



HAL
open science

Influence de la maturation cellulaire sur les conséquences d'une hypoxie transitoire dans les neurones centraux en culture : évaluation de la contribution de l'excitotoxicité et des facteurs de transcription

Rafki Chihab

► To cite this version:

Rafki Chihab. Influence de la maturation cellulaire sur les conséquences d'une hypoxie transitoire dans les neurones centraux en culture : évaluation de la contribution de l'excitotoxicité et des facteurs de transcription. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1998. Français. NNT : 1998NAN10298 . tel-01747109

HAL Id: tel-01747109

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01747109>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

13 11540

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
1998

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 12 novembre 1998

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
Mention : Neurosciences

par

Rifki CHIHAB

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies
Biologie, structure et fonction des tissus ostéo-articulaires - Paris VII -

**Influence de la maturation cellulaire sur les conséquences d'une
hypoxie transitoire dans les neurones centraux en culture.
Evaluation de la contribution de l'excitotoxicité
et des facteurs de transcription.**

Membres du jury

Pierre MONIN, Pr, Nancy, *Président*
Catherine VERRECCHIA, Dr, Paris, *Rapporteur*
Elie SALIBA, Pr, Tours, *Rapporteur*
Stéphane MARRET, Pr, Rouen
Jean-Luc DAVAL, Dr, Nancy

BU PHARMACIE



D 104 041186 8

A mes parents...

et à Nahel.

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé
sous la responsabilité du Docteur Jean-Luc DAVAL*

à

*l'unité INSERM 272, Nancy
"Biologie et Pathologie du Développement Humain"
Directeur : Professeur Paul VERT*

puis au sein de la

*Jeune équipe 2164
de l'Université Henri Poincaré Nancy 1
"Adaptation Néonatale et Développement"
Directeur : Professeur Pierre MONIN*

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent:

A Monsieur le Professeur Paul VERT, Directeur de l'Unité 272 de l'INSERM et Chef de Service de Médecine et Réanimation Néonatales - Génétique de la Maternité Régionale de Nancy, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et offert l'opportunité de réaliser ce travail.

A Monsieur le Professeur Pierre MONIN, Chef de Service de Médecine Infantile I à l'Hôpital d'Enfants Nancy - Brabois et Directeur de la Jeune Equipe 2164 de l'Université Nancy I, pour m'avoir permis de poursuivre ce travail et avoir accepté de siéger dans ce jury.

A Monsieur le Docteur Jean-Luc DAVAL, Chargé de Recherche à l'INSERM, pour m'avoir encadré et guidé durant ces 4 années. Qu'il me soit permis d'exprimer toute la sympathie que j'éprouve pour lui et qu'il trouve ici toute ma gratitude pour sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse et la confiance qu'il m'a témoignée. Je lui suis extrêmement reconnaissant.

A Madame le Docteur Catherine VERRECCHIA, Maître de Conférence des Universités à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris (Université Paris V) et à Monsieur le Professeur Elie SALIBA, Chef de Service au Département de Pédiatrie Médicale du Centre de Pédiatrie Gatien de Clocheville de Tours. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail et les conseils qu'ils m'ont prodigués en vue de son amélioration.

A Monsieur le Professeur Stéphane MARRET, Chef de Service de Médecine Néonatale à l'Hôpital Charles Nicolle de Rouen, pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury.

A Madame Violette KOZIEL pour son dévouement sans limites et ses aides innombrables (techniques et autres) et à Madame Anne-Claude HUMBERT pour son aide précieuse.

Aux Docteurs Jean OILLET et Frédéric NICOLAS, anciens étudiants chercheurs pour mes débuts au laboratoire. Qu'il me soit permis de leur exprimer mon amitié.

Au Docteur Jean-François DORIAT qui a joué le rôle de comité de lecture pour ce mémoire.

A Christelle qui a fait preuve de beaucoup de patience.

Enfin, je souhaite du courage à Carine, Valérie, Céline, Stéphanie et Frédéric.

SOMMAIRE



REMERCIEMENTS

SOMMAIRE1

LISTE DES ABREVIATIONS8

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE 10

Introduction11

I. HYPOXIE-ISCHEMIE PERINATALE.....12

A. NEUROPATHOLOGIE.....12

B. MODELES D'ETUDE16

1. Modèles in vivo16

2. Modèles in vitro17

a) Tranches de cerveau18

b) Cultures cellulaires.....18

C. EVENEMENTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES.....20

D. MORT CELLULAIRE.....23

1. Nécrose et Apoptose.....23

a) Nécrose.....23

b) Apoptose.....23

2. Caractéristiques de l'apoptose24

a) Caractéristiques morphologiques.....24

b) Caractéristiques biochimiques24

3. Composantes moléculaires de l'apoptose.....25

a) Gènes de mort cellulaire25

b) Gènes de survie cellulaire27

4. Mécanismes moléculaires de l'apoptose.....28

a) Signal apoptotique28

b) Activation de seconds messagers.....29

c) Protéines kinases et phosphorylation30

d) Facteurs de transcription	30
e) Formation de corps apoptotiques	31
5. Apoptose et cycle cellulaire	32
<i>E. APOPTOSE AU COURS DU DEVELOPPEMENT</i>	<i>34</i>
<i>F. MORT NEURONALE CONSECUTIVE A L'HYPOXIE-ISCHEMIE</i>	<i>36</i>
1. Fragmentation de l'ADN génomique	37
2. Apport des inhibiteurs de la synthèse protéique	38
3. Gènes impliqués	39
II. GLUTAMATE ET HYPOXIE-ISCHEMIE	39
<i>A. ROLES PHYSIOLOGIQUES DU GLUTAMATE</i>	<i>40</i>
<i>B. METABOLISME, STOCKAGE ET LIBERATION DU GLUTAMATE</i>	<i>41</i>
<i>C. RECEPTEURS DU GLUTAMATE</i>	<i>42</i>
1. Complexe récepteur NMDA	42
a) Structure du récepteur NMDA	43
1) Site de liaison du glutamate	43
2) Site de liaison de la glycine	44
3) Canal ionique	44
b) Régulation du récepteur	45
2. Récepteurs AMPA/kainate	46
a) Structure des récepteurs AMPA/kainate	46
b) Pharmacologie des récepteurs AMPA/kainate	47
3. Récepteur L-AP4	48
4. Récepteurs métabotropes	48
<i>D. RECEPTEURS DU GLUTAMATE AU COURS DU DEVELOPPEMENT</i>	<i>50</i>
1. Ontogenèse des récepteurs NMDA	50
2. Ontogenèse des récepteurs non-NMDA	52
<i>E. EXCITOTOXICITE LIEE AU GLUTAMATE</i>	<i>53</i>
1. Concept d'excitotoxicité	53
2. Hypothèse excitotoxique	54
3. Excitotoxicité et rôle du glutamate dans l'hypoxie/ischémie	55
4. Remise en cause de l'hypothèse excitotoxique	57

III. FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET HYPOXIE-ISCHEMIE	58
<i>A. INTRODUCTION</i>	58
1. Définition	58
2. Réponse précoce	59
3. Les protéines Fos et Jun	59
<i>a) Induction des gènes fos et jun</i>	61
<i>b) Régulation de la transcription des gènes fos et jun</i>	63
<i>c) Le complexe nucléoprotéique AP-1</i>	64
<i>d) Structures de liaison à l'ADN et de dimérisation</i>	66
4. Réponses génomiques primaires dans les tissus nerveux	66
5. Autres facteurs de transcription	69
<i>a) Le facteur de transcription c-Myc</i>	69
1) La famille Myc	69
2) Fonctions cellulaires de Myc	70
3) Myc et mort cellulaire	72
<i>b) Les protéines à doigt de zinc</i>	73
<i>B. FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS L'HYPOXIE-ISCHEMIE</i>	74
1. Facteurs de transcription fos et jun	74
2. Autres facteurs de transcription	77
<i>C. VOIE DES KINASES JNK DANS LA MORT CELLULAIRE</i>	78

OBJECTIFS DE L'ETUDE

81

SECTION EXPERIMENTALE	86
METHODOLOGIES	87
I. ANIMAUX.....	88
II. SUPPORTS ET PRODUITS POUR LA CULTURE CELLULAIRE	88
III. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES CENTRAUX.....	89
<i>A. MISE EN CULTURE DES NEURONES.....</i>	<i>89</i>
<i>B. CARACTERISATION DES NEURONES.....</i>	<i>90</i>
IV. EXPOSITION A L'HYPOXIE	91
V. CONTRIBUTION DE L'EXCITOTOXICITE.....	92
<i>A. EXPOSITION AU GLUTAMATE ET SES ANALOGUES.....</i>	<i>92</i>
<i>B. ANTAGONISTES DES RECEPTEURS DU GLUTAMATE.....</i>	<i>92</i>
VI. MORPHOLOGIE CELLULAIRE	93
VII. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE.....	93
<i>A. PRINCIPE</i>	<i>93</i>
<i>B. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....</i>	<i>94</i>
VIII. MESURE DE LA LIBERATION DE LACTATE DESHYDROGENASE.....	94
<i>A. PRINCIPE</i>	<i>94</i>
<i>B. PROTOCOLE EXPERIMENTAL.....</i>	<i>95</i>
IX. MESURE DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE.....	95
X. EVALUATION DES TAUX DE SYNTHESE PROTEIQUE	96
XI. ANALYSE DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROSE.....	96
<i>A. PRINCIPE.....</i>	<i>96</i>
<i>B. MARQUAGE AU DAPI</i>	<i>97</i>
<i>C. DISCRIMINATION ENTRE NECROSE ET APOPTOSE.....</i>	<i>97</i>
<i>D. FRAGMENTATION DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE.....</i>	<i>98</i>

XII. EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	99
<i>A. ANTICORPS</i>	<i>99</i>
<i>B. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE.....</i>	<i>100</i>
1. Principe	100
2. Protocole expérimental	100
<i>C. WESTERN BLOTTING</i>	<i>101</i>
1. Principe	101
2. Protocole expérimental	102
<i>a) Extraction des protéines.....</i>	<i>102</i>
<i>b) Electrophorèse en gel de polyacrylamide</i>	<i>102</i>
<i>c) Electrotransfert.....</i>	<i>103</i>
<i>d) Immunorévélation des protéines.....</i>	<i>104</i>
<i>D. INTERACTIONS ADN-PROTEINE</i>	<i>105</i>
1. Principe de la méthode de “retard sur gel”	105
2. Oligonucléotides.....	105
3. Retard sur gel ou gel shift.....	106
<i>a) Marquage des oligonucléotides.....</i>	<i>106</i>
<i>b) Réaction de liaison et électrophorèse.....</i>	<i>106</i>

I. ETUDE DE LA PARTICIPATION DE L'EXCITOTOXICITE AUX DOMMAGES HYPOXIQUES.....108

A. EFFETS DE L'HYPOXIE EN FONCTION DU NIVEAU DE MATURITE NEURONALE..... 108

- 1. Caractérisation du modèle 108**
 - a) Analyse immunohistochimique 108*
 - b) Paramètres physiologiques après hypoxie 109*
- 2. Comparaison des effets de l'hypoxie sur les cultures de neurones de 6 et 13 jours 109**
 - a) Etude de la souffrance neuronale après hypoxie 109*
 - b) Effet de l'hypoxie/réoxygénation sur les propriétés fonctionnelles 110*
 - c) Effet de l'hypoxie/réoxygénation sur les taux d'apoptose et de nécrose 111*
 - d) Fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose 112*

B. ETUDE DES REPONSES EXCITOTOXIQUES EN FONCTION DU NIVEAU DE MATURITE NEURONALE..... 113

- 1. Effets du glutamate sur les cultures de neurones de 6 et 13 jours 113**
 - a) Etude de la souffrance neuronale après exposition au glutamate 113*
 - b) Effet d'une exposition au glutamate sur les propriétés fonctionnelles 114*
 - c) Effet d'une exposition au glutamate sur les taux d'apoptose et de nécrose 114*
 - d) Rôle de la protéine kinase C dans la réponse excitotoxique..... 115*
- 2. Comparaison des effets des analogues du glutamate sur les cultures de neurones de 6 et 13 jours..... 117**
- 3. Influence des antagonistes des récepteurs du glutamate..... 117**

II. CONTRIBUTION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AUX CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE.....119

A. ETUDE DE L'EXPRESSION DES COMPOSANTS DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1 A LA SUITE D'UN EPISODE HYPOXIQUE..... 119

- 1. Recherche des facteurs AP-1 dans les cultures primaires de neurones..... 119**
- 2. Expression des protéines appartenant aux familles Fos et Jun au cours de l'hypoxie/réoxygénation 120**
- 3. Activation des kinases JNK1 et JNK3 au cours de l'hypoxie/réoxygénation 122**

B. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DE LA FAMILLE MYC A LA SUITE D'UN EPISODE HYPOXIQUE..... 123

DISCUSSION	124
I. EXAMEN CRITIQUE DU MODELE D'ETUDE	125
<i>A. AVANTAGES</i>	<i>125</i>
<i>B. LIMITES</i>	<i>126</i>
II. CONTRIBUTION DE L'EXCITOTOXICITE AUX CONSEQUENCES D'UNE HYPOXIE TRANSITOIRE	127
<i>A. NEURONES IMMATURES</i>	<i>127</i>
<i>B. NEURONES "PLUS MATURES"</i>	<i>131</i>
III. EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AU COURS DE L'HYPOXIE/REOXYGENATION	136
<i>A. LE FACTEUR AP-1</i>	<i>136</i>
1. Expression basale	136
2. Altérations de la composition du complexe AP-1 au cours de l'hypoxie/réoxygénation	137
<i>B. IMPLICATION DE JNK1 ET JNK3 DANS LA MORT NEURONALE D'ORIGINE HYPOXIQUE</i>	<i>139</i>
<i>C. EXPRESSION DES PROTEINES DE LA FAMILLE MYC</i>	<i>140</i>
 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	 142
ANNEXE (publications relatives au travail présenté)	148
BIBLIOGRAPHIE	150

LISTE DES ABREVIATIONS

2DG	2-D-désoxyglucose
AAE	acides aminés excitateur
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate
AP-1	activated protein 1
ATF	activated transcription factor
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B cell lymphomal leukemia-2
CaRE	calcium-response element
Cdk	cyclin-dependent kinase
Ced	C. elegans cell death protein
CHX	cycloheximide
CRE	cyclic AMP-response element
CREB	cyclic AMP-response element binding protein
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethylsulfoxyde
EGF	epidermal growth factor
ERK	extracellular regulated protein kinase
FGF	fibroblast growth factor
HEPES	N-[12 hydroxyethyl]piperazine-N'-[acide 2-ethanalsulfonique]
ICE	Interleukin-1 β converting enzyme
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LDH	lactate déshydrogénase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK	MEK kinase
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NBQX	tetrahydroxy-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide disodium
NF κ B	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-methyl-D-aspartate
PBS	phosphate buffered saline
PC12	pheochromacytomas 12
PKC	protéine kinase C
PMSF	phenylmethylsulfonylfluoride
PVDF	polyvinylidene difluoride
SAB	sérum albumine bovine
SDS	sodium dodecyl sulfate
SNC	système nerveux central
SRE	serum response element
SVF	sérum de veau foetal
TBS	tris buffered saline
TBST	tris buffered saline-tween 20
TE	tampon Tris-EDTA
TEMED	tetraméthylènediamine
TNF	tumor necrosis factor
<i>trans</i> -ACPD	<i>trans</i> -(\pm)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

De par sa grande immaturité à la naissance qui lui confère une plasticité importante, le cerveau reste particulièrement vulnérable à diverses agressions. Il peut être sujet à des dommages cellulaires secondaires à des perturbations dans l'approvisionnement de substrats nécessaires à sa maturation et la mise en place de fonctions cérébrales normales; l'oxygène apparaît à cet égard comme l'un des facteurs les plus critiques. Par ailleurs, les conséquences lésionnelles d'un épisode hypoxique/ischémique périnatal, ainsi que leurs manifestations cliniques, varient en fonction de l'état maturationnel du système nerveux central.

Les objectifs de ce travail consistent à étudier l'influence de la maturité cellulaire dans la survenue des dommages neuronaux d'origine hypoxique, de corréler ces dommages à l'action des acides aminés excitateurs, principalement le glutamate, et d'analyser le type de mort neuronale provoquée par une exposition à une hypoxie ou au glutamate. Nous avons également analysé la séquence d'induction/répression des protéines ayant un rôle régulateur de la transcription et donc responsables de l'orientation future des neurones vers la mort ou la survie cellulaire.

Après une introduction qui rappelle succinctement quelques thèmes pathogéniques et les modèles d'étude de l'hypoxie-ischémie périnatale ainsi que les mécanismes cellulaires impliqués dans cette pathologie, nous envisagerons la mort cellulaire par apoptose et certains gènes associés. Le rôle du glutamate et des facteurs de transcription seront ensuite abordés, d'abord dans un contexte général puis dans l'hypoxie-ischémie.

I. HYPOXIE-ISCHEMIE PERINATALE

A. NEUROPATHOLOGIE

L'encéphalopathie hypoxique-ischémique au cours de la période périnatale est caractérisée par des faits neuropathologiques et cliniques multiples d'une grande complexité. Elle est fréquente en période périnatale et ses conséquences au niveau cérébral peuvent être graves. Chez l'enfant prématuré et le nouveau-né à terme, l'hypoxie-ischémie demeure la cause majeure de morbidité neurologique (Hill et Volpe, 1981; Volpe, 1995).

En dépit des progrès réalisés dans les soins anténatals, les techniques de monitoring foetal, l'intervention obstétricale et la réanimation des nouveau-nés, l'asphyxie à la naissance demeure associée à une mortalité néonatale ou à des séquelles neurologiques irréversibles. Par ailleurs, l'étendue de ces séquelles peut être estimée par des techniques de neuroimagerie et de monitoring de l'électroencéphalogramme (Muttit *et al.* 1991).

La vulnérabilité du système nerveux central (SNC) est fonction de son degré de maturation et de l'état fonctionnel de la circulation, la vulnérabilité à l'anoxie des neurones matures contrastant avec celle des neurones immatures (Fazekas *et al.*, 1941 ; Jilek, 1970 ; Towfighi *et al.*, 1991 ; Gressens *et al.*, 1991 ; Larroche, 1991). L'animal immature tolère mieux l'anoxie et l'hypoxie que l'animal adulte et le fœtus est plus résistant que le nouveau-né (Duffy *et al.*, 1975 ; Duffy et Vannucci, 1977).

Toutefois, le cerveau en développement reste particulièrement vulnérable pendant la phase de croissance neuronale. Des altérations de l'environnement pendant les différentes périodes du développement périnatal peuvent être responsables de changements structuraux et/ou fonctionnels du SNC (Dobbing et Sands, 1979; Smart, 1991; Morgane *et al.*, 1992).

Le schéma général du développement du SNC est le même pour l'homme et l'ensemble des mammifères. Cependant, la vitesse de croissance et la chronologie des événements par rapport au moment de la naissance diffèrent selon les espèces (Alling, 1985). La nature et l'étendue des séquelles neurologiques dépendent du moment de survenue de l'agression par rapport au profil développemental et de sa durée (Smart, 1991). Chez le rat, la réponse aux perturbations environnementales varie au cours de la maturation cérébrale. C'est ainsi que de la naissance au 20^{ème} jour postnatal, l'organisme est incapable de s'adapter et la résistance à l'anoxie et à l'hypoxie diminue rapidement. De la 4^{ème} à la 5^{ème} semaine de vie, la résistance à l'hypoxie et à l'anoxie est la plus faible. Le rat est adulte à 2 mois, tous les systèmes qui assurent l'homéostasie sont complètement matures, fonctionnellement spécialisés et morphologiquement différenciés. La résistance à l'hypoxie et à l'anoxie augmente alors modérément par rapport à la période précédente (Jilek, 1970).

L'originalité des lésions hypoxiques-ischémiques chez le nouveau-né réside dans leur topographie. Chez le nouveau-né à terme, les zones sélectivement vulnérables sont le cortex, le diencéphale, les noyaux gris centraux, le cervelet, les pédoncules, la protubérance, le bulbe rachidien et la moelle. Dans toutes ces structures, l'atteinte frappe prioritairement la substance grise, ce qui oppose les lésions cérébrales du nouveau-né à terme à celles du prématuré qui siègent majoritairement dans la substance blanche périventriculaire (Volpe, 1995). Toutefois, chez le prématuré, ces lésions ne sont pas exclusivement liées aux accidents hypoxiques-ischémiques mais peuvent être également d'origine inflammatoire mettant alors en jeu les cytokines.

Cliniquement, la nécrose corticale du nouveau-né engendre un état de mal convulsif précoce, prolongé, évoluant vers un coma irréversible. Le cerveau présente un oedème avec aplatissement des ventricules, auxquels s'associe une destruction sous-corticale plus précoce et plus visible que l'atteinte corticale elle-même. L'hippocampe est également affecté, sélectivement au niveau du secteur de Sommer (CA1) et du subiculum (Younkin, 1992; Magny *et al.*, 1994).

Volpe (1995) a regroupé les différentes manifestations de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique périnatale en plusieurs catégories. La plus commune d'entre elles est la nécrose neuronale sélective. Elle coexiste souvent avec les autres lésions dans l'hippocampe, le néocortex cérébral et les noyaux de la base (noyau caudé, putamen et globus pallidus). Les autres régions du cerveau peuvent aussi être sujettes à une telle lésion. S'ajoutent à ce type d'atteinte :

- ✓ la lésion cérébrale parasagittale où les éléments neuronaux sont les plus sévèrement affectés. Cette atteinte représente 40% des anomalies détectées chez les nouveau-nés ayant présenté une hypoxie-ischémie sévère,

- ✓ le status marmoratus impliquant les noyaux de la base et le thalamus,

- ✓ la leucomalacie périventriculaire dont les caractéristiques pathologiques consistent avant tout en une nécrose focale périventriculaire et une nécrose diffuse de la substance blanche,

- ✓ la nécrose cérébrale ischémique focale ou multifocale caractérisée par une dégénérescence neuronale dont la distribution est dépendante de la localisation d'une anomalie d'un ou de plusieurs vaisseaux majeurs. Avec sa distribution vasculaire spécifique, la distinction de cette affection des autres lésions (lésion cérébrale parasagittale et leucomalacie périventriculaire) est parfois difficile (Magny *et al.*, 1994; Volpe, 1995).

Différentes pathologies, en diminuant le débit sanguin cérébral (ischémie), diminuent l'apport en oxygène (hypoxie) au tissu cérébral et sont ainsi à l'origine de lésions neuronales directement liées aux modifications métaboliques subies par les cellules.

Chez l'homme adulte, les causes les plus communes d'altération du débit sanguin sont l'hypertension, l'athérosclérose, l'hémorragie consécutive à une rupture vasculaire ou une obstruction comme la thrombose. Au cours de la période périnatale, les causes principales consistent en une asphyxie intra-utérine, une insuffisance respiratoire

postnatale secondaire à des apnées récurrentes, la persistance d'une circulation de type foetal ou une insuffisance cardiaque consécutive à une maladie cardiaque congénitale (Hill et Volpe, 1981; Volpe, 1995).

Le processus ischémique comprend principalement deux phases. La première associe une hypoxie, voire une anoxie (suppression de l'apport d'oxygène aux tissus) à une hypoglycémie (réduction du taux de glucose sanguin). Cette phase est suivie d'une période de récupération lorsque la circulation se rétablit. Le décalage entre l'hypoxie et la phase de récupération, ainsi que la vitesse de rétablissement de la circulation sont déterminants dans l'apparition des lésions ischémiques. Les lésions du cerveau sont entraînées d'une part par les réactions biochimiques en cascade relatives au manque d'oxygène et, d'autre part, par la baisse des fonctions vitales des cellules. La gravité des lésions ischémiques dépend aussi de l'efficacité de l'apport sanguin supplémentaire assuré par les artères collatérales. En outre, il a été montré que la période de reperfusion s'accompagne de conséquences métaboliques et structurales délétères secondaires à l'hypoxie-ischémie (Volpe, 1995).

Dans de nombreux cas, en période périnatale, l'hypoxie associée ou non à l'ischémie, est le résultat d'une asphyxie qui survient suite à un dérèglement d'échanges gazeux respiratoires. Au cours de l'asphyxie, la caractéristique majeure additionnelle est l'hypercapnie qui résulte d'un certain nombre d'effets métaboliques (acidose) et physiologiques (augmentation initiale du flux sanguin cérébral). L'asphyxie, en période périnatale, affecte de nombreux organes chez le nouveau-né à terme, dont les systèmes cardiaque, pulmonaire, nerveux central, rénal et hématologique. Les effets de l'asphyxie chez l'enfant au cours de la période néonatale ont été étudiés surtout sur le SNC dont les séquelles incluent les déficits moteurs et psychiques (retard mental, troubles de la mémoire et de perception), les convulsions, le coma et la mort (Hill et Volpe, 1982; Ishige *et al.*, 1987; Volpe, 1995).

B. MODELES D'ETUDE

1. Modèles in vivo

Les modèles animaux aident à comprendre l'étendue et les raisons des dommages subis par le tissu cérébral. Le rat et la gerbille sont deux espèces qui se prêtent facilement à l'obtention d'ischémies expérimentales aux conséquences reproductibles (Tamura *et al.*, 1981; Uemura *et al.*, 1991a,b; Gass *et al.*, 1992; Tominaga *et al.*, 1993). L'occlusion des artères carotides chez la gerbille provoque une ischémie avec des manifestations cliniques et des troubles biochimiques, mais l'inexistence des artères communicantes antérieures ou postérieures n'a pu être démontrée dans cette espèce seulement dans 40 à 60% des cas (Delbarre *et al.*, 1988). La vascularisation du cerveau de singe qui, comme celle de l'homme, présente une certaine variabilité interindividuelle conduit à des résultats plus proches de la pathologie humaine. Toutefois, l'étude d'un grand nombre d'animaux est nécessaire pour l'obtention de résultats homogènes (Abe *et al.*, 1991; Linnik *et al.*, 1993; Aoki *et al.*, 1995; Alicke et Schwartz-Bloom, 1995; Almeida *et al.*, 1995).

Le modèle d'ischémie recherchée détermine le choix du type d'occlusion artérielle réalisé. Par exemple, l'ischémie sélective de la moelle épinière se réalise par l'occlusion de l'artère principale abdominale (aorte chez le rongeur) au niveau sous-rénal. L'ischémie focale chez le rat, où l'artère cérébrale moyenne est irréversiblement fermée par électrocautérisation, entraîne une nécrose importante dans les tissus irrigués par cette artère dans le cortex pariétal et le striatum (Tamura *et al.*, 1981). Les désordres neuronaux sont également étudiés dans des modèles d'ischémie focale chez la souris (Mésenge *et al.*, 1996; Grandati *et al.*, 1997).

L'ischémie hémicérébrale globale peut être obtenue par les occlusions ipsilatérales concomitantes de l'artère cérébrale moyenne et de l'artère carotidienne commune, la totalité de la circulation cérébrale étant alors interrompue de manière unilatérale pendant une brève période (Pulsinelli et Brierley, 1979; Jorgenson *et al.*, 1989;

Héron *et al.*, 1993; MacManus *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1996). L'électrocautérisation et la ligature figurent parmi les méthodes d'occlusion les plus souvent utilisées.

Dans les modèles foetaux, une hypoxie *in utero* peut être réalisée en plaçant des animaux en période de gestation dans une chambre isobare dont l'atmosphère est appauvri en oxygène (Vierck et Meier, 1963; Xia et Haddad, 1994). De même, des études postnatales consistent soit à placer les animaux dans une chambre en atmosphère contrôlée (Slotkin *et al.*, 1986; Pearigen *et al.*, 1996) soit en combinant une ligature de carotide avec une privation en oxygène (Rice *et al.*, 1981) ou encore à injecter en intracérébral l'iboténate, un analogue des récepteurs du glutamate (Marret *et al.*, 1996).

De tels modèles ont permis de montrer que les fonctions cellulaires telles que le métabolisme énergétique et la synthèse protéique sont irréversiblement compromises, conduisant à une dégénérescence cellulaire dans les zones cérébrales sensibles (hippocampe, cortex cérébral et striatum). Néanmoins, la diversité phénotypique du cerveau et l'influence de paramètres périphériques ou centraux difficilement maîtrisables, rendent difficile la mise en œuvre d'une description quantitative et temporelle des phénomènes et l'interprétation des mécanismes mis en jeu.

2. Modèles *in vitro*

La mise au point de modèles *in vitro*, est apparue indispensable pour contourner les problèmes inhérents à la complexité du cerveau *in situ*.

Les tranches de cerveau et les cultures cellulaires qui permettent de mieux maîtriser les conditions expérimentales sont les deux types majeurs de modèles *in vitro* utilisés.

a) Tranches de cerveau

La réalisation d'une hypoxie s'effectue en modifiant l'atmosphère gazeuse environnante par incubation dans une chambre d'immersion dans laquelle les tranches de cerveau sont maintenues en survie (Tombaugh, 1994). En omettant, en plus de l'oxygène, le glucose dans le liquide de perfusion, on réalise une ischémie simulée (Pedata *et al.*, 1993; Mitani *et al.*, 1994, 1995; Paschen, 1995; Paschen et Djuricic, 1995).

Ce modèle permet de caractériser l'activité électrique des neurones après hypoxie/ischémie. L'organisation des réseaux neuronaux est conservée et cette caractérisation est réalisable pendant la réoxygénation. Les études biochimiques et morphologiques peuvent également être appréhendées à condition de respecter les précautions histologiques d'usage avec une attention particulière accordée à l'orientation des coupes par rapport aux couches neuronales.

Par ailleurs, certains auteurs étudient les manifestations excitotoxiques en cultivant les embryons entiers de souris soumis à l'action du glutamate ou ses analogues (Gressens *et al.*, 1996).

b) Cultures cellulaires

Les cultures primaires sont réalisées à partir d'échantillons de tissu prélevés directement chez l'animal et placés dans des conditions où les cellules peuvent survivre et se multiplier. Le nombre de générations cellulaires et la durée de vie d'une culture sont limités. Les neurones sont des types cellulaires difficiles à cultiver. Cependant, grâce à divers artifices techniques, mais surtout en utilisant des cellules issues de tumeurs (neuroblastomes), il a été possible de cultiver de nombreuses souches cellulaires et d'obtenir des lignées permanentes. Ces lignées présentent des caractéristiques fonctionnelles mais ne sont pas purement neuronales et ne présentent pas les propriétés des cellules du cerveau immature (Bottenstein et Sato, 1979; Bottenstein, 1985). Elles ont néanmoins l'avantage d'être plus faciles à cultiver et ne représentent pas un mélange de

différents types cellulaires qui rend difficile l'interprétation des résultats (Mesner *et al.*, 1992; Gibson *et al.*, 1997).

Dans notre cas, nous avons utilisé des cultures primaires "monophénotypiques" (très enrichies en neurones) maintenues dans un milieu chimiquement défini (Daval *et al.*, 1991; Nicolas et Daval, 1993; Daval et Nicolas, 1994). L'environnement physique ou chimique des cellules peut être changé, en modifiant le mélange gazeux d'incubation (hypoxie/réoxygénation) ou en exposant les neurones à un agent pharmacologique (glutamate, agonistes ou antagonistes de ses récepteurs). Certains auteurs utilisent des inhibiteurs métaboliques comme le cyanure ou l'iodoacétate pour induire une hypoxie histotoxique (Daval *et al.*, 1991; Uto *et al.*, 1995).

Les différents modèles utilisés, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, sont complémentaires et concourent à proposer des mécanismes cellulaires et moléculaires survenant au cours et au décours d'une hypoxie et/ou ischémie.

C. EVENEMENTS CELLULAIRES ET MOLECULAIRES

Il a été montré par des moyens d'investigation cliniques et électrophysiologiques, que les changements apparaissent dans les premières secondes et minutes après l'agression hypoxique-ischémique et précèdent des altérations dans la concentration des composés riches en énergie (Nedergaard, 1988; Volpe, 1995).

Dans le cas d'une ischémie grave, différents phénomènes surviennent dans le cerveau:

- baisse importante des taux d'ATP suivie d'un arrêt de la pompe Na/K-ATPase,
- oedème,
- activation de processus métaboliques, lipolyse, glycolyse et protéolyse,
- libération d'acides gras,
- libération d'acide lactique,
- libération des eicosanoïdes,
- éclatement des mitochondries,
- déplétion en neurotransmetteurs.

Les mécanismes pouvant participer à la dégénérescence neuronale après hypoxie/ischémie périnatale sont regroupés dans la **figure 1**.

L'augmentation intracellulaire de la concentration en calcium occupe une place prépondérante dans les mécanismes reconnus à l'origine de la dégénérescence des neurones (Siesjö, 1981; Schurr et Rigor, 1992; Johnston, 1993; Orrenius et Nicotera, 1994). L'ion Ca^{2+} est présent à faible concentration dans une cellule au repos, grâce à une expulsion active vers le milieu extracellulaire. Au sein de la cellule, il est stocké dans le réticulum endoplasmique, les mitochondries et le noyau. Cette distribution du Ca^{2+} est nécessaire à la transmission du signal nerveux. Le calcium est aussi un second messenger important (Miller, 1991) et l'homéostasie calcique est capitale pour la cellule. La dérégulation de l'homéostasie calcique et l'augmentation de la concentration intracellulaire

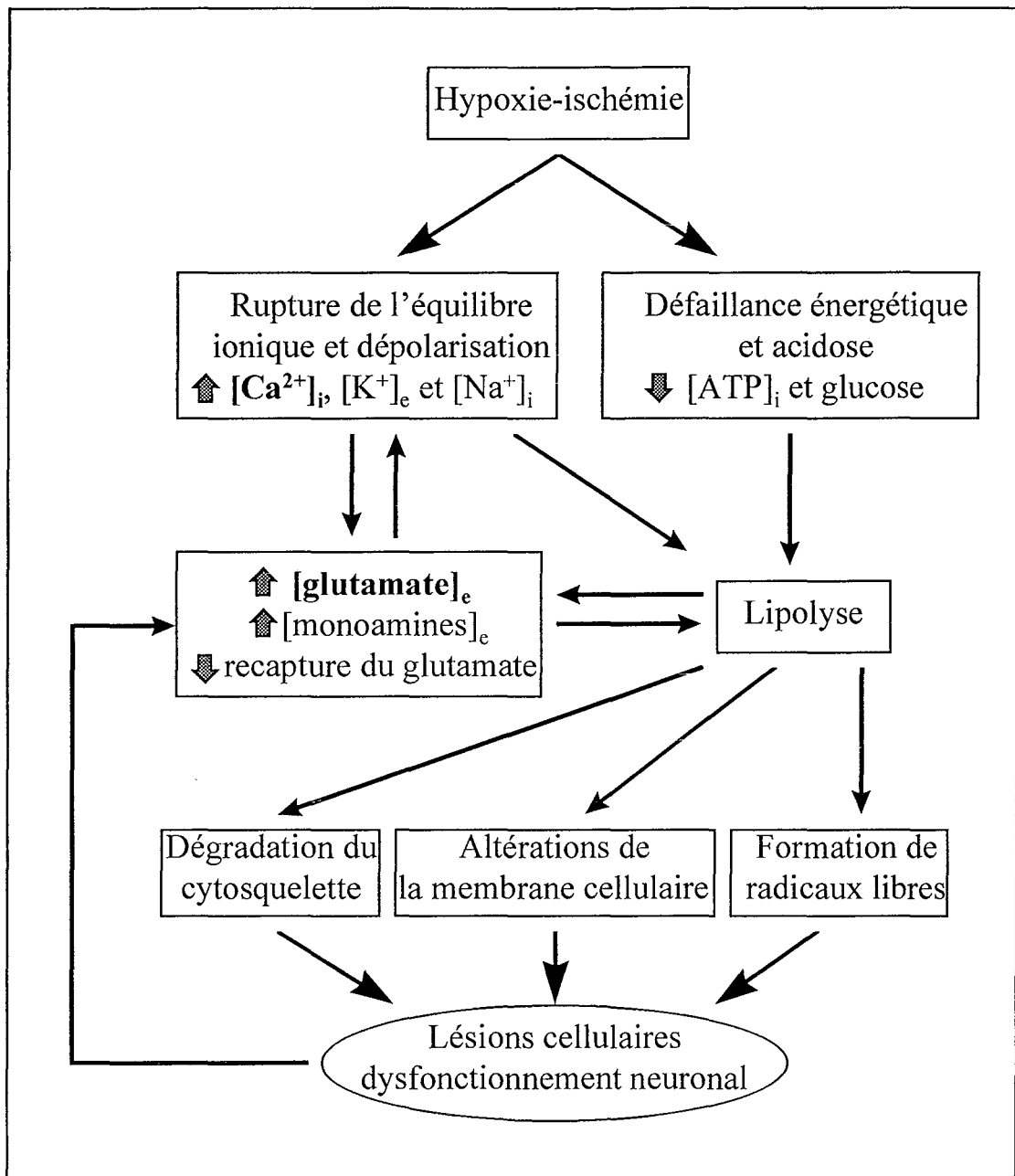


Figure 1 : Illustration schématique des principaux événements cellulaires et moléculaires d'origine hypoxique-ischémique. Modifiée d'après Nedergaard (1988) et Johnston (1993). e: extracellulaire; i: intracellulaire.

en calcium sont à l'origine de la suractivation de systèmes enzymatiques aux propriétés autolytiques pour les neurones (Mitani *et al.*, 1995).

Dans une atmosphère appauvrie, voire dépourvue en oxygène, la dépense énergétique des neurones est importante. Le taux de l'ATP intracellulaire peut diminuer jusqu'à atteindre 5% seulement du taux normal (Mitani *et al.*, 1994). Ce déficit en ATP provoque une cascade de réactions cellulaires. L'équilibre ionique est rompu par des mouvements passifs, le Ca^{2+} et le Na^+ pénètrent massivement dans les cellules, tandis que le K^+ et le Cl^- quittent le milieu intracellulaire (Spector, 1962).

L'ouverture des canaux calcium et sodium dépend de l'inversion du potentiel membranaire et l'influx des électrolytes s'accompagne d'une entrée d'eau dans les cellules qui augmentent alors de volume.

L'entrée du Ca^{2+} entraîne l'activation des réactions lipolytiques et protéolytiques dont les conséquences sont nocives pour le neurone. L'épuisement rapide des réserves énergétiques provoque une baisse considérable de l'activité de dégradation et de recapture des neurotransmetteurs (Wahl *et al.*, 1989), et ceci a pour conséquences:

✓ une libération altérée du principal acide aminé excitateur, le glutamate (voir chapitre II). Le glutamate agit par l'intermédiaire de récepteurs ionotropes et métabotropes postsynaptiques. L'activation des récepteurs sensibles au *N*-méthyl-D-aspartate (NMDA) conduisant à l'ouverture de canaux calciques a été démontrée dans les modèles d'hypoxie-ischémie. Les autres récepteurs ionotropes du glutamate sont également activés et contribuent à dépolariiser les neurones en ouvrant les canaux sodium et en favorisant l'ouverture des canaux calciques associés aux récepteurs NMDA (Wahl *et al.*, 1991; Mitani *et al.*, 1991; Penning *et al.*, 1993). Les systèmes de recapture présynaptique du glutamate étant inhibés, les récepteurs du glutamate sont activés en permanence, maintenant la concentration intracellulaire en calcium à un niveau élevé (Wahl *et al.*, 1989, 1991).

✓ l'accumulation des acides aminés excitateurs (AAE), d'acide lactique, des eicosanoïdes et des peroxydes, qui entraîne l'endotoxicité (Reynolds et Hastings, 1995). La déplétion des monoamines (noradrénaline, dopamine, sérotonine) ainsi que la libération des eicosanoïdes provoquent un oedème et une vasoconstriction locale qui aggravent les processus destructeurs (Younkin, 1992).

La stimulation des récepteurs métabotropes par le glutamate active la phospholipase C qui, en hydrolysant les phospho-inositides membranaires, induit la formation d'acides gras libres comme l'inositol-triphosphate (IP3), qui permet la libération dans le cytoplasme du calcium retenu dans le réticulum endoplasmique, et le diacylglycérol (DAG). Ce dernier provoque la translocation de la protéine kinase C (PKC) cytosolique vers la membrane et active la phospholipase A2 qui fragilise la membrane plasmique en induisant la formation d'acide arachidonique générateur de radicaux libres (Reynolds et Hastings, 1995). La production d'entités réactives dérivées de l'oxygène affecte les enzymes et d'autres protéines, entraînant la désintégration structurale de la cellule (Johnston, 1993).

La surcharge en calcium provoque également l'activation des calpaïnes responsables de la désintégration de la cyto-architecture cellulaire (Ostwald *et al.*, 1993). Elle concourt aussi à l'activation de programmes génétiques précoces qui interviendraient, pour une grande part, dans la détermination du devenir neuronal (Gubits *et al.*, 1993; Dragunow *et al.*, 1994; Rosenbaum *et al.*, 1994; Munell *et al.*, 1994; Beilharz *et al.*, 1995) (voir chapitre III).

