factor in the striatum of Huntington's disease transgenic mice. *Exp Neurol* 2004, 185, 26-35.
82. Cedarbaum J.M., Chapman C., Charatan M. *et al.*, The pharmacokinetics of subcutaneously administered recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to parameters of the acute-phase response. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. *Clin Neuropharmacol* 1995, 18, 500-514.
83. Cedarbaum J.M., Chapman C., Charatan M. *et al.*, A phase I study of recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis. The ALS CNTF Treatment Study (ACTS) Phase I-II Study Group. *Clin Neuropharmacol* 1995, 18, 515-532.
84. Olson L., Backlund E.O., Ebendal T. *et al.*, Intraputaminial infusion of nerve growth factor to support adrenal medullary autografts in Parkinson's disease. One-year follow-up of first clinical trial. *Arch Neurol* 1991, 48, 373-381.
85. Penn R.D., Kroin J.S., York M.M., Cedarbaum J.M., Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* 1997, 40, 94-99; discussion 99-100.
86. Gill S.S., Patel N.K., Hotton G.R. *et al.*, Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003, 9, 589-595.
87. Davidson B.L., Breakefield X.O., Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003, 4, 353-364.
88. Déglon N., Hantraye P., Viral vectors as tools to model and treat neurodegenerative disorders. *J Gene Med* 2005, 7, 530-539.
89. Tuszynski M.H., Thal L., Pay M. *et al.*, A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med* 2005, 11, 551-555.
90. Aebischer P., Schlupe M., Déglon N. *et al.*, Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 1996, 2, 696-699.
91. Emerich D.F., Salzberg H.C., Update on immunoisolation cell therapy for CNS diseases. *Cell Transplant* 2001, 10, 3-24.
92. Aebischer P., Pochon N.A., Heyd B. *et al.*, Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogenic cell line engineered to secrete hCNTF. *Hum Gene Ther* 1996, 7, 851-860.
93. Winn S.R., Tresco P.A., Zielinski B., Greene L.A., Jaeger C.B., Aebischer P., Behavioral recovery following intrastriatal implantation of microencapsulated PC12 cells. *Exp Neurol* 1991, 113, 322-329.
94. Kordower J.H., Liu Y.T., Winn S., Emerich D.F., Encapsulated PC12 cell transplants into hemiparkinsonian monkeys: a behavioral, neuroanatomical, and neurochemical analysis. *Cell Transplant* 1995, 4, 155-171.
95. Aebischer P., Tresco P.A., Sagen J., Winn S.R., Transplantation of microencapsulated bovine chromaffin cells reduces lesion-induced rotational asymmetry in rats. *Brain Res* 1991, 560, 43-49.
96. Bachoud-Levi A.C., Déglon N., Nguyen J.P. *et al.*, Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF. *Hum Gene Ther* 2000, 11, 1723-1729.
97. Emerich D.F., Lindner M.D., Winn S.R., Chen E.Y., Frydel B.R., Kordower J.H., Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996, 16, 5168-5181.

98. Bloch J., Bachoud-Levi A.C., Déglon N. *et al.*, Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2004, 15, 968-975.
99. Kuwert T., Noth J., Scholz D. *et al.*, Comparison of somatosensory evoked potentials with striatal glucose consumption measured by positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease. *Mov Disord* 1993, 8, 98-106.
100. Priori A., Berardelli A., Inghilleri M., Polidori L., Manfredi M., Electromyographic silent period after transcranial brain stimulation in Huntington's disease. *Mov Disord* 1994, 9, 178-182.
101. Bachoud-Levi A.C., Remy P., Nguyen J.P. *et al.*, Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 2000, 356, 1975-1979.
102. Emerich D.F., Winn S.R., Neuroprotective effects of encapsulated CNTF-producing cells in a rodent model of Huntington's disease are dependent on the proximity of the implant to the lesioned striatum. *Cell Transplant* 2004, 13, 253-259.
103. Kordower J.H., Isacson O., Emerich D.F., Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible? *Exp Neurol* 1999, 159, 4-20.
104. Lisovoski F., Akli S., Peltekian E. *et al.*, Phenotypic alteration of astrocytes induced by ciliary neurotrophic factor in the intact adult brain, As revealed by adenovirus-mediated gene transfer. *J Neurosci* 1997, 17, 7228-7236.
105. Janson C., McPhee S., Bilaniuk L. *et al.*, Clinical protocol. Gene therapy of Canavan disease: AAV-2 vector for neurosurgical delivery of aspartoacylase gene (ASPA) to the human brain. *Hum Gene Ther* 2002, 13, 1391-1412.
106. Oransky I., Gene therapy trial for Parkinson's disease begins. *Lancet* 2003, 362, 712.
107. Tuszynski M.H., Growth-factor gene therapy for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2002, 1, 51-57.