Parmi les causes des phénomènes dévastateurs ischémiques, figure aussi l'hypoglycémie qui peut provoquer un processus de dégradation. Les conséquences sont très comparables à celles provoquées par l'anoxie. En revanche, alors que l'anoxie augmente plutôt les taux extracellulaires de l'acide glutamique, la libération de l'acide aspartique d'origine métabolique prédomine dans l'hypoglycémie.

Enfin, l'activité épileptique post-asphyxique majore les dommages neuronaux et accroît les risques neurologiques ultérieurs (Nedergaard, 1988; Johnston, 1993).

D. MORT CELLULAIRE

1. Nécrose et Apoptose

La nécrose et l'apoptose constituent les deux modes de mort cellulaire chez les organismes vivants.

a) Nécrose

La nécrose est une mort cellulaire pathologique qui intervient dans les cas extrêmes d'agression cellulaire. Il s'agit d'un processus passif et accidentel qui ne nécessite pas la participation active de la cellule.

La nécrose est causée par des événements traumatiques et/ou toxiques et présente pour caractéristiques morphologiques, la dilatation du réticulum endoplasmique, l'augmentation du volume mitochondrial et le gonflement cellulaire. Ceci entraîne la rupture osmotique de la membrane, avec lyse cellulaire et libération du contenu enzymatique de la cellule qui présente alors des propriétés toxiques pour les cellules voisines. Il s'ensuit une réaction inflammatoire souvent suivie d'une cicatrisation fibreuse (Kerr et Harmon, 1991).

b) Apoptose

L'apoptose est un processus de mort physiologique intervenant dans tous les organismes vivants, éliminant par là les cellules nuisibles ou dont la fonction est anormale. La mort cellulaire durant le développement normal a été décrite à l'origine par Kerr *et al.* (1972). Les auteurs ont décrit cette mort cellulaire comme étant une nécrose avec rétrécissement de la cellule. Ils ont ensuite proposé le terme "apoptose" du mot grec "Hippocratic corpus" dont l'étymologie évoque la chute des feuilles. La mort cellulaire physiologique, la mort cellulaire programmée et le suicide cellulaire sont les autres

terminologies attribuées à l'apoptose. L'apoptose constitue un mécanisme actif d'élimination des cellules indésirables durant le développement embryonnaire et chez l'adulte (Kerr *et al.*, 1972; Kerr et Harmon, 1991).

2. Caractéristiques de l'apoptose

a) Caractéristiques morphologiques

Contrairement à la nécrose, il s'agit d'un programme génétique de suicide cellulaire. Il n'y a pas de gonflement d'organites, ni de réaction inflammatoire dans l'apoptose. Le mécanisme implique une série d'étapes cellulaires morphologiques distinctes.

En premier lieu, une cellule isolée affectée dans un tissu normal perd tout contact avec son environnement immédiat. La chromatine nucléaire se condense et conduit à une fragmentation de l'ADN. Le rétrécissement cellulaire est dû à la perte du volume cytoplasmique et la plupart des organites intracellulaires reste intacte (Kerr *et al.*, 1987; Kerr et Harmon, 1991). La seconde phase est caractérisée par la rétraction de la membrane induisant la fragmentation cellulaire et la formation de corps apoptotiques contenant des restes nucléaires. Dans la phase finale, les cellules voisines et les macrophages phagocytent les fragments pour une complète élimination.

b) Caractéristiques biochimiques

L'événement biochimique le mieux défini dans l'apoptose implique la fragmentation de l'ADN nucléaire (MacManus *et al.*, 1993). Le clivage de l'ADN double brin est observé au niveau des régions "linker" entre les nucléosomes. Des fragments multiples de 180-200 paires de bases sont observés par des électrophorèses sur gel d'agarose et se présentent sous l'apparence d'une échelle. Les enzymes comme l'endonucléase Ca²⁺-dépendante, la transglutaminase et les protéases sont impliquées dans les changements structuraux liés à l'apoptose (Wyllie, 1980; Arends *et al.*, 1990).

3. Composantes moléculaires de l'apoptose

Par définition, la mort cellulaire programmée implique un gène ou un ensemble de gènes codant pour des protéines ayant un effet létal sur les cellules exprimant ces gènes. C'est ainsi que plusieurs gènes ont été incriminés dans l'apoptose, avec des capacités de régulation différentes et il existe une homéostasie complexe entre les gènes de mort cellulaire et ceux de survie. La perte de cette homéostasie initierait une cascade d'événements biologiques qui altèrent la résistance des cellules à l'apoptose.

a) Gènes de mort cellulaire

L'identification des gènes concernés a été rendue possible par des manipulations génétiques (knock-out, null mutation ou approches anti-sens) qui perturbent l'expression génétique et modifient le devenir des cellules.

Les connaissances de base ont été acquises chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Les analyses génétiques ont identifié 2 gènes, Ced-3 (*C. elegans* death protein) qui est un inducteur d'apoptose et Ced-4 dont l'inactivation par mutation ou par stratégie anti-sens empêche la mort cellulaire par apoptose (Horvitz *et al.*, 1982; Labouesse, 1994).

L'apoptose est associée à une protéolyse, faisant intervenir des protéases à cystéine appelées "caspases" dont le prototype humain est l'enzyme ICE (interleukin-1 β -converting enzyme), l'homologue de la protéine Ced-3 (Yuan *et al.*, 1993). Sa surexpression transitoire a été associée à la mort des cellules de mammifères (Miura *et al.*, 1993).

La caspase ICE possède une forte capacité à cliver les résidus aspartate et présente la propriété de s'auto-activer par clivage de son précurseur ou d'activer d'autres caspases, suggérant une activité en cascade des différentes protéases (Mignon *et al.*, 1998). ICE fait partie de la machinerie d'autodestruction de la cellule en agissant sur des

protéines du cytoplasme, du noyau, de la lamina nucléaire du cytosquelette ou du réticulum endoplasmique.

L'activation d'une autre classe d'enzymes protéolytiques, les calpaïnes, entraîne la lyse de nombreuses protéines de structure ou de régulation, détruisant ainsi la cyto-architecture cellulaire. Elles se présentent sous forme inactive dans le cytoplasme et sont activées par la mobilisation du calcium intracellulaire, événement clé dans l'induction de l'apoptose (Ostwald *et al.*, 1993).

Un certain nombre d'autres gènes sont également essentiels dans la mort cellulaire par apoptose chez les mammifères. Le proto-oncogène c-myc, qui normalement stimule la division cellulaire, est aussi impliqué dans l'induction de l'apoptose (Chin *et al.*, 1995). L'augmentation de l'expression de l'ARNm et de la protéine c-Myc survient tôt dans le processus de l'apoptose des fibroblastes et des neurones (Freytag *et al.*, 1990; Dragunow et Preston, 1995). L'induction de l'apoptose par c-myc est sous la dépendance de l'activation de ses homologues max et mad, les protéines formant des dimères Myc-Max ou Max-Mad ayant des effets opposés sur la transcription de gènes spécifiques impliqués dans la progression du cycle cellulaire.

Le gène suppresseur de tumeurs, p53, est un autre gène important de cette classe et son implication dans le processus apoptotique a été démontrée dans les cellules neuronales *in vivo* (Wood et Youle, 1995) et *in vitro* (Jordàn *et al.*, 1997). Les mutations apportées au gène p53 induisent une abrogation de l'apoptose dans les cellules de mammifères (Bright et Khar, 1994) et la transfection de cellules par le gène p53 induit une activation transcriptionnelle entraînant la mort par apoptose (Yonish-Rouach *et al.*, 1995). En outre, l'apoptose induite par c-myc nécessiterait l'expression de la protéine p53 fonctionnelle (Levine, 1997; Hunter, 1997).

b) Gènes de survie cellulaire

Le gène *ced-9* agit à l'encontre du programme de suicide cellulaire chez le nématode. Quand sa fonction est anormalement activée, la mort cellulaire est avortée. Par ailleurs, après inactivation du gène *ced-9* par mutation, plusieurs cellules qui normalement survivent, entament une mort cellulaire programmée dépendante de *ced-3* et *ced-4* et les animaux meurent durant leur développement (Horvitz *et al.*, 1982; Labouesse, 1994).

L'existence de tels gènes anti-apoptotiques dans les cellules de mammifères a été aussi démontrée. *Bcl-2*, une protéine membranaire mitochondriale, inhibe l'apoptose quand elle est surexprimée, ceci dans toute une variété de cellules de mammifères (Martinou *et al.*, 1994). Le gène humain, une fois introduit chez *C. elegans*, peut également supprimer l'apoptose. Toutefois, sa surexpression ne suffit pas à annihiler les conséquences néfastes de tous les types d'agressions.

Contrairement à d'autres oncoprotéines, *Bcl-2* ne stimule pas la prolifération cellulaire mais permet la survie des cellules en dehors du cycle cellulaire (Raff, 1992). *Bcl-2* inhibe l'induction de l'apoptose par *c-myc* et rend les cellules moins sensibles aux radiations et aux substances cytotoxiques (Bright et Khar, 1994). Son expression est faible dans les neurones de la zone CA1 de l'hippocampe, les plus vulnérables à l'ischémie (Chen *et al.*, 1996).

L'effet bénéfique de *Bcl-2* serait entre autre médié par le blocage de l'activation des caspases (Srinivasan *et al.*, 1996), la stabilisation du calcium dans le réticulum endoplasmique ou par la prévention de la perte du potentiel membranaire au niveau des mitochondries (Shimizu *et al.*, 1996; Kroemer, 1997). En outre, *Bcl-2* aurait des propriétés antioxydantes. Elle empêche la formation de radicaux libres oxygénés ainsi que la peroxydation lipidique induites, par exemple, suite à une hypoglycémie associée au cyanure dans les lignées lymphocytaires ou nerveuses (Hockenbery *et al.*, 1993; Kahn, 1994; Myers *et al.*, 1995).

Enfin, les protéines de choc thermique (Hsp) ou protéines de stress qui interviennent dans l'assemblage et la séparation des complexes multiprotéiques, la translocation de chaînes polypeptidiques et dans la régulation du clivage protéique, sont fortement exprimées après différents types d'agressions comme l'anoxie, l'hypoglycémie (Chariat-Marlangue *et al.*, 1992) ou l'hyperthermie (Marini *et al.*, 1990; Morrison-Bogorad *et al.*, 1995; Jacquier-Sarlin *et al.*, 1995). Elles participeraient aux mécanismes de défense cellulaire. Des cellules tumorales traitées avec un oligonucléotide anti-sens pour hsp70 développent un processus apoptotique, avec inhibition de la prolifération cellulaire (Macario, 1995). Le mécanisme de prévention de l'apoptose par les Hsp pourrait être en relation avec la protection contre les molécules oxydantes en ayant pour cibles les mitochondries (Polla *et al.*, 1996). Néanmoins, Mailhos *et al.* (1994) ont montré que les Hsp protégeraient les cellules neuronales du stress thermique et non de la mort cellulaire programmée (Mailhos *et al.*, 1994). D'autres auteurs (Ferrer *et al.*, 1995) ont montré que la survie des neurones de l'hippocampe ayant subi une ischémie ne dépend pas de l'induction de Hsp70 chez la gerbille. Le mode de protection de l'apoptose par ces protéines n'est toujours pas établi.

4. Mécanismes moléculaires de l'apoptose

Les différentes étapes moléculaires conduisant à la mort cellulaire par apoptose sont récapitulées dans la **figure 2**.

a) Signal apoptotique

L'apoptose peut être considérée comme une réponse physiologique à l'influence environnementale médiée par des signaux de transduction à la surface cellulaire et activant un programme génétique pour un état anti-prolifératif (Lee *et al.*, 1993; Vaux, 1993; Dickson, 1995). La liaison des molécules à leurs sites spécifiques provoque soit une activation cellulaire ayant pour conséquence la croissance, soit une inhibition de la croissance aboutissant à la mort cellulaire. Ceci dépend du stade de maturation de la cellule et/ou de la qualité du signal (Bonfoco *et al.*, 1995; Ishitani *et al.*, 1996). Parmi les

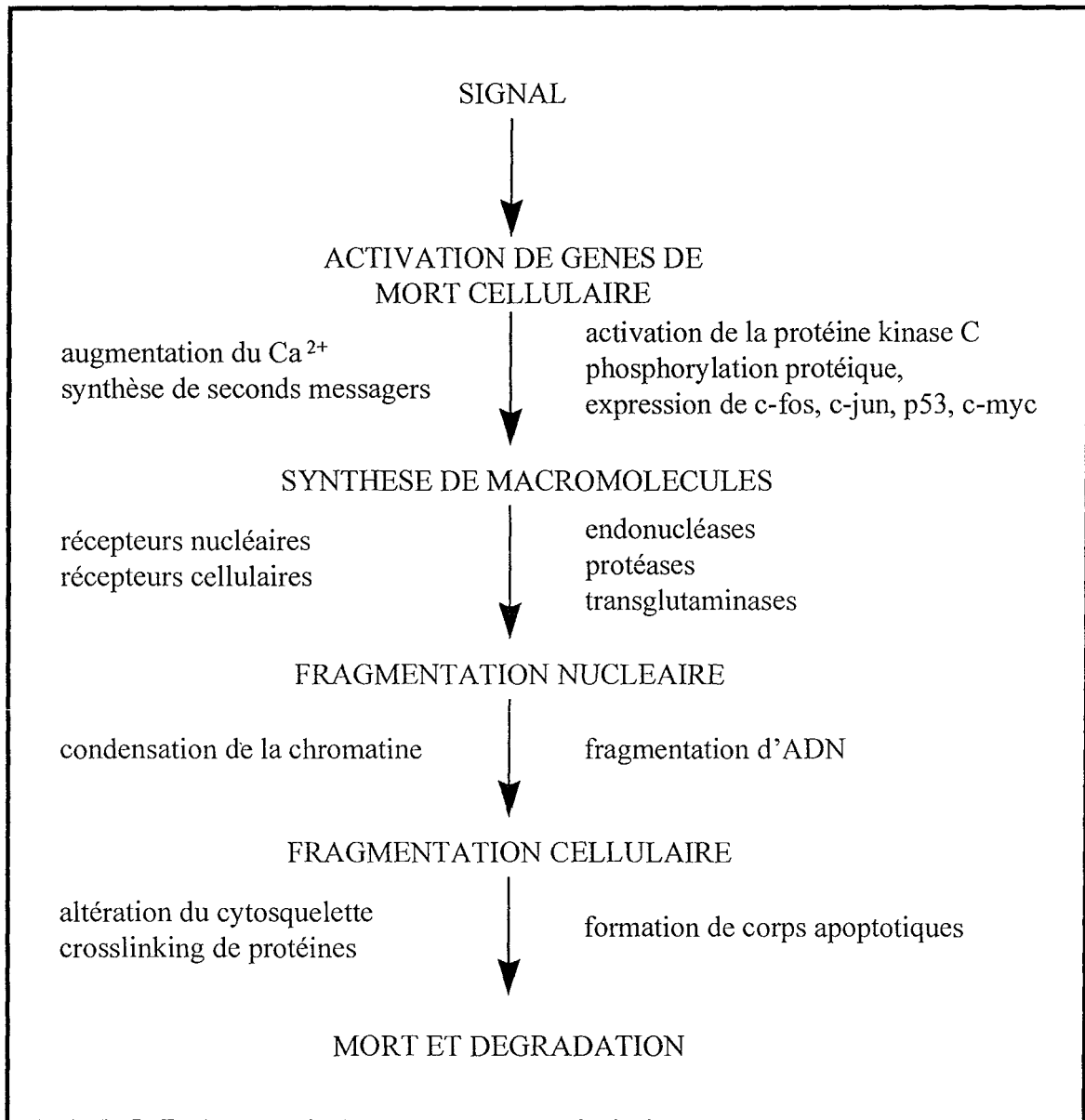


Figure 2 : Evénements moléculaires de l'apoptose. D'après Bright et Khar (1994).

inducteurs de la mort cellulaire programmée, on note les analogues du glutamate (Smeyne *et al.*, 1993; Pennypacker *et al.*, 1994; Larm *et al.*, 1997) et des neurotoxines (Walkinshaw et Waters, 1994). L'apoptose peut être induite par les glucocorticoides dans les thymocytes de rat (Wyllie, 1980; Sikora *et al.*, 1993), par la privation en sérum ou en potassium dans les cultures de certains types de neurones (LeBlanc, 1995; Kharmalov *et al.*, 1995; Estévez *et al.*, 1998), ou encore par l'activation des récepteurs spécifiques au TNF (facteur nécrosant les tumeurs) (Smith *et al.*, 1994). D'autres études ont souligné l'importance de l'antigène Fas et le complexe Fas/Apo-1 pour leur capacité à médier l'apoptose (Ni *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1994).

b) Activation de seconds messagers

Le calcium joue un rôle important dans la régulation de l'apoptose et sert de relais aux stimuli apoptotiques, mais le mécanisme précis par lequel le calcium induit la mort cellulaire n'est pas complètement élucidé (Orrenius et Nicotera, 1994; Limbrick Jr *et al.*, 1995). L'apoptose est caractérisée par des changements énergétiques et métaboliques où le rôle du calcium est évident (Lee *et al.*, 1993; Mills *et al.*, 1995). Toutefois, l'endonucléase Ca^{2+} - et Mg^{2+} -dépendante, qui dégrade l'ADN double brin, reste une cible de choix pour le Ca^{2+} et elle est activée par la mobilisation du Ca^{2+} cytosolique séquestré au niveau du réticulum endoplasmique ou d'origine extracellulaire (Wyllie, 1980; Arends *et al.*, 1990). Des taux élevés de Ca^{2+} cytosolique induisent aussi l'activation d'enzymes Ca^{2+} -dépendantes telles les transglutaminases et les calpaïnes (Ostwald *et al.*, 1993). Il a été montré que les protéines de liaison du Ca^{2+} telles que la calmoduline et par conséquent les enzymes calmoduline-dépendantes, jouent un rôle dans l'apoptose (Barron *et al.*, 1995). L'augmentation du Ca^{2+} constitue également un événement clé pour l'induction des facteurs de transcription directement impliqués dans l'apoptose (Lerea *et al.*, 1992; Bading *et al.*, 1993; Roche et Prentki, 1994).

L'AMPc a été également suspecté d'intervenir dans l'apoptose (Gubits *et al.*, 1989; Honma *et al.*, 1996); des taux élevés d'AMPc induisent l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription (Vaccharino *et al.*, 1993). Néanmoins, l'activation

soutenue de la voie de l'AMPc permet la survie des neurones dopaminergiques du mésencéphale qui étaient destinés à mourir par apoptose (Michel et Agid, 1996).

c) Protéines kinases et phosphorylation

La contribution de la phosphorylation de la tyrosine dans la voie de la fragmentation d'ADN n'est pas clairement établie. Des études récentes ont révélé que la phosphorylation des protéines telles que p56^{lck}, la tyrosine kinase ou des récepteurs, précède la délivrance du signal (Omri *et al.*, 1996). Les enzymes membranaires et cytosoliques, en particulier la PKC, impliquées dans les phosphorylations protéiques, ont une grande importance dans la transduction des signaux apoptotiques (Mattson, 1991; Ohtani *et al.*, 1995).

Il est actuellement établi qu'une cascade de protéines kinases est impliquée dans l'apoptose (Lee *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1997).

d) Facteurs de transcription

L'apoptose nécessite l'induction d'un programme génétique dans lequel les oncoprotéines nucléaires, avec leur activité de régulation de la transcription, occupent une place déterminante. Une expression non régulée de c-myc est associée à l'induction de l'apoptose dans les cellules myéloïdes murines, les fibroblastes ou les neurones de rat (Freytag *et al.*, 1990; Chin *et al.*, 1995; Dragunow et Preston, 1995). L'expression des proto-oncogènes c-fos et c-jun est stimulée après induction de l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Dragunow *et al.*, 1994; Smeyne *et al.*, 1993; Cummings, 1995). Le traitement avec des oligonucléotides anti-sens dirigés contre fos et jun, seuls ou en combinaison, protège les cellules de l'apoptose suggérant un rôle actif pour fos et jun dans la mort cellulaire programmée (Anderson *et al.*, 1995; Dragunow et Preston, 1995). Les études réalisées pour analyser le mécanisme de la mort neuronale après privation en NGF (nerve growth factor) indiquent que l'expression du proto-oncogène c-jun est induite après privation en facteur trophique dans les cultures neuronales, et son rôle dans la mort

cellulaire a été suggéré par le fait que la microinjection d'anticorps spécifiques anti-c-Jun (Estus *et al.*, 1994) ou d'un vecteur d'expression codant pour un mutant négatif dominant pour c-jun (Ham *et al.*, 1995) protégeait les neurones.

En revanche, selon certaines équipes, l'induction de c-fos ne serait pas essentielle dans le processus apoptotique (Gajate *et al.*, 1996) et c-jun pourrait avoir un rôle protecteur (Leah *et al.*, 1991; Jenkins *et al.*, 1993), l'expression de c-Jun étant corrélée à la période de régénération des neurones sensoriels.

Le produit du gène p53 participe aussi à l'induction de l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Wood et Youle, 1995; Ameisen, 1996; Hunter, 1997; Jordàn *et al.*, 1997; Levine, 1997). La transfection des cellules par le gène sauvage p53 entraîne l'induction de l'apoptose et les souris transgéniques knock-out pour p53 deviennent résistantes à l'apoptose induite par irradiation (Yonish-Rouach *et al.*, 1995).

La participation des facteurs de transcription sera abordée plus largement dans le chapitre III.

e) Formation de corps apoptotiques

Les changements morphologiques spécifiques suggèrent des événements biochimiques qui caractérisent le programme d'apoptose. Toutefois, les données sur ces événements sont fragmentaires. L'apoptose est un processus actif nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP mais aussi la synthèse d'ARN et de protéines. La synthèse *de novo* de protéines "tueuses" s'avère ou non nécessaire. Dans de nombreux modèles expérimentaux, l'activité des inhibiteurs de la synthèse protéique et des ARN empêche l'apoptose (Mesner *et al.*, 1992; Eastman, 1993; Dragunow et Preston, 1995).

La formation des inositol phosphates, l'augmentation des taux de Ca^{2+} intracellulaire et l'expression d'un certain nombre de gènes, sont les premiers événements de l'apoptose. Ils sont ensuite suivis par un flux rapide et sélectif d'ions et d'eau à partir

des cellules entraînant la condensation du cytoplasme et de la chromatine et la formation de fragments d'ADN donnant lieu par la suite à des corps apoptotiques. Ces derniers contiennent des protéines liées entre elles et résistantes à la dissolution par les détergents (Bright et Khar, 1994). Le "cross-linking" des protéines dans les corps apoptotiques est dû à la formation des liaisons Σ (γ -glutamyl) lysine et γ -glutamyl-bis-spermidine, produit caractéristique de la transglutaminase. Ces liaisons étant résistantes à la protéolyse, elles peuvent s'accumuler durant l'apoptose. Les changements au niveau des glycoprotéines à la surface des corps apoptotiques permettent la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques. Les protéases Ca^{2+} -dépendante peuvent alors participer à la dégradation du cytosquelette des corps apoptotiques (Bright et Khar, 1994).

5. Apoptose et cycle cellulaire

Des études récentes suggèrent un lien entre les mécanismes d'apoptose et la prolifération cellulaire. La progression dans le cycle cellulaire est régulée par un groupe de sérine/thréonine kinases appelées kinases cyclines-dépendantes (Cdk 2-5) phosphorylées par leurs cyclines respectives (C, D1-3, E).

Meikrantz et Schlegel (1995) considèrent l'apoptose comme un processus intimement lié au cycle cellulaire. L'apoptose est majoritairement présente dans les tissus en prolifération et la manipulation artificielle du cycle cellulaire peut soit empêcher, soit potentialiser l'apoptose. En outre, Park *et al.* (1998) suggèrent l'existence au sein du même neurone de voies apoptotiques multiples selon la nature du stress.

Tout gène impliqué dans la régulation du cycle cellulaire ou dans la régulation de la prolifération peut potentiellement intervenir dans la régulation de l'apoptose: c'est le cas par exemple de la cycline D1 dont l'induction est superposable à la mort des neurones sympathiques (Freeman *et al.*, 1994). Shi *et al.* (1994) ont montré que l'activation de Cdk1 à un moment particulier du cycle cellulaire entraîne la mort par apoptose des cellules du lymphome YAC-1. Toutefois, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 est concomitant à l'inhibition de l'activité des Cdk par la protéine p53 dans les fibroblastes humains soumis

aux radiations (Dulic *et al.*, 1994). En fait, p53 induirait l'apoptose en interrompant le cycle cellulaire, processus qui nécessite l'activation du gène WAF1 (p21) dont le produit bloquerait la progression du cycle en inhibant un cofacteur de l'ADN polymérase, le PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ainsi que les kinases associées aux cyclines (Xiong *et al.*, 1993). Jordàn *et al.* (1997), par contre, ont suggéré que le rôle de p53 dans la mort des neurones hippocampiques serait distinct de son action liée à l'arrêt du cycle cellulaire.

Certains facteurs de transcription sont des proto-oncogènes impliqués dans la régulation du cycle et la prolifération cellulaires. En fait, une cellule se multiplie quand elle reçoit des signaux de prolifération, avec, d'une part, l'expression de proto-oncogènes qui amorcent la multiplication cellulaire et, d'autre part, l'activation d'enzymes, les cdk, qui assurent le bon déroulement du cycle cellulaire. Paradoxalement, ces événements déclenchent aussi l'apoptose. la cellule qui reçoit des signaux de multiplication s'autodétruit, sauf si elle reçoit, préalablement ou simultanément, des signaux de survie qui déclenchent l'induction de gènes comme bcl-2. C'est ainsi que l'expression de c-Myc est un facteur péjoratif pour la survie de la cellule en absence de signaux de survie tels que les facteurs de croissance (Meikrantz et Schlegel, 1995).

Ainsi, les relations entre cycle cellulaire et apoptose apparaissent de plus en plus étroites et l'entrée en apoptose résulterait d'un cycle cellulaire non régulé. Dans le cas des neurones ayant perdu la capacité de proliférer, on pourrait imaginer que l'activation des complexes multiprotéiques qui régulent le cycle cellulaire puisse aussi entraîner la mort par apoptose.

E. APOPTOSE AU COURS DU DEVELOPPEMENT

Le développement de l'embryon est caractérisé par des phénomènes incessants de multiplication, différenciation et migration des cellules, qui aboutissent à la transformation de l'œuf originel, formé d'une seule cellule, en un être pluricellulaire complexe. Paradoxalement, durant cette période, surviennent, en l'absence de toute maladie et de tout vieillissement, des épisodes massifs de mort cellulaire. A cet égard, la mort cellulaire fait partie intégrante du programme normal de développement (Ameisen, 1996).

L'embryon est ainsi remodelé par élimination des tissus ancestraux qui n'ont pas lieu d'être dans l'espèce, des structures seulement requises à un moment donné du développement telles que la queue et les branchies du têtard et des structures nécessaires à l'un des deux sexes en vue de la différenciation sexuelle.

L'apoptose est également impliquée dans la sculpture des organes et des membres. Elle permet l'élimination des tissus joignant les doigts et les orteils, assurant ainsi leur séparation et participe à l'ouverture des orifices du tube digestif, à la formation des reins, au remodelage des os et des cartilages ainsi qu'à l'acquisition de la peau ou des cheveux.

Ce sont les études de la formation du système immunitaire et du cerveau qui ont révélé la complexité des mécanismes de mort cellulaire (Vaux, 1993; Dickson, 1995).

Pendant la période embryonnaire, plus de 90% des lymphocytes meurent au cours de cette sélection. L'organisme ne permet de survivre qu'aux lymphocytes capables de remplir leur fonction.

Dans l'embryon, les cellules nerveuses, établissent des connexions avec d'autres populations cellulaires pour la formation de réseaux de communication. Dans la plupart des régions du système nerveux, environ un neurone sur deux meurt pendant la période où

s'établissent ces contacts. Par exemple, un grand nombre de cellules granulaires du cervelet de souris dégèrent spontanément au cours des deux premières semaines de vie postnatale et le gène p53 a été incriminé dans la régulation développementale de ces neurones qui meurent dans les mêmes proportions chez les souris mutantes pour ce gène (Wood et Youle, 1995). En fait, durant cette période, tous les neurones sont programmés pour mourir, et leur destin - la survie ou la mort - dépend de leur capacité à établir un contact avec leur cible. Dès qu'un neurone établit ce contact, un signal de survie produit par ses partenaires cellulaires empêche la mise en route du programme de mort. Sont ainsi éliminés les neurones inutiles ayant établi des circuits peu performants qui parasiteraient les circuits efficaces, et les neurones dangereux ayant établi des connexions aberrantes avec les cellules qui ne sont pas des partenaires naturels et ne libèrent pas de signaux indispensables à leur survie (Oppenheim, 1991; Ameisen, 1996).

F. MORT NEURONALE CONSECUTIVE A L'HYPOXIE/ISCHEMIE

Les mécanismes entraînant la mort neuronale après asphyxie cérébrale néonatale demeurent hypothétiques (Gluckman et Williams, 1992). Durant l'hypoxie-ischémie, la perte d'énergie aiguë entraîne une rupture de l'homéostasie ionique, l'accumulation de Na^+ et Ca^{2+} intracellulaires et un gonflement osmotique qui, si l'agression est sévère, peut entraîner la lyse cellulaire. De plus, les actions cytotoxiques du glutamate et des radicaux libres peuvent exacerber les conséquences de l'agression. Une seconde phase de la mort neuronale intervient quelques heures plus tard et qui correspondrait à un phénomène de type apoptotique (Pulsinelli *et al.*, 1982; Giulian *et al.*, 1989; Goto *et al.*, 1990; Shigeno *et al.*, 1990; Beilharz *et al.*, 1995).

Alors que l'élimination des neurones en excès au cours du développement intervient via l'apoptose (Raff, 1992), de nombreux travaux montrent que l'apoptose n'est pas confinée à une mort physiologique. Elle intervient également dans des situations pathologiques telles que l'hypoxie-ischémie.

Les cellules qui meurent pendant le développement et celles qui meurent *in vitro* après sevrage en facteur trophique ont en commun les caractéristiques morphologiques que nous avons décrites comme étant associées à l'apoptose (Kerr et Harmon, 1991). Ces mêmes altérations ayant été rapportées après hypoxie-ischémie, de multiples études postulent en faveur de l'implication de l'apoptose dans les dommages consécutifs à l'hypoxie-ischémie (Beilharz *et al.*, 1995).

La perte neuronale après hypoxie-ischémie dépend généralement de la sévérité de l'agression (Beilharz *et al.*, 1995). Lors d'une agression hypoxique-ischémique sévère, apparaît une nécrose exacerbée par une inflammation. La mort neuronale sélective d'origine apoptotique se développe le plus souvent après des agressions brèves (Dickson, 1995).

Dans les modèles expérimentaux d'ischémie, la démonstration de l'existence de mort par apoptose dans le cerveau est basée sur la présence d'une fragmentation spécifique en échelle de l'ADN (Héron *et al.*, 1993; Okamoto *et al.*, 1993; Tominaga *et al.*, 1993; MacManus *et al.*, 1993). D'autres études ont décrit le rôle protecteur de la cycloheximide ou de l'actinomycine D après ischémie expérimentale (Goto *et al.*, 1990; Shigeno *et al.*, 1990; Linnik *et al.*, 1993).

1. Fragmentation de l'ADN génomique

Comme mentionné précédemment, la fragmentation d'ADN et les changements morphologiques cellulaires ont été utilisés comme critères pour évaluer la participation de l'apoptose/mort cellulaire programmée dans le système nerveux à l'issue de l'hypoxie-ischémie. Le calcium peut activer l'endonucléase responsable de la fragmentation d'ADN dans les neurones corticaux embryonnaires (Takei et Endo, 1994). La formation de fragments inter-nucléosomiaux a également été observée dans le cerveau de rat jeune et adulte après épisodes d'hypoxie-ischémie globale (Beilharz *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1994). L'ischémie cérébrale focale chez la souris entraîne une augmentation significative du nombre de cellules exhibant un ADN fragmenté (Li *et al.*, 1995) et la mort induite par les radicaux libres dans les neurones corticaux embryonnaires a été associée avec la condensation et la fragmentation de la chromatine (Ratan *et al.*, 1994). Associés à d'autres, ces résultats suggèrent que le stress oxydatif peut induire l'apoptose dans les neurones corticaux d'embryons. Rosenbaum *et al.* (1994) ont montré que la fragmentation d'ADN avait lieu dans les neurones en culture après une hypoxie seule et nombreuses sont les études suggérant que la mort neuronale après hypoxie-ischémie implique des changements morphologiques et biochimiques similaires à ceux utilisés pour décrire l'apoptose.

2. Apport des inhibiteurs de la synthèse protéique

Il a été rapporté que les inhibiteurs de la synthèse des ARN et des protéines peuvent réduire la mort neuronale retardée et sélective produite par une hypoxie-ischémie brève chez les rongeurs (Goto *et al.*, 1990; Shigeno *et al.*, 1990; Papas *et al.*, 1992; Linnik *et al.*, 1993). De même, l'inhibition de la synthèse protéique par la cycloheximide (CHX) ou l'anisomycine, réduit la mort secondaire dans les cultures neuronales du cervelet après anoxie (Dessi *et al.*, 1992) ou dans les cultures du ganglion cervical supérieur après hypoxie (Rosenbaum *et al.*, 1994).

La dégénérescence des neurones corticaux embryonnaires induite par les radicaux libres (Ratan *et al.*, 1994), l'apoptose induite dans les neurones et les fibroblastes en culture par l'étoposide (Nakajima *et al.*, 1994) et la mort neuronale induite par les rayons X dans l'hippocampe en développement (Kerr *et al.*, 1987) sont aussi réduites par les inhibiteurs de la synthèse protéique.

Par contre, Deshpande *et al.* (1992) ont rapporté que les dommages induits par une ischémie transitoire, dans la zone CA1 de l'hippocampe, ne sont pas réduits par l'anisomycine, la CHX ou l'actinomycine D. Les raisons de ces divergences ne sont pas connues, mais cela pourrait être lié à des différences dans la durée et la sévérité de l'agression. Il a été suggéré que l'inhibition prolongée de la synthèse protéique précède la mort neuronale retardée après ischémie chez la gerbille et que la reprise d'une synthèse protéique soutenue serait nécessaire pour éviter les lésions cérébrales (Beilharz *et al.*, 1995). Aussi, l'effet neuroprotecteur des inhibiteurs de la synthèse protéique vis-à-vis de l'hypoxie serait due à une hypothermie (Kiessling *et al.*, 1991).

De plus, certaines équipes ont rapporté que la synthèse protéique qui survient durant un épisode d'ischémie/reperfusion pourrait être neuroprotectrice (Kleihues et Hossmann, 1971; Maruno et Yanagihara, 1990). Ainsi, les effets des inhibiteurs de la synthèse protéique sur la mort neuronale apoptotique s'avèrent complexe.

3. Gènes impliqués

La démonstration de l'implication de quelques-uns des gènes de l'apoptose dans la mort neuronale après hypoxie-ischémie est très récente, mais les résultats, associés aux caractérisations biochimiques et aux études structurales, permettent d'affirmer que certains neurones en fonction des caractéristiques de l'agression entrent en apoptose, alors que d'autres meurent par nécrose.

Après ischémie cérébrale, on observe une diminution importante de la synthèse de protéines dans les neurones (Paschen et Djuricic, 1995). Cependant, un très petit nombre de gènes, comme les gènes de réponse précoce, les gènes codant pour les protéines de choc thermique et certains gènes codant pour des facteurs de croissance et leurs récepteurs, sont induits après le choc hypoxique-ischémique (Wilson et Sutherland, 1989; Chariat-Marlangue *et al.*, 1992; Dragunow *et al.*, 1993; Kusumoto *et al.*, 1996). Ces gènes pourraient être impliqués soit dans la propagation du choc ischémique, soit dans la protection, voire la réparation des cellules.

Dans le cerveau ischémié après occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat, on trouve l'expression de la protéine p53 dans les régions de mort neuronale c'est-à-dire dans le cortex et le striatum (Li *et al.*, 1994). Chez les souris transgéniques hétérozygotes pour un gène nul p53 ou homozygotes pour ce gène, on observe une réduction notable du volume de l'infarctus après occlusion de l'artère cérébrale moyenne (Crumrine *et al.*, 1994). Cependant, les résultats obtenus sont difficiles à interpréter dans la mesure où l'absence totale de la protéine p53 protège moins qu'une expression modérée. Cela pourrait indiquer que la protéine p53 n'agit probablement pas de façon directe mais par l'intermédiaire de ses gènes cibles, tel que p21 (WAF) qui code pour un inhibiteur de Cdk (Xiong *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994). Par ailleurs, la protéine p53 régule des gènes qui ne sont pas à proprement parler des gènes régulateurs de l'apoptose, mais dont l'expression est induite par l'ischémie: hsp70 (Agoff *et al.*, 1993) et c-fos (Kley *et al.*, 1992). Nous exposerons plus en détail dans le chapitre III les études réalisées sur l'expression de c-fos, et des facteurs de transcription en général, suite aux agressions hypoxiques et/ou ischémiques.

II. GLUTAMATE ET HYPOXIE-ISCHEMIE

A. ROLES PHYSIOLOGIQUES DU GLUTAMATE

Le glutamate est un acide aminé naturel à chaîne linéaire avec une fonction acide carboxylique en gamma. Il participe à la constitution des protéines et intervient dans diverses réactions du métabolisme cellulaire. C'est un acide aminé non essentiel, c'est-à-dire qu'il est synthétisé par l'organisme, mais comme il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique, il ne peut être apporté par le sang et est donc élaboré dans les tissus cérébraux (Fagg et Foster, 1983).

Avec l'aspartate, le glutamate est responsable des principales activités excitatrices du système nerveux central. Les deux molécules sont de structure et de propriétés très voisines et l'expression d'acides aminés excitateurs (AAE) est utilisée pour désigner ces deux composés. L'excitation par le glutamate est très répandue dans les centres nerveux et la majorité des synapses excitatrices centrales sont glutamatergiques (McGeer *et al.*, 1987; Headley et Grillner, 1991; Jahr et Lester, 1992). A travers leurs récepteurs, les AAE ne médient pas seulement la transmission synaptique normale à travers les voies excitatrices, ils participent aussi à la modification des connexions synaptiques. Les AAE jouent un rôle important dans des phénomènes essentiels tels que le développement cérébral, l'apprentissage et la mémoire (Collingridge et Lester, 1989). Cependant, la suractivation de leurs récepteurs peut médier la dégénérescence neuronale (Beal, 1992; Dessi *et al.*, 1994; Regan *et al.*, 1995). Il existerait, en fait, une frontière étroite entre la fonction normale des AAE et les réactions toxiques qui leur sont associées.

B. METABOLISME, STOCKAGE ET LIBERATION DU GLUTAMATE

La synthèse du glutamate participe au métabolisme cellulaire et fait intervenir une coopération entre cellules gliales et terminaisons neuronales. L'anion L-glutamate peut être produit par transamination de l'acide α -céto-glutarique ou par désamination de la glutamine ou encore à partir de l'ornithine en plusieurs étapes. L'importance relative de ces trois voies est inconnue et pourrait varier selon les régions cérébrales. La voie de biosynthèse du glutamate est en relation étroite avec le cycle de Krebs. L'origine du glutamate est donc multiple, les apports pouvant s'adapter aux besoins (McGeer *et al.*, 1987; Fagg et Foster, 1983).

L'une des caractéristiques des terminaisons glutamatergiques est la présence d'un système spécialisé de concentration intravésiculaire très actif. Le glutamate du système nerveux central est présent dans trois compartiments : extracellulaire, cytosolique et vésiculaire. Ces compartiments donnent lieu à des échanges grâce à l'existence de systèmes de transporteurs membranaires très actifs. Les propriétés du transporteur de la membrane plasmique sont différentes par l'affinité et la spécificité de celui de la paroi vésiculaire. Ce système de transport électrogénique à haute affinité consiste en un échange entre 1 ion glutamate et 3 ions Na^+ (éventuellement 2 Na^+ et 1 H^+) qui entrent dans la cellule pour un ion K^+ qui sort. Chaque ion glutamate qui pénètre entraîne donc avec lui une charge positive, d'où un courant membranaire entrant qui peut être détecté. Il apparaît que ce système de transport est étroitement dépendant du potentiel et du gradient de potassium (la dépolarisation ou/et l'élévation du taux de K^+ externe le réduisant) (Fagg et Foster, 1983; Sahai, 1990; Dessi *et al.*, 1994).

La régulation de l'activité du transporteur est assurée par l'équilibre entre plusieurs facteurs. Une défaillance de cette régulation entraîne la mort cellulaire par excitotoxicité.

C. RECEPTEURS DU GLUTAMATE

Les études électrophysiologiques, biochimiques et de liaison de radioligands ont montré l'existence d'au moins cinq types de récepteurs distincts. Actuellement, deux catégories majeures de récepteurs sont connues, ionotropes et métabotropes (Monaghan *et al.*, 1989). Les récepteurs ionotropes comprennent le complexe récepteur NMDA (activé par le *N*-méthyl-D-aspartate) et d'autres que l'on regroupe sous le nom de "non-NMDA", comprenant les récepteurs de types AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionate), kainate et le type présynaptique L-AP4 (2-amino-4-phosphobutanoate).

Les récepteurs NMDA, AMPA et kainate ont été définis par les actions dépolarisantes des agonistes sélectifs et par leur blocage par des antagonistes sélectifs. Le récepteur L-AP4 représenterait un autorécepteur inhibiteur. Les récepteurs métabotropes, notamment activés par l'ACPD (amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate), modifient le métabolisme des inositols phosphates. La transmission de l'excitation implique les actions médiées par un ou plusieurs combinaisons de ces récepteurs (Young et Fagg, 1991).

1. Complexe récepteur NMDA

Le récepteur NMDA, dont un schéma de la structure est présentée sur la **figure 3**, est certainement le mieux caractérisé des récepteurs des acides aminés excitateurs. Sur le plan fonctionnel, le résultat le plus important de son activation est une entrée de calcium dans la cellule, impliquant, la participation de plusieurs composants du récepteur. Ce type de récepteur intervient dans la plasticité neuronale, la transmission synaptique lente, mais aussi dans les désordres neurodégénératifs (Monaghan *et al.*, 1989; Sahai, 1990; Beal, 1992; Mattson *et al.*, 1995; Headley et Grillner, 1991; Mayers et Miller, 1991).

a) Structure du récepteur NMDA

Structuralement, le récepteur NMDA est assemblé à partir de deux sous-unités, la sous-unité NR1 qui est le principal constituant, avec 8 isoformes obtenues par épissage alternatif (A-H) (Moriyoshi *et al.*, 1991), et la sous-unité NR2 dont il a été caractérisé 4 sous-types (NR2A, B, C et D) (Monyer *et al.*, 1992; Mori et Mishina, 1995).

L'assemblage oligomérique par combinaison des sous-unités NR1 et NR2 confère à ce récepteur-canal sa complexité. La sous-unité NR1 est exprimée de manière ubiquitaire dans le cerveau de l'adulte (Laurie *et al.*, 1995), alors que la sous-unité NR2 présente une distribution plus restreinte (Watanabe *et al.*, 1992; Wenzel *et al.*, 1995).

Les différents sites de liaison au niveau du récepteur pouvant moduler son activité sont représentés dans la **figure 3**.

1) Site de liaison du glutamate

Les agonistes du récepteur NMDA ont une activité et une affinité qui varient selon la fonction acide de la chaîne latérale. L'acide iboténique avec son radical isoxazole est un agoniste à affinité plus faible que celles du glutamate, aspartate ou NMDA. D'autres analogues du glutamate tels que l'acide trans-2,3-piperidine dicarboxylique et le cis-1(R)-amino-1,3(R)-dicarboxy-cyclopentane suggèrent que la conformation active de l'acide glutamique au niveau du récepteur NMDA pourrait être non pas linéaire, mais pliée. L'acide quinolinique, métabolite hétéroaromatique du tryptophane, en est un autre exemple.

Les molécules qui se fixent directement sur le site récepteur et qui entrent en compétition avec le ligand naturel ou les agonistes sélectifs empêchant ainsi la réponse cellulaire sont appelées des antagonistes compétitifs. Les plus puissantes d'entre elles agissent à concentration micromolaire (Monaghan *et al.*, 1989).

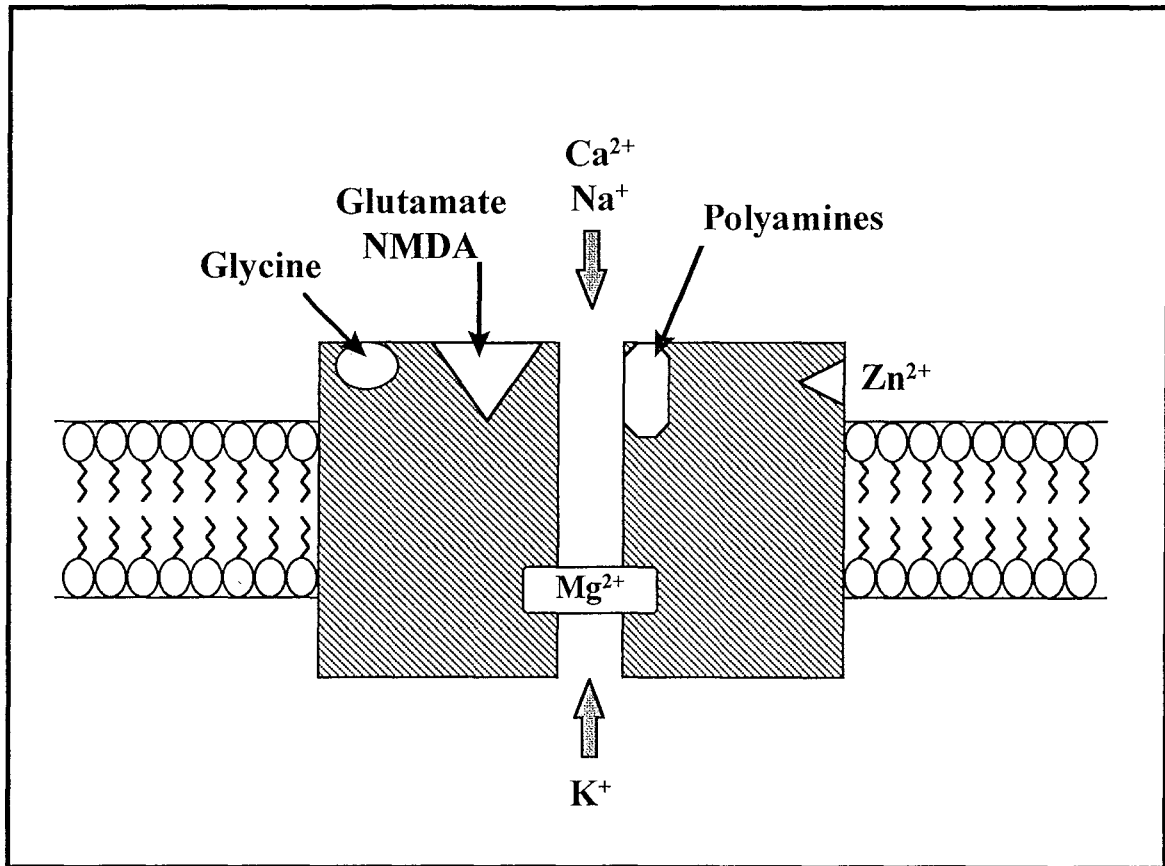


Figure 3 : Schéma de la structure du récepteur de type NMDA (*N*-methyl-D-aspartate).

L'AP5 (DL-2-amino-5-phosphonopentanoate) et l'AP7 (DL-2-amino-7-phosphonoheptanoate) ont une puissance et une sélectivité égales (Monaghan *et al.*, 1984; Olverman *et al.*, 1988). Les autres antagonistes du récepteur NMDA dérivent de l'AP5 et l'AP7. Ainsi, l'acide β -D-aspartylaminométhyl phosphonique (ASP-AMP) et l'acide γ -D-glutamylaminométhyl phosphonique (GLU-AMP) sont deux peptides avec des profils proches de l'AP5. L'acide 3-[(\pm)-2-carboxypiperazine-4-yl]-propyl-1-phosphonique (CPP) est un analogue d'AP7, avec une structure plus rigide et approximativement trois fois plus puissant que l'AP5 (Davies *et al.*, 1986; Harris *et al.*, 1986; Lehmann *et al.*, 1987). L'acide 1-(cis-2-carboxypiperidine-4-yl)-methyl-1-phosphonique (CGS 19755), un analogue de la pipéridine et dont la structure est basée sur celle du CPP et AP5, est encore plus puissant que le CPP (Lehmann *et al.*, 1988).

2) Site de liaison de la glycine

La glycine potentialise l'action du glutamate ou du NMDA mais est dépourvue d'action propre (Johnson et Ascher, 1987). L'effet est obtenu par une augmentation de la fréquence d'ouverture du canal ionique. La glycine est indispensable à l'activation du récepteur NMDA par le glutamate et autres agonistes (Kleckner et Dingledine, 1988). Le kynurénate, un antagoniste du récepteur NMDA, agit par compétition au niveau du site de liaison de la glycine. Son action peut être inversée par un excès de glycine (Evans *et al.*, 1987). Un analogue du kynurénate, le 7-chlorokynurénate, a une grande sélectivité et une affinité élevée pour le site glycine du récepteur NMDA (Kemp *et al.*, 1988). La glycine elle-même est l'agoniste le plus puissant utilisé comme radioligand sous forme tritiée.

3) Canal ionique

La caractéristique essentielle de la réponse ionique par activation du récepteur NMDA est sa dépendance vis-à-vis du voltage. Cette propriété fait intervenir l'action du magnésium. Pour les valeurs de potentiel aux alentours du niveau de repos, les ions Mg^{2+} bloquent le canal ionique. Le canal est perméable aux ions Na^+ , K^+ et principalement Ca^{2+} . Il s'agit bien d'un type de canal individualisé, car si l'on suit l'entrée du calcium, on

constate qu'elle se fait indépendamment du flux calcique qui emprunte les canaux dépendants du voltage (Ascher et Nowak, 1986; Jahr et Stevens, 1987; Jahr et Lester, 1992).

b) Régulation du récepteur

Il existe des antagonistes sélectifs du récepteur NMDA comme la kétamine et la phénylcyclidine (site PCP localisé dans la canal) qui ne bloquent pas les réponses au kaïnate ou au quisqualate. D'autres dérivés, comme le TCP (thiénylcyclohexyl-pipéridine) et le MK-801 (dizocilpine) sont encore plus actifs et présentent des propriétés neuroprotectrices. Ces composés ne sont pas des antagonistes compétitifs, la fixation sur le site de reconnaissance du glutamate n'étant pas bloquée, et fonctionnent par inhibition de l'ouverture du canal. Par ailleurs, ce type de blocage nécessite l'action préalable d'un agoniste, ce qui montre que la fixation se produit sur le canal ionique à l'état ouvert. Ainsi, l'effet des antagonistes non compétitifs dépend de l'occupation du site récepteur, leur antagonisme vis à vis du récepteur étant accru en présence d'agonistes NMDA.

Le blocage du récepteur et sa levée sont partiellement dépendants du potentiel membranaire (Nowak *et al.*, 1984; Mayers *et al.*, 1984). Le site de fixation du magnésium, situé dans le canal, est voisin du site de blocage, les ions Mg^{2+} pouvant prévenir l'effet bloquant de façon dépendante du potentiel. En absence de magnésium, les canaux NMDA sont indépendants du voltage. En sa présence, par contre, il se produit un blocage des courants ioniques dépendants du voltage. Les ions Mg^{2+} , à dose élevée, bloquent la réponse NMDA et l'effet du magnésium est maximal dans des conditions d'hyperpolarisation et virtuellement absent pour des différences de potentiel de -20 mV et au-delà (Ascher et Nowak, 1987). Cette propriété est à l'origine de la voltage-dépendance de la réponse NMDA. Au niveau du potentiel de repos, le canal ionique activé par le NMDA est pratiquement totalement bloqué par les concentrations physiologiques de magnésium. En revanche, après dépolarisation, le blocage par l'ion Mg^{2+} est levé (Takahashi *et al.*, 1995). Un tel mécanisme serait associé à la neurotoxicité du glutamate médiée par le récepteur NMDA (Cox *et al.*, 1989).

Les ions Zn^{2+} exercent un rôle régulateur par action sur un site différent. Le zinc bloque le récepteur, mais de façon indépendante du voltage (Christine et Choi, 1990).

La spermine, la spermidine et d'autres polyamines endogènes augmentent la liaison du MK-801 ou du TCP au récepteur NMDA en présence de glutamate, cet effet étant inhibé par les antagonistes compétitifs (AP5, AP7 ou CCP). L'effet serait dû à une affinité des polyamines pour des sites spécifiques et non pas à une propriété d'interaction générale de ces molécules avec la membrane. Les sites de fixation étant localisés sur la face interne de la membrane, ces agents doivent franchir celle-ci pour exercer leurs effets. L'efficacité du récepteur NMDA pourrait donc être modulée par des polyamines et ceci sous la dépendance du glutamate et de la glycine (Carter *et al.*, 1989; Lodge et Johnson, 1991). Une production accrue de polyamines au cours de certains états pathologiques pourrait contribuer au phénomène de neurotoxicité.

2. Récepteurs AMPA/kainate

a) Structure des récepteurs AMPA/kainate

La pharmacologie permet de séparer les récepteurs ionotropes non-NMDA en deux types : les récepteurs de type kainate (à haute affinité pour le kainate) et les récepteurs de type AMPA (à faible affinité pour le kainate) (Keinanen *et al.*, 1990; Wisden et Seeburg, 1993).

Le récepteur de type AMPA est constitué de la combinaison de plusieurs sous-unités nommées Glu R1 à Glu R4, laquelle combinaison joue un rôle dans la spécificité ionique du canal AMPA, les sous-unités Glu R1, 2 et 4 étant plus perméables au Ca^{2+} que la sous-unité Glu R2. Le récepteur AMPA est associé dans la membrane à une protéine à rôle régulateur (**figure 4**).

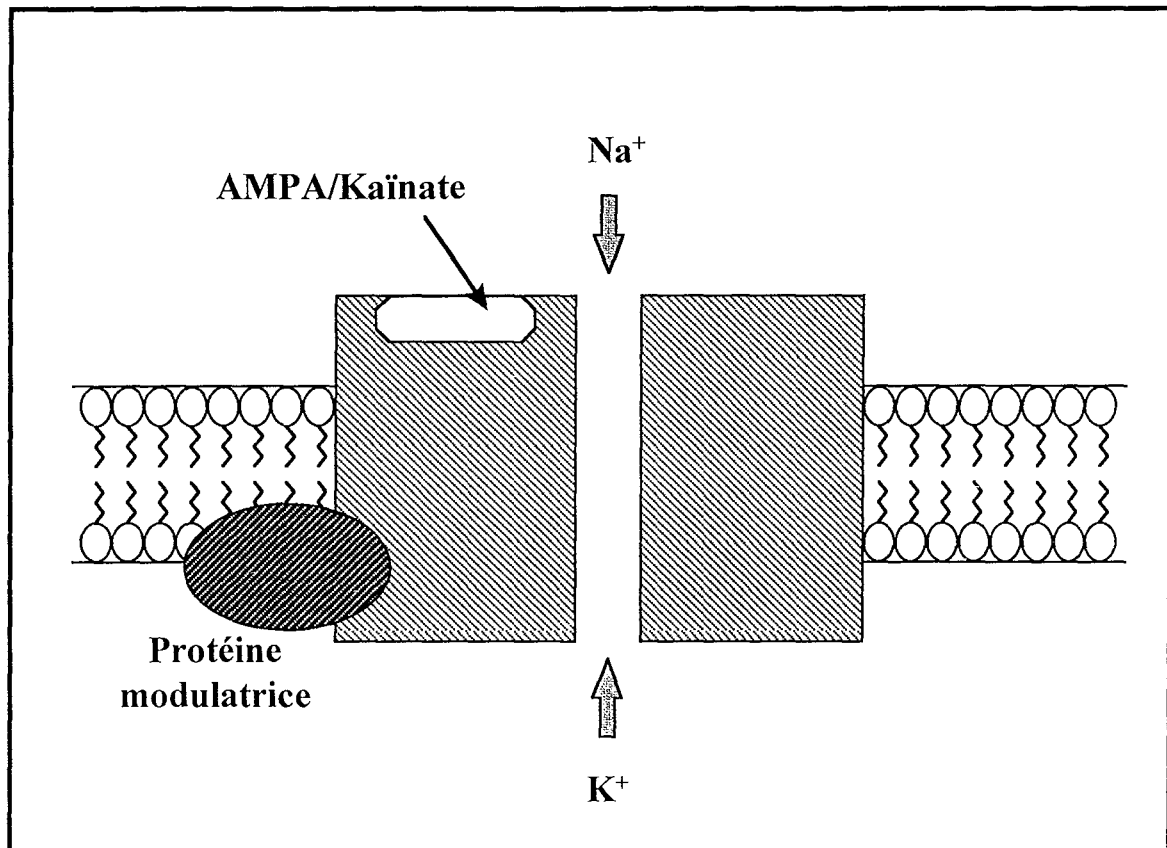


Figure 4 : Schéma de la structure du récepteur de type AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate).

La structure du récepteur de type kainate consiste en la combinaison de sous-unités Glu R5 à Glu R7 qui correspondent à des sites de faible affinité par rapport à d'autres sous-unités : KA1 et KA2. Le canal fonctionnel est constitué des sous-unités KA1 ou KA2 de façon hétéromérique avec une sous-unité Glu R5 ou Glu R6 (Hollmann et Heinemann, 1994).

b) Pharmacologie des récepteurs AMPA/kainate

Les profils d'activité des agonistes sont, par ordre d'efficacité décroissante :

- ✓ pour le type kainate : domoate > kainate > quisqualate > glutamate.
- ✓ pour le type AMPA : quisqualate ≥ AMPA > glutamate > kainate.

On remarque que le glutamate n'est pas l'agoniste le plus actif. Les agonistes non-NMDA du glutamate, le kainate, l'AMPA et le quisqualate, activent l'ouverture des canaux ioniques au Na^+ et K^+ et ils ont en général une faible perméabilité au Ca^{2+} . Cependant, certains récepteurs à haute affinité pour l'AMPA ont une perméabilité substantielle au Ca^{2+} (Keinanen *et al.*, 1990). La faible perméabilité au Ca^{2+} , ou à d'autres cations divalents, des récepteurs AMPA et kainate a été liée à la présence de résidus arginine au niveau du deuxième domaine de la sous-unité GLuR2.

Les dérivés des quinoxalines-diones, le 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) et le 6-cyano-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline-2,3-dione (CNQX), sont des antagonistes spécifiques des récepteurs non-NMDA sans pourtant pouvoir différencier les récepteurs AMPA des récepteurs kainate. Seul le 6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline-2,3-dione (NBQX) est assez spécifique des récepteurs AMPA.

Les deux types de récepteurs sont souvent associés mais montrent une distribution sélective dans le télencéphale par autoradiographie. Le kainate [^3H] montre une forte densité de sites de liaison dans la couche CA3 de l'hippocampe, les couches profondes du cortex, le striatum et la couche granuleuse du cervelet, entre autres. La liaison de l'AMPA [^3H] montre une densité plus forte dans la couche CA1 de

l'hippocampe, les couches corticales externes, le septum latéral et la couche moléculaire du cervelet (Collingridge et Lester, 1989).

3. Récepteur L-AP4

Cette catégorie contraste avec les types évoqués précédemment par l'effet hyperpolarisant produit lors de son activation et par la localisation des récepteurs essentiellement au niveau présynaptique. La caractéristique pharmacologique est le blocage obtenu par le L-AP4, un analogue de glutamate, le groupe carboxyle étant remplacé par un phosphate (amino-4-phosphobutyrate). La mise en évidence de ce type de récepteurs résulte de l'observation dans la moelle épinière ou l'hippocampe d'un blocage par l'AP4 de certaines excitations sans blocage de l'effet d'agonistes appliqués localement comme le glutamate, l'aspartate, le NMDA, le kaïnate et le quisqualate (Fagg et Foster, 1983; Hollmann et Heinemann, 1994).

Ce récepteur est couplé avec un canal chlorure et son activation produit une hyperpolarisation. Cet effet ayant lieu au niveau présynaptique constitue donc un rétro-contrôle inhibiteur.

4. Récepteurs métabotropes

A l'heure actuelle, huit sous types de récepteurs métabotropes ont été clonés : de mGlu R1 à mGlu R8 (Hollmann et Heinemann, 1994), tous couplés à une protéine G (**figure 5**).

Ce type de récepteurs possède des propriétés pharmacologiques distinctes des récepteurs ionotropes. Ils interviennent dans les processus de plasticité synaptique, de mémorisation et d'apprentissage ainsi que la modulation de la transmission excitatrice synaptique (Sladeczek *et al.*, 1988; Schoepp *et al.*, 1990; Schoepp et Conn, 1993).

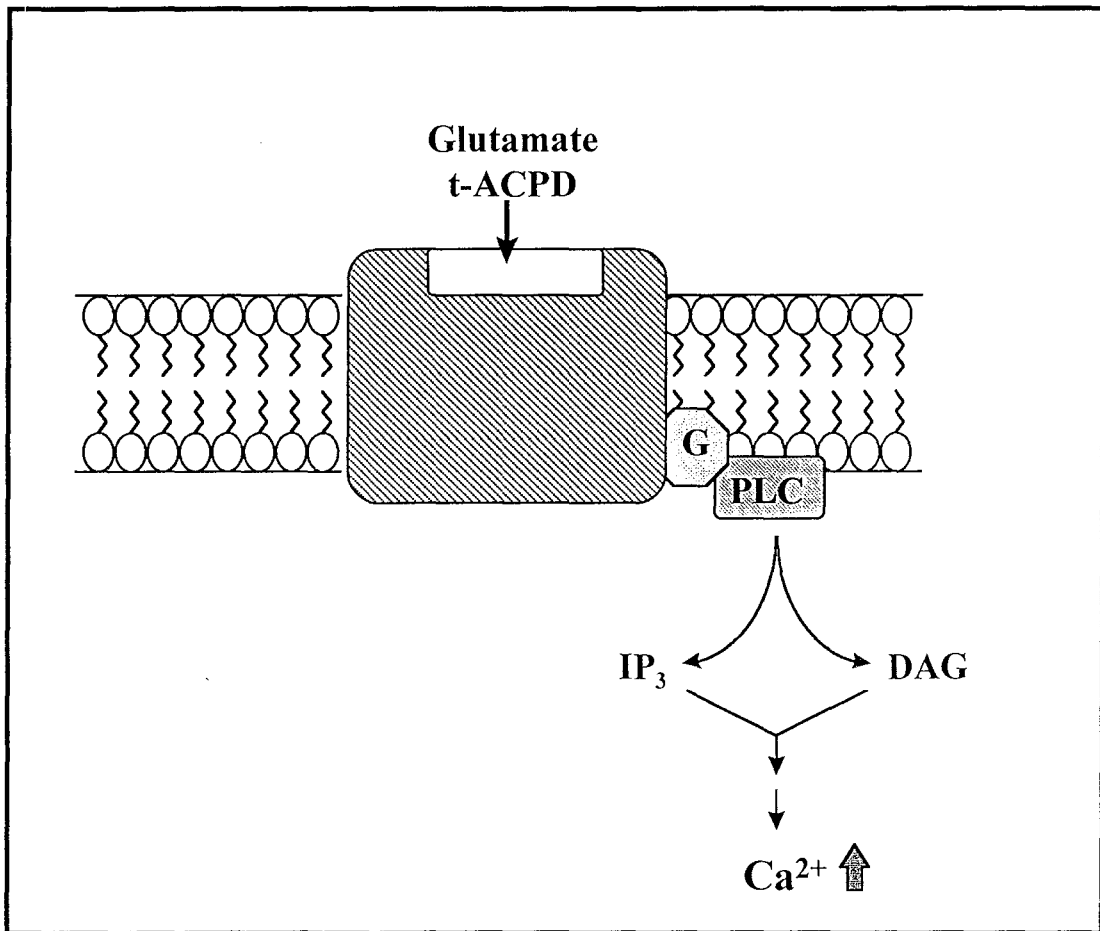


Figure 5 : Schéma de la structure des récepteurs métabotropes.

t-ACPD: *trans*-(±)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate; DAG: diacylglycérol; IP₃: inositol triphosphate; PLC: phospholipase C; G: protéine G.

La réponse métabotrope est caractérisée par des oscillations du courant chlore. Le couplage du récepteur s'effectue par la stimulation de l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). Le PIP2 est hydrolysé par la phospholipase C couplée au récepteur par l'intermédiaire d'une protéine G. Le DAG est un second messenger qui stimule la protéine kinase C membranaire et l'IP3, une fois libéré dans le cytosol, permet la mobilisation du calcium à partir du réticulum endoplasmique. Par ailleurs, il existe d'autres systèmes de transduction couplés aux récepteurs métabotropes. En effet, la liaison du glutamate à son récepteur métabotrope conduit à l'activation de l'enzyme adénylyl cyclase qui entraîne la production d'AMP cyclique (Winder et Conn, 1995) ou bien de la phospholipase A2 (PLA2) à l'origine de la libération d'acide arachidonique (Johnston, 1993).

Le quisqualate, comme le glutamate et l'iboténate, peut induire une réponse, mais non le kaïnate, l'AMPA ou le NMDA. Le *trans*-ACPD (*trans*-(±)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate) stimule le métabolisme des inositol phosphates, effet inhibé par les antagonistes non compétitifs, le LAβH (L-aspartate-β-hydroxamate) et l'AP3 (2-amino-3-phospho-propionate).

Littman *et al.* (1993) ont subdivisé les récepteurs couplés aux phosphoinositides en trois sous types en fonction de leur sensibilité aux agonistes et antagonistes:

✓ un sous-type stimulé par le D-aspartate et insensible à l'action antagoniste du LAβH et du AP3 et qui serait impliqué durant le développement.

✓ un sous-type stimulé par le *trans*-ACPD, le quisqualate et l'iboténate et bloqué par le LAβH et l'AP3. On le retrouve dans l'hippocampe et le cortex cérébral.

✓ un sous-type stimulé par le *trans*-ACPD, le quisqualate et l'iboténate mais insensible aux actions du LAβH et AP3. Il est présent essentiellement dans le cervelet (Littman *et al.*, 1993).

D. RECEPTEURS DU GLUTAMATE AU COURS DU DEVELOPPEMENT

La maturation des propriétés électrophysiologiques, biochimiques et pharmacologiques des récepteurs du glutamate au cours du développement est en partie responsable des modifications d'excitabilité cérébrale ainsi que de la survie, de la croissance, de la différenciation et de la régulation de la cytoarchitecture neuronale. La plasticité développementale du système nerveux central des mammifères dépend largement des propriétés de ces récepteurs (Coyle, 1977; MacDonald et Johnston, 1990; Scatton, 1993).

La teneur cérébrale en glutamate, comme celle des autres AAE, augmente au cours du développement, en relation avec l'évolution fonctionnelle des structures cérébrales (Ricci *et al.*, 1990). Les AAE sont abondamment présents dans le cerveau de rat pendant la période périnatale et des sites de liaison pour le glutamate ont été mis en évidence dès la naissance, avec une augmentation de la capacité à fixer le glutamate au cours du développement cérébral (Sanderson et Murphy, 1982).

1. Ontogenèse des récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont détectables dans le cerveau de rat le 1^{er} jour suivant la naissance. Leur densité devient supérieure à celle des adultes entre le 14^{ème} et le 28^{ème} jour postnatal (MacDonald *et al.*, 1988; Insel *et al.*, 1990; MacDonald et Johnston, 1990).

L'activation du récepteur par le glutamate et la glycine étant faible chez les rats de 5 jours et le fait qu'elle augmente de manière substantielle jusqu'au stade de 15 jours, soulignent l'intérêt de la maturation fonctionnelle du complexe récepteur. Les analyses autoradiographiques ont révélé un développement différentiel et spécifique des différents sites du récepteur (Insel *et al.*, 1990; MacDonald *et al.*, 1990) et sa capacité à fixer le MK-801 apparaît avant les sites de liaison du glutamate (Doriat *et al.*, 1998). Doriat *et al.* (1998) ont montré une augmentation progressive du nombre total des sites de liaison pour

le MK-801 dans le cerveau de rat durant la période postnatale et les changements d'affinité pour cet antagoniste au cours de l'ontogenèse des récepteurs NMDA (Mishra et Delivoria-Papadopoulos, 1992) soulignent le rôle de ces récepteurs dans le cerveau immature. Ces récepteurs sont fonctionnels au 3^{ème} jour postnatal (Burgard et Hablitz, 1993), stade auquel apparaissent également les sites de liaison pour le MK-801 (Morin *et al.*, 1989).

Par ailleurs, cette augmentation transitoire de la densité des récepteurs NMDA durant le premier mois postnatal (Tremblay *et al.*, 1988) et la présence de synapses excitatrices fonctionnelles durant le développement embryonnaire et postnatal (Connors *et al.*, 1983; Blanton et Kriegstein, 1991) suggèrent une influence trophique des récepteurs NMDA au cours du développement (Burgard et Hablitz, 1993).

De plus, la neurotoxicité du NMDA augmente transitoirement dans le cerveau immature de rat (MacDonald *et al.*, 1988; MacDonald et Johnston, 1990). Cette augmentation se superpose à l'augmentation de la densité des sites de liaison pour le NMDA dans l'hippocampe et le cortex de rat en développement (Tremblay *et al.*, 1988).

Toutefois, les changements des caractéristiques de liaison du MK-801 au cours du développement cérébral refléteraient une ontogenèse séquentielle des différents types de récepteurs NMDA avec pour chacun une distribution et un profil développemental propres (Monyer *et al.*, 1992). La sous-unité NR1 serait surtout exprimée aux stades pré- et post-natals, et l'expression de la sous-unité NR2 serait plutôt séquentielle jusqu'à l'âge adulte (Monyer *et al.*, 1994). En effet, dans le cerveau, une expression différentielle des différentes sous-unités NR2A, NR2B, NR2C et NR2D durant le développement postnatal a été démontrée (Wenzel *et al.*, 1997), laquelle entraînerait des différences de fonction entre les divers récepteurs NMDA (Carmignoto et Vicini, 1992; Khazipov *et al.*, 1995; Portera-Cailliau *et al.*, 1996). Alors que les sous-unités NR2A et NR2C sont fortement exprimées après la naissance, les sous-unités NR2B et NR2D sont plutôt présentes pendant le développement embryonnaire et dans la période périnatale (Watanabe *et al.*, 1992). L'expression de NR2D diminue avec la maturation cérébrale (Wenzel *et al.*, 1996)

et les souris déficientes pour les gènes codant pour NR1 et NR2B meurent 1 jour après la naissance (Ikeda *et al.*, 1995; Ebralidze *et al.*, 1996).

2. Ontogenèse des récepteurs non-NMDA

La présence des récepteurs non-NMDA a été démontrée dans le cortex à partir du 1^{er} jour après la naissance (Insel *et al.*, 1990; MacDonald et Johnston, 1990; Burgard et Hablitz, 1993). Le développement de leurs sites de liaison dans le cerveau de rat est caractérisé par une faible capacité de liaison prénatale et une augmentation rapide qui atteint des valeurs maximales au 21^{ème} jour postnatal. (Campochiaro et Coyle, 1978). Erdö et Wolff (1989) ont montré une augmentation transitoire du nombre et de l'affinité des récepteurs non-NMDA dans le cortex du cerveau immature de rat. Au cours de la 2^{ème} semaine postnatale, leur expression est transitoirement plus élevée que chez l'adulte. Les niveaux maximum de liaison de l'acide kaïnique dans la plupart des régions cérébrales sont atteintes entre 14 et 21 jours (Miller *et al.*, 1990).

Durant le développement postnatal, la densité des sites de liaison du glutamate augmente, mais l'efficacité de couplage de ces sites avec le métabolisme des phosphoinositides décline progressivement. Chez la souris, la stimulation de l'hydrolyse des phosphoinositides est très forte à 6-8 jours après la naissance mais elle diminue durant les 10 jours suivants et atteint les valeurs mesurées chez l'adulte aux environs du 24^{ème} jour postnatal (Nicoletti *et al.*, 1986).

E. EXCITOTOXICITE LIEE AU GLUTAMATE

Les effets physiologiques importants obtenus par activation des récepteurs aux AAE découlent majoritairement d'une entrée de calcium dont les conséquences intracellulaires sont nombreuses. Parmi ces effets, certains sont nécessaires au bon déroulement des processus de développement et d'apprentissage, d'autres qui résultent d'un dépassement du mécanisme sont au contraire toxiques.

1. Concept d'excitotoxicité

Les lésions produites par l'administration des AAE et de leurs analogues, rassemblées sous le nom de lésions excitotoxiques, ont été décrites depuis longtemps (Lucas et Newhouse, 1957; Olney, 1969).

Cette propriété semble générale pour les différents types de récepteurs aux AAE, et une corrélation entre l'activation des récepteurs NMDA ou non-NMDA et la sensibilité à l'excitotoxicité a été mise en évidence (Frandsen et Schousboe, 1987, 1990; Frandsen *et al.*, 1989; Marret *et al.*, 1995a,b). Cependant, la neurotoxicité incrimine davantage les récepteurs NMDA, les antagonistes NMDA étant les plus efficaces pour s'opposer aux effets néfastes de l'administration de glutamate (Choi *et al.*, 1988; Hartley et Choi, 1989; Lysko *et al.*, 1989; Black *et al.*, 1995). Dans un modèle de culture de motoneurones de la moelle épinière, par contre, le processus excitotoxique est insensible au blocage des récepteurs NMDA et semble être médié par les récepteurs AMPA/kainate (Rothstein *et al.*, 1993).

La médiation de l'excitotoxicité dépend largement des différents sous-types de récepteurs exprimés par la population cellulaire concernée. Toutefois, le rôle de l'acide glutamique endogène est à prendre en considération. Les effets de l'acide kainique, qui est un puissant neurotoxique *in vivo*, semblent dépendre de la libération de l'acide glutamique endogène, ces effets pouvant être inhibés par ablation des afférences glutamatergiques (Campochiaro et Coyle, 1978).

2. Hypothèse excitotoxique

La régulation des quantités de glutamate et d'aspartate dans le milieu extracellulaire, et dans la fente synaptique en particulier, dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la recapture par les neurones ou les cellules gliales.

Dans des études réalisées *in vitro*, la mort neuronale a été observée après un contact avec un milieu riche en glutamate (Koh et Choi, 1987; Choi *et al.*, 1987; Dessi *et al.*, 1994) mais *in vivo* la capture par les cellules gliales réduit la toxicité. On sait maintenant que les lésions du système nerveux produites par les AAE et leurs analogues sont dues à un débordement des mécanismes physiologiques au cours duquel la dépolarisation, l'entrée des ions Na^+ , l'augmentation des ions Ca^{2+} dans les cellules et la libération des AAE ne sont plus contrôlées (Choi, 1987, 1988). Il s'ensuit alors l'apparition d'altérations membranaires et finalement une lyse cellulaire.

Parmi les mécanismes de la toxicité cellulaire, qui sont très nombreux du fait de la richesse des interactions possibles des ions Ca^{2+} , nous retiendrons :

- ✓ l'activation des calpaïnes qui, dégradant les différents constituants du cytosquelette, désorganisent les terminaisons nerveuses (Doble, 1995).

- ✓ l'activation des phospholipases avec production d'acide arachidonique (Patel *et al.*, 1990) qui est impliqué dans la potentialisation à long terme mais aussi dans des processus pathologiques (Farooqui et Horrocks, 1991, 1994). La libération des AAE est réduite sous l'action d'inhibiteurs du métabolisme de l'acide arachidonique (Peterson *et al.*, 1995), suggérant un effet en retour de l'acide arachidonique sur la concentration en AAE (**figure 6**).

- ✓ la production de radicaux libres oxygénés qui est corrélée avec le degré d'activation des récepteurs NMDA (Reynolds et Hastings, 1995).

- ✓ la production de monoxyde d'azote capable d'inhiber la respiration mitochondriale (Bonfoco *et al.*, 1995).

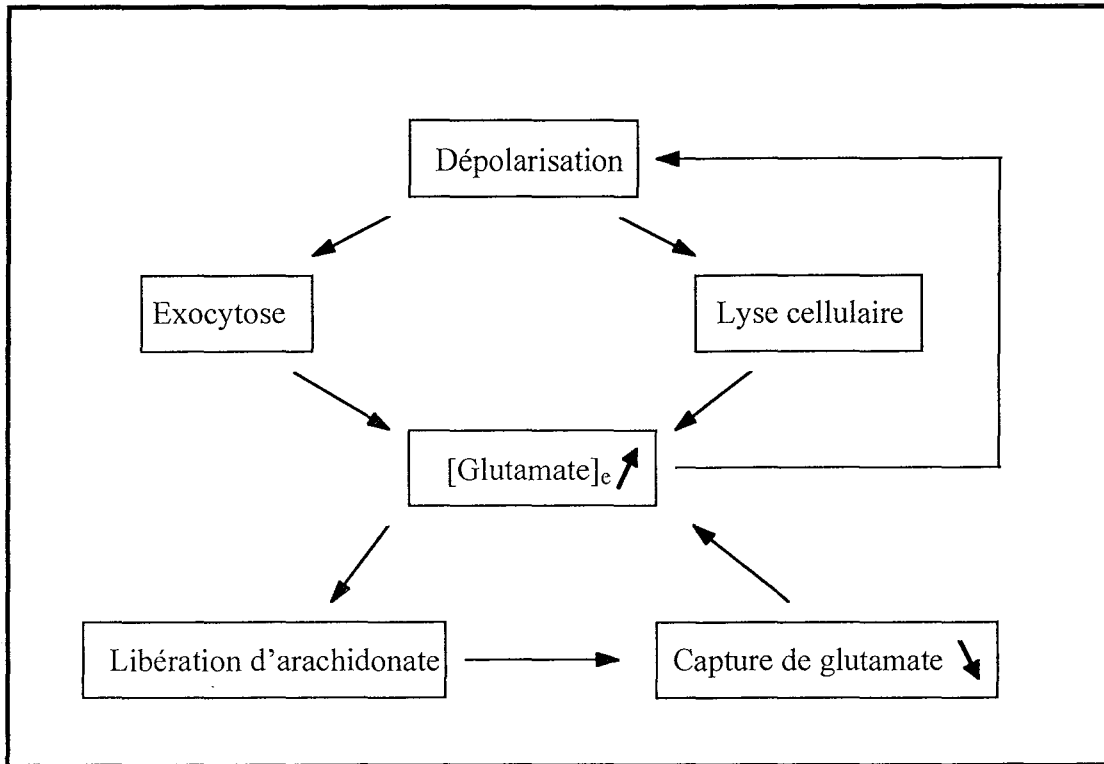


Figure 6 : Effet neurotoxique du glutamate extracellulaire.

La régulation du taux de glutamate dans le milieu extracellulaire est assurée par la capture de l'ion glutamate par les neurones et les cellules gliales. Si cette capture diminue, par dépolarisation ou augmentation du potassium extracellulaire ($[K^+]_e$), le phénomène tend à s'amplifier de lui-même (la sortie de potassium augmentant de plus en plus la dépolarisation) et l'effet est encore aggravé par l'action de l'acide arachidonique. L'origine de l'effet neurotoxique du glutamate est donc dans ce mécanisme qui se poursuit par une décharge répétitive des neurones et un flux calcique entrant qui échappent à tout contrôle.

En outre, les taux d'AAE ont tendance à s'auto-entretenir. L'élévation de la concentration en acide arachidonique inhibe la recapture du glutamate ce qui contribue à l'augmentation de la concentration extracellulaire en glutamate. Les fortes concentrations en glutamate dans l'environnement extracellulaire, peuvent diffuser vers d'autres neurones et provoquer leur dépolarisation, amplifiant ainsi les effets toxiques (**figure 6**).

Par ailleurs, l'augmentation du calcium intracellulaire peut aussi stimuler l'exocytose à partir des vésicules synaptiques, entretenant ainsi la libération du glutamate (Sanchez-Prieto et Gonzalez, 1988).

3. Excitotoxicité et rôle du glutamate dans l'hypoxie-ischémie

Les propriétés toxiques du glutamate sont sous-jacentes à la vulnérabilité neuronale induite par l'hypoxie/ischémie. Pendant l'agression hypoxique/ischémique, on assiste à une libération accrue de glutamate, en relation avec l'augmentation de la concentration calcique (Drejer *et al.*, 1985; Wahl *et al.*, 1994). Les neurones affectés, libèrent à leur tour des AAE et le processus lésionnel s'étend.

In vitro, la mort neuronale induite par l'anoxie est étroitement liée aux effets neurotoxiques des AAE (Drejer *et al.*, 1985), elle peut être bloquée en augmentant la concentration de Mg^{2+} extracellulaire (Nowak *et al.*, 1984; Choi et Rothman, 1990), en présence des antagonistes des récepteurs NMDA (Rothman, 1983, 1984) ou encore d'un inhibiteur de la libération du glutamate (Dessi *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent que l'anoxie entraîne la libération du glutamate qui, par un mécanisme excitotoxique médié par les récepteurs NMDA, induit la mort neuronale.

Dans un modèle d'ischémie cérébrale globale chez le rat, Benveniste *et al.* (1984) ont montré par microdialyse l'augmentation massive des taux de glutamate. Dans un modèle d'ischémie focale, ces taux sont étroitement corrélés avec l'importance des lésions

(Butcher *et al.*, 1990). Enfin, il a été démontré que la nécrose induite par ischémie dans la zone CA1 de l'hippocampe est réduite par ablation des fibres collatérales glutamatergiques afférentes à cette structure (Onodera *et al.*, 1986).