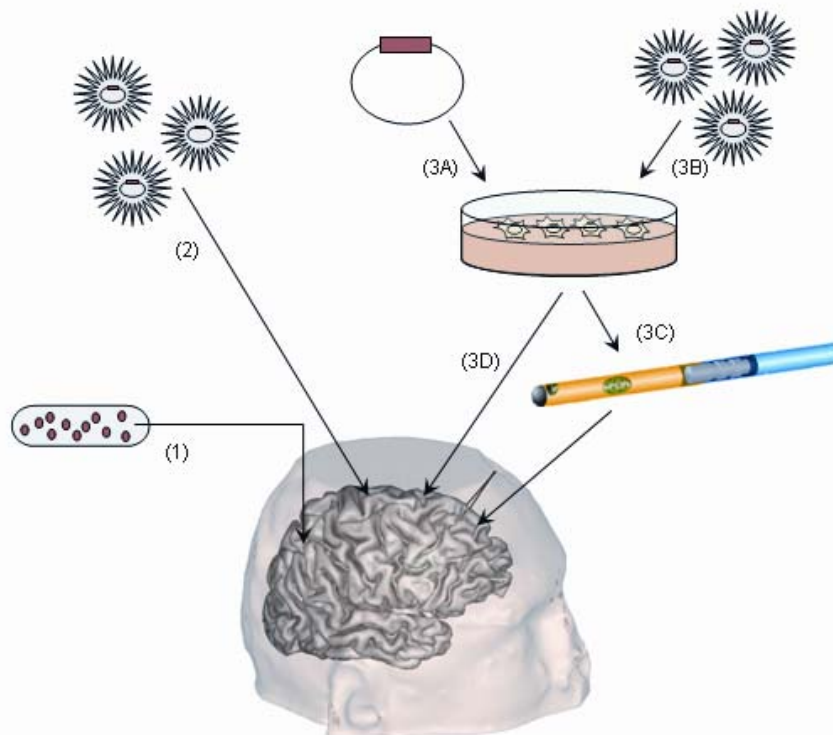


## Figures legends

### Figure 1: Strategies for peptide delivery to the brain

To deliver a therapeutic molecule such as CNTF to brain cells that are naturally isolated from the rest of the body by blood-brain barrier, several strategies can be envisioned:

- (1) Osmotic minipumps filled with recombinant peptide provide a direct way of delivering the protein of interest to the lateral ventricle or directly into the brain parenchyma.
- (2) Viruses that encode the gene of interest are used as vectors to infect targeted cells in the brain. Classical viral vectors used for gene therapy in the central nervous system come from adeno-associated viruses, adenoviruses and lentiviruses.
- (3) Cultured cells can be genetically modified (after transfection with plasmids (3A) or infection with viral vectors (3B)) to express the gene of interest. They can then be grafted in the vicinity of vulnerable neurons. These cells may be encapsulated to protect them from host responses following implantation (3C). Alternatively, transgenic cells can be directly grafted into the affected structure (3D).



## Figure 2: The capsule

The capsule is composed of a polymer membrane filled with engineered cells, closed with glue at one end and connected to a silicone catheter at the other end to facilitate manipulation and retrieval. The cells are surrounded by a matrix to promote the anchorage and survival. The capsule contains a small radio-opaque titanium connector that allows its detection *in vivo* by magnetic resonance or X-ray imaging.