La protection des antagonistes des récepteurs NMDA, mais aussi non-NMDA contre les effets de l'hypoxie-ischémie, sur les neurones *in vivo* ou *in vitro*, souligne la participation de ces différents récepteurs dans la survenue des dommages suivant l'hypoxie/ischémie (Schurr et Rigor, 1992; Schurr *et al.*, 1995; Maier *et al.*, 1995).

L'activation des récepteurs NMDA semble jouer un rôle majeur dans la mort neuronale induite par ischémie cérébrale. La première démonstration a été réalisée par Simon *et al.* (1984) au cours d'un travail où l'injection intracérébrale d'un antagoniste compétitif protégeait les rats des effets d'une ischémie globale transitoire. Depuis, de nombreux composés (antagonistes des récepteurs NMDA ou AMPA/kainate et inhibiteurs présynaptiques de la neurotransmission glutamatergique) ont montré des capacités neuroprotectrices vis-à-vis des modèles d'ischémie focale, tandis que leur efficacité dans les modèles d'ischémie globale est plus discutée (Buchan, 1990). Enfin, les inhibiteurs de la libération du glutamate, Riluzole et Lamotrigine, réduisent les pertes neuronales induites après ischémie globale ou focale (Pratt *et al.*, 1992; Rataud *et al.*, 1994).

Parmi les structures les plus sensibles à l'excitotoxicité, l'hippocampe est la mieux étudiée et présente après ischémie une dégénérescence neuronale différée. Le striatum est également sévèrement touché, mais dans cette structure et *in vivo*, la neurotoxicité n'est pas induite en inhibant seulement la recapture du glutamate (Massieu *et al.*, 1995).

Rajdev et Reynolds (1994) ont montré que le glutamate et le NMDA, à des concentrations habituellement non toxiques, deviennent toxiques pour des neurones corticaux en insuffisance métabolique. Ainsi, l'hypoglycémie accompagnant l'ischémie est également un médiateur de l'excitotoxicité et il semble qu'une courte période de privation en glucose changerait la sensibilité des neurones au glutamate. De plus, une réduction

prolongée de l'apport en glucose pourrait contribuer à maintenir les taux de glutamate extracellulaire très élevés (Rajdev et Reynolds, 1994).

4. Remise en cause de l'hypothèse excitotoxique

Tandis que divers travaux ont mis l'accent sur l'implication du glutamate dans la mort neuronale d'origine hypoxique/ischémique, la théorie de l'excitotoxicité et le rôle accordé au glutamate dans l'hypoxie sont toutefois de plus en plus discutés (Choi et Rothman, 1990; Hossmann, 1994). L'excitotoxicité ne serait pas seule mise en jeu et pourrait même s'avérer d'importance mineure dans certains cas d'ischémie sévère au cours desquels les antagonistes NMDA n'exercent pas d'effet protecteur sur les neurones (Gloldberg *et al.*, 1987).

De plus, les effets de la privation en oxygène ne se superposent pas exactement à ceux du glutamate. Dans les neurones hippocampaux en culture exposés à de fortes concentrations en glutamate, l'augmentation du taux de calcium intracellulaire est différente de celle provoquée par l'anoxie (Haddad et Jiang, 1993).

Dans l'ischémie focale, les lésions cérébrales sont confinées aux territoires irrigués par l'artère ligaturé et se développent en quelques heures (Kaplan *et al.*, 1991). Par contre, la mort neuronale induite par une ischémie globale peut être retardée de quelques jours et elle est restreinte à un petit nombre de populations cellulaires (Kirino *et al.*, 1984) quoique que le glutamate soit bien libéré dans le milieu extracellulaire (Benveniste *et al.*, 1984).

Par ailleurs, l'hypothèse excitotoxique repose pour beaucoup sur les résultats de travaux effectués *in vitro* à l'encontre desquels de nombreuses questions restent posées. La comparaison de ces études avec les observations faites *in vivo* a conduit à réévaluer le rôle du glutamate (Hossmann, 1994).

III. FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET HYPOXIE-ISCHEMIE

A. INTRODUCTION

De nombreux travaux ont mis l'accent sur le rôle des gènes précoces dans la plasticité neuronale. Ces gènes qui représentent la première réponse d'expression génique obtenue après stimulation cellulaire, peuvent être classés en deux catégories:

✓ les gènes codant pour des protéines affectant directement la fonction cellulaire.

✓ les gènes codant pour des facteurs de transcription qui influencent l'activité des cellules indirectement en agissant sur l'expression de gènes cibles. Ces molécules de signalisation qui médient la régulation de la croissance sont impliquées dans d'autres processus, comme la différenciation cellulaire et la physiologie neuronale.

Nous nous sommes intéressés à la deuxième catégorie, plus précisément à l'expression des facteurs de transcription Fos, Jun, Myc et des protéines appartenant à leurs familles dans le cadre de l'hypoxie cérébrale précoce.

1. Définition

Les facteurs de transcription représentent une famille de gènes répondant à toute une variété de stimuli. Les ARN messagers (ARNm) correspondants sont traduits en protéines capables de se lier à des séquences spécifiques de l'ADN et influencer ainsi différentes fonctions cellulaires comme la division et la différenciation de même que l'apoptose (**figure 7**).

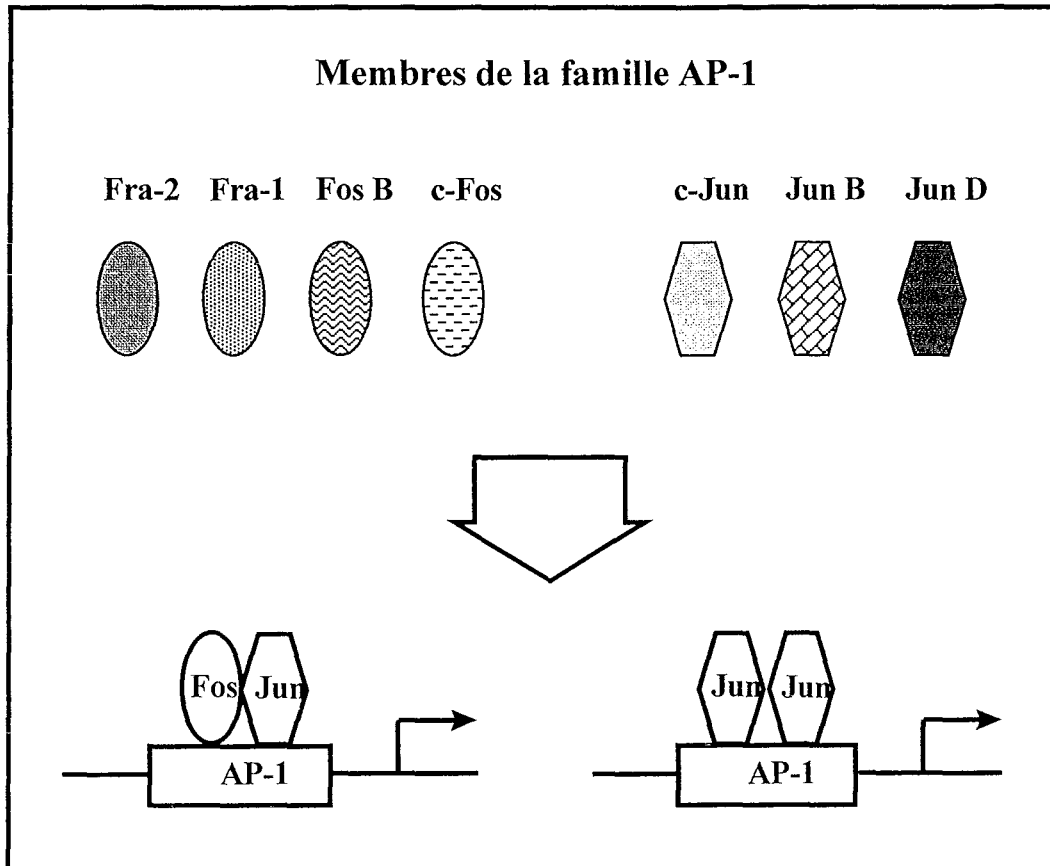


Figure 7 : Composition du facteur de transcription AP-1.

2. Réponse précoce

Les cibles génomiques des neurotransmetteurs et autres stimuli englobent un nombre important de gènes caractérisés par une induction rapide de leur expression. Ces gènes sont appelés gènes précoces. Les plus étudiés sont les proto-oncogènes *fos* et *jun*. Les gènes précoces sont caractérisés par une induction rapide de leurs ARNm puis de leurs protéines. Ce sont les premières cibles des systèmes de transduction cellulaire et l'activité de leurs protéines est responsable de la stimulation secondaire du génome et de la réponse spécifique à long terme à la stimulation initiale (Doucet *et al.*, 1990).

Quand les cellules sont stimulées, les mécanismes de transduction du signal génèrent et amplifient la réponse ou l'événement cellulaire appropriés. Dans le noyau, convergent les activités des seconds messagers en stimulant l'expression des gènes précoces.

3. Les protéines Fos et Jun

Le terme *fos* a été utilisé initialement pour décrire l'oncogène codé par les virus FBJ-MSV (Finkel-Biskis-Jinkis murine osteogenic sarcoma virus) et FBR (Finkel-Biskis-Reilly) (Curran et Teich, 1982; Curran et Verma, 1984) et le terme oncogène englobe plusieurs gènes transformants isolés directement des tumeurs humaines, ainsi que des gènes viraux. Les gènes cellulaires normaux à partir desquels les oncogènes rétroviraux sont issus sont appelés proto-oncogènes et représentent les progéniteurs des oncogènes (Bishop, 1985; Curran, 1989). Les séquences cellulaires normales dont l'oncogène viral (*v-fos*) est issu constituent le proto-oncogène *fos* ou *c-fos* (Curran *et al.*, 1983).

Comme *c-fos*, *c-jun* est un proto-oncogène dont le nom a été donné initialement à l'oncogène du virus ASV17, *ju-nana* correspondant au nombre 17 en japonais (Maki *et al.*, 1987). Les deux proto-oncogènes sont des facteurs de transcription induits par différents signaux environnementaux. Ils fonctionnent en couplant les signaux à court terme à des altérations à long terme du phénotype cellulaire, ceci en régulant l'expression

de gènes cibles. En effet, les études de co-transfection ont montré que les protéines Fos et Jun peuvent fonctionner comme des modulateurs de l'expression génique (Setoyama *et al.*, 1986).

Le gène *c-fos* code pour un ARNm de 2,2 kilobases qui, après traduction, donne naissance à la phosphoprotéine nucléaire *c-Fos* de 55 kDa (Curran *et al.*, 1987). La protéine *c-Fos* subit ensuite des modifications post-traductionnelles qui correspondent à la phosphorylation des résidus serine et thréonine (Barber et Verma, 1987), le degré de phosphorylation étant inversement proportionnel à sa capacité à se lier à l'ADN (Müller *et al.*, 1987). *In vitro*, *c-Fos* serait phosphorylée au moins par une kinase dépendante de l'AMPc (Curran *et al.*, 1987). La phosphoprotéine de poids moléculaire apparent de 62 kDa est présente dans le complexe nucléoprotéique associé à la chromatine (Renz *et al.*, 1987; Curran et Morgan, 1987) ; elle est normalement exprimée à des taux faibles dans de nombreux types cellulaires.

Fos participe à la formation d'un complexe protéique nucléaire en association avec une protéine cellulaire de 39 kDa (Curran *et al.*, 1985) identifiée comme *c-Jun*, le produit du proto-oncogène *c-jun* (Rauscher *et al.*, 1988) (**figure 7**). Toutefois, d'autres protéines nucléaires, appelées "Fos-related antigens" (Fra) sont induites par les stimuli extracellulaires qui provoquent une variation de l'expression de *c-Fos* (Müller *et al.*, 1984; Franza *et al.*, 1987; Cohen et Curran, 1988). Plusieurs de leurs gènes ont été séquencés et clonés, *fra-1* (Cohen et Curran, 1988), *fra-2* (Nishina *et al.*, 1990) et *fos B* (Zerial *et al.*, 1989) (**figure 7**). Leurs ARNm sont inductibles avec une cinétique relativement similaire à celle de *c-fos* et les protéines contiennent des régions de grande homologie avec *c-Fos*, comme le domaine de liaison à l'ADN et la région "leucine zipper" nécessaire à la dimérisation.

Comme c-fos, c-jun est membre d'une famille de gènes comprenant jun B (Ryder *et al.*, 1988) et jun D (Ryder *et al.*, 1989). De plus, tous les membres de la famille Jun forment des complexes avec les protéines de la famille Fos (Zerial *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1989) (**figure 7**). Les gènes jun B et jun D sont exprimés avec des cinétiques différentes de celle de c-jun ; alors que jun B est inductible, jun D est un membre constitutivement exprimé.

a) Induction des gènes fos et jun

Le développement cellulaire est guidé par deux types de signaux : des signaux cellulaires intrinsèques et des signaux extrinsèques. Ces signaux induisent des altérations phénotypiques en agissant, qualitativement et quantitativement, sur la transcription génétique. Le développement cellulaire apparaît comme la régulation temporelle de l'expression génique (Morgan et Curran, 1989).

Dans le cas des signaux extracellulaires (neuromédiateurs, hormones, facteurs trophiques...), un mécanisme de transduction couplant ces molécules effectrices à la transcription génique est nécessaire et le proto-oncogène c-fos constitue un marqueur permettant le suivi des effets physiologiques, électriques et pharmacologiques dans le système nerveux.

Il est maintenant établi que plusieurs types de stimuli, certains associés à des processus de différenciation et d'autres liés à l'excitation neuronale, impliquent une induction transitoire des ARNm et des protéines de c-fos. Cette induction s'effectue même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique, suggérant que les protéines nécessaires à l'expression sont présentes dans les cellules non stimulées et qu'elles sont activées par des modifications post-traductionnelles. Ce fait permet de classer fos et les autres gènes rapidement induits dans la catégorie des gènes précoces (Lau et Nathans, 1987; Curran et Morgan, 1987).

L'application de neurotransmetteurs (Kasof *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1996) ou une dépolarisation directe des neurones en culture (Morgan et Curran, 1986; Bartel *et al.*, 1989; Sheng *et al.*, 1990) peut entraîner une induction de c-fos. La protéine c-Fos peut être induite dans les neurones *in vivo* par une excitation physiologique, électrique ou pharmacologique (Morgan *et al.*, 1987; Sagar *et al.*, 1988).

Compte tenu de l'inductibilité de c-fos, de son association avec la chromatine (Abate *et al.*, 1990) et du fait que v-fos peut perturber le développement cellulaire normal (Curran, 1988), c-Fos peut fonctionner comme une composante du changement transcriptionnel, activant ou réprimant l'expression génique (Müller *et al.*, 1984; Kerpolla et Curran, 1991).

Dans beaucoup de types cellulaires, le taux de c-fos est strictement régulé. Le taux basal d'expression est normalement bas. L'induction des ARNm et de la protéine est rapide et transitoire en réponse à différents agents activateurs. L'ARNm de c-fos et la protéine correspondante apparaissent alors puis disparaissent en quelques heures. Toutefois, il y a des circonstances exceptionnelles où les cellules maintiennent des taux élevés d'expression (Curran, 1988).

La découverte que l'expression de c-fos peut être induite transitoirement à des taux élevés par le sérum ou les facteurs de croissance suggère que ce gène intervient dans les processus de signalisation (Müller *et al.*, 1984; Greenberg et Ziff, 1984; Kruijer *et al.*, 1985). De nombreux auteurs interprètent ces résultats en postulant que c-fos serait exclusivement impliqué dans la régulation cellulaire. Son induction ne serait pas nécessairement liée à la division cellulaire (Bravo *et al.*, 1985), mais plutôt une conséquence immédiate à la stimulation de différents récepteurs.

b) Régulation de la transcription des gènes fos et jun

La région régulatrice 5' du gène fos humain a été caractérisée et les séquences régulant la transcription de fos contiennent les motifs suivants:

✓ SRE (serum-responsive element) qui médie l'induction de fos par les facteurs de croissance et les protéines des proto-oncogènes Ha-ras (Fukumoto *et al.*, 1990) et raf (Jamal et Ziff, 1990).

✓ AP-1 (activated protein 1) qui médie l'induction par les phorbols esters, probablement par la PKC.

✓ CRE (cyclic AMP-responsive element) qui est co-activé avec la séquence nucléotidique nécessaire pour l'induction par le Ca²⁺ (CaRE, calcium responsive-element).

Ces éléments de régulation jouent un rôle dans le contrôle de l'induction de l'expression. L'élément de réponse au sérum, SRE (Treisman, 1985; Gilman *et al.*, 1986; Prywes et Roeder, 1987) agit comme un "enhancer" et lie une protéine nucléaire de 67 kDa (SRF : serum-response factor) (Treisman, 1986, 1987; Gilman *et al.*, 1986; Prywes et Roeder, 1987). Indépendamment de son nom, SRE ne relie pas uniquement les réponses transcriptionnelles à la stimulation par le sérum. En contribuant aux taux basal de transcription dans les cellules non stimulées, il fonctionne en couplant les réponses à différents types de stimuli (Konig *et al.*, 1989).

Malgré le fait que différents seconds messagers activent la transcription de c-fos via SRE, un autre élément de régulation fonctionne comme un élément de régulation basale et d'induction (Gilman *et al.*, 1986; Fisch *et al.*, 1987; Sheng *et al.*, 1988). Ce site est identique à CRE présent dans de nombreux gènes (Comb *et al.*, 1986; Montminy *et al.*, 1986). En plus du fait qu'il fonctionne comme CRE, cet élément agit comme élément de réponse au calcium (CaRE) en médiant, par exemple, l'inductibilité de c-fos par la

dépolarisation des cellules PC12 (Sheng *et al.*, 1990). Les influx calciques voltage-dépendants (Morgan et Curran, 1986), les neurotransmetteurs (Sheng et Greenberg, 1990; Xia *et al.*, 1996) et les ions bariure (Curran et Morgan, 1986) agissent à travers la séquence CRE/CaRE, pour une induction de l'expression de c-fos dans les cellules PC12 (**figure 8**).

L'analyse de la région régulatrice du gène c-jun humain (Angel *et al.*, 1988) a révélé des sites de liaison pour plusieurs facteurs de transcription comportant : Sp1, CTF (CAAT sequence transcription factor), AP-1 et AP-2 qui est un facteur médiant l'induction par les phorbols esters et les stimulateurs de l'AMPc. En effet, un site AP-1 et 2 sites AP-2 sont en amont du site d'initiation du facteur de transcription c-jun dans la région non traduite. La transcription de jun n'est ni sérum-dépendante, ni AMPc-dépendante et les séquences correspondantes SRE et CRE n'existent pas dans son promoteur, contrairement au gène c-fos.

c) Le complexe nucléoprotéique AP-1

Les produits protéiques des gènes c-fos et c-jun forment des complexes homodimériques et hétérodimériques qui fonctionnent comme des régulateurs transcriptionnels en se liant aux séquences d'ADN des motifs AP-1 et CRE (Franza *et al.*, 1988) présents dans de nombreux gènes (**figure 8**). Ainsi, Fos fonctionne comme un régulateur de la transcription en coopération avec Jun (Morgan et Curran, 1989; Doucet *et al.*, 1990).

Jun est également capable de se lier à des protéines qui se fixent à la séquence CRE et certains auteurs (Benbrook et Jones, 1990; Sassone-Corsi *et al.*, 1990) ont mis en évidence l'interaction moléculaire entre Jun et CREB (Cyclic AMP-response element binding protein) qui médie l'induction génétique à travers l'AMPc (Yamamoto *et al.*, 1988). En effet, Jun est une protéine dont la spécificité de liaison à l'ADN est relativement moyenne et qui, en présence de Fos, a une grande spécificité pour les sites AP-1 (séquence consensus 5'-TGACTCA-3'). Par contre, en présence de CREB, Jun a une grande

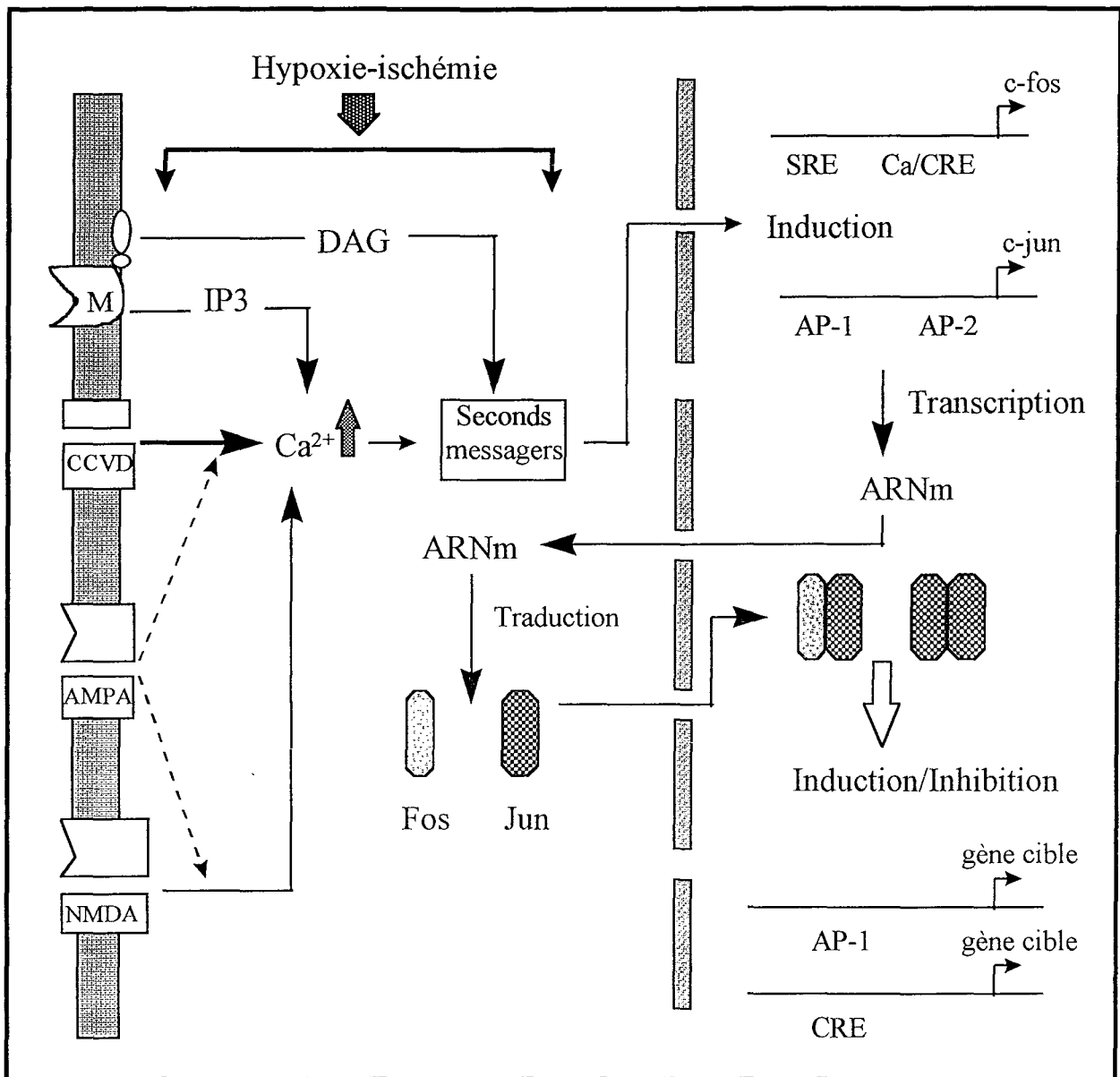


Figure 8 : Couplage stimulation-transcription consécutif à une hypoxie/ischémie. Modifiée d'après Kiessling et Gass (1994).

Le modèle suggère que l'hypoxie/ischémie peut induire l'activation de gènes précoces (c-fos, c-jun) par l'intermédiaire de récepteurs ionotropes ou métabotropes. Le signal permet l'activation d'un système de seconds messagers. La transcription des gènes fos et jun est initiée par la liaison d'éléments de régulation spécifiques au niveau de leurs promoteurs. Les protéines Fos et Jun formées se dimérisent et se fixent à leurs sites de liaison spécifiques (AP-1 et CRE) au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles induisant la régulation de leur transcription.

CCVD: Canal calcium voltage-dépendant; NMDA: *N*-methyl-D-aspartate; AMPA: α amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate; AP-1: Activated-protein 1; AP-2: Activated-protein 2; IP3: inositoltriphosphate; DAG: diacylglycerol; M: Récepteur métabotrope; SRE: Serum-response element; Ca/CRE: cAMP/ Ca^{2+} -response element.

spécificité pour les sites CRE (*TGAGCTCA*). La présence de Fos dans l'hétérodimère Fos-Jun augmente l'affinité du complexe pour l'ADN en augmentant la stabilité de l'interaction protéine-ADN (Rauscher *et al.*, 1988a, 1988b; Chiu *et al.*, 1988).

Le facteur de transcription associé à AP-1 (ou complexe AP-1) peut être formé par les membres des familles Fos et Jun. Fra-1 et Fos B sont capables de réaliser des interactions hétérodimériques avec c-Jun (**figure 7**). Jun B et Jun D peuvent former des hétérodimères avec c-Fos, mais l'association Fos-Jun B, contrairement aux autres combinaisons, serait plutôt inhibitrice de la transcription (Schutte *et al.*, 1989). Alors que les protéines de la famille Jun peuvent former des complexes monodimériques, celles de la famille Fos doivent, pour leur activité, former des hétérodimères utilisant des motifs "Leucine zipper" avec les protéines de la famille Jun (Cohen *et al.*, 1989; Kerppola et Curran, 1991).

Plusieurs travaux suggèrent que les combinaisons entre Fos, Jun, et les autres constituants du complexe AP-1 ont leur propre spécificité pour reconnaître la séquence AP-1, et alternativement, chaque complexe peut reconnaître différentes séquences de type AP-1 (Doucet *et al.*, 1990).

Ainsi, Fos et Jun sont des facteurs de transcription inductibles et leur mécanisme combinatoire suggère une spécificité différentielle au niveau génomique en réponse à l'activation cellulaire. Tous ces facteurs de transcription peuvent réguler l'expression génique neuronale et non neuronale dans le cerveau des mammifères.

Enfin, les membres des familles Fos et Jun peuvent aussi se dimériser avec d'autres protéines comme ATF (activated transcription factor) et CREB, augmentant ainsi les combinaisons possibles de liaison à l'ADN (Hai et Curran, 1991).

d) Structures de liaison à l'ADN et de dimérisation

Etant donné que fos et jun possèdent des séquences régulatrices nécessaires pour la liaison du complexe AP-1, la possibilité d'autorégulation de ces deux gènes a été largement étudiée. Jun régule positivement l'expression de son propre gène à travers le site AP-1 (Angel *et al.*, 1988) contrairement à l'autorégulation négative de l'expression de fos (Sassone-Corsi *et al.*, 1988; Konig *et al.*, 1989), laquelle implique une séquence de type AP-1 à côté du motif SRE. Toutefois, le site AP-1 de c-fos est capable d'une régulation positive de ce gène quand la liaison du facteur SRE est abolie (Doucet *et al.*, 1990).

Deux caractéristiques structurales de ces protéines sont importantes pour leur activité de régulation:

✓ la structure "leucine zipper", où les résidus leucine dans la surface en hélice α apportent une interface pour la dimérisation.

✓ la région basique, adjacente à "leucine zipper", permet l'interaction des dimères avec les nucléotides de la séquence AP-1 (Neuberg *et al.*, 1989). Aussi bien Fos que Jun participent à l'activité de liaison de l'hétérodimère (Abate *et al.*, 1990; Hirai *et al.*, 1990).

4. Réponses génomiques primaires dans les tissus nerveux

Les produits protéiques de la majorité des gènes précoces contiennent des motifs structuraux leur conférant un rôle de modulateurs de la transcription. L'expression rapide et inductible de ces régulateurs transcriptionnels en réponse aux interactions ligand-récepteur, a poussé Curran et Morgan (1987) à formuler l'idée d'un couplage stimulus-transcription, c'est-à-dire de la transduction des signaux extracellulaires en réponses géniques à long terme en vue de l'adaptation cellulaire. Après stimulation cellulaire, l'induction rapide de la réponse précoce et la synthèse des facteurs de transcription

agissent comme des “troisièmes messagers”, couplant la surface cellulaire à la régulation génique responsable du phénotype cellulaire ultime.

Dans le système nerveux, les réponses à long terme des cellules peuvent contribuer aux phénomènes de différenciation, plasticité et mémoire. L'expression de Fos est associée au passage des cellules de l'état quiescent au stade prolifératif, à l'induction de la différenciation terminale de cellules, à la sortie du cycle cellulaire et à la croissance des cellules matures (Kaczmarek et Kaminska, 1989).

La reconnaissance et l'activation transcriptionnelle des séquences AP-1 par les produits protéiques des familles Fos et Jun apportent une panoplie de spécificités essentielles pour la régulation des réponses génomiques au niveau des cellules nerveuses par des facteurs trophiques, les neurotransmetteurs et les changements de conductivité ionique.

L'induction de la différenciation des cellules PC12 par le NGF (nerve growth factor) est associée à une augmentation rapide et transitoire de l'expression de c-fos et c-jun (Kruijer *et al.*, 1985). Le NGF et d'autres facteurs de croissance induisent la protéine c-Fos avec des modifications post-traductionnelles importantes, alors que l'induction médiée par le Ca^{2+} n'est pas accompagnée de telles modifications (Curran et Morgan, 1986). Cependant, les agents dépourvus d'activité de différenciation vis-à-vis des cellules PC12, comme l'EGF (epidermal growth factor), les phorbols esters et les ions K^+ , induisent également la transcription de c-fos (Kruijer *et al.*, 1985), suggérant que l'expression du gène peut être nécessaire mais pas suffisante pour l'expression du phénotype différencié (Doucet *et al.*, 1990).

En 1989, Bartel *et al.* ont montré que si NGF et EGF induisent c-fos, c-jun et jun B dans les cellules PC12, la dépolarisation membranaire par la nicotine ou par K^+ activent l'expression de c-fos et jun B seulement.

Le fait que les dimères Jun-Jun et Fra-1-Jun reconnaissent le site AP-1 (Franza *et al.*, 1988) suggère que l'action de Fos peut être compensée par d'autres produits de gènes précoces dans la cellule où l'expression spécifique de Fos est réduite. L'observation de la croissance des neurites comme indicateur phénotypique de la différenciation sans évaluation des événements génotypiques associés est probablement insuffisante pour exclure le rôle de Fos dans la différenciation.

L'expression de c-fos a été associée à la stimulation de seconds messagers et serait indépendante de la différenciation neuronale. Dans les cultures primaires de cellules gliales, l'expression de c-fos est associée à l'activation des seconds messagers (Condorelli *et al.*, 1989). EGF couplé à son récepteur tyrosine-kinase induit la prolifération et la synthèse d'ADN en même temps que l'induction de c-fos. Par contre, les agonistes des récepteurs du glutamate, induisent des changements morphologiques qui suggèrent la différenciation et stimulent l'expression de c-fos (Didier *et al.*, 1989; Sharp *et al.*, 1990; Popovici *et al.*, 1990; Gorman *et al.*, 1995). L'expression de c-fos est donc associée à l'activation de récepteurs spécifiques (**figure 8**). Elle est soit indépendante de la prolifération induite par les agonistes, soit un médiateur de la prolifération et la différenciation (Condorelli *et al.*, 1993).

Ruppert et Willie (1987) ont démontré qu'une désagrégation mécanique induit l'expression de c-fos dans le cerveau de souris. Par contre, la protéine c-Fos serait induite exclusivement dans les tissus néonataux, et non dans les tissus adultes. Cette inductibilité dépendante de l'âge correspondrait à la phase de différenciation et prolifération cellulaires. Le taux de méthylation du gène c-fos chez la souris change considérablement après la naissance (Uehara *et al.*, 1989) et ces modifications nucléotidiques pourraient être responsables des modifications d'expression de fos en fonction de l'âge dans le cerveau de souris.

La présence de taux élevés de fos dans le SNC en développement, comme dans les modèles de prolifération et différenciation cellulaires, montre l'importance de c-fos et des autres facteurs de transcription dans la régulation des activités de croissance neuronale (Gubits *et al.*, 1988; Caubert, 1989; Gonzalez Martin *et al.*, 1991).

5. Autres facteurs de transcription

a) Le facteur de transcription c-Myc

1) La famille Myc

Les trois membres prototypes de la famille myc (c-myc, N-myc et L-myc) codent pour des protéines d'environ 67 kDa. Le gène c-myc est exprimé dans différents types de cellules en division et son expression non régulée a été impliquée dans le développement de tumeurs. Les gènes N-myc et L-myc présentent une grande homologie avec c-myc; la structure et l'organisation de ces gènes et leurs transcrits sont identiques. L'expression de N-myc est restreinte à certaines lignées, la plupart desquelles montrent des caractéristiques neuronales (Zimmerman *et al.*, 1986).

L'observation des 3 motifs du côté carboxy-terminal, "Leucine zipper" (LZ), "helix-loop-helix" (HLH) et la région basique (B), évoque une fonction de liaison spécifique à l'ADN, ces motifs apparaissant dans de nombreuses protéines ayant cette capacité. Les motifs LZ et HLH seraient impliqués dans la médiation des interactions entre les protéines (Halazonetis et Kandil, 1991). Toutefois, leur présence du côté COOH-terminal implique la fonction d'oligomérisation pour cette région. Prendergast *et al.* (1991) ont montré que c-Myc ne peut pas s'homodimériser et ont suggéré que les protéines partenaires pourraient exister et former des complexes avec c-Myc pour la liaison à l'ADN.

Max fait partie des protéines B/HLH/LZ qui forment un complexe de liaison spécifique à l'ADN avec c-Myc via le motif HLH/LZ. L'hétérodimère c-Myc-Max reconnaît le site de liaison de c-Myc avec une forte affinité et la méthylation du site de reconnaissance inhibe fortement la liaison à l'ADN. Dans les fibroblastes 3T3, les taux de Max augmentent fortement sous l'action du sérum, suggérant une régulation par les produits des gènes précoces (Prendergast *et al.*, 1991). La fonction de transactivation de

Myc apparaît très dépendante de son hétérodimérisation avec Max et de la liaison de l'hétérodimère à la séquence consensus de l'ADN (Prendergast *et al.*, 1991; Blackwood *et al.*, 1996). Toutefois, les homodimères Max-Max régulent l'expression de gènes cibles via des séquences d'ADN spécifiques.

Les protéines Mad1, Mad2, Mad3 et Mad4 constituent les autres composantes dont l'interaction avec Max aurait des effets opposés à l'hétérodimère Myc-Max (Zimmerman et Alt, 1990).

2) Fonctions cellulaires de Myc

Le proto-oncogène c-myc joue un rôle essentiel dans la régulation de la croissance et la différenciation cellulaires (Cole, 1986; Meichle *et al.*, 1992). La présence de la protéine c-Myc dans le noyau (Hann *et al.*, 1983) suggère qu'elle pourrait opérer dans la régulation génique ou le contrôle du cycle cellulaire. En effet, les études sur les fonctions de c-myc ont suggéré des rôles possibles dans la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel et aussi dans la réplication de l'ADN (Lüscher et Eisenman, 1990). La surexpression de c-myc dans les cellules en culture et les souris transgéniques peut entraîner la dérégulation de la croissance et empêcher la différenciation cellulaire (Kato et Dang, 1992). Zimmermann *et al.* (1986) ont suggéré que comme pour c-myc l'expression différentielle des gènes N-myc et L-myc aurait un rôle dans le développement et la différenciation des cellules de mammifères.

Le rôle régulateur de Myc vient de son profil biochimique et de ses activités biologiques. En particulier, Myc fonctionne en partie comme un facteur de transcription à séquence spécifique et peut stimuler la transcription des gènes possédant la séquence consensus (*GACCACGTGGTC*), site de liaison de la protéine (Halazonetis et Kandil, 1991). Les gènes candidats régulés par Myc sont impliqués dans la synthèse de l'ADN (Lüscher et Eisenman, 1990) et la régulation du cycle cellulaire (Meichle *et al.*, 1992; Evan et Littlewood, 1993), supportant l'idée que c-Myc régulerait la transcription d'un certain nombre de gènes avec pour conséquence des altérations de la croissance et la

différenciation cellulaire (Dang, 1991). En effet, le site de liaison de Myc est présent dans les régions de régulation des gènes participant à la croissance cellulaire (Halazonetis et Kandil, 1991). Penn *et al.* (1990) ont montré qu'*in vivo*, en plus de son rôle dans la régulation de la transcription cellulaire, c-myc régulerait sa propre expression par un mécanisme de feed-back négatif, l'introduction des gènes myc activé ou v-myc dans différentes cellules ayant pour effet de supprimer l'expression endogène de c-myc. Toutefois, ce mécanisme d'autorégulation ne dépend pas seulement de la protéine Myc mais nécessite des facteurs de transactivation précédemment cités.

En effet, Chin *et al.* (1995) ont montré que l'inhibition de Myc et l'accumulation de Mad pourraient être nécessaires pour la progression des cellules précurseurs vers un état différencié et l'arrêt de la croissance. La relation entre Myc et Mad dans les tissus humains et de souris a montré que ces deux protéines exercent des effets opposés sur les voies génétiques centrales concernant la transition d'un état de prolifération immature à un état différencié. Les hétérodimères formés entre Max et Mad peuvent inhiber l'expression des cibles régulées par Myc via leur capacité d'occuper par compétition la séquence consensus *CACGTG* et de réprimer activement ces cibles. Le concept que Mad peut fonctionner comme inhibiteur de l'activité de Myc est supporté par les observations biologiques que la surexpression du gène mad humain peut supprimer l'activité de transformation de c-myc dans les cellules en culture et bloquer la transition de la phase G1 à la phase S dans le cycle cellulaire (Chen *et al.*, 1995).

Au cours du développement, l'augmentation des taux d'ARNm de mad (Larsson *et al.*, 1994) et la transition des complexes associés à Max, du dimère Myc-Max à Mad-Max (Ayer et Eisenman, 1993) accompagnent la différenciation des lignées myéloïdes humaines *in vitro*. Spécifiquement, cette idée a été supportée d'une part par la capacité de Myc et Mad à s'associer à Max et se lier à des séquences cibles communes et, d'autres part, à la capacité de Mad à supprimer la transactivation exercée par Myc (Ayer *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1995).

Par ailleurs, Sakamuro *et al.* (1996) ont identifié une protéine qui interagit avec Myc et possède des propriétés inhibitrices sur la croissance. Cette protéine, BIN1 (Box-dependent Myc-INteracting protein 1), suggère de nouvelles connexions entre Myc et le contrôle de la croissance, et pourrait apporter un lien entre Myc et la transcription. En effet, BIN1 interagit avec la région E-box située du côté N-terminal de la protéine Myc. BIN1 est structurellement liée à RVS167, un inhibiteur du cycle cellulaire chez les champignons. Comme Mad, BIN1 inhiberait les transformations cellulaires induites par Myc.

3) Myc et mort cellulaire

Lorsque son expression est coordonnée avec d'autres signaux de prolifération, c-myc a un rôle de régulateur positif de la progression du cycle cellulaire. En l'absence de ces signaux, il serait un facteur péjoratif pour la survie des cellules (Askew *et al.*, 1991; Kato et Dang, 1992; Meichle *et al.*, 1992; Evan *et al.*, 1992). Les bases moléculaires de ces effets biologiques divergents restent toutefois hypothétiques. La protéine c-Myc induirait l'apoptose via la phosphoprotéine p53 qui serait responsable de l'arrêt prématuré du cycle en phase G1. Au repos, les fibroblastes de souris exprimant le gène sauvage p53 entrent à nouveau dans le cycle cellulaire puis en apoptose. Les cellules mutantes pour p53, par contre, entrent dans le cycle cellulaire mais ne subissent pas l'apoptose (Hermeking et Eick, 1994). Cependant, il a été rapporté que Myc induirait l'apoptose des cellules épithéliales via un mécanisme indépendant de p53 (Sakamuro *et al.*, 1995). Par ailleurs, Bcl-2 inhiberait l'apoptose médiée par c-myc et p53 dans les fibroblastes de rat et les cellules lymphoïdes (Fanidi *et al.*, 1992; Strasser *et al.*, 1994). La surexpression de Bcl-2 impliquerait une réduction de prolifération avec inhibition du cycle au point de transition entre G0/G1 et S (Levine, 1997).

Il a été rapporté que l'inhibition de c-myc empêche la progression des cellules vers la phase S et entraîne l'arrêt du cycle cellulaire (Heikkilä *et al.*, 1987). Aussi, le blocage de l'expression de c-Myc par des oligonucléotides antisens dans les cellules T

empêcherait l'apoptose (Shi *et al.*, 1992) et il a été montré que la protéine c-Myc induit l'apoptose dans les fibroblastes (Evan *et al.*, 1992).

Enfin, alors que Buttyan *et al.* (1988) ont suggéré que de c-Myc interviendrait dans la cascade impliquée dans la mort cellulaire par apoptose dans la prostate de rat et que son activation serait induite par c-Fos, Rosenbaum *et al.* (1994) ont montré que l'antisens de c-myc n'a pas d'effet sur l'apoptose induite par l'hypoxie dans les neurones en culture de ganglions cervicaux supérieurs de rats nouveau-nés.

b) Les protéines à doigt de zinc

En dehors des gènes fos, jun et myc, d'autres gènes précoces sont transitoirement activés dans les cellules stimulées par les facteurs de croissance ou le sérum.

Egr-1/Zif 268 (homologue de krox-24) et Egr-2 (krox-20) codent pour des protéines nucléaires avec des domaines de liaison à l'ADN en doigt de zinc ressemblant à ceux du facteur de transcription Sp1. Egr-1 peut inhiber certains promoteurs par compétition avec Sp1 pour la liaison au motif de liaison. Leur conformation est assurée par la coordination du cation Zn^{2+} qui permet une interaction avec le sillon de l'ADN et ce sont les cystéines qui donnent naissance à des ponts disulfures inter- ou intramoléculaires essentiels pour la conformation tridimensionnelle de la protéine. La protéine Sp-1 contient trois "doigts de zinc" dont l'activité transcriptionnelle est perturbée par le stress oxydant *in vivo* (Wu *et al.*, 1996).

B. FACTEURS DE TRANSCRIPTION DANS L'HYPOXIE/ISCHEMIE

1. Facteurs de transcription fos et jun

Les études menées sur l'expression des facteurs de transcription inductibles après hypoxie-ischémie sont nombreuses et fournissent des résultats contradictoires selon les modèles utilisés.

Plusieurs auteurs (Onodera *et al.*, 1989; Nowak *et al.*, 1990; Wessel *et al.*, 1991; Blumenfeld *et al.*, 1992; Gass *et al.*, 1992; Dragunow *et al.*, 1993; Gubits *et al.*, 1993; Honkaniemi *et al.*, 1995) ont rapporté que l'hypoxie-ischémie induit dans le cerveau du rat et de la gerbille adultes, l'expression des ARNm et des protéines de c-fos et c-jun. Une hypoxie seule est également responsable d'une induction sélective des gènes précoces (Prabhakar *et al.*, 1995). Des rats adultes soumis à une ischémie transitoire globale montrent une induction des ARNm de fos dans le cortex cérébral après 30 minutes de reperfusion (Onodera *et al.*, 1989). Une étude similaire (Jorgenson *et al.*, 1989) montre une augmentation des ARNm de fos dans le gyrus denté et dans l'aire CA1 de l'hippocampe à 24 et 72 heures après l'initiation de la reperfusion. Ces résultats sont corrélés avec l'accumulation du Ca^{2+} dans l'aire CA1 après ischémie (Dienel, 1984), suggérant que l'accumulation du cation est impliquée dans l'induction de fos (**figure 8**). Par ailleurs, Dragunow et Robertson (1988) ont montré que les cellules gliales de la zone péri-ischémique expriment c-Fos entre 12 et 24 heures après ischémie, parallèlement à l'expression de c-fos observée dans les cellules neuronales du cortex lésé.

An *et al.* (1993) ont montré qu'après une ischémie focale de 30 minutes les ARNm de c-fos et jun B sont induits fortement, alors que ceux de c-jun étaient faiblement activés dans le cerveau de rat adulte. En revanche, l'étude menée par Wessel *et al.* (1991) a montré qu'après un épisode ischémique de 20 minutes, les ARNm de c-fos et ceux de c-jun augmentent de la même manière.

D'autres travaux ont rapporté soit une faible induction de c-Fos après ischémie (Popovici *et al.*, 1990), soit une induction dans les régions en bordure de la zone ischémisée (Uemura *et al.*, 1991), soit encore dans les neurones résistants à l'agression (Uemura *et al.*, 1991).

En fait, c-Fos pourrait jouer un rôle dans la propagation de l'agression ou la récupération du cerveau après hypoxie/ischémie (Kiessling et Gass, 1994).

Dans un modèle d'ischémie unilatérale couplée à une hypoxie chez le rat de 21 jours où une carotide est ligaturée et l'animal exposé à un environnement hypoxique pendant 90 minutes (Gunn *et al.*, 1990), une induction de c-Fos a été observée dans les neurones destinés à survivre, mais à aucun moment dans ceux destinés à mourir. Ceci refléterait une suppression de l'expression basale de c-Fos et des Fos dans les régions endommagées du cerveau dès 2 h après l'agression. Dans ce type de modèle, les dommages neuronaux sont souvent confinés à une partie du cerveau (le côté ligaturé), l'autre côté étant utilisé comme un témoin.

Kiessling *et al.* (1993) ont montré qu'une ischémie globale transitoire chez la gerbille induit les ARNm des facteurs de transcription inductibles dans les neurones hippocampaux destinés à mourir, mais pas les protéines correspondantes. En revanche, les ARNm et les protéines semblent induites dans les neurones capables de survivre. De tels résultats confortent les études montrant une diminution généralisée de la synthèse protéique après hypoxie-ischémie (Yanagihara, 1978) et suggèrent que l'expression des protéines des facteurs de transcription fos et jun pourrait prédire la survie cellulaire après un épisode hypoxique-ischémique.

Certaines équipes (Smeyne *et al.*, 1993; Dragunow *et al.*, 1994) ont montré une corrélation entre l'expression prolongée de c-fos et la vulnérabilité sélective de certains neurones. Pour d'autres, au contraire, l'expression du gène c-fos semble associée à la survie des neurones après ischémie focale (Uemura *et al.*, 1991; Kinouchi *et al.*, 1994).

Combs *et al.* (1992) viennent conforter cette dernière hypothèse en montrant que l'hyperglycémie qui aggrave la souffrance cérébrale engendrée par l'ischémie supprime l'expression de l'ARNm de c-fos après ischémie.

Cette variation dans les résultats serait certainement liée à la diversité des modèles utilisés par les différentes équipes. En effet, il semblerait que les résultats reflètent des différences selon la sévérité du choc ischémique.

En faisant varier la durée de l'hypoxie-ischémie, Dragunow *et al.* (1994) ont pu mettre en évidence soit une mort neuronale retardée soit une nécrose. Les auteurs ont associé la mort neuronale retardée à l'induction de l'expression de c-Fos, Fos B, Fras, c-Jun, Jun B et Jun D. C-Jun, et dans une moindre mesure c-Fos, ont révélé une expression prolongée dans les neurones destinés à subir une mort retardée et non nécrotique, suggérant que ces protéines pourraient être impliquées dans la cascade biochimique causant la mort neuronale retardée. Le facteur de transcription Krox-24 (Egr-1/Zif 268) qui présente une expression basale importante, est inhibé dans les neurones de l'hippocampe au moment où la protéine c-Jun est induite au maximum (Dragunow *et al.*, 1994).

Ausserer *et al.* (1994) ont rapporté que le stress hypoxique associé à une baisse de l'apport en glucose induit c-Jun et cette induction serait bloquée par le précurseur du glutathion, suggérant que c-Jun pourrait contribuer aux dommages induits par le stress oxydatif et agirait comme un gène de réponse au stress.

In vivo, l'expression prolongée de c-jun et probablement celle de c-fos et fos B ont été impliquées dans la mort neuronale retardée qui survient après une agression ischémique (Onodera *et al.*, 1989; Jorgenson *et al.*, 1989).

2. Autres facteurs de transcription

L'expression des protéines en doigt de zinc Krox 20 et Krox 24 varie en fonction du degré de sévérité des agressions hypoxiques-ischémiques. Dans un modèle d'ischémie unilatérale associée à 15 minutes d'hypoxie, Krox 24 est fortement exprimée après l'agression, puis subit une longue répression dans les régions cérébrales où la perte neuronale est importante, contrairement à Krox 20 dont l'expression ne varie pas. Dans le cas d'une ischémie associée à une hypoxie plus longue (60 minutes) où la perte neuronale est rapide et de type nécrotique, on note l'expression des deux protéines dans les neurones du côté non ligaturé (Dragunow *et al.*, 1994). La suppression de l'expression basale de Krox 24 pourrait refléter les dommages neuronaux rapides et l'inhibition de la synthèse protéique survenant après ischémie, suggérant que les gènes précoces ne seraient pas impliqués dans le processus nécrotique. Toutefois, dans les neurones destinés à mourir par apoptose, Krox 24 ne jouerait aucun rôle contrairement à c-Jun qui est fortement exprimée.

In vivo, p53 est aussi impliqué dans la mort cellulaire programmée d'origine hypoxique-ischémique. Crumrine *et al.* (1994) ont montré qu'après occlusion de l'artère cérébrale moyenne, les souris transgéniques hétérozygotes pour le gène nul p53 ou homozygotes pour ce gène ne subissent pas de dommages liés à l'ischémie. De tels dommages sont habituellement observés dans les zones sensibles telles que l'hippocampe, le cortex et le striatum où l'expression de la protéine p53 a été rapportée (Li *et al.*, 1994). En fait, l'expression modérée de la protéine serait davantage bénéfique que son absence totale, probablement en raison de la régulation qu'exerce p53 sur des gènes tels que ceux codant pour les protéines de stress (HSP). Le volume de l'infarctus est également réduit après une ischémie corticale permanente chez la souris dont les neurones surexpriment Bcl-2. L'effet protecteur de Bcl-2 semble prédominer aux alentours de la zone nécrosée, suggérant que la mort cellulaire programmée d'origine hypoxique-ischémique interviendrait essentiellement dans la zone péri-lésionnelle (Martinou *et al.*, 1994).

C. VOIE DES KINASES JNK DANS LA MORT CELLULAIRE

Les études de la superfamille des MAPK (mitogen-activated protein kinases) ont permis de comprendre les événements de signalisation cellulaire permettant de transmettre les informations à partir de récepteurs vers le noyau (Xia *et al.*, 1996). Chez les vertébrés, les trois voies des MAPK les mieux caractérisées constituent un élément de signalisation multifonctionnel qui agit d'une manière séquentielle, où chaque enzyme phosphoryle et par là active le membre suivant de la séquence pour finalement atteindre les complexes Fos/Jun-AP1 et d'autres facteurs de transcription. Ces trois voies sont : ERK (extracellular signal-regulated protein kinases), JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinases) et p38 MAPK (**figure 9**).

La balance et les relations entre les trois cascades jouent un rôle important dans la transduction du signal dans les cellules eucaryotes. L'activation des ERK est généralement impliquée dans la survie cellulaire, celle des JNK/SAPK et p38 serait plutôt impliquée dans les réponses à différents stress. En effet, l'activation de ERK par une autre kinase, la MEK1 (MAPK/ERK kinase), entraîne la transformation des cellules de mammifères (Mansour *et al.*, 1994), alors que l'activation de JNK et p38 par les phosphorylations successives de MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase 1) et de MEK7 entraîne l'apoptose (Xia *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1996).

A l'heure actuelle, dix isoformes pour JNK ont été identifiées dans le cerveau humain, résultat de l'épissage alternatif des trois gènes JNK1, JNK2 et JNK3 dont les produits protéiques ont pour cible la phosphorylation des facteurs de transcription comme les membres de la famille Jun, ATF, Elk1 ou Sap1 (Dérillard *et al.*, 1994; Gupta *et al.*, 1996; Janknecht et Hunter, 1997; Zhang et Miller, 1997). L'activation de JNK nécessite la phosphorylation au niveau de 2 résidus, Thr-183 et Tyr-185, par les MEK4,7 qui elles-mêmes sont phosphorylées et activées par les MEKK1-3. **La figure 9** résume la cascade des phosphorylations entraînant l'activation des facteurs de transcription.

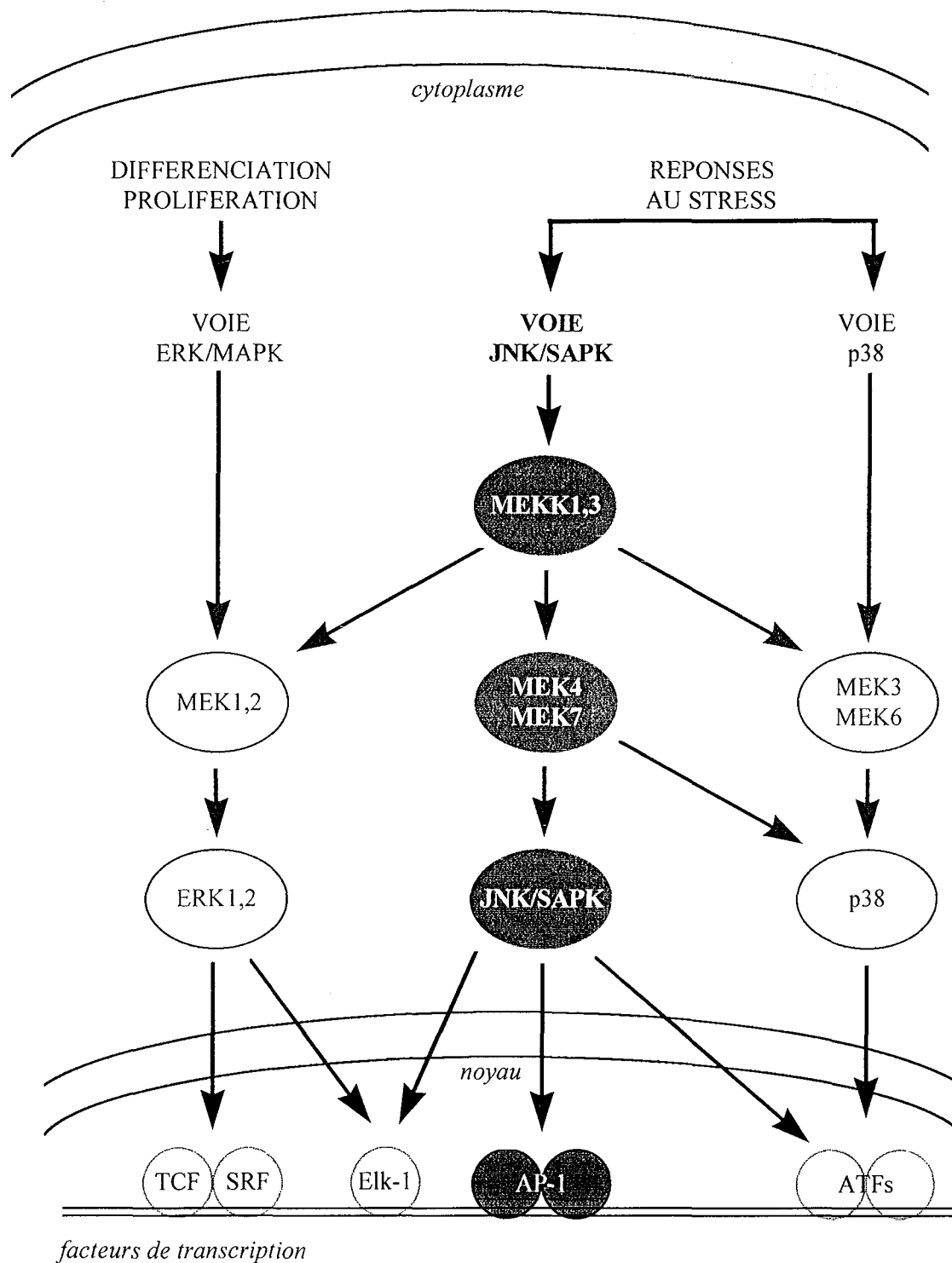


Figure 9 : Mécanisme de transduction du signal impliquant les MAPK et assurant le couplage avec des facteurs de transcription. Modifiée d'après Bhat (1995) et Hunter (1997).

JNK: c-Jun N-terminal kinase; SAPK: stress-activated protein kinases; ERK: extracellular signal regulated kinases; MEK: MAPK/ERK kinase; MEKK: MAPK/ERK kinase kinase; TCF: ternary complex factor; SRF: serum-responsive factor; ATF: activated transcription factor; AP-1: activated protein-1.

La cascade JNK peut être induite par des facteurs multigéniques comme les facteurs de croissance, l'oncogène Ras et les phorbols esters. L'activité JNK est aussi induite par des stimuli comme la lumière U.V., les inhibiteurs de la synthèse protéique, les cytokines pro-inflammatoires, le choc thermique ou encore le glutamate (Sluss *et al.*, 1994; Cano *et al.*, 1995; Adler *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1996; Flood *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1997; Schwarzschild *et al.*, 1997). La durée de l'activation des JNK semble avoir une grande importance quant à la voie à empreinter par la cellule, l'induction de JNK par les radiations UV ou γ est transitoire pendant la prolifération et persistante pendant l'apoptose (Chen *et al.*, 1996a,b).

L'apoptose d'une partie des neurones sympathiques primaires de rat privés de support trophique est associée à une activation de JNK et consécutivement à la phosphorylation de c-Jun (Virdee *et al.*, 1997). De plus, les souris déficientes en JNK3 sont protégées de l'apoptose induite par les acides aminés excitateurs dans l'hippocampe, l'activité transcriptionnelle du facteur AP-1 dans les souris mutantes étant réduite (Yang *et al.*, 1997). La protéine p53 serait un substrat de JNK1 et JNK3 (Hu *et al.* 1997). Hirata *et al.* (1997) ont rapporté qu'une activation de la voie JNK, avec la phosphorylation de c-Jun, de MKK4 (JNK kinase) et d'autres protéines, se produit lors de l'apoptose induite par le manganèse dans les cellules PC12. De plus, l'exposition des cellules de Purkinje immatures au céramide, produit de la sphingomyelinase, induit la phosphorylation des JNK/SAPK (Furuya et Hirabayashi, 1997); le céramide étant un inducteur d'apoptose de populations neuronales (Brugg *et al.*, 1996).

En bref, il y a implication générale de JNK dans les réponses à différents stress. Néanmoins, dans certains neurones soumis à une privation en facteur trophique, la suppression de l'activité JNK et la déphosphorylation de c-Jun par addition d'un facteur de survie pourraient être insuffisantes pour les secourir (Virdee *et al.*, 1997). De plus, la protection par la surexpression de Bcl-2 entraînant la survie des cellules de la lignée PC12 est associée à l'activation de JNK. D'autres facteurs de survie tels que l'actinomycine D protégeraient les neurones sans affecter JNK (Park *et al.*, 1996).

Par ailleurs, la démonstration de l'activation des MAPK en général, et des JNK en particulier, après ischémie-hypoxie, a été faite surtout sur des organes comme le cœur, le foie ou les reins (Bendinelli *et al.*, 1996; Knight et Buxton, 1996; Yin *et al.*, 1997; Mizukami *et al.*, 1997). *In vitro*, il a été montré que l'hypoxie et l'hypoxie/réoxygénation induisent la transcription des facteurs de transcription via les MAP kinases et les SAP kinases, dans des cultures de myocytes de rat ou des lignées cellulaires (Müller *et al.*, 1997; Seko *et al.*, 1997). Par contre, peu d'équipes se sont intéressés à la cascade des MAP kinases après hypoxie et/ou ischémie cérébrale. Néanmoins, Ferrer *et al.* (1997) ont montré une augmentation de l'expression de c-Jun dans les aires sensibles de l'hippocampe chez la gerbille adulte soumise à une ischémie cérébrale transitoire, laquelle augmentation est associée à une activation de JNK1.

OBJECTIFS DE L'ETUDE

La période périnatale est une période particulière au cours de laquelle de nombreuses situations pathologiques sont susceptibles d'être à l'origine d'épisodes d'hypoxie, principale cause de souffrance cérébrale chez l'enfant. L'encéphalopathie hypoxique/ischémique est caractérisée par une cascade d'événements métaboliques, hémodynamiques et cellulaires avec des répercussions immédiates sur le cerveau en développement et pouvant être à l'origine de séquelles neurologiques ultérieures (Gray *et al.*, 1993). Le risque d'accident hypoxique/ischémique cérébral concernerait 3 à 7% des nouveau-nés à terme, tandis que plus de 40% des grands prématurés présentent des lésions post-anoxiques hémorragiques et leucomalaciques plus ou moins sévères.

Les mécanismes impliqués dans la dégénérescence neuronale d'origine hypoxique/ischémique feraient intervenir une surcharge cellulaire en Ca^{2+} avec épuisement progressif des réserves énergétiques et suractivation des récepteurs glutamatergiques, causée par l'accumulation des acides aminés excitateurs, notamment le glutamate. En effet, en dehors de sa fonction de neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux central, le glutamate a été impliqué dans des désordres excitotoxiques et peut participer aux perturbations cellulaires associées à de nombreuses pathologies dégénératives, y compris dans le cerveau en développement (Lipton et Rosenberg, 1994). Une activation glutamatergique soutenue augmenterait la concentration en calcium et provoquerait la suractivation des systèmes enzymatiques et la production de radicaux libres aux effets délétères (Rothman, 1983, 1984; Choi et Rothman, 1990; Buchan *et al.*, 1991). Enfin, la période faisant suite à la réoxygénation cérébrale est déterminante pour le devenir des cellules nerveuses transitoirement privées d'oxygène. Toutefois, les connaissances sur le rôle du glutamate dans les désordres engendrés par l'hypoxie seule restent limitées, (Schurr et Rigor, 1992; Haddad et Jiang, 1993). Les mécanismes associés aux dommages neuronaux d'origine hypoxique pourraient être différents de ceux associés à l'ischémie (Taniguchi *et al.*, 1994). De plus, un certain nombre de données récentes tendent à remettre en cause l'hypothèse excitotoxique (Hossmann, 1994).

Certes, les travaux réalisés *in vivo* ont fourni des résultats précieux mais n'apparaissent pas toujours adaptés à l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la pathologie hypoxique, ceci en raison de la diversité phénotypique du cerveau et de sa complexité. De ce fait, l'utilisation de cultures cellulaires semble une approche mieux adaptée à l'analyse des réponses neuronales à l'agression hypoxique.

Nous disposons au laboratoire d'un modèle reproductible d'hypoxie/réoxygénation *in vitro* utilisant des cultures primaires de neurones cérébraux. Après 6 jours *in vitro*, les neurones soumis à une hypoxie transitoire de 6 h développent un processus de mort cellulaire programmée de type apoptotique qui s'instaure dans les 3 jours suivant la réoxygénation (Bossenmeyer *et al.*, 1998). Etant donné que dans ce modèle, les neurones expriment les différents sous-types de récepteurs pour le glutamate présentant des propriétés fonctionnelles (Oillet *et al.*, 1995), nous avons analysé les effets de l'hypoxie et tenté d'appréhender la participation des événements excitotoxiques dans les conséquences de cette agression. Pour ce faire, nous avons comparé les effets d'une exposition au glutamate à ceux induits par une hypoxie sur des neurones primaires après 6 jours de culture.

Par ailleurs, il a été montré chez plusieurs espèces que les animaux très jeunes sont plus résistants que les adultes à une privation en oxygène (Towfighi *et al.*, 1991; Friedman et Haddad, 1993). Cependant, les mécanismes qui contribuent à la résistance du cerveau immature restent hypothétiques (Schurr et Rigor, 1987; Bickler *et al.*, 1993; Towfighi *et al.*, 1995; Volpe, 1995). Certains travaux ont montré que les effets du glutamate sur les neurones sont dépendants du stade développemental (Frandsen et Schousboe, 1990). Afin d'évaluer l'influence du niveau de maturation cérébrale sur la participation de l'excitotoxicité dans les dommages hypoxiques, la réponse à l'application du glutamate et d'agonistes sélectifs des différents sous-types de récepteurs (NMDA, AMPA, kainate et *trans*-ACPD) a été analysée puis comparée à celle engendrée par un épisode hypoxique sur les neurones utilisés à deux stades maturationnels différents, à savoir après 6 et 13 jours de culture en conditions définies.

Tandis que la viabilité cellulaire a été mesurée, la souffrance neuronale a été évaluée par la libération de LDH. Les variations du métabolisme énergétique ont été analysées par le prélèvement du 2-désoxyglucose et les modifications des taux de synthèse protéique ont été étudiées par l'incorporation de leucine radioactive. Enfin, l'apoptose et la nécrose ont été analysées par l'incorporation nucléaire d'un fluorochrome, le diamidino phenylindole (DAPI).

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'hypoxie/réoxygénation est à l'origine d'une mort neuronale retardée telle qu'elle a été rapportée *in vivo* dans les structures vulnérables du cerveau (Linnik *et al.*, 1993; Rosenbaum *et al.*, 1994; Beilharz *et al.*, 1995). Dans la séquence des événements faisant suite à une agression hypoxique, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium va participer à l'induction de gènes qui, selon le cas, peuvent être impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, agissent comme facteurs de transcription ou influencent l'activité des protéases (Gubits *et al.*, 1993; Ostwald *et al.*, 1993; Munell *et al.*, 1994; Dragunow *et al.*, 1994). L'épisode hypoxique puis la réoxygénation instaurent une séquence d'altérations, à la fois précoces et tardives, de l'expression de gènes et protéines spécifiques, effecteurs ou répresseurs des processus apoptotiques, qui vont conditionner le devenir des cellules nerveuses (Siesjö, 1981; Schurr et Rigor, 1992; Johnston, 1993).

Dans le but d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les altérations cérébrales engendrées par l'hypoxie/réoxygénation chez le sujet en développement et dans un travail global de décryptage de cette séquence dans notre modèle, nous avons, pour notre part, cherché à établir la séquence précise des modifications d'expression des protéines dont l'interaction avec des séquences d'ADN influencerait la transcription génétique.

A cet égard, le facteur de transcription AP-1 (activated-protein 1) est l'un des plus étudiés. Il se présente sous forme d'homo- ou d'hétérodimères qui, dans le noyau, se lient à des motifs spécifiques au niveau de l'ADN de gènes cibles. En réponse à une agression de type hypoxique/ischémique, nombre d'informations sur l'induction des gènes formant ce facteur sont disponibles mais souvent contradictoires et les différentes combinaisons entre protéines appartenant aux familles Fos et Jun pour former les dimères seraient déterminantes pour les effets sur la transcription et la réponse cellulaire à long terme.

Pour s'assurer de la présence d'un complexe AP-1 fonctionnel dans notre modèle, nous avons analysé l'activité de liaison à l'ADN du facteur AP-1 dans les extraits nucléaires par la technique du gel-retard.

Par ailleurs, les facteurs de transcription sont régulés par des kinases appartenant à la superfamille des MAPK (mitogen-activated protein kinases). Dans ce contexte, la voie des JNK (c-Jun N-terminal kinases), qui augmente l'activité d'AP-1 en phosphorylant c-Jun, serait d'une grande importance en contribuant à transmettre l'information dans un processus de mort neuronale retardée (Dérijard *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1996a,b). Néanmoins, aucune donnée sur la participation des JNK n'a été rapportée dans des neurones soumis à l'hypoxie.

Aussi, l'étude de l'expression des protéines susceptibles de former le complexe AP-1 (c-Fos, c-Fra, c-Jun, Jun B et Jun D) couplée à celle de JNK1 et JNK3 devrait nous permettre d'appréhender les altérations dynamiques de ce facteur de transcription dans les conditions définies par notre modèle et de les associer à la mort neuronale retardée d'origine hypoxique.

L'expression des différentes protéines étudiées a été analysée à l'aide de techniques immunohistochimiques et par Western blotting.

SECTION EXPERIMENTALE

METHODOLOGIES

I. ANIMAUX

Toutes les expérimentations ont été réalisées avec des rats de souche Sprague-Dawley provenant du centre d'élevage R. Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les animaux ont été maintenus dans une animalerie pendant plusieurs jours avant toute expérimentation de manière à éliminer les interférences dues au stress et aux conditions du transport. Cette salle est maintenue à une température de 22-23°C et soumise à un cycle lumière/obscurité de 12 h dans des conditions standards. La nourriture et l'eau de boisson sont délivrées *ad libitum*.

Les expérimentations ont été réalisées selon les recommandations décrites dans le "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (NIH, Bethesda, MD, 1985).

Après identification de la phase du cycle oestral des rates par histologie de prélèvements vaginaux (coloration au Giemsa), des femelles en prooestrus ont été mises en accouplement pendant 24 h. Ensuite, elles ont été isolées jusqu'au 14^{ème} jour de gestation.

II. SUPPORTS ET PRODUITS POUR LA CULTURE CELLULAIRE

Les boîtes pour culture utilisées dans notre modèle, d'un diamètre de 35 mm et d'une hauteur de 10 mm, sont fournies par Falcon (Becton-Dickinson, Royaume-Uni).

Tous les produits utilisés pour les cultures primaires de neurones centraux et leur provenance sont regroupés dans le **tableau 1**.

La composition des différents milieux de culture est exposée dans le **tableau 2**.

	Produits	Fournisseurs
Support pour culture	Poly-L-lysine	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
Prélèvement d'embryons	Halothane	Belamont, Paris, France
Milieus de culture	DMEM	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA
	DMEM-Ham's F12	ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA
	Sérum de veau foetal	Gibco-Brl, Inchinnan, Scotland
Additifs	L-Glutamine	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Glucose	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Bicarbonate de sodium	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Transferrine humaine	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Insuline bovine	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Putrescine	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	17- β -oestradiol	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Sélénite de sodium	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Progestérone	Sigma Chemicals, St louis, MO, USA
	Pénicilline-Streptomycine	Gibco-Brl, Inchinnan, Scotland

DMEM : Dulbecco-modified Eagle's medium

Tableau 1 : Produits utilisés pour la culture de neurones.

Milieu de base	Milieu enrichi en sérum	Milieu enrichi en hormones (SATO)
- mélange DMEM :Ham's F12 sans glutamine (50 :50) 11,82 g/l	- milieu de base	- milieu de base
- glucose 5 g/l	- sérum de veau foetal 5%	- transferrine 0,1 g/l
- bicarbonate de sodium 1,9 g/l		- insuline bovine 5 mM
- glutamine 0,2 g/l		- putrescine 100 µM
- pénicilline 25 mg/l		- sélénite de sodium 30 nM
- streptomycine 25 mg/l		- 17-β-oestradiol 1 pM
- pH 7,4		- progestérone 10 nM

Tableau 2 : Composition des différents milieux de culture.

III. CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES CENTRAUX

La veille du jour de la mise en culture, 60 à 80 boîtes de Pétri pour culture de tissus ont été remplies de 2 ml d'une solution aqueuse extemporanée et stérile de poly-L-lysine (10 µg/ml) puis placées dans un incubateur à 37°C alimenté par un mélange 95% air et 5% CO₂ en atmosphère humide saturée en eau. La poly-L-lysine a le pouvoir de former, au cours des heures qui suivent, un réseau de polymère homogène auquel les cellules neuronales dissociées adhèrent tout au long de la culture et forme une monocouche (Yavin et Yavin, 1974).

Le lendemain, jour de la culture, la solution de poly-L-lysine a été éliminée. Les boîtes ont été rincées par 2 ml de milieu de base (**tableau 2**) et finalement replacées dans l'incubateur avec 2 ml de milieu de base enrichi de sérum de veau foetal 5% (SVF 5%).

A. MISE EN CULTURE DES NEURONES

Le modèle de culture utilisé a été mis au point au laboratoire (Daval *et al.*, 1988, 1991) et toute l'expérimentation a été réalisée dans des conditions stériles, sous hotte à flux laminaire et avec du matériel à usage unique. Le protocole de mise en culture est résumé dans la **figure 10**.

Au 14^{ème} jour de gestation, la rate a été anesthésiée à l'halothane, son abdomen incisé, et l'utérus gravide prélevé. Après libération de leur placenta, les embryons ont été placés dans du milieu enrichi en SVF 5%. Pour chaque embryon, la partie supérieure de l'encéphale a été sectionnée puis les méninges et les microvaisseaux sanguins ont été éliminés. Les tissus correspondant au cerveau antérieur ont été alors récupérés dans un tube conique (Falcon) contenant 10 ml de milieu enrichi en SVF 5% et conservé à 37°C. Les amas cellulaires ont été dissociés mécaniquement à la seringue. La suspension cellulaire obtenue a été centrifugée pendant 10 mn à 1250 rpm. Le surnageant obtenu a été remplacé par 10 ml de milieu enrichi en SVF 5% et une seconde homogénéisation a été

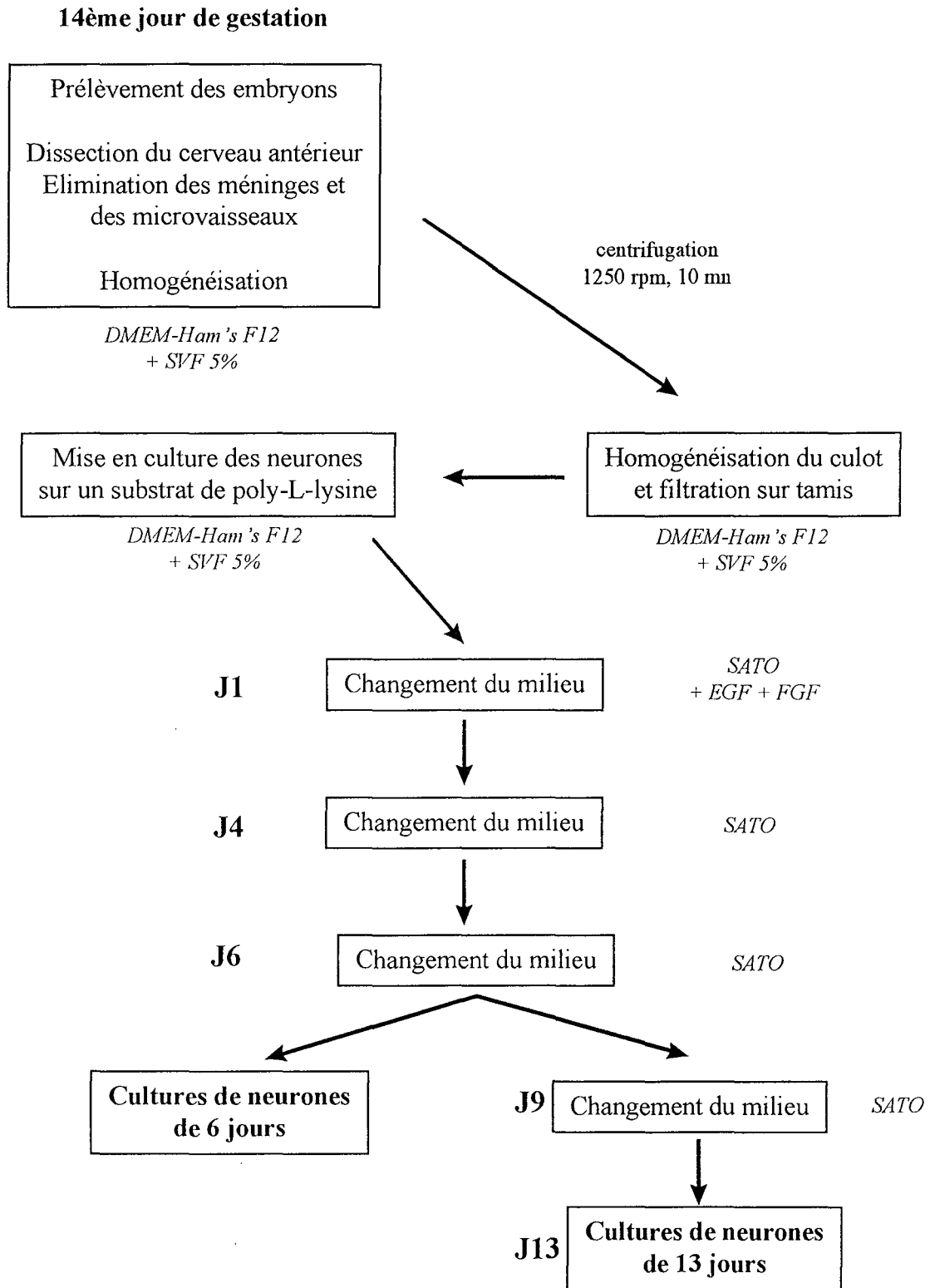


Figure 10 : Protocole de culture de neurones primaires de cerveau antérieur de rat.

effectuée. Afin d'éliminer les amas résiduels, la suspension cellulaire a été filtrée sur un tamis de nylon stérile (46 µm).

Une fois la suspension cellulaire homogène, la densité des cellules a été estimée à l'aide d'un hémocytomètre et ajustée à 10^6 cellules/ml. Les boîtes ont étéensemencées à raison de 10^6 cellules par boîte et placées en conditions standard dans l'incubateur.

Vingt quatre heures après l'ensemencement, le milieu de culture a été remplacé par un milieu enrichi en hormones (**tableau 2**) (Bottenstein et Sato, 1979; Aizenman *et al.*, 1986) et contenant des facteurs de croissance, fibroblast growth factor (FGF, 2 ng/ml) et epidermal growth factor (EGF, 10 ng/ml) (Sigma Chemicals, St louis, MO, USA). Au 4^{ème} jour de culture, le milieu a été renouvelé, cette fois sans addition de facteurs de croissance, et maintenu jusqu'au 6^{ème} jour pour les cultures utilisées à ce stade. En revanche, pour les cultures utilisées à 13 jours, le milieu a été changé par du milieu DMEM enrichi en hormones au 9^{ème} jour de culture. Les cultures ont été ainsi maintenues jusqu'au 13^{ème} jour *in vitro*.

B. CARACTERISATION DES NEURONES

L'attachement, le développement, la densité et la morphologie des cellules en culture ont été régulièrement suivis par observation en microscopie à contraste de phase (Nikon, modèle Diaphot TMD).

Le pourcentage de cellules viables a été déterminé par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan.

Pour évaluer la pureté des neurones, l'analyse immunohistochimique de la NSE (énoïase spécifique des neurones) et de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) a été réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques (Borg *et al.*, 1985).

IV. EXPOSITION A L'HYPOXIE

Après 6 ou 13 jours de croissance *in vitro*, l'apport en oxygène aux cellules a été interrompu en transférant les boîtes de culture dans une enceinte humidifiée, thermorégulée et alimentée par un mélange gazeux constitué de 95% N₂ et 5% CO₂. L'hypoxie a été réalisée pendant 1 h ou 6 h. Sur une même série de culture, des boîtes ont été réoxygénées dans des conditions standards d'incubation (37°C, 95% air et 5% CO₂) pendant 24, 48, 72 ou 96 h après l'épisode hypoxique de 6 h. Dans certains cas, les neurones ont été exposés à un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide (CHX 1 µM, Sigma Chemicals), durant l'exposition à l'hypoxie. En parallèle, des neurones témoins ont été maintenus dans les conditions standards du début à la fin de l'expérience ou bien exposés à la CHX seule pendant 6 h.

Immédiatement après les 6 h d'hypoxie, puis à 24 h et 72 h après réoxygénation, des aliquotes du milieu d'incubation ont été rapidement collectées à partir de boîtes représentatives et analysées pour leur pression partielle en oxygène (PO₂), en gaz carbonique (PCO₂) et leur pH à l'aide d'un analyseur des gaz du sang (Corning, Halstead, UK) (Sher, 1990).

V. CONTRIBUTION DE L'EXCITOTOXICITE

Le traitement des cultures par des agents pharmacologiques tels que le glutamate, les agonistes ou antagonistes sélectifs des récepteurs du glutamate, l'inhibiteur de la synthèse protéique ou encore un inhibiteur de la PKC, a été réalisée par addition directe des composés concernés dans le milieu de culture. Les différentes substances ont été diluées dans un milieu identique au milieu utilisé dans les cultures témoins non traitées.

A. EXPOSITION AU GLUTAMATE ET SES ANALOGUES

Au 6^{ème} ou 13^{ème} jour de culture des neurones, le milieu de culture a été remplacé, pendant 6 h, par le même milieu additionné de glutamate (100 µM, RBI, Natick, MA, USA) ou d'un agoniste sélectif de ses récepteurs (100 µM, RBI), c'est-à-dire NMDA (*N*-methyl-D-aspartate, dans des conditions dépolarisantes avec 50 mM KCl), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate), kaïnate, ou *trans*-ACPD (*trans*-(\pm)-1-amino-1,3-cyclopentane dicarboxylate). Dans certains cas, les neurones ont été exposés à 1 µM CHX durant l'exposition au glutamate. En parallèle, les neurones témoins ont été constamment maintenus dans des conditions standards ou bien exposés à la CHX (1 µM) seule pendant le même laps de temps.

B. ANTAGONISTES DES RECEPTEURS DU GLUTAMATE

Afin d'évaluer les effets d'antagonistes des récepteurs du glutamate dans les neurones cultivés pendant 13 jours, l'exposition à l'hypoxie ou au glutamate a par ailleurs été réalisée, en présence d'antagonistes des récepteurs NMDA (dizocilpine maleate ou MK-801, RBI) ou non-NMDA (1,2,3,4-tetrahydroxy-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[*f*]quinoxaline-7-sulfonamide disodium ou NBQX, RBI). Chacune des drogues a été utilisée à 5 et 10 µM.

VI. MORPHOLOGIE CELLULAIRE

La mort cellulaire dans les cultures de neurones peut être qualitativement suivie grâce à la microscopie à contraste de phase. La comparaison de la morphologie cellulaire des cultures soumises à l'hypoxie ou traitées par le glutamate avec les cultures témoins permet la détection d'altérations cellulaires. Ces changements consistent par exemple en un gonflement cellulaire ou en la réduction du nombre de neurites combinée à la désintégration des neurites présents. La dégénérescence des corps cellulaires entraîne une réduction marquée de la densité en culture. La fragmentation des neurites peut être visible au microscope à contraste de phase. Le gonflement osmotique des corps cellulaires suggère plutôt une mort nécrotique avec dégradation non spécifique du système membranaire qui s'en suit. La mort par apoptose, par contre, est difficilement reconnaissable au microscope sans analyses spécifiques.

VII. MESURE DE LA VIABILITE CELLULAIRE

A. PRINCIPE

Les sels de tetrazolium font partie d'un large groupe de composés organiques hétérocycliques qui forment, après réduction, des formazans insolubles et colorés dans les cellules métaboliquement actives. Ces composés ont été largement utilisés comme indicateurs de systèmes rédox et de viabilité (Altman, 1976). Le MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide) est un sel monotetrazolium largement utilisé pour mesurer la prolifération cellulaire et la cytotoxicité (Mosmann, 1983).

Dans les cellules vivantes, le sel de tetrazolium est converti dans les mitochondries intactes en formazan qui sous l'action de déshydrogénases génératrices de NADH forme un précipité violet pouvant être détecté par spectrophotométrie après extraction (Hansen *et al.*, 1989). Cette conversion cellulaire est directement proportionnelle au nombre de cellules viables. Bien que non absolue, cette technique permet d'apprécier les modifications de viabilité par comparaison à un groupe témoin.

B. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les neurones ont été incubés à 37°C pendant 2 h en présence de MTT (500 µg/ml de milieu, Sigma Chemicals), lavés deux fois avec une solution tampon phosphate (phosphate-buffered saline, PBS : 137 mM NaCl, 6 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,4) puis lysés dans du dimethyl sulfoxide (DMSO, 1 ml/boîte, Sigma Chemicals). La densité optique a été mesurée à 519 nm (Spectronic 2000, Bausch et Lomb) et les résultats exprimés en pourcentage par rapport aux témoins mesurés en parallèle.

VIII. MESURE DE LA LIBERATION DE LACTATE DESHYDROGENASE

A. PRINCIPE

Dans les cultures cellulaires, la cytotoxicité peut être quantitativement suivie en mesurant l'activité d'une enzyme cytosolique, la lactate déshydrogénase (LDH), dans le milieu extracellulaire.

La LDH est une oxydo-réductase cytoplasmique qui existe sous cinq formes isoenzymatiques dont les proportions varient suivant les tissus et le stade de développement (Bonavista, 1964). L'augmentation du taux sérique de LDH a été observé à la suite de plusieurs types de traumatismes cellulaires et a été utilisée en clinique comme index de divers états pathologiques (Hsieh et Blumenthal, 1956). De telles propriétés ont été exploitées par Koh et Choi (1987) qui ont montré que l'élévation de LDH dans le milieu d'incubation de neurones corticaux en culture était bien corrélée au degré de souffrance cellulaire imposée par différents traitements.

Le pourcentage de cellules endommagées peut être évalué par l'activité de la LDH libérée dans le milieu extracellulaire relativement à la LDH totale mesurée après lyse

des cellules avec un détergent. L'activité de la LDH a été mesurée selon le protocole décrit par Amador *et al.* (1963) basé sur l'oxydation du lactate en pyruvate et mesure de la réduction simultanée du NAD^+ en $\text{NADH} + \text{H}^+$.

B. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La présence de LDH dans le milieu de culture a été recherchée à la fin de l'exposition des neurones à l'hypoxie ou au glutamate, puis 24 h et 72 h après exposition pour les deux stades maturationnels étudiés (6 et 13 jours de culture). L'activité enzymatique a été validée à l'aide d'un sérum de contrôle (Accutrol, Sigma Diagnostics).

Des aliquotes de 50 μl d'échantillons du milieu extracellulaire ont été mélangées avec 160 μl de tampon (90 mM K_2HPO_4 , 15 mM KH_2PO_4 , 1,25 mM sodium pyruvate). Après addition de 6 μl de solution (13 mM NADH-Na_2 , 120 mM NaHCO_3), la diminution de la densité optique a été mesurée à 340 nm à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre (Spectronic 2000, Bausch et Lomb).

IX. MESURE DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE

L'activité fonctionnelle des cellules a été évaluée par la mesure du prélèvement spécifique de 2-désoxyglucose tritiée ($2\text{DG}[^3\text{H}]$, C.E.A., Saclay, 0.63 TBq/mmmole), reflet du métabolisme énergétique. Le 2DG est un analogue du glucose qui n'est pas métabolisé et donc s'accumule dans les cellules. Les boîtes ont été rincées par 2x2 ml d'une solution Krebs-Ringer (NaCl 125 mM, KCl 4,8 mM, MgSO_2 1,2 mM, CaCl_2 1,3 mM, KH_2PO_4 1,2 mM) tamponnée par de l'HEPES (N-[12-hydroxyethyl] piperazine-N'-[acide 2-ethanalsulfonique], pH 7,4). Les cellules ont été ensuite pré-incubées pendant 15 mn à 37°C dans le même tampon. Après élimination du milieu, les neurones ont été incubés pendant 30 mn dans 1,5 ml de la solution tampon contenant 1 mM de $2\text{DG}[^3\text{H}]$, lavés avec 3x2 ml de tampon puis séchés. Les neurones ont été ensuite solubilisés dans 1 ml de NaOH 1M et des échantillons de 100 μl ont été prélevés pour le comptage de la radioactivité par scintillation liquide (Compteur Beckmann, modèle LS 1801).

X. EVALUATION DES TAUX DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Les taux de synthèse protéique dans les cellules neuronales ont été analysés en mesurant l'incorporation de L-leucine radiomarquée dans les fractions solubles et insolubles des cellules en culture.

Avant exposition à l'hypoxie ou au glutamate, le milieu de culture de chaque boîte a été remplacé par 2 ml de milieu contenant la leucine^[3H] (0,5 µCi/ml, activité spécifique : 1924 TBq/mmol, New England Nuclear, Boston, MA). A la fin de la période d'exposition puis en fonction du temps, les boîtes de culture ont été rincées par 2x2 ml d'une solution de NaCl 0,9% à 4°C puis traitées pendant 20 mn avec 1 ml d'acide trichloro-acétique (TCA 10%, 4°C). Le matériel soluble au TCA a été collecté et les cellules ont été lavées par 2x0,5 ml d'éthanol. Après évaporation complète de l'éthanol, un échantillon de 100 µl a été mélangé avec 2 ml de scintillant (Hisafe II) dans une fiole de comptage et laissé pendant 24 h à 4°C à l'obscurité avant la mesure de la radioactivité. Les fractions insolubles, demeurées au fond des boîtes de culture, ont été solubilisées dans 1 ml de NaOH 1M au cours d'une incubation d'1 h à 37°C. Un échantillon de 100 µl provenant de chaque boîte a été prélevé et mélangé à 2 ml de liquide scintillant. La radioactivité a été mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Beckman, modèle LS 1801).

XI. ANALYSE DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROSE

A. PRINCIPE

Dans les neurones mourants, tous les changements morphologiques ne sont pas visibles en microscopie optique. La morphologie nucléaire et la structure de la chromatine sont fortement affectées durant la mort neuronale. La variation des événements nucléaires peut être associée à la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. L'état du noyau et la

structure de la chromatine peuvent être visualisés par marquage à l'aide d'un fluorochrome, le DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma Chemicals). La fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose est également très utilisée pour mettre en évidence le phénomène d'apoptose.

B. MARQUAGE AU DAPI

Les neurones ont été fixés pendant 10 mn dans un mélange éthanol:acide acétique (3:1), lavés pendant 1 mn dans l'eau distillée et séchés. Leur ADN nucléaire a ensuite été marqué pendant 10 mn par 0,5 µg/ml de DAPI dilué dans l'eau. Les cellules ont été de nouveau lavées deux fois à de l'eau distillée, séchées puis traitées avec une solution anti-décoloration (10 mg/ml p-phenyldiamine dans 90% de glycérol). Adaptée de Wolvetang *et al.* (1994), cette technique permet de visualiser les noyaux puis, en fonction de leurs caractéristiques morphologiques, d'effectuer des comptages cellulaires à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Axioskop) à 365 nm.

C. DISCRIMINATION ENTRE NECROSE ET APOPTOSE

Les cellules vivantes présentent un noyau rond avec une fluorescence diffuse indiquant une chromatine homogène. Les neurones nécrotiques sont caractérisés par des petits noyaux très réfringents avec une condensation chromatinienne uniforme, tandis que les neurones apoptotiques montrent une chromatine condensée et fragmentée (Gschwind et Huber, 1997).

Des comptages des cellules présentant les différentes propriétés ont été réalisés dans un minimum de 3 expériences différentes. Les noyaux apoptotiques et nécrotiques, comme les noyaux à fluorescence diffuse, ont été répertoriés dans un minimum de 3 aires de 100 noyaux par boîte de culture. Les résultats sont rapportés en pourcentage de cellules sélectivement affectées par rapport au nombre total de neurones.

D. FRAGMENTATION DE L'ADN SUR GEL D'AGAROSE

Les cultures ont été lavées 2 à 3 fois avec du PBS puis les cellules ont été récupérées dans 10 ml de PBS et centrifugées à 1200 rpm pendant 5 mn. Une fois le surnageant éliminé, les cellules formant le culot ont été resuspendues dans un volume égal de tampon d'extraction contenant 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 0,5% SDS et 0,1 mg/ml de protéinase K (Sigma Chemicals), puis incubées pendant 12 à 18 h à 50°C. Après addition d'un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et une centrifugation à 12000 rpm pendant 10 mn, la phase aqueuse a été récupérée et une seconde extraction organique a été réalisée avec le chloroforme seul. Après mesure du volume de la phase aqueuse, $1/10^{\text{ème}}$ du volume d'acétate de sodium 3M, 2 volumes d'éthanol et 10 μ l de MgCl_2 1,5 M ont été ajoutés pour précipiter l'ADN. Après une centrifugation de 12000 rpm pendant 10 mn, le culot a été lavé dans de l'éthanol à 70% puis centrifugé à 12000 rpm. Une fois l'éthanol éliminé, le culot a été resuspendu dans 20 à 50 μ l de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, et EDTA 1 mM) additionné de 15 μ l de ribonucléase A (10 mg/ml, Sigma Chemicals) puis incubé pendant 1 h à 37°C pour dissolution complète. Après une deuxième extraction au phénol-chloroforme, le culot a été finalement précipité et resuspendu dans 20 à 50 μ l de tampon TE.

Une quantité d'ADN extraite à partir de 5 boîtes a été déposée dans un gel d'agarose à 1,2% contenant 0,1 μ g/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse a été conduite à 80 volts dans un tampon TBE (0,045 M Tris-borate et 0,001M EDTA) puis le gel a été visualisé sur une lampe UV et photographié.

XII. EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION

A. ANTICORPS

Pour réaliser les marquages immunohistochimiques et par western blotting des différents facteurs de transcription étudiés, nous disposions des anticorps suivants, tous fournis par Santa-Cruz Biotechnology:

- ✓ c-Jun (KM1) : anticorps monoclonal de souris dirigé contre la séquence peptidique 56-69 de la protéine codée par le gène c-jun humain.

- ✓ Jun B (N-17) et Jun D (329) : anticorps polyclonaux de chèvre qui correspondent, respectivement, aux séquences 45-61 et 329-341 des protéines codées par les gènes jun B et jun D murins.

- ✓ c-Fos (4) et c-Fos (K25) : anticorps polyclonaux de lapin, respectivement, dirigés contre les séquences 3-16 et 128-152 de la protéine codée par le gène c-fos humain. c-Fos (4) ne reconnaît que la protéine c-Fos de 62 kDa, alors que c-Fos (K25) ne permet pas la distinction entre les différentes protéines de la famille Fos et reconnaît les protéines c-Fos, Fos B, Fra-1 et Fra-2.

- ✓ c-Myc (C-33): anticorps monoclonal de souris provenant de la fusion des cellules spléniques des souris BALB/c immunisées avec la protéine recombinante c-Myc, avec des cellules de myélome murines portant Sp2.

- ✓ Max (C-17) et Mad 1 (C-19): anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre les séquences 135-151 de Max p21 et 203-221 de Mad humaines, respectivement.

Nous disposions également d'un anticorps polyclonal anti-JNK (C-17) de chèvre dirigé contre la séquence 368-384 de la protéine JNK1. Il réagit avec deux c-Jun N-terminal kinases, p46 JNK1 et p54 β JNK3.

B. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

1. Principe

Une première incubation avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine recherchée est suivie d'une seconde incubation avec un anticorps secondaire reconnaissant les immunoglobulines de l'espèce productrice de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est conjugué à une sonde fluorescente permettant la révélation de l'anticorps primaire. Les sondes fluorescentes utilisées sont de deux types: l'isothiocyanate de fluoresceine (FITC, longueur d'onde d'excitation : 488 nm, longueur d'onde d'émission : 520 nm, dans le vert) et l'indocarbocyanine (Cy-3, longueur d'onde d'excitation : 488 nm, longueur d'onde d'émission : 575 nm, dans le rouge).

2. Protocole expérimental

Les anticorps primaires et secondaires ont été dilués dans du PBS contenant 0,5% de sérum albumine bovine (SAB, Sigma Chemicals). Les dilutions utilisées sont de 1/40 pour c-Jun, c-Fos (4), c-Fos (K25), c-Myc (C-33), Max (C-17) et Mad 1 (C-19) et 1/20 pour Jun B et Jun D. L'anticorps secondaire anti-lapin marqué au Cy-3 a été utilisé au 1/80 pour la détection de c-Fos, Max et Mad 1, celui anti-souris marqué au FITC au 1/200 pour la détection de c-Jun et c-Myc tandis que l'anticorps anti-chèvre marqué au FITC a été utilisé au 1/100 pour la détection de Jun B et Jun D. Les anticorps secondaires ont été fournis par Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Les boîtes de culture ont été brièvement rincées avec du PBS puis les neurones ont été fixés pendant 10 mn dans du méthanol froid. Une fois séchées à l'air libre, les boîtes ont été lavées avec du PBS. Après la sélection d'une zone de réaction délimitée à l'aide d'un DAKO PEN, les neurones ont été incubés pendant 20 mn avec la SAB à 0,5% afin de supprimer les liaisons non spécifiques des immunoglobulines. Les cellules ont été ensuite lavées puis incubées pendant 1 h avec l'anticorps primaire. Après lavage, elles ont

été incubées pendant 1 h avec l'anticorps secondaire. Les neurones ont été de nouveau lavés trois fois avec du PBS et des lamelles ont été montées avec une goutte d'aquapolymount (DAKO) pour examen à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss, Axioskop).

Toutes les observations décrites reflètent les résultats d'un marquage conduit dans un minimum de trois préparations différentes.

C. WESTERN BLOTTING

1. Principe

L'électrophorèse analytique des protéines s'effectue dans des gels de polyacrylamide dans des conditions assurant leur dissociation et minimisant leur agrégation. Le haut pH du gel de séparation favorise l'ionisation de la glycine et les ions qui en résultent migrent à travers le gel immédiatement derrière les ions chlorure au delà des polypeptides entassés. Les polypeptides dénaturés qui sont liés au SDS deviennent chargés négativement et les complexes SDS-polypeptide migrent à travers le gel en fonction de leur poids moléculaire.

Les protéines sont ensuite transférées sur un support solide puis détectées immunologiquement par chimioluminescence. Après une première incubation avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée, la membrane où les protéines sont fixées est incubée avec un anticorps secondaire marqué à la peroxydase qui en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) catalyse l'oxydation du luminol avec émission de lumière produite par le 4-iodophenol. Ce dernier agit comme un transmetteur radicalaire entre le radical oxygène formé et le luminol. Pour cette technique, nous avons utilisé un kit commercialisé par Boehringer-Mannheim (BM chemiluminescence western blotting kit).

2. Protocole expérimental

a) Extraction des protéines

Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS froid puis récupérées dans un tampon hypotonique (100 µl/boîte de culture) contenant 10 mM HEPES (pH 7,9), 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0,5 mM dithiothreitol (DTT) et 0,2 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride). Après 10 mn dans la glace, une centrifugation à 12000 rpm pendant 15 mn permet de récupérer le surnageant contenant les protéines cytosoliques. Les culots correspondants ont été resuspendus dans un tampon contenant 20 mM HEPES (pH 7,9), 25% (v/v) glycérol, 1,5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,2 mM PMSF et 0,25% (p/v) NP40 (Nonidet P-40) à raison de 50 µl pour un culot provenant de 5 boîtes. Après 20 mn dans la glace, une centrifugation à 12000 rpm pendant 30 mn conduit à la récupération des protéines nucléaires présentes dans le surnageant (Dignam *et al.*, 1983).

Les protéines cytosoliques et nucléaires ont été quantifiées selon la méthode de Lowry (1951). En milieu alcalin, les protéines réagissent avec le réactif de Folin-Ciocalteu additionné d'ions cuivriques, pour donner une coloration bleue mesurée à 660 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du milieu en protéine. La gamme d'étalonnage est réalisée avec une solution d'albumine sérique bovine (Sigma Chemicals).

b) Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les protéines cytoplasmiques ou nucléaires ont été séparées dans des conditions dénaturantes selon la technique de Laemmli (1970). Deux types de gels de polyacrylamide ont été coulés: un gel de concentration à 5% et un gel de résolution à 10%. Ces deux gels sont différents par la concentration en polyacrylamide et par la valeur de leur pH. L'électrophorèse est réalisée en présence de SDS.

La composition des deux gels est la suivante:

✓ gel de concentration:

Tris/HCl 0,5 M pH 6,8	3 ml
Acrylamide/bisacrylamide 30%/0,8% (p/v) (Prolabo)	1 ml
Eau ultra-pure	2 ml
SDS 10% (p/v)	60 µl
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	40 µl
TEMED	4 µl

✓ gel de séparation:

Tris/HCl 0,75 M pH 8,8	4,5 ml
Acrylamide/bisacrylamide 30%/0,8% (p/v)	3,0 ml
Eau ultra-pure	1,5 ml
SDS 10% (p/v)	90 µl
Persulfate d'ammonium 10% (p/v)	70 µl
TEMED	7 µl

Les protéines (25 µg) ont été dénaturées à 100°C pendant 5 mn dans un tampon Tris-HCl 50 mM (pH 6,8) contenant 2% de SDS, 10% de glycérol, 100 mM de DTT et 0,1% de bleu de bromophénol, puis déposées dans les puits correspondants sur le gel de concentration. L'électrophorèse a été réalisée en courant constant à 25 mA pendant 1 h dans un tampon Tris-Glycine (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,5).

c) Electrotransfert

Les protéines séparées par électrophorèse ont été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène difluoride, DuPont NEN) selon la technique décrite par Towbin *et al.* (1979) dans une solution tampon contenant 48 mM Tris, 39 mM glycine, 20% méthanol et 0,037% SDS, à l'aide d'un appareil de transfert (Trans-blot semi-dry electrophoretic transfer system, Bio-Rad) en milieu semi-sec, sous un courant constant de

1,6 mA/cm² pendant 30 mn. Le sandwich est constitué successivement de 4 feuilles de papier Whatman[®] 3MM, membrane PVDF, gel, 4 feuilles de papier Whatman[®] 3MM (Towbin *et al.*, 1979).

d) Immunorévélation des protéines

Les membranes de PVDF ont été ensuite saturées avec la solution bloquante fournie dans le kit diluée à 1% dans le tampon TBS pH 7,5 (Tris-buffered saline, 50 mM Tris et 150 mM NaCl). Ensuite, elles ont été incubées pendant 1 h avec l'anticorps primaire dilué dans la solution bloquante à 0,5%. c-Fos (4), c-Fos (K25), c-Jun (KM1) et JNK (C-17) ont été utilisés au 1/500. En revanche, Jun B (N-17) et Jun D (329) ont été utilisés au 1/800.

Après un double lavage de 5 mn chacun, dans le TBST (0,1% Tween 20 dans TBS) puis dans la solution bloquante (0,5%), les membranes ont été incubées pendant 1 h en présence de l'anticorps secondaire anti-souris/anti-lapin (1/1250 pour la détection de c-Fos et c-Jun) ou anti-chèvre (1/5000 pour la détection de Jun B et Jun D, 1/10000 pour la détection de JNK1 et JNK3) marqués à la peroxydase. Les membranes ont été ensuite lavées 4 fois dans le TBST et les bandes ont été détectées par chimioluminescence selon les instructions des fournisseurs. Après une exposition de 2 mn maximum des membranes sur des films à rayons X (Kodak X-Omat), les blots ont été révélés. Ils ont ensuite été scannés et quantifiés à l'aide d'un analyseur d'images (Biocom 200).

Les résultats rapportés par la suite ont été obtenus à partir de 3 préparations différentes au minimum et sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux mesures densitométriques effectuées à partir des cultures témoins.

D. INTERACTIONS ADN-PROTEINE

1. Principe de la méthode de “retard sur gel”

La méthode permet de mettre en évidence la liaison de protéines à des éléments de régulation de la transcription au niveau de l'ADN.

Les protéines sont détectées par leur capacité à retarder la mobilité d'un fragment d'ADN marqué à travers un gel non dénaturant. Cette technique a permis de détecter de nombreuses protéines de liaison à l'ADN dans des extraits cellulaires variés. Après la détection d'une interaction entre protéine et ADN, il est nécessaire de déterminer la spécificité de liaison. Ceci peut être vérifié en utilisant des fragments d'ADN mutés ou des fragments d'ADN non marqués, comme compétiteurs de la réaction. Le test de liaison à l'ADN utilise des gels de polyacrylamide. Les protéines qui se lient spécifiquement à un fragment d'ADN marqué retardent la mobilité du fragment durant l'électrophorèse entraînant l'apparition de bandes qui correspondent aux complexes ADN-protéine. Ce test permet une détermination quantitative de l'affinité, l'abondance et la spécificité de liaison des protéines à l'ADN.

2. Oligonucléotides

Les oligonucléotides double-brins utilisés proviennent de Santa-Cruz Biotechnologies.

Nous disposons d'un oligonucléotide de 21 paires de bases (5'-CGCTTGATGACTCAGCCGCAA-3') construit avec la séquence consensus AP-1 capable de se lier aux dimères Fos-Jun et Jun-Jun et d'un oligonucléotide muté où les bases CA du motif ont été remplacées par les bases TG.

3. Retard sur gel ou gel shift

a) *Marquage des oligonucléotides*

Les oligonucléotides ont été marqués au phosphore 32 par la T4 polynucléotide kinase qui catalyse le transfert du phosphate du [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP vers l'extrémité 5'-OH de l'ADN.

Une quantité de 100 ng d'oligonucléotide a été mélangée dans un volume final de 25 μl à 2,5 μl de tampon kinase 10X (Proméga), 50 pmoles de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (activité spécifique >3000 Ci/mmol, Isotopchim, Peyruis, France) et 20 unités de T4 polynucléotide kinase (Proméga). Après une extraction au phénol-chloroforme et précipitation de l'ADN, l'oligonucléotide marqué a été conservé à -80°C dans le tampon TE.

b) *Réaction de liaison et électrophorèse*

Une quantité de 10 μg de protéines nucléaires extraites selon la méthode de Dignam *et al.* (1983) a été mélangée à 20 ng d'oligonucléotides marqués, 100 nM de MgCl_2 , 500 ng d'ADN de sperme de saumon (Proméga) et 6,25 μg de polydI-dC (Sigma Chemicals). Après une incubation de 15 mn à 4°C , les complexes ADN-protéines ainsi formés ont été déposés sur un gel de polyacrylamide à 6%. L'électrophorèse a été réalisée à 30 mA pendant 75 mn dans le tampon TBE. Les gels ont été ensuite séchés et autoradiographiés avec des films Kodak X-Omat durant 24 h au minimum, à -80°C .

Pour les réactions de compétition, les oligonucléotides dont la séquence consensus est soit intacte soit mutée ont été utilisés en excès (50 fois).

RESULTATS

I. ETUDE DE LA PARTICIPATION DE L'EXCITOTOXICITE AUX DOMMAGES HYPOXIQUES

A. EFFETS DE L'HYPOXIE EN FONCTION DU NIVEAU DE MATURITE NEURONALE

Afin d'étudier les conséquences d'une privation en oxygène sur le cerveau en développement, les effets d'une hypoxie transitoire de 6 h sur des neurones en culture de 6 jours ont été comparés à ceux analysés sur des neurones en culture de 13 jours.

1. Caractérisation du modèle

a) Analyse immunohistochimique

Dans notre modèle, les cellules se développent rapidement en une population de neurones présentant un aspect homogène. Les prolongements neuritiques commencent à croître à partir du 2^{ème} jour de culture. Après 6 jours *in vitro*, un réseau dense de cellules se forme avec de multiples ramifications et quelques agrégats cellulaires.

Nos conditions expérimentales permettent d'obtenir une majorité de neurones fonctionnels (Borg *et al.*, 1985). Le pourcentage de cellules viables, déterminé par la méthode d'exclusion au Bleu Trypan, a été évalué à 97% après une semaine de culture dans un milieu sans sérum sur un substrat de polylysine. L'analyse immunohistochimique de l'énolase spécifique des neurones et de la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) a permis d'estimer la pureté des cultures entre 90 et 93% (Hansson *et al.*, 1984; Aizenman *et al.*, 1986). Après 13 jours de culture, les agrégats et les ramifications cellulaires sont plus nombreux, générant une densité élevée. Le pourcentage d'éléments non neuronaux augmente légèrement à ce stade pour atteindre 9 à 12%.

Temps		Témoins	Hypoxie/Réoxygénation
6 h	pH	7,27 ± 0,02	7,17 ± 0,03**
	PO ₂	138,6 ± 3,9	29,6 ± 3,1**
	PCO ₂	32,6 ± 1,8	35,2 ± 3,1
24 h	pH	7,26 ± 0,02	7,14 ± 0,02**
	PO ₂	140,1 ± 3,4	144,5 ± 2,7
	PCO ₂	29,8 ± 2,2	33,0 ± 3,1
72 h	pH	7,23 ± 0,03	7,24 ± 0,02
	PO ₂	140,0 ± 1,3	143,0 ± 2,3
	PCO ₂	33,1 ± 3,0	32,9 ± 1,8

Les valeurs de PO₂ et PCO₂ sont rapportées en mm Hg.

Tableau 3 : Evolution des paramètres physiologiques (pH, PO₂, PCO₂) dans le milieu d'incubation des neurones après un épisode hypoxique transitoire de 6 h suivi de 72 h de réoxygénation. D'après Daval *et al.* (1991).

*Valeurs moyennes ± DS obtenues à partir de dix échantillons. **p<0,01 par rapport aux cultures témoins.*

b) Paramètres physiologiques après hypoxie

Le **tableau 3** résume les variations des paramètres physiologiques mesurés dans le milieu d'incubation des cultures exposées à un épisode hypoxique transitoire de 6 h puis réoxygénées pendant 72 h.

L'incubation des neurones en anaérobiose pendant 6 h a réduit d'environ 80% la PO_2 mesurée dans le milieu de culture avec diminution du pH qui refléterait l'accumulation de lactate. Après 24 h de réoxygénation, le pH est resté plus faible que dans les cultures témoins, alors que la PO_2 est plus élevée. A 72 h post-réoxygénation, tous les paramètres analysés étaient identiques à ceux des témoins (Daval *et al.*, 1991).

2. Comparaison des effets de l'hypoxie sur les cultures de neurones de 6 et 13 jours

a) Etude de la souffrance neuronale après hypoxie

Sur les cultures de neurones de 6 jours, un épisode hypoxique de 6 h a entraîné une mort cellulaire retardée qui se traduit par une baisse significative de la viabilité cellulaire à partir de 48 heures de réoxygénation et qui atteint 20% par rapport aux témoins à 72 h (**figure 11**). En revanche, pour les cultures de 13 jours, la viabilité a été réduite de 13% dès 24 h de réoxygénation pour atteindre 24% à 72 h (**figure 12**). Comme pour les cultures de 6 jours, la survie cellulaire n'est pas affectée à la fin de l'épisode hypoxique.

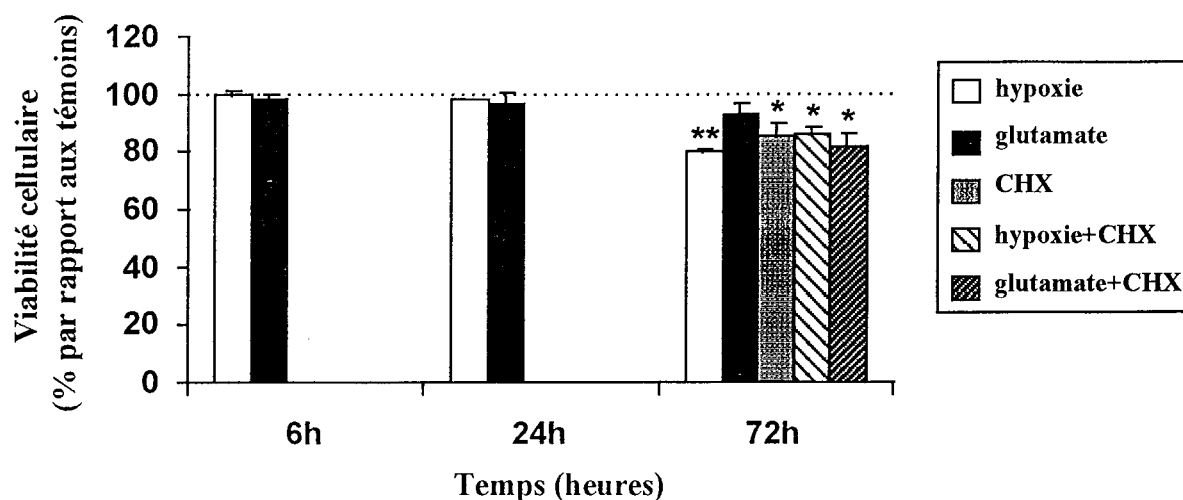


Figure 11 : Conséquences d'une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) sur la viabilité des neurones traités à 6 jours. CHX: cycloheximide (1 μ M).

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

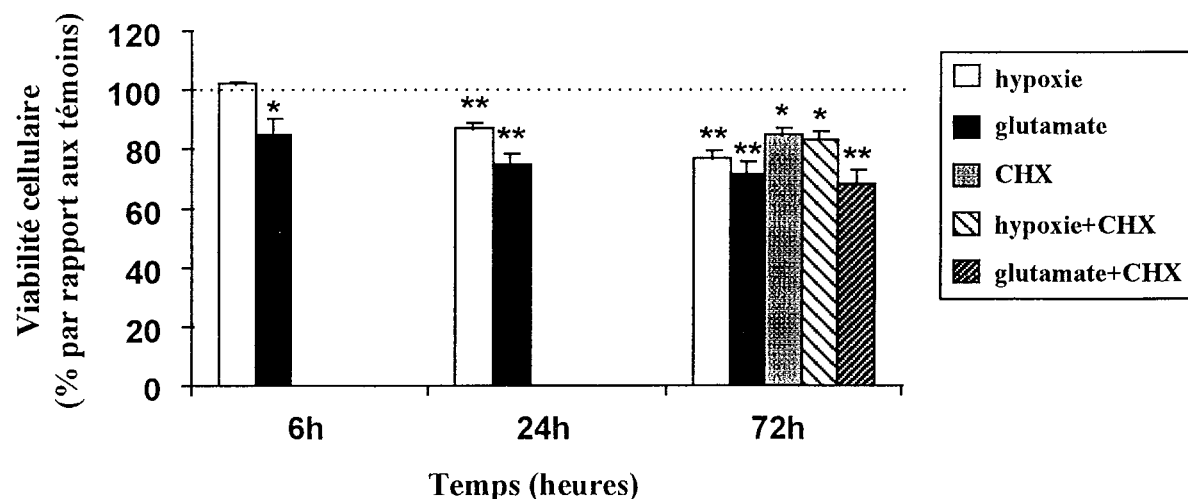


Figure 12 : Conséquences d'une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) sur la viabilité des neurones traités à 13 jours. CHX: cycloheximide (1 μ M).

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

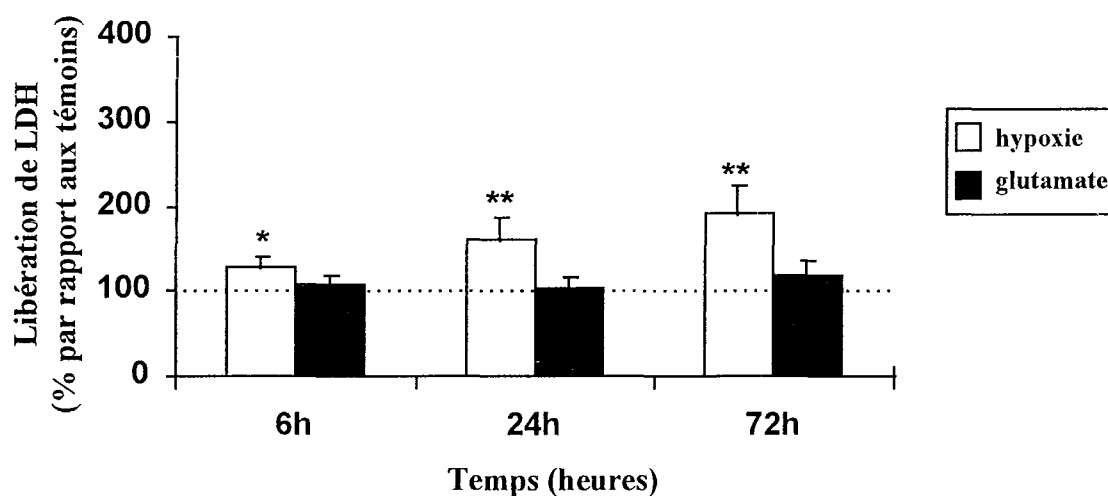


Figure 13 : Conséquences d'une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) sur la libération de LDH dans les cultures de neurones traités à 6 jours.

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

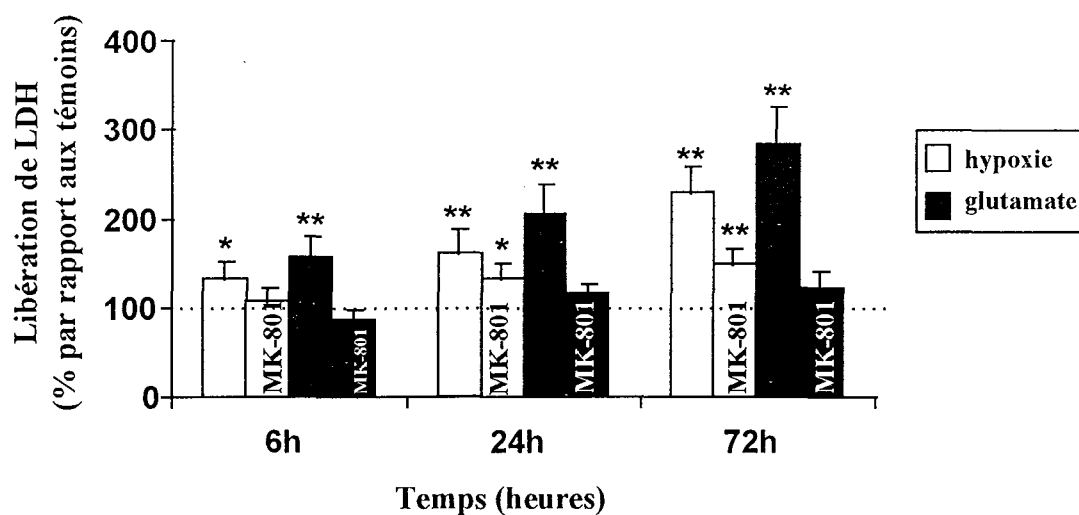


Figure 14 : Conséquences d'une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) sur la libération de LDH dans les cultures de neurones traités à 13 jours. Influence d'un inhibiteur des récepteurs NMDA (MK-801, 10 μ M).

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

A la suite d'un traitement des neurones, durant l'hypoxie, par un inhibiteur de la synthèse protéique (CHX, 1 μ M), le taux de cellules viables ne diffère pas de celui des témoins exposés à la CHX seule dans les cultures de 6 jours, alors qu'il baisse faiblement mais non significativement dans les cultures de 13 jours (**figures 11 et 12**).

Les **figures 13 et 14** montrent l'évolution temporelle de la libération de LDH après l'épisode hypoxique de 6 h. Dans les cultures de 6 jours, l'hypoxie a induit une augmentation de LDH dans le milieu extracellulaire de 28% à la fin de l'hypoxie, de 61% 24 h après la réoxygénation et de 92% à 72 h. Dans les cultures de 13 jours, les variations par rapport aux témoins ont été plus importantes dès la fin de l'agression. En effet, les taux de LDH ont augmenté significativement après 6 h d'hypoxie (33%), et ont atteint 62% à 24 h et 130% à 72 h.

b) Effet de l'hypoxie/réoxygénation sur les propriétés fonctionnelles

Les neurones témoins ont une activité métabolique stable entre 6 et 9 jours de culture. Le métabolisme énergétique, reflété par l'incorporation de 2-DG[³H], a augmenté significativement après 6 h d'hypoxie (21,5% par rapport aux témoins) puis après 24 h de réoxygénation (35%). A 72 h, par contre, le prélèvement de 2-DG a été réduit de 13,2% (**figure 15**).

Après 13 jours de culture, le métabolisme énergétique a été transitoirement stimulé après 6 h d'hypoxie, puis a baissé progressivement pour atteindre des valeurs significativement plus faibles que celles des témoins (-30%) au temps de 72 h après réoxygénation (**figure 16**).

La synthèse protéique, reflétée par l'incorporation de leucine tritiée mesurée dans la fraction cellulaire acido-insoluble, présente un profil caractéristique d'une mort cellulaire programmée dans les cultures de neurones de 6 jours (**figure 17**). Une augmentation rapide et transitoire de la synthèse protéique a été mesurée après 1 h

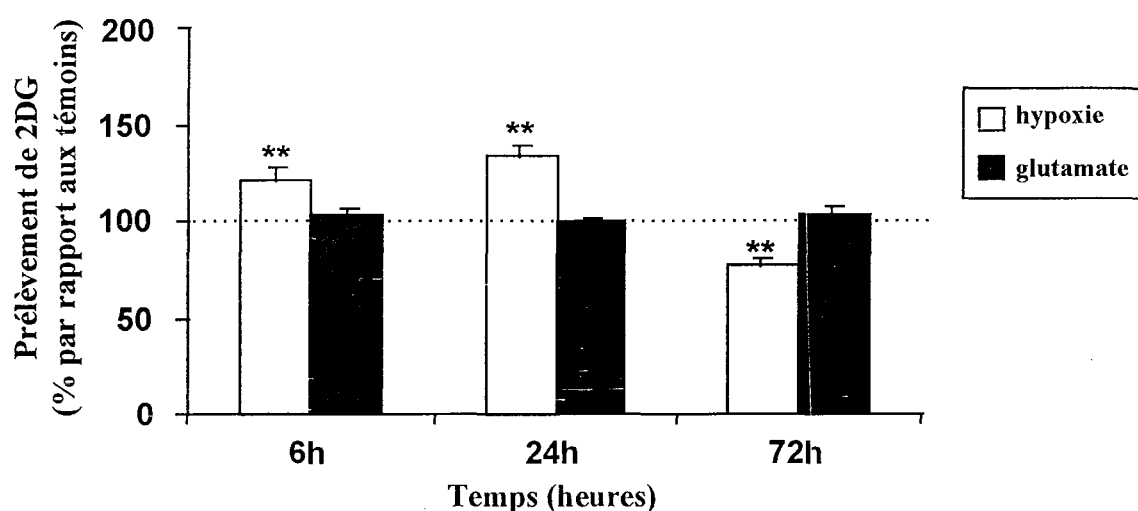


Figure 15 : Evolution du métabolisme énergétique analysé par l'incorporation du 2-DG^[3H] après exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) des neurones cultivés pendant 6 jours.

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

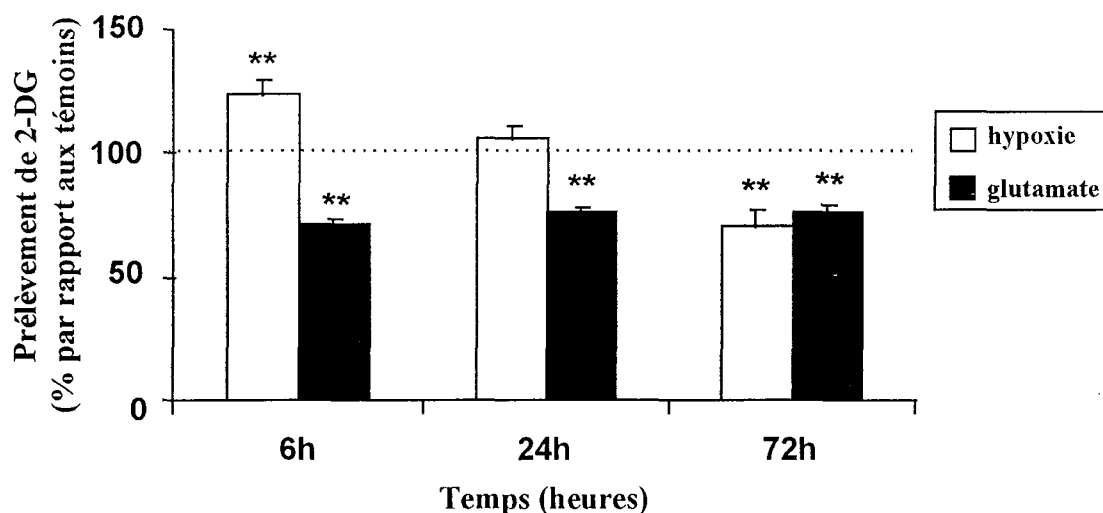


Figure 16 : Evolution du métabolisme énergétique analysé par l'incorporation du 2-DG^[3H] après une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) des neurones cultivés pendant 13 jours.

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

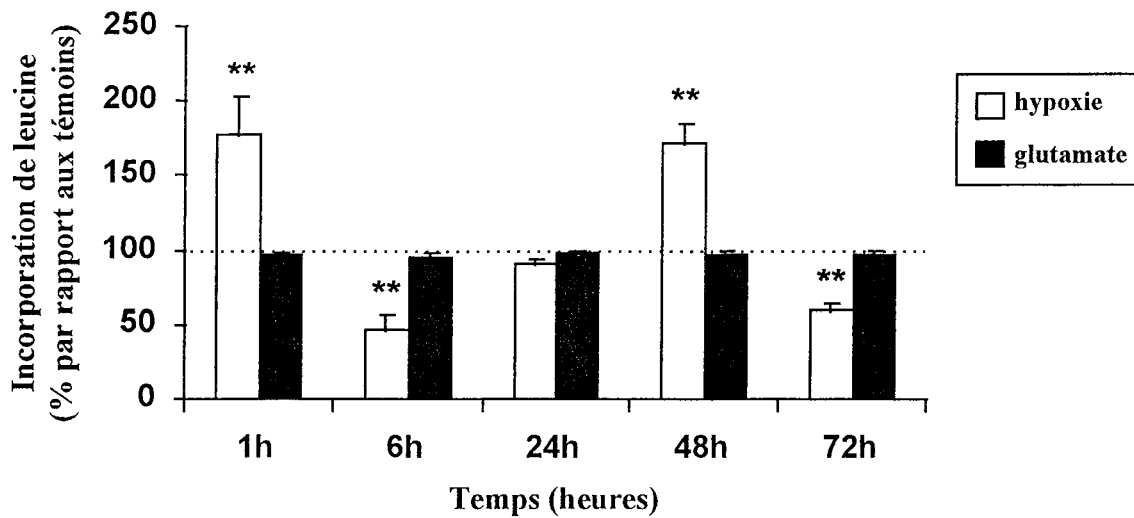


Figure 17 : Variation des taux de synthèse protéique reflétés par l'incorporation de leucine^[3H], au cours (1 et 6 h) et après (24, 48 et 72 h) exposition à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) des cultures de neurones de 6 jours.

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

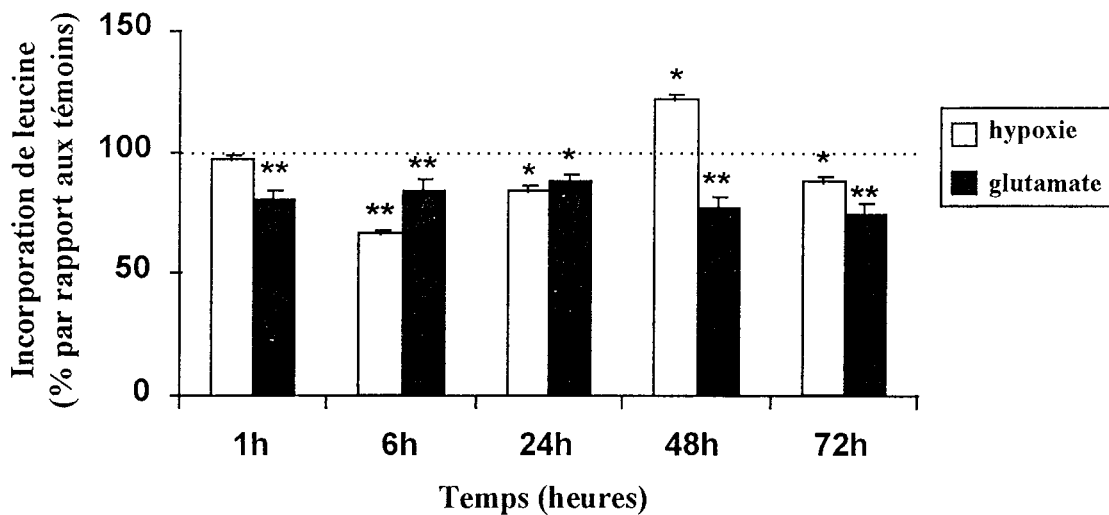


Figure 18 : Variation des taux de synthèse protéique reflétés par l'incorporation de leucine^[3H], au cours (1 et 6 h) et après (24, 48 et 72 h) exposition à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) des cultures de neurones de 13 jours.

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences minimum, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

d'hypoxie (77%). Après une baisse mesurée à la fin de l'épisode hypoxique (-53%), la synthèse des macromolécules s'est normalisée après 24 h de réoxygénation. Après une nouvelle augmentation à 48 h (72%), sans modification morphologique évidente des neurones, la synthèse protéique a été finalement diminuée à 72 h (-41%) parallèlement à la présence de signes de dégénérescence neuronale.

Les changements des taux d'incorporation de leucine tritiée consécutivement à l'hypoxie étaient moins prononcés dans les cultures de neurones de 13 jours. Aucune différence n'a été observée après 1 h d'hypoxie, alors que les diminutions observées à 6 h (-27%), à 24 h (-15%) et à 72 h (-12%) étaient faibles mais significatives par rapport aux témoins. La seule augmentation notable (22%) a été observée après 48 h de réoxygénation (**figure 18**).

c) Effet de l'hypoxie/réoxygénation sur les taux d'apoptose et de nécrose.

L'utilisation du fluorochrome DAPI a révélé que le nombre de neurones apoptotiques et nécrotiques demeurait faible dans les cultures témoins jusqu'à 9 jours *in vitro* (2,6% et 5,6% par rapport au nombre total de neurones, respectivement) (**tableau 4**).

Dans les cultures de 6 jours, aucune variation dans le nombre de cellules nécrotiques n'a été mesurée après une hypoxie de 6 h suivie de 72 h de réoxygénation (8,7%). L'augmentation du nombre de cellules apoptotiques qui apparaissent à partir de 48 h post-réoxygénation (6,3%), s'est fortement accentué à 72 h pour atteindre 19,2% (**tableau 4 et figure 19**). L'addition de CHX au milieu d'incubation au cours de l'hypoxie a réduit le nombre de cellules apoptotiques qui était alors similaire à celui mesuré dans les cultures témoins (3,6% versus 2,6%). Les cellules nécrotiques quant à elles atteignaient 20,5%, alors que la CHX par elle-même a induit une nécrose dans les mêmes proportions (18,2%). L'effet bénéfique de la CHX sur les conséquences de l'hypoxie est en corrélation avec les résultats de la viabilité cellulaire à ce stade de maturation.

		<i>Nécrose</i>	<i>Apoptose</i>
Cultures de neurones de 6 jours	<i>Témoins</i>	5,6 ± 1,4	2,6 ± 0,6
	<i>Témoins + CHX</i>	18,2 ± 2,1**	2,9 ± 1,6
	<i>Hypoxie</i>	8,7 ± 2,3	19,2 ± 5,7**
	<i>Hypoxie + CHX</i>	20,5 ± 2,1**	3,6 ± 1,5
	<i>Glutamate</i>	5,1 ± 0,7	3,0 ± 0,5
	<i>Glutamate + CHX</i>	17,8 ± 1,9**	3,3 ± 1,2
Cultures de neurones de 13 jours	<i>Témoins</i>	14,9 ± 2,3	4,1 ± 1,1
	<i>Témoins + CHX</i>	23,8 ± 4,3*	3,8 ± 1,0
	<i>Hypoxie</i>	22,3 ± 1,5**	8,2 ± 1,3*
	<i>Hypoxie + CHX</i>	28,4 ± 3,8**	3,3 ± 1,3
	<i>Glutamate</i>	40,7 ± 2,3**	4,8 ± 1,0
	<i>Glutamate + CHX</i>	46,2 ± 3,6**	3,7 ± 1,5

Tableau 4 : Effet d'une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 µM) sur les taux de nécrose et d'apoptose analysés après 72 h sur des cultures de neurones de 6 et 13 jours.

CHX : Cycloheximide, 1 µM.

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de neurones.

*Valeurs moyennes ± DS obtenues à partir de 5 expériences différentes. * p < 0,05 et ** p < 0,01 (test de comparaisons multiples de Dunnett).*

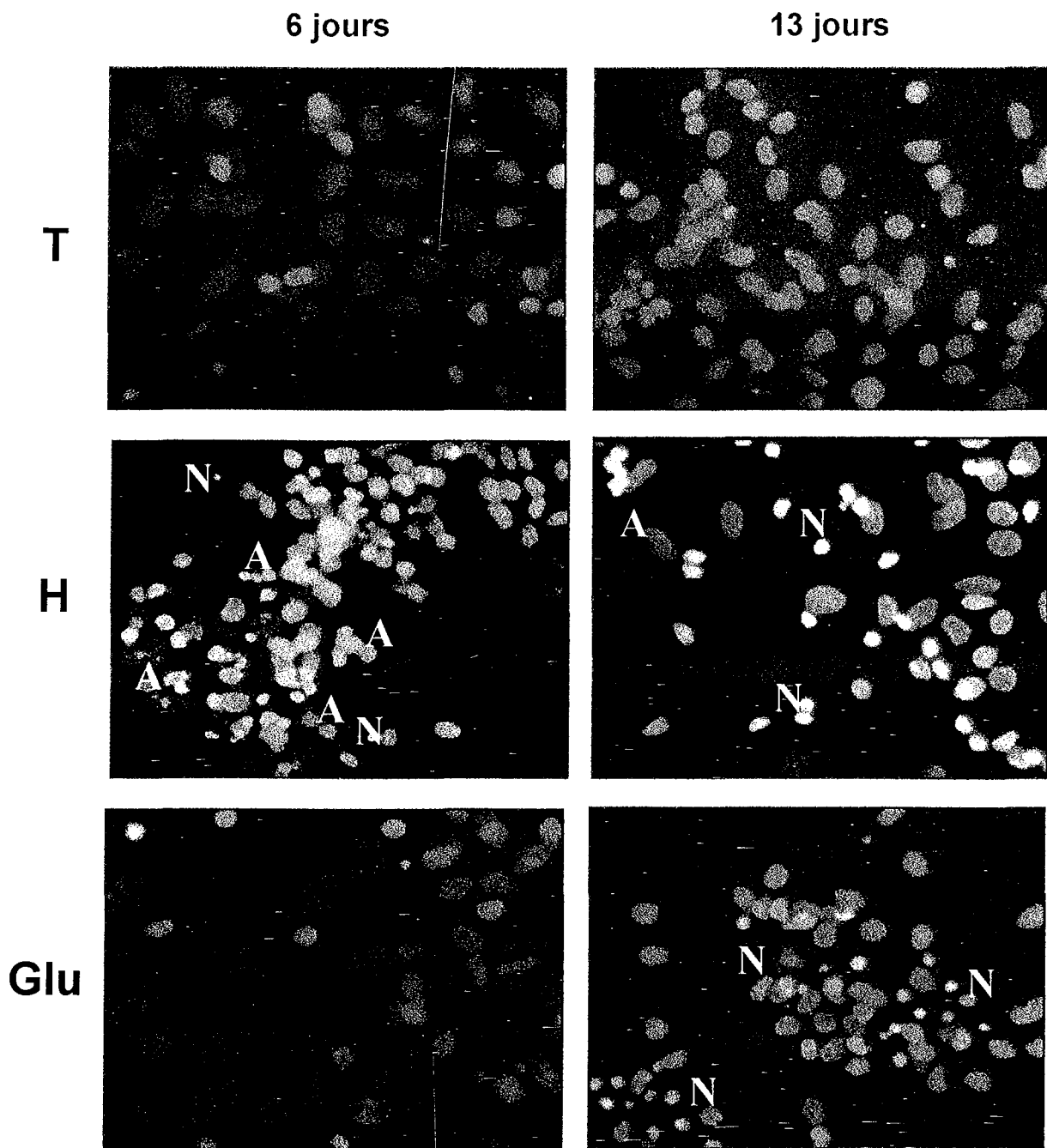


Figure 19 : Marquage nucléaire au DAPI, 72 h après une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate (100 μ M) des neurones cultivés pendant 6 ou 13 jours. A : apoptose, N : nécrose, T : témoins, H : hypoxie, Glu : glutamate.

En revanche, dans les cultures de 13 jours exposées à l'hypoxie, les signes morphologiques de l'apoptose et de la nécrose révèlent un pourcentage de cellules apoptotiques et nécrotiques plus élevé par rapport aux témoins à 72 h post-réoxygénation (8,2% et 22,3%, respectivement). En présence de CHX, et contrairement aux cultures de 6 jours, l'hypoxie/réoxygénation n'a eu aucun effet bénéfique sur les taux de nécrose après hypoxie par comparaison aux résultats obtenus après traitement à la CHX seule (**tableau 4**).

d) Fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose

La fragmentation d'ADN en échelle caractéristique d'un phénomène d'apoptose n'a pas été observée ni dans les cultures de neurones de 6 jours ni celles de 13 jours après exposition à une hypoxie pendant 6 h. Cependant, une fragmentation d'ADN de type aléatoire représentée par "*une traînée*" a été observée après 96 h de réoxygénation dans les cultures de 6 jours et après 48 h et 96 h dans celles de 13 jours (**figure 20**).

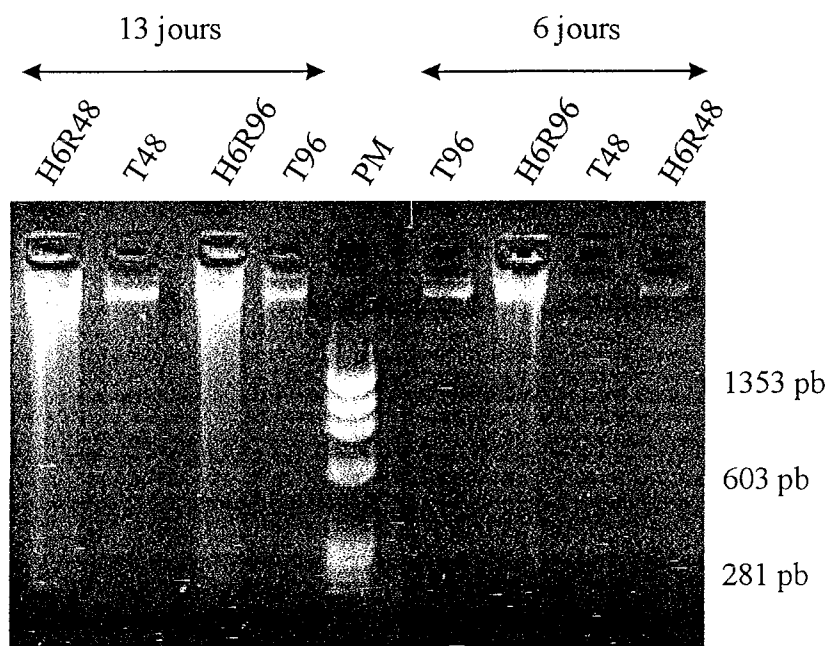


Figure 20 : Electrophorèse horizontale sur gel d'agarose de l'ADN des neurones cultivés pendant 6 et 13 jours et exposés à une hypoxie transitoire de 6 h puis réoxygénés pendant 96 h.
 T : témoins, H : hypoxie, R : réoxygénation.

B. ETUDE DES REPONSES EXCITOTOXIQUES EN FONCTION DU NIVEAU DE MATURITE NEURONALE

1. Effets du glutamate sur les cultures de neurones de 6 et 13 jours

Notre objectif était d'analyser les conséquences d'une exposition au glutamate sur des neurones à 2 stades de maturation différents : 6 et 13 jours.

a) Etude de la souffrance neuronale après exposition au glutamate

Dans les cultures de neurones de 6 jours, la morphologie cellulaire et la libération de LDH sont restées inchangées après traitement des neurones par des concentrations élevées (100 μ M) en glutamate (**figure 13**). La viabilité cellulaire a baissé de 7,2% à 72 h par rapport aux témoins et la présence de CHX dans le milieu d'incubation n'a eu aucun effet sur la survie des neurones par comparaison aux cultures de 6 jours traitées à la CHX seule (**figure 11**).

Les neurones plus matures (13 jours) se sont révélés par contre plus sensibles au glutamate, lequel a induit des altérations morphologiques des neurones exposés pendant 6 h puis replacés dans les conditions standard pendant 72 h. Pour illustrer l'action du glutamate, **la figure 21** montre qu'à ce stade de maturation, les altérations associées au glutamate (100 μ M) sont essentiellement reflétées par le décollement d'un nombre croissant de cellules de leur substratum, avec une perte des agrégats cellulaires.

Dès la fin de l'exposition (6 h) puis en fonction du temps, les taux de LDH mesurés dans le milieu extracellulaire des cultures de 13 jours ont été augmentés significativement par rapport aux témoins (**figure 14**). Le glutamate a diminué la viabilité

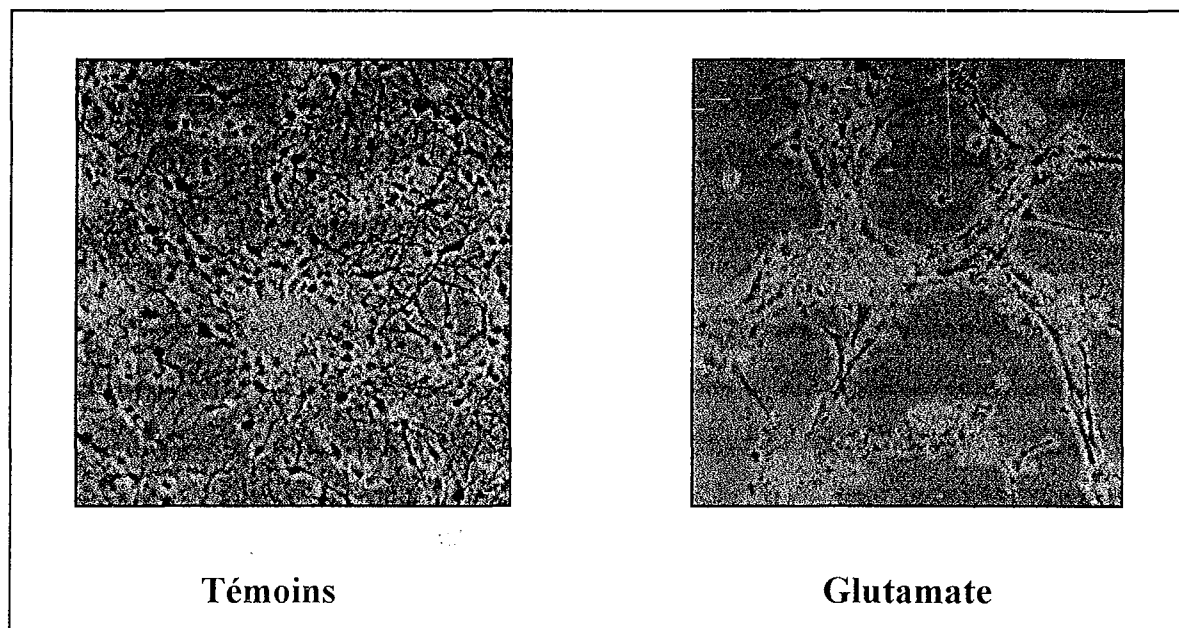


Figure 21 : Aspect morphologique des neurones cultivés pendant 13 jours, exposés pendant 6 h au glutamate (100 μ M) et remis dans des conditions standard pendant 72 h.

neuronale de 30% dans les 3 jours qui ont suivi l'exposition (**figure 12**) et le traitement des neurones par la CHX n'a pas eu d'effet protecteur, la viabilité cellulaire ayant baissé également de 30%.

b) Effet d'une exposition au glutamate sur les propriétés fonctionnelles

Dans les cultures de 6 jours, le métabolisme énergétique et la biosynthèse protéique sont restés inchangés après traitement au glutamate au cours des 3 jours suivant l'exposition (**figures 15 et 17**).

Dans les cultures de 13 jours, par contre, la sensibilité des neurones au glutamate est reflétée par la réduction définitive du métabolisme énergétique observée dès la fin du traitement, le prélèvement spécifique de 2-DG étant alors diminué de plus de 20% (**figure 16**). Comme illustré sur **la figure 18**, l'incorporation de leucine a diminué significativement de 20% dès 1 h d'exposition et est restée en dessous des valeurs témoins tout au long de l'étude.

c) Effet d'une exposition au glutamate sur les taux d'apoptose et de nécrose

Le marquage nucléaire par le DAPI (**figure 19**) a révélé que les noyaux des neurones de 6 jours traités au glutamate montrent majoritairement une fluorescence diffuse, caractéristique d'une chromatine normale au cours des 72 h suivant l'exposition. Les pourcentages de neurones apoptotiques et nécrotiques détectés à 72 h ne diffèrent pas de ceux des cultures témoins (**tableau 4**). La présence de CHX durant l'exposition au glutamate n'a eu d'effet ni sur l'apoptose (3,3% versus 2,9%) ni sur la nécrose (17,8% versus 18,2%) par rapport aux cultures traitées à la CHX seule (**tableau 4**).

En ce qui concerne les cultures plus matures, **le tableau 4 et la figure 19** montrent la présence de 4,8% de neurones apoptotiques à 72 h après exposition contre 4,1% dans les cultures témoins au même temps. Parallèlement, la densité des cellules nécrotiques s'est accrue à la suite du traitement (40% versus 15% pour les témoins). A ce stade de culture, le traitement des neurones par la CHX au cours de l'exposition n'a pas permis de réduire le nombre de neurones apoptotiques ou nécrotiques. Dans ce cas, nous avons mesuré 3,7% d'apoptose et 46,2% de nécrose.

d) Rôle de la protéine kinase C dans la réponse excitotoxique

Dans le but d'appréhender le rôle de l'inactivation de la PKC dans le mécanisme excitotoxique, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur de cette enzyme sur la réponse des cultures de neurones au glutamate.

Utilisée à 30 nM, la staurosporine n'altère pas la viabilité des neurones témoins mais en présence de l'inhibiteur, les cultures de 6 jours deviennent sensibles au glutamate avec une baisse de la viabilité de 34% (**tableau 5**).

Comme nous l'avons vu précédemment, la viabilité cellulaire a été significativement diminuée de 30% dans les cultures de 13 jours au cours des 3 jours suivant l'exposition au glutamate. La staurosporine seule n'altère pas la viabilité des neurones témoins, comme pour les cultures de neurones de 6 jours. La baisse de viabilité, observée 72 h après la conjugaison du glutamate et la staurosporine, est identique à celle observée avec le glutamate seul (**tableau 5**).

Le tableau 5 résume également les résultats des comptages de cellules apoptotiques et nécrotiques que nous avons effectués après exposition au glutamate, à la staurosporine ou à la conjugaison du glutamate et de la staurosporine, sur les cultures de 6 et 13 jours.

		<i>Viabilité cellulaire</i>	<i>Nécrose</i>	<i>Apoptose</i>
Neurones de 6 jours	<i>Témoins</i>	100,0 ± 1,2	5,6 ± 1,4	2,6 ± 0,6
	<i>Glutamate</i>	92,8 ± 4,3	5,1 ± 0,7	3,0 ± 0,5
	<i>Staurosporine</i>	103,8 ± 0,5	9,0 ± 1,4	10,3 ± 1,8**
	<i>Glutamate + Staurosporine</i>	66,7 ± 3,2**	17,0 ± 4,2**	9,4 ± 4,1**
Neurones de 13 jours	<i>Témoins</i>	100,0 ± 2,6	14,9 ± 2,3	4,1 ± 1,1
	<i>Glutamate</i>	71,5 ± 4,2**	40,7 ± 2,3**	4,8 ± 1,0
	<i>Staurosporine</i>	95,5 ± 2,7	16,2 ± 1,9	4,0 ± 0,6
	<i>Glutamate + Staurosporine</i>	68,6 ± 2,1**	41,0 ± 4,1**	4,6 ± 0,7

Tableau 5 : Viabilité cellulaire, nécrose et apoptose analysées 72 h après exposition, des cultures de neurones de 6 et 13 jours, au glutamate (100 µM). Influence de l'inactivation de la protéine kinase C par la staurosporine (30 nM).

Les résultats de viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins. Les résultats d'apoptose et de nécrose sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de neurones. Valeurs moyennes ± DS obtenues à partir de 3 à 5 expériences différentes. ** $p < 0.01$ (test de comparaisons multiples de Dunnett).

Comme dans les témoins, le marquage nucléaire au DAPI montre que la majorité des neurones de 6 jours traités au glutamate présentent une fluorescence diffuse. On note 5,1% de cellules nécrotiques et 3% de cellules apoptotiques. Toutefois, la staurosporine seule a augmenté significativement (10,3%) le taux d'apoptose par rapport aux témoins. Compte tenu du fait que la staurosporine augmente par elle-même le nombre de cellules apoptotiques, le glutamate conjugué à la staurosporine n'a donc eu aucun effet sur l'apoptose à ce stade de culture, le pourcentage enregistré étant de 9,4%. Le nombre de cellules nécrotiques, par contre, a été augmenté à 17% (**tableau 5**).

Dans les cultures de 13 jours, on ne détecte pas d'augmentation d'apoptose à 72 h après exposition. Dans le même temps, la densité des cellules nécrotiques est significativement plus élevée (40% pour les traités et 15% pour les témoins). La staurosporine seule n'a pas d'effet et l'addition de staurosporine au glutamate, contrairement à 6 jours, n'a pas modifié les pourcentages de nécrose et d'apoptose. On retrouve les 40% de nécrose et les 5% d'apoptose, observées après exposition au glutamate seul (**tableau 5**).

2. Comparaison des effets des analogues du glutamate sur les cultures de neurones de 6 et 13 jours

Après 6 jours de culture, la teneur en protéines, la libération de LDH et le métabolisme énergétique n'ont subi aucune altération à la suite d'un traitement par les agonistes des récepteurs du glutamate utilisés dans cette étude (**tableau 6, figures 22A et 23A**).

Comme pour le glutamate lui-même, les cellules plus matures (13 jours *in vitro*) se sont révélées plus sensibles au NMDA et à l'AMPA. Les neurones ont montré alors des altérations morphologiques prononcées et le métabolisme énergétique a été définitivement réduit à la fin du traitement par le NMDA. A 72 h, le prélèvement spécifique de 2-DG a été réduit de 126,4 à 88,9 nmol/mg de protéines et la viabilité cellulaire a baissé de plus de 20% comme après exposition au glutamate (**tableau 6 et figure 22B**). Alors que le kainate altère transitoirement le métabolisme énergétique 24 h après exposition et reste sans effet à 72 h, le *trans*-ACPD a entraîné une augmentation significative de la teneur en protéines à 72 h après exposition (18,7%) tout en préservant les caractéristiques morphologiques et la viabilité cellulaire (**tableau 6 et figure 23B**).

3. Influence des antagonistes des récepteurs du glutamate

Afin d'analyser le rôle de l'excitotoxicité dans la nécrose induite par l'hypoxie dans les neurones de 13 jours, nous avons testé l'influence d'antagonistes des récepteurs NMDA (MK-801) et non-NMDA (NBQX) utilisés à 5 et 10 μM , pour leur capacité à bloquer les effets du glutamate.

Aux deux concentrations utilisées, le MK-801 et le NBQX ont protégé les neurones de l'action du glutamate. En effet, à 72 h, le pourcentage de cellules viables était

		<i>Viabilité cellulaire</i>	<i>Prélèvement de 2-DG</i>
Neurones de 6 jours	<i>Témoins</i>	100,0 ± 1,2	105,3 ± 3,9
	<i>NMDA (100 µM) + KCl (50 mM)</i>	97,1 ± 2,9	103,9 ± 4,1
	<i>AMPA (100 µM)</i>	98,0 ± 3,4	106,2 ± 2,4
	<i>Kaïnate (100 µM)</i>	97,4 ± 3,1	107,0 ± 2,0
	<i>trans-ACPD (100 µM)</i>	102,2 ± 2,9	108,6 ± 3,7
Neurones de 13 jours	<i>Témoins</i>	100,0 ± 2,6	126,4 ± 2,1
	<i>NMDA (100 µM) + KCl (50 mM)</i>	78,0 ± 2,9**	88,9 ± 3,8**
	<i>AMPA (100 µM)</i>	81,7 ± 2,2**	124,0 ± 2,3
	<i>Kaïnate (100 µM)</i>	93,6 ± 4,8	123,9 ± 2,5
	<i>trans-ACPD (100 µM)</i>	102,1 ± 3,6	126,2 ± 1,4

Tableau 6 : Viabilité cellulaire et incorporation de 2-DG^[3H] analysées 72 h après exposition, des cultures de neurones de 6 et 13 jours, aux agonistes des récepteurs du glutamate.

*Les résultats de viabilité sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins. Les résultats de prélèvement de 2-DG sont exprimés en nmol/mg de protéines. Valeurs moyennes ± DS obtenues à partir de 5 expériences différentes. ** p < 0,01 (test de comparaisons multiples de Dunnett).*

NMDA : *N*-methyl-D-aspartate ; AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate ; *trans*-ACPD : *trans*-(+)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylate.

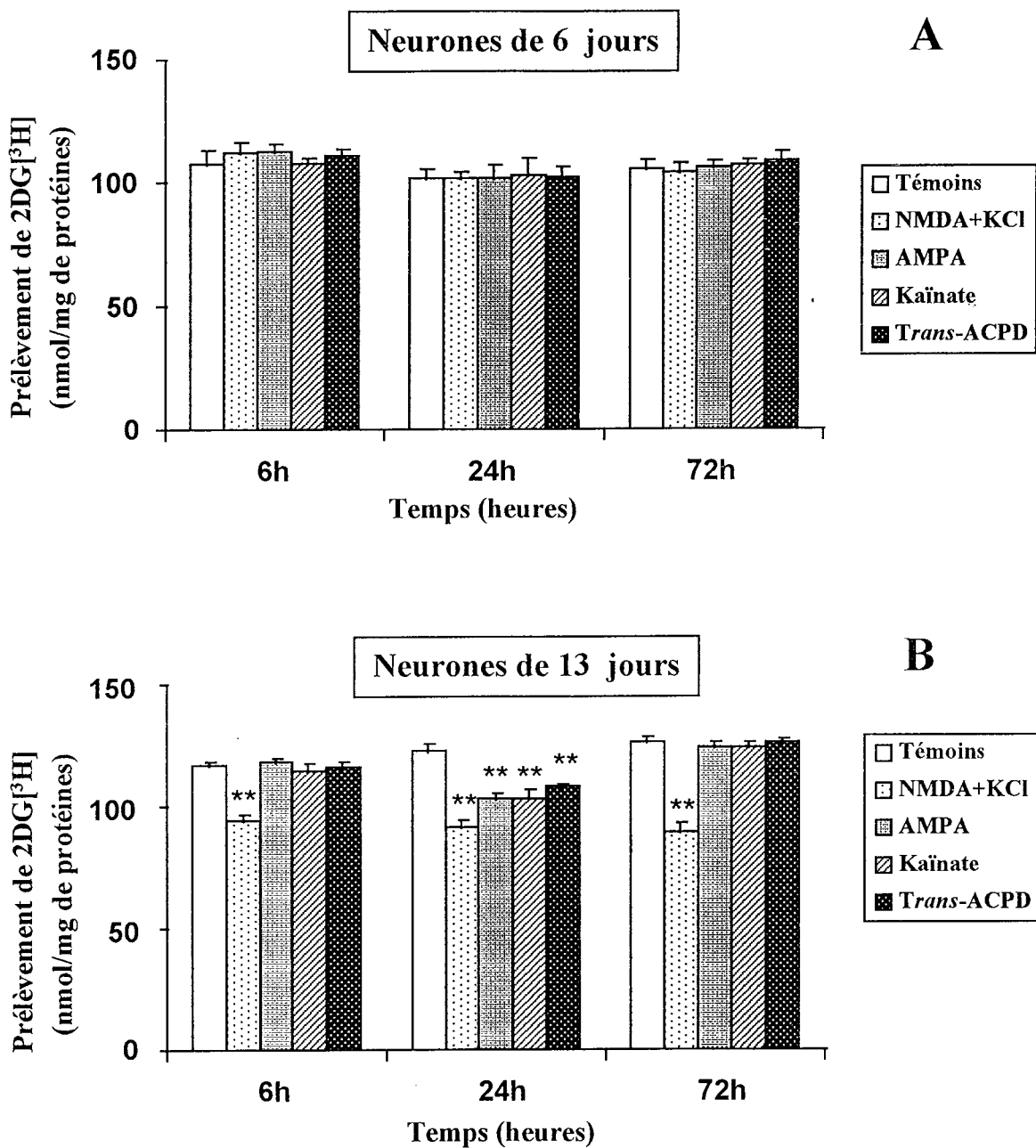


Figure 22 : Evolution du métabolisme énergétique analysé par l'incorporation de 2-DG[³H] après une exposition de 6 h des neurones cultivés pendant 6 (A) ou 13 jours (B), aux agonistes des récepteurs du glutamate (100 µM).

Valeurs moyennes ± DS obtenues à partir de 5 expériences différentes, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

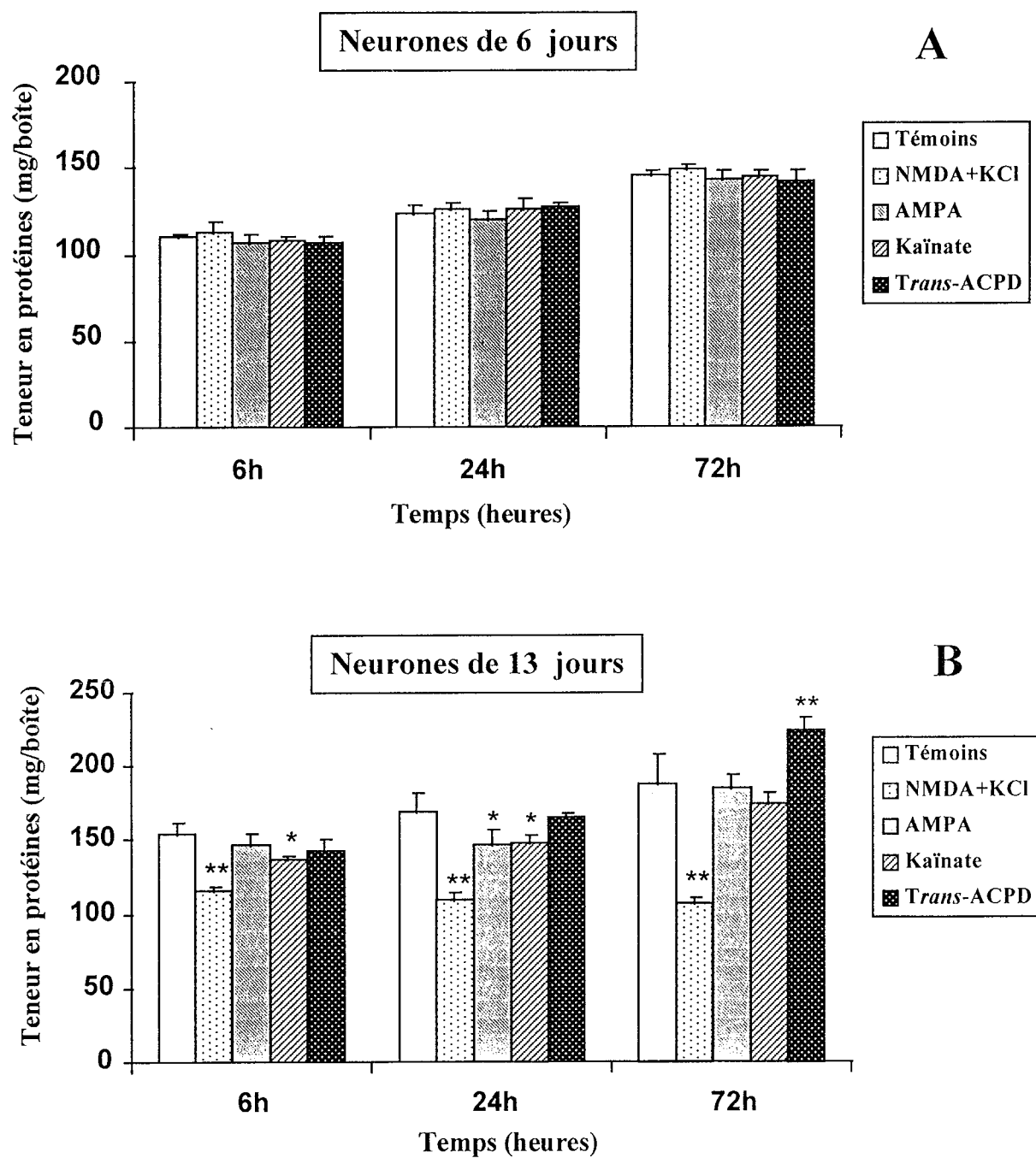


Figure 23 : Evolution de la teneur en protéines totales après une exposition de 6 h, des neurones cultivés pendant 6 (A) ou 13 jours (B), aux agonistes des récepteurs du glutamate (100 μ M).

Valeurs moyennes \pm DS obtenues à partir de 5 expériences différentes, chacune utilisant plus de 5 boîtes de culture. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ par rapport aux témoins (test de comparaisons multiples de Dunnett).

identique aux témoins et les taux d'apoptose et de nécrose ont été ramenés aux valeurs témoins (15-17% de nécrose et 3-4% d'apoptose) (**tableau 7**).

La figure 14 illustre le fait que le MK-801, comme le NBQX, protégeait les neurones. Les taux élevés de LDH enregistrés lors de l'exposition au glutamate ne sont plus aussi importants après traitement par l'un des 2 antagonistes.

L'addition de MK-801 ou de NBQX au milieu durant l'hypoxie a significativement réduit le pourcentage de neurones nécrotiques (d'environ 29% à 17-18%), alors que celui des neurones apoptotiques était identique à celui des cultures exposées à l'hypoxie seule (environ 8-9%). L'utilisation des antagonistes a entraîné une augmentation de viabilité cellulaire de 77,5% (hypoxie seule) à 95% (hypoxie + antagoniste) (**tableau 7**). Les taux de LDH dans le milieu extracellulaire ont été également réduits sous l'action des antagonistes (**figure 14**).

	<i>Viabilité cellulaire</i>	<i>Nécrose</i>	<i>Apoptose</i>
Témoins	100,0 ± 5,1	14,6 ± 2,9	3,8 ± 0,7
Témoins + MK-801	114,2 ± 6,3	13,4 ± 1,9	3,2 ± 0,6
Témoins + NBQX	107,9 ± 7,7	12,9 ± 2,5	3,3 ± 0,7
Glutamate	69,7 ± 5,5	41,8 ± 2,9	4,1 ± 1,1
Glutamate + MK-801	102,5 ± 8,4**	15,2 ± 2,4**	3,8 ± 1,6
Glutamate + NBQX	104,8 ± 4,5**	17,4 ± 1,7**	3,6 ± 1,0
Hypoxie	77,5 ± 5,6	29,3 ± 3,5	8,9 ± 1,7
Hypoxie + MK-801	95,2 ± 3,9*	17,6 ± 2,8*	8,8 ± 1,3 ^{oo}
Hypoxie + NBQX	94,9 ± 5,7*	18,1 ± 3,1*	8,2 ± 1,5 ^{oo}

Tableau 7 : Effets des antagonistes (10 µM) des récepteurs du glutamate sur les conséquences induites 72 h après une exposition de 6 h à l'hypoxie ou au glutamate.

Les résultats de viabilité cellulaire sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins. Les résultats de nécrose et d'apoptose sont exprimés en pourcentage par rapport au nombre total de neurones.

*Valeurs moyennes ± DS obtenues à partir de trois expériences différentes. ^{oo} p < 0,01 par rapport aux "témoins + MK-801" ou "témoins + NBQX". ** p < 0,01 et * p < 0,05 par rapport à l'hypoxie seule ou glutamate seul (test de comparaison multiples de Dunnet).*

NBQX: 6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)quinoxaline-2,3 dione.

II. CONTRIBUTION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AUX CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE

Les résultats présentés précédemment montrent une sensibilité des neurones immatures vis-à-vis de l'hypoxie qui se traduit par une mort neuronale retardée de type apoptotique.

Aussi, nous avons tenté d'approcher les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le devenir des cultures de neurones de 6 jours soumis à une hypoxie de 6 h en étudiant l'expression de protéines susceptibles d'être impliqués dans l'apoptose. Compte tenu du rôle des facteurs de transcription dans la réponse cellulaire à une agression, nous avons essentiellement orienté notre travail sur les protéines associées au facteur de transcription AP-1 et sur l'implication de la voie des JNK connue pour moduler l'activité de ce complexe.

A. ETUDE DE L'EXPRESSION DES COMPOSANTS DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-1 A LA SUITE D'UN EPISODE HYPOXIQUE

1. Recherche des facteurs AP-1 dans les cultures primaires de neurones

En utilisant la technique de retard sur gel, nous avons montré que l'activité de liaison du facteur AP-1 à l'ADN existe aussi bien dans les cultures témoins que celles ayant subi une hypoxie. Abolie par l'addition d'un excès d'oligonucléotides non marqués possédant la séquence consensus AP-1, l'activité de liaison est restée inchangée en présence de la sonde mutée (**figure 24**). Sur tous les films analysés, deux bandes non spécifiques et de faible intensité ont été également détectées.

Par comparaison avec les cultures témoins, les activités de liaison du facteur AP-1 ne semblent pas varier au cours de l'hypoxie/réoxygénation, sauf après 1 h d'hypoxie où une augmentation de l'intensité a été régulièrement observée (**figure 24**).

2. Expression des protéines appartenant aux familles Fos et Jun au cours de l'hypoxie/réoxygénation

L'analyse immunohistochimique de la protéine c-Jun montre qu'elle est surexprimée à 1 h après le début de l'hypoxie. A la fin d'un épisode hypoxique de 6 h, son expression est restée plus élevée qu'en normoxie, l'élévation étant moins prononcée qu'à 1 h. Au cours de la réoxygénation, l'expression de la protéine a été augmentée de façon soutenue (**figure 25**).

L'analyse par western blotting avec le même anticorps a montré que la protéine c-Jun est exprimée constitutivement et que l'hypoxie provoque une induction de cette protéine (**figure 26**). Nous avons mis en évidence une augmentation des taux d'expression de 265% après 1 h d'hypoxie. Elle atteint 50% à la fin d'une hypoxie de 6 h. L'augmentation observée à 48 h post-réoxygénation est moins importante que la surexpression observée à 96 h (100%) (**figure 26**).

Les figures 27 et 28 montrent que l'expression de Jun B a été fortement stimulée après 1 h d'hypoxie (169%) et les taux sont restés élevés jusqu'à la fin de l'épisode hypoxique (20%). Ils ont ensuite diminué de 13% par rapport aux témoins à 48 h post-réoxygénation. La protéine est restée détectable à la fin de la réoxygénation (96 h) mais, à ce temps de l'expérience, aucune différence n'a pu être observée entre les cultures témoins et celles soumises à une hypoxie/réoxygénation.

Après 1 h d'hypoxie, il a été également détecté une augmentation de l'expression de Jun D (**figures 29 et 30**). Aucune différence n'a cependant été observée à la fin de l'hypoxie par rapport aux témoins. Durant la réoxygénation, l'expression de Jun D a décliné fortement à 48 h (43%), tandis qu'elle était difficilement détectable à 96 h.

L'analyse immunohistochimique a montré que l'expression de c-Fos est élevée après 1 et 6 h d'hypoxie. Cette induction a persisté jusqu'à 48 h post-réoxygénation, alors que l'intensité d'expression de la protéine était comparable à celle des témoins à 96 h (**figure 31**).

Toutefois, alors que les immunoblots obtenus avec le même anticorps ont révélé la présence d'une bande de 62 kDa correspondant à c-Fos, une seconde bande d'environ 45 kDa a été détectée et pourrait correspondre à une Fra (Fos-related antigen) (**figure 32**). La protéine de 62 kDa a été transitoirement induite après 1 h (100%) et 6 h (109%) d'hypoxie. Au cours de la période de réoxygénation, les taux de p62 c-Fos sont retournés aux taux mesurés dans les cultures témoins à 48 h puis ont baissé de 42% à 96 h. Dans le même temps, il a été observé une augmentation de l'expression de la protéine de 45 kDa pendant l'hypoxie, suivie d'une diminution à 48 h pour aboutir finalement à des valeurs similaires aux témoins à 96 h. Nous avons, par ailleurs, utilisé un anticorps (c-Fos K25) dirigé contre les 4 protéines de la famille Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 et Fra-2) et l'immunohistochimie a montré une surexpression globale de ces protéines durant la période d'hypoxie. Leur expression a été transitoirement plus faible à 48 h, l'intensité de fluorescence augmentant par rapport aux témoins à 96 h (**figure 33**). Cet anticorps n'a cependant pas permis d'obtenir des résultats reproductibles en western blotting.

3. Activation des kinases JNK1 et JNK3 au cours de l'hypoxie/réoxygénation

Par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre deux c-Jun N-terminal kinases, JNK1 et JNK3, les résultats montrent que JNK1 est constitutivement exprimée dans nos cultures primaires de neurones (**figure 34**). Néanmoins, son expression a baissé sensiblement après 1 h d'hypoxie (-46%), tandis que la baisse atteignait environ 17% après 6 h d'hypoxie. L'expression de JNK1 a transitoirement augmenté après 48 h de réoxygénation (48% par rapport aux témoins) alors qu'à 96 h, nous avons enregistré une baisse de 19% de l'expression.

Par ailleurs, la bande de 54 kDa correspondant à JNK3 est apparue transitoirement à 48 h après réoxygénation. JNK3 n'était pas exprimée par les cultures témoins maintenues en normoxie. Absente durant l'hypoxie elle-même, JNK3 a été très fortement induite à 48 h pour disparaître à nouveau à 96 h post-réoxygénation (**figure 34**).

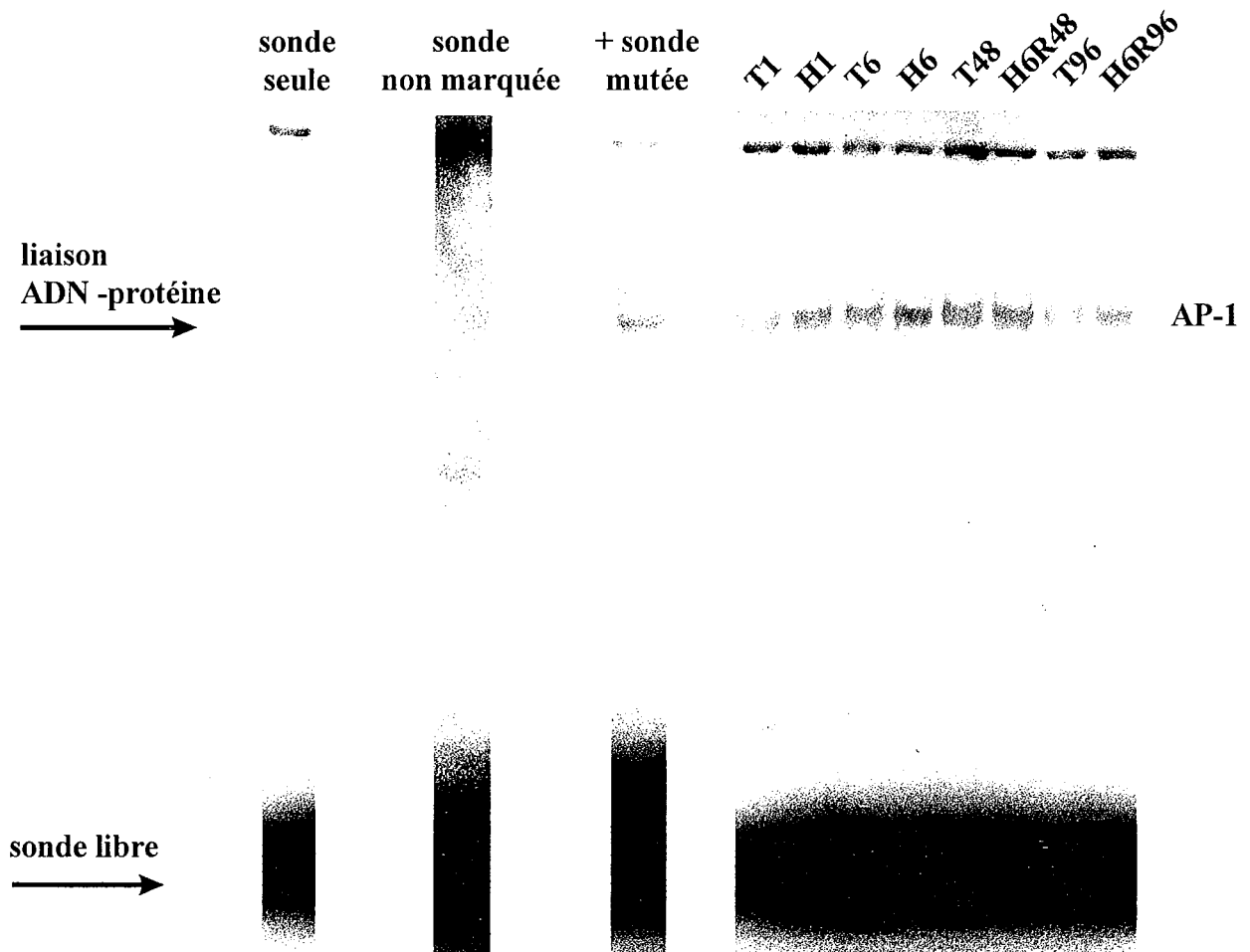


Figure 24 : Profil de l'activité de liaison du facteur de transcription AP-1 à sa séquence consensus spécifique au cours du temps dans les cultures de neurones témoins (T) et de ceux exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation. H: hypoxie, R: réoxygénation.

Le gel est représentatif de 3 préparations différentes. Sont représentées également:

- la migration de l'oligonucléotide marqué en absence d'extrait nucléaire.
- l'addition d'un excès d'oligonucléotides à consensus AP-1 non marqués (sonde non marquée).
- l'addition d'un excès d'oligonucléotides à consensus AP-1 muté non marqués (+ sonde mutée).

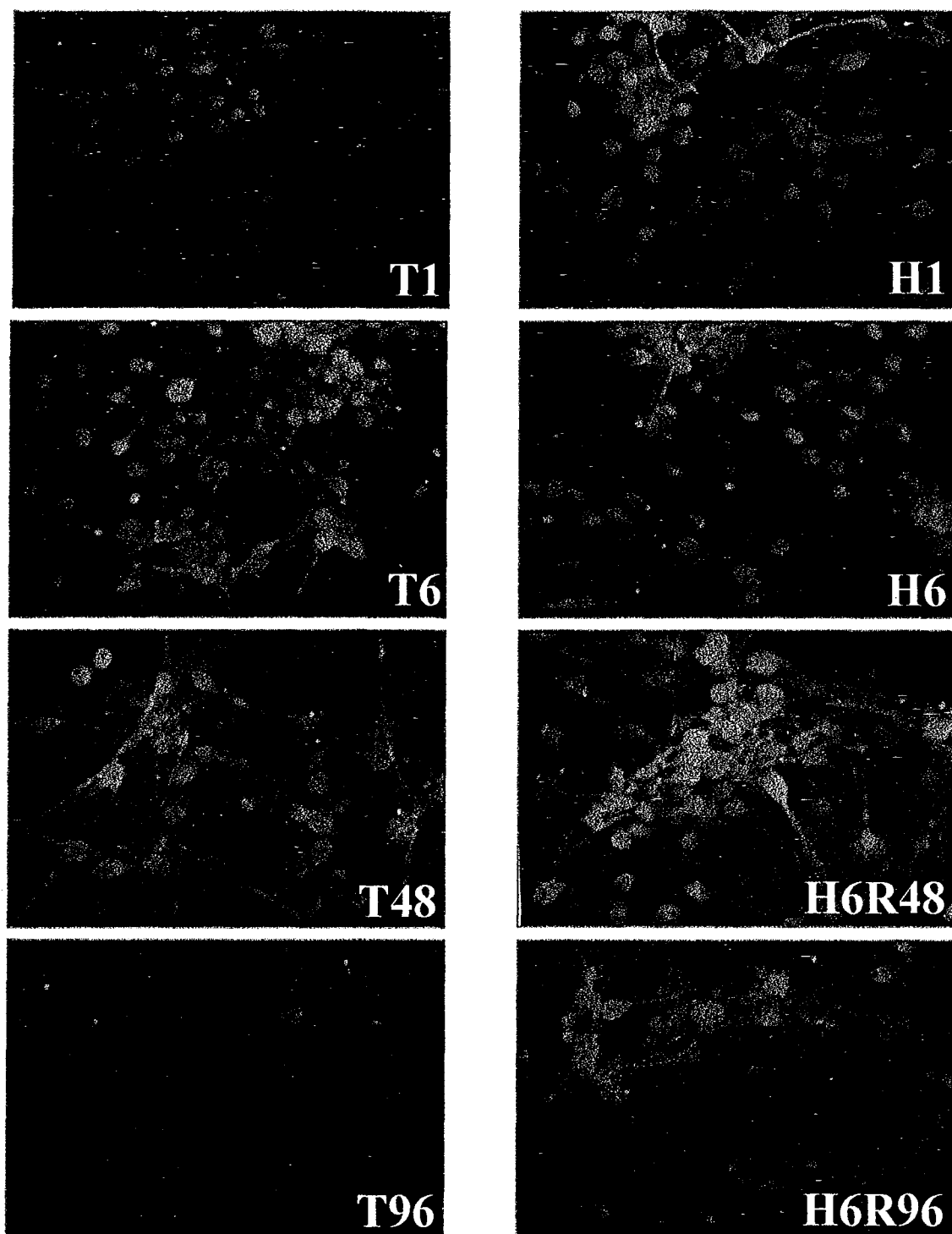


Figure 25 : Marquage immunohistochimique de la protéine c-Jun en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation.

T: témoin, H: hypoxie, R: réoxygénation.

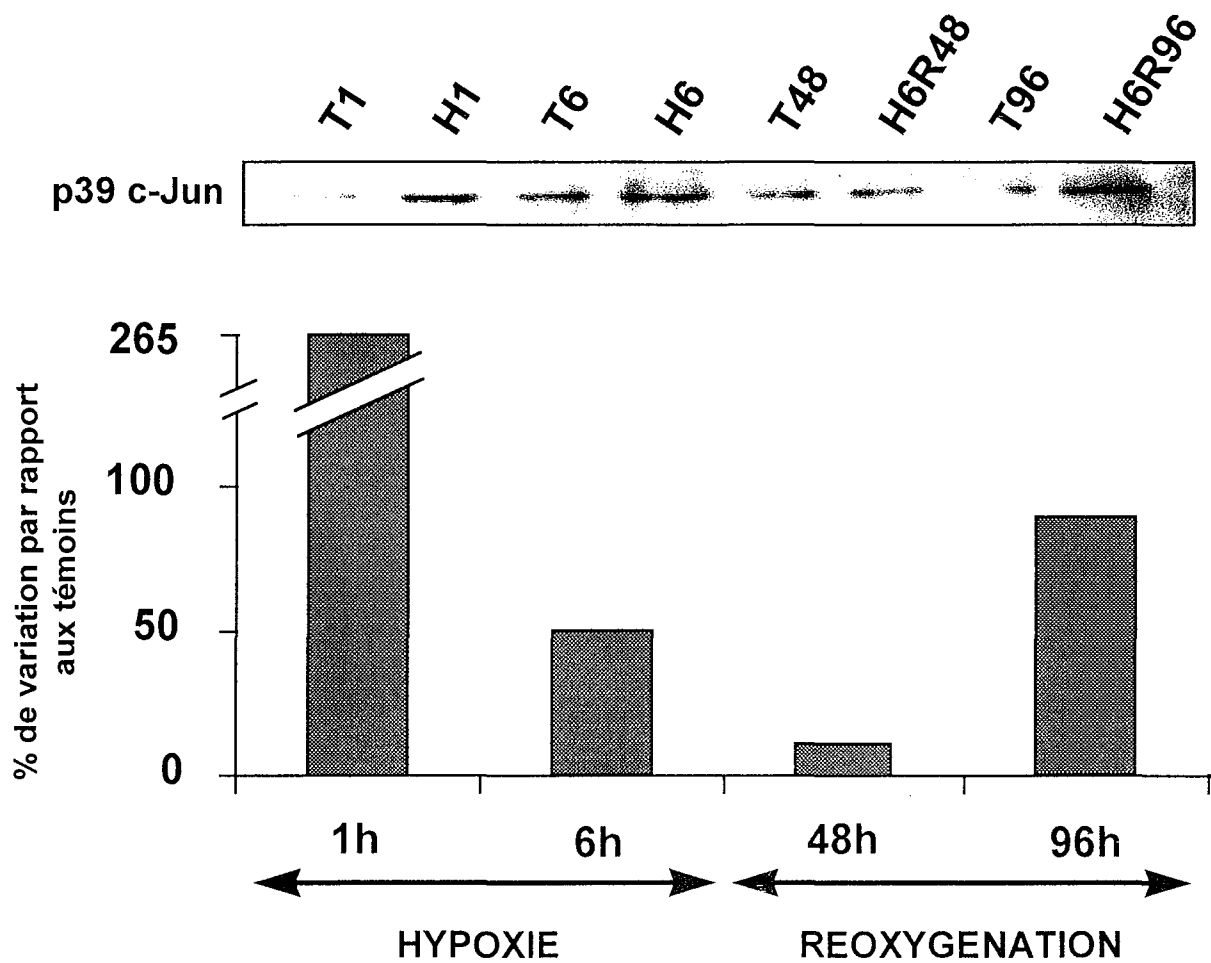


Figure 26 : Evolution de l'expression de la protéine c-Jun au cours d'un épisode d'hypoxie/réoxygénation dans les neurones en culture primaire.

T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

Le blot est représentatif de 3 préparations différentes. Les résultats correspondant aux analyses densitométriques sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

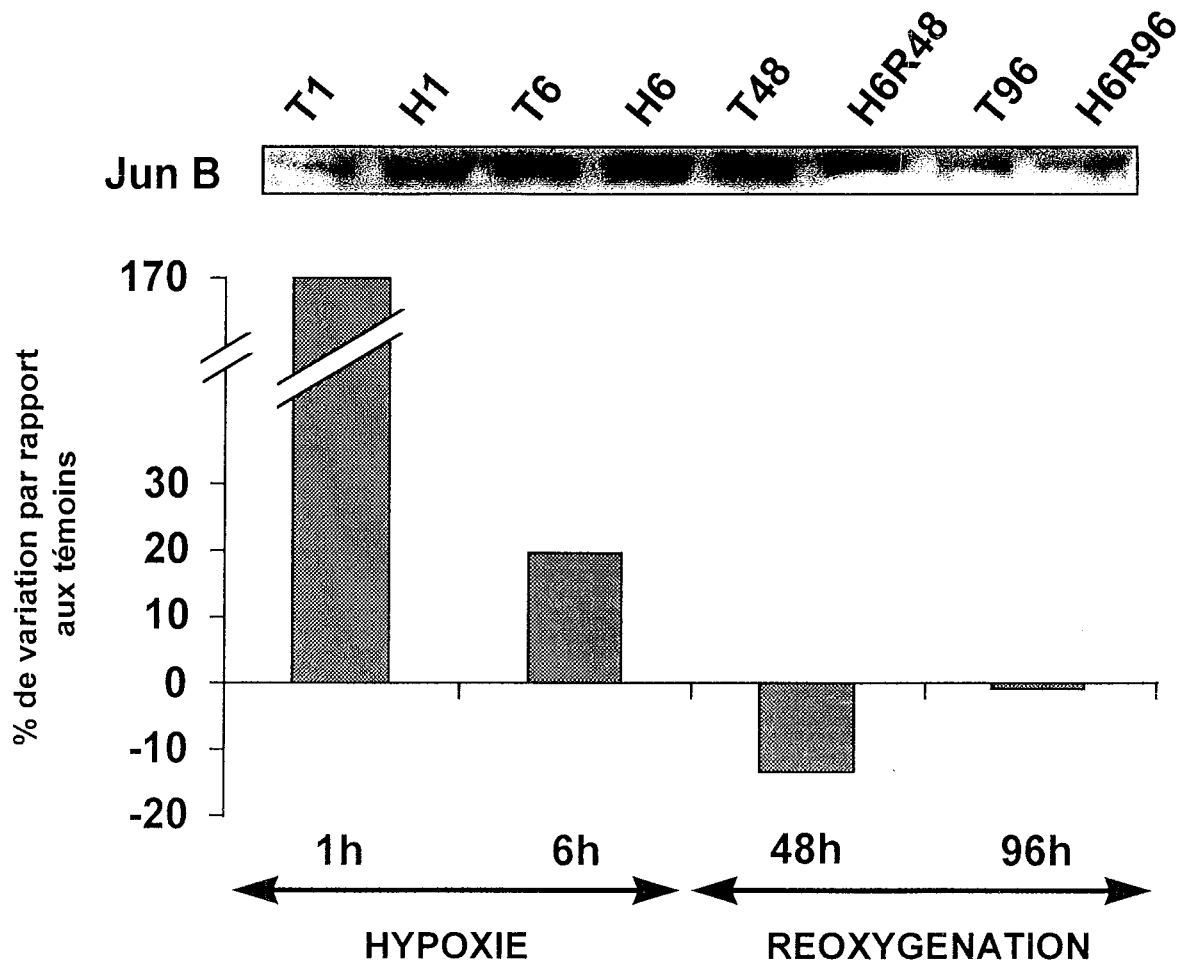


Figure 27 : Evolution de l'expression de la protéine Jun B au cours d'un épisode d'hypoxie/réoxygénation dans les neurones en culture primaire.

T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

Le blot est représentatif de 3 préparations différentes. Les résultats correspondant aux analyses densitométriques sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

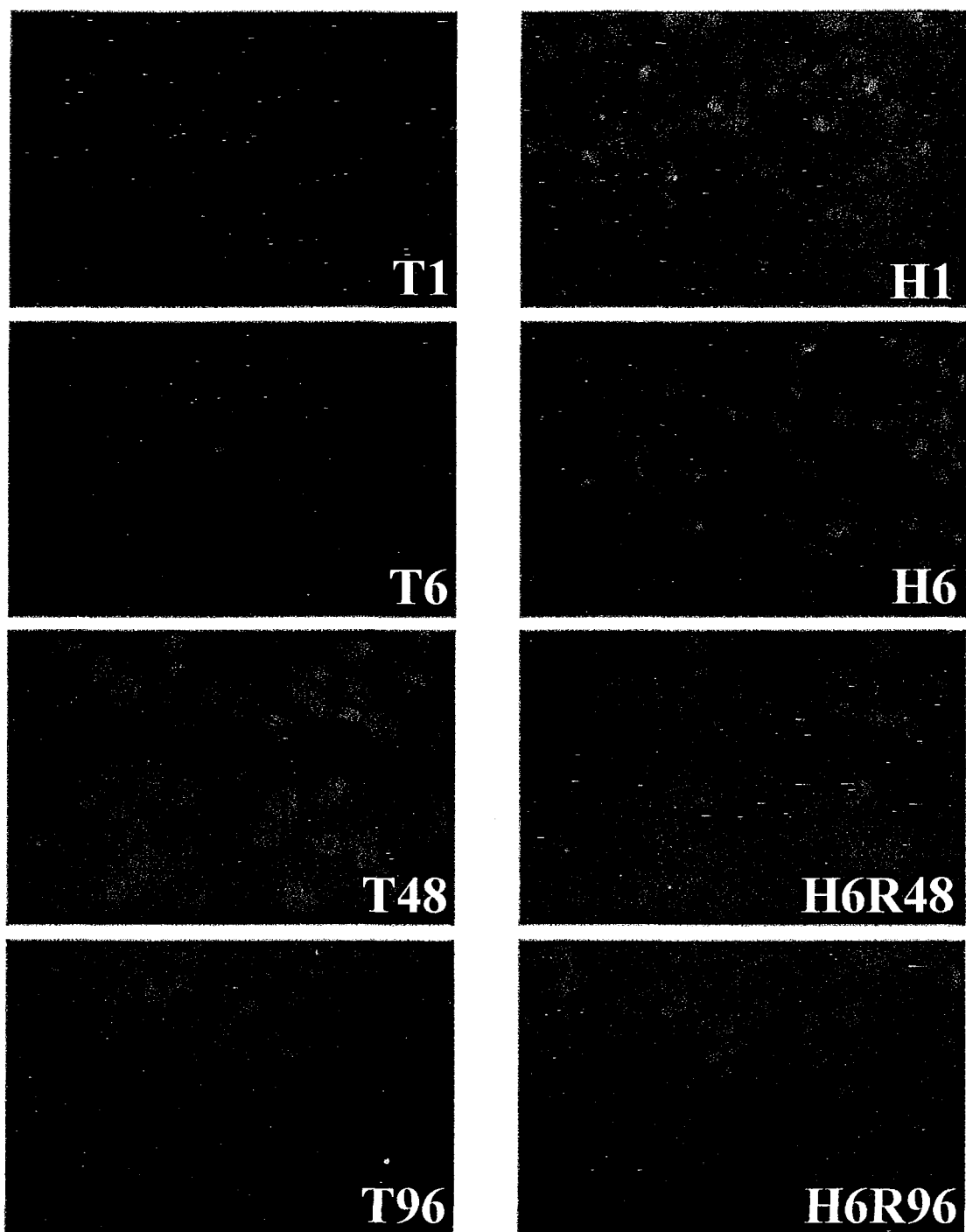


Figure 28 : Marquage immunohistochimique de la protéine Jun B en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation.
T: témoin, H: hypoxie, R: réoxygénation.

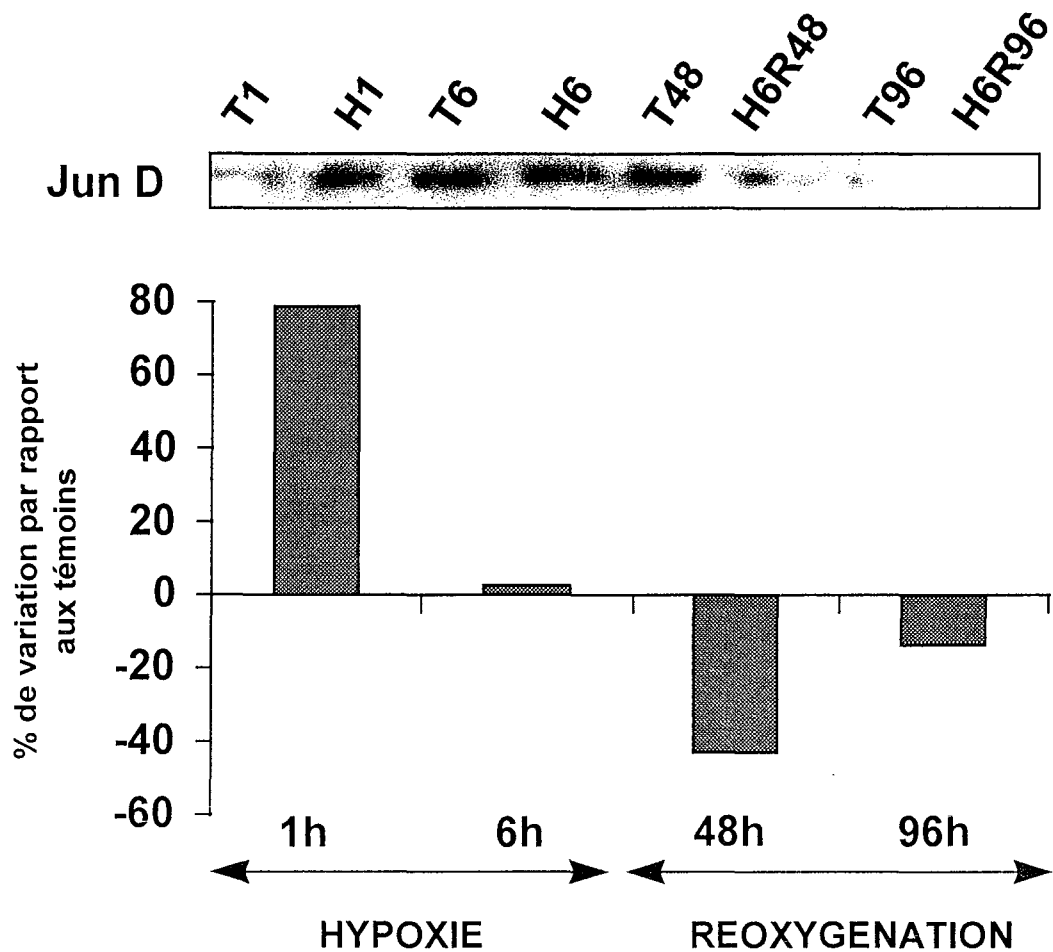


Figure 29 : Evolution de l'expression de la protéine Jun D au cours d'un épisode d'hypoxie/réoxygénation dans les neurones en culture primaire.

T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

Le blot est représentatif de 3 préparations différentes. Les résultats correspondant aux analyses densitométriques sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

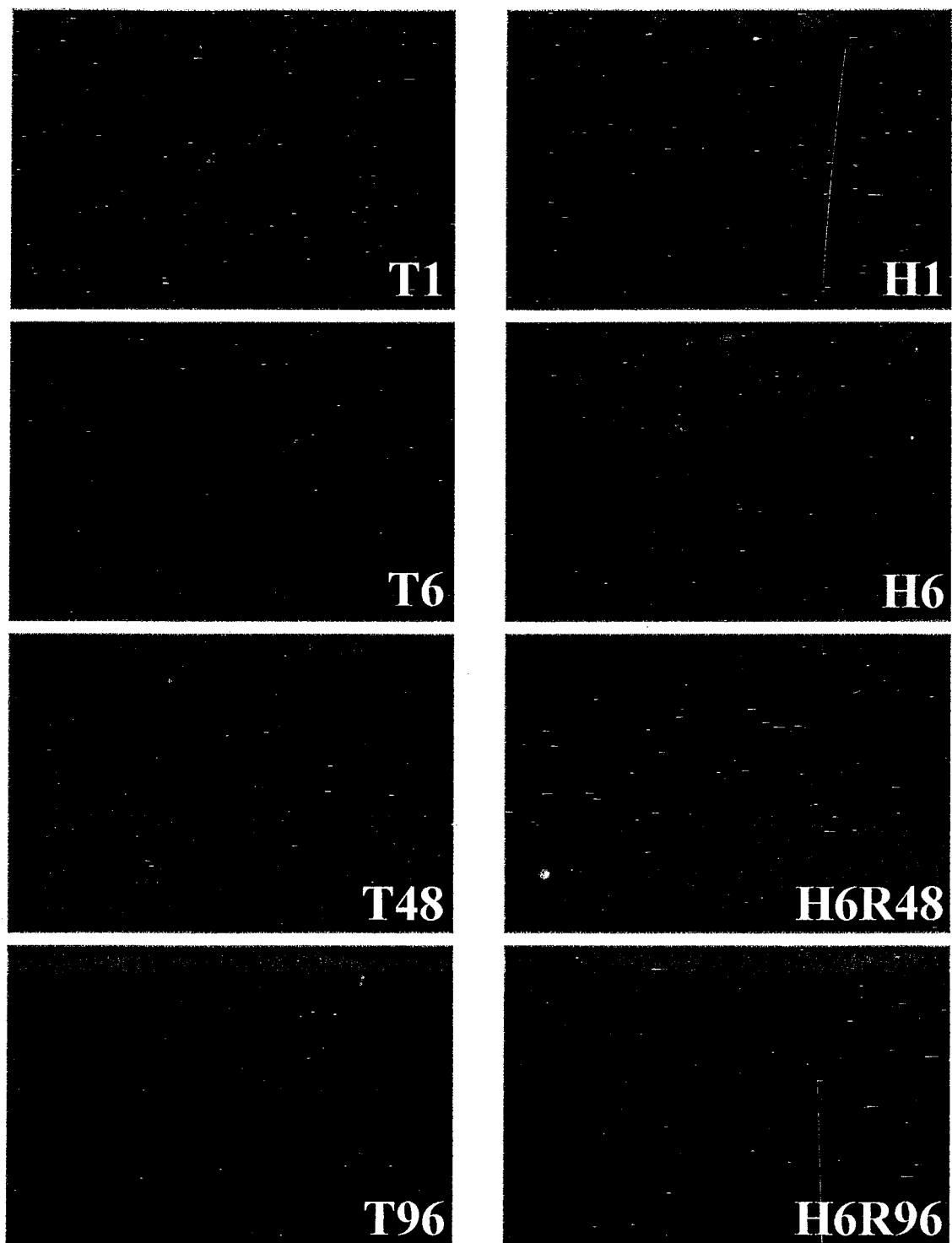


Figure 30 : Marquage immunohistochimique de la protéine Jun D en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation.

T: témoin, H: hypoxie, R: réoxygénation.

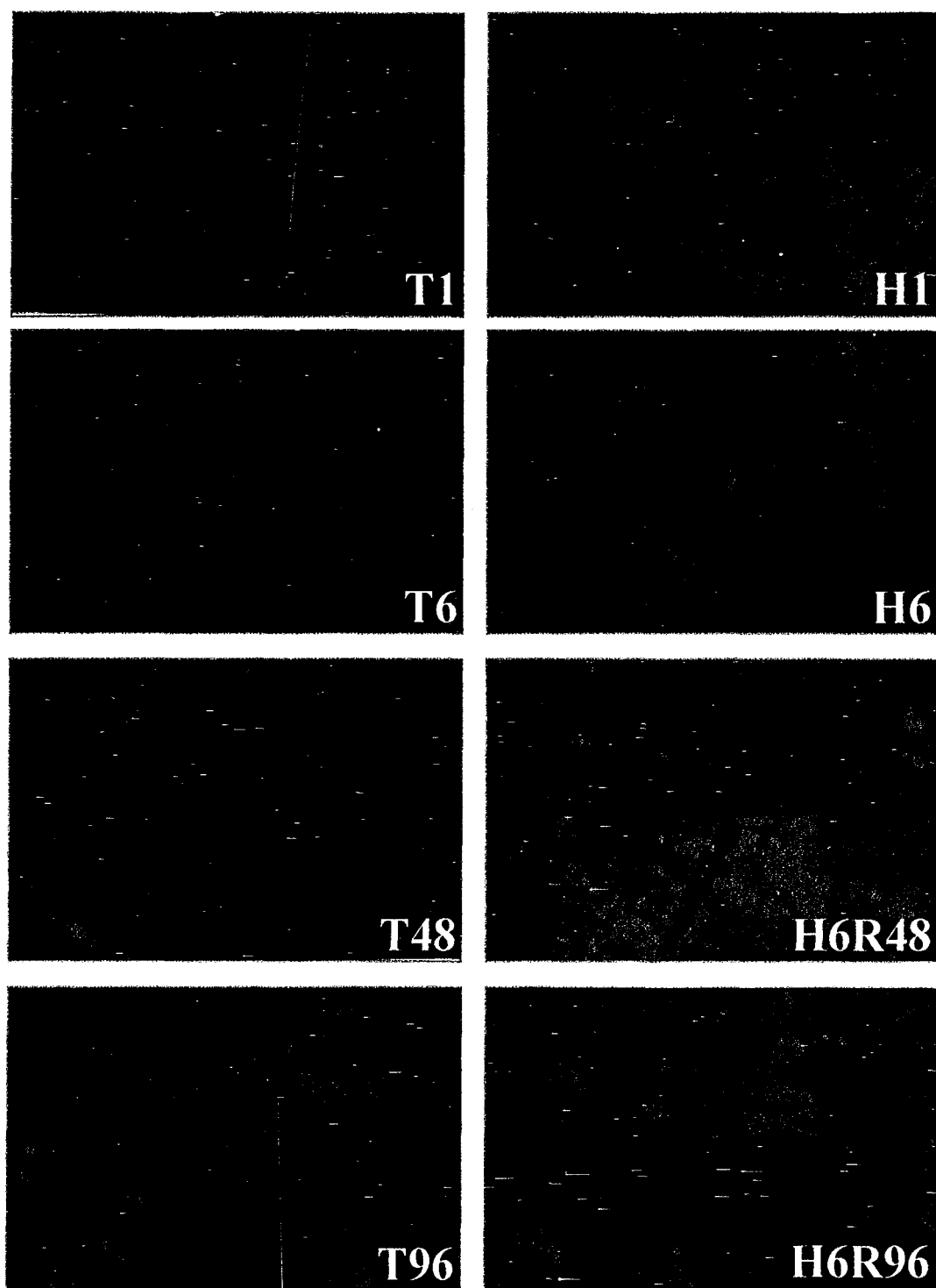


Figure 31 : Marquage immunohistochimique de la protéine p62 c-Fos en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation.

T: témoin, H: hypoxie, R: réoxygénation.

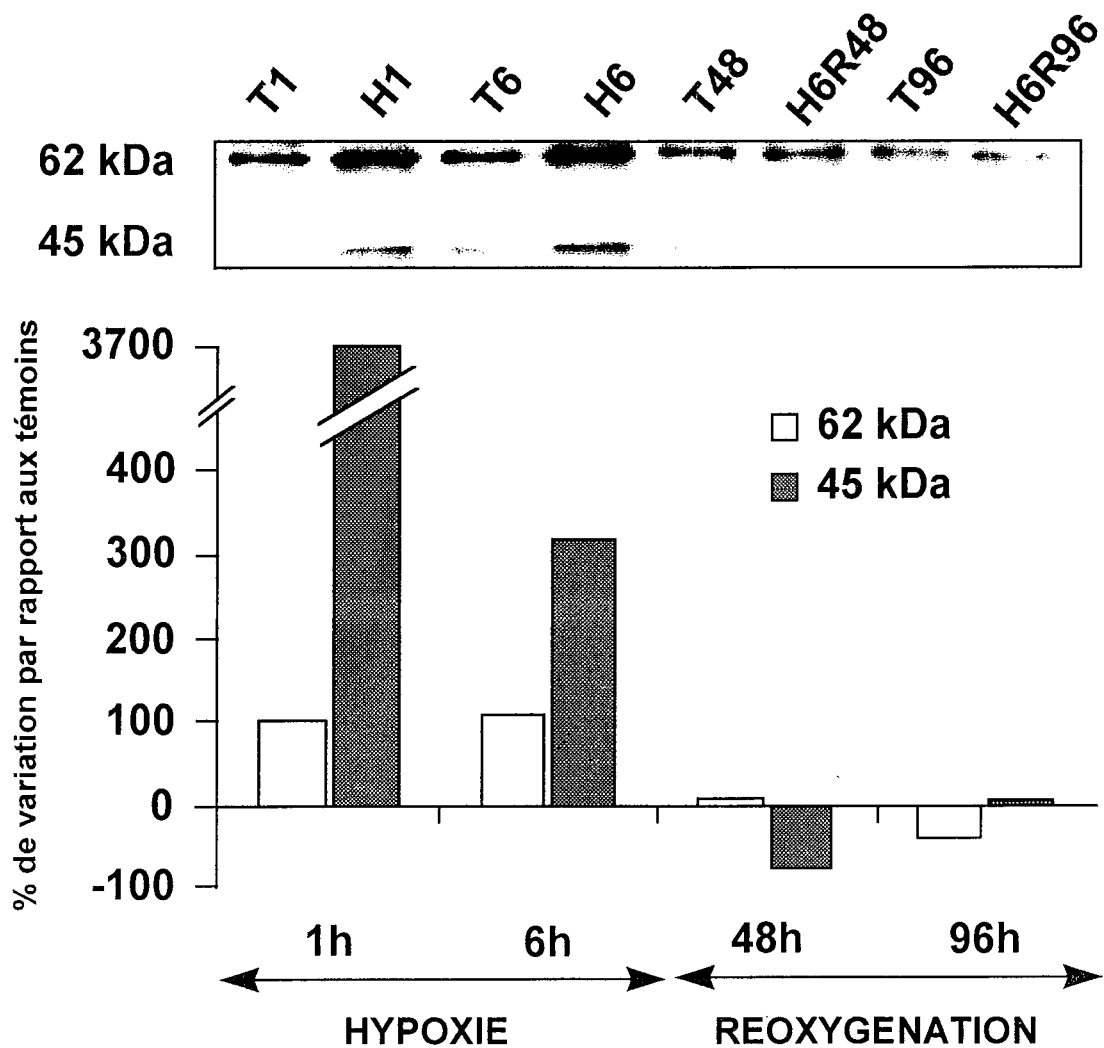


Figure 32 : Evolution de l'expression de la protéine p62 c-Fos au cours d'un épisode d'hypoxie/réoxygénation dans les neurones en culture primaire.

T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

Le blot est représentatif de 3 préparations différentes. Les résultats correspondant aux analyses densitométriques sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins. Noter que l'anticorps c-Fos (4) était dirigé contre la protéine c-Fos de 62 kDa et les résultats ont révélé une seconde bande avec un poids moléculaire apparent de 45 kDa.

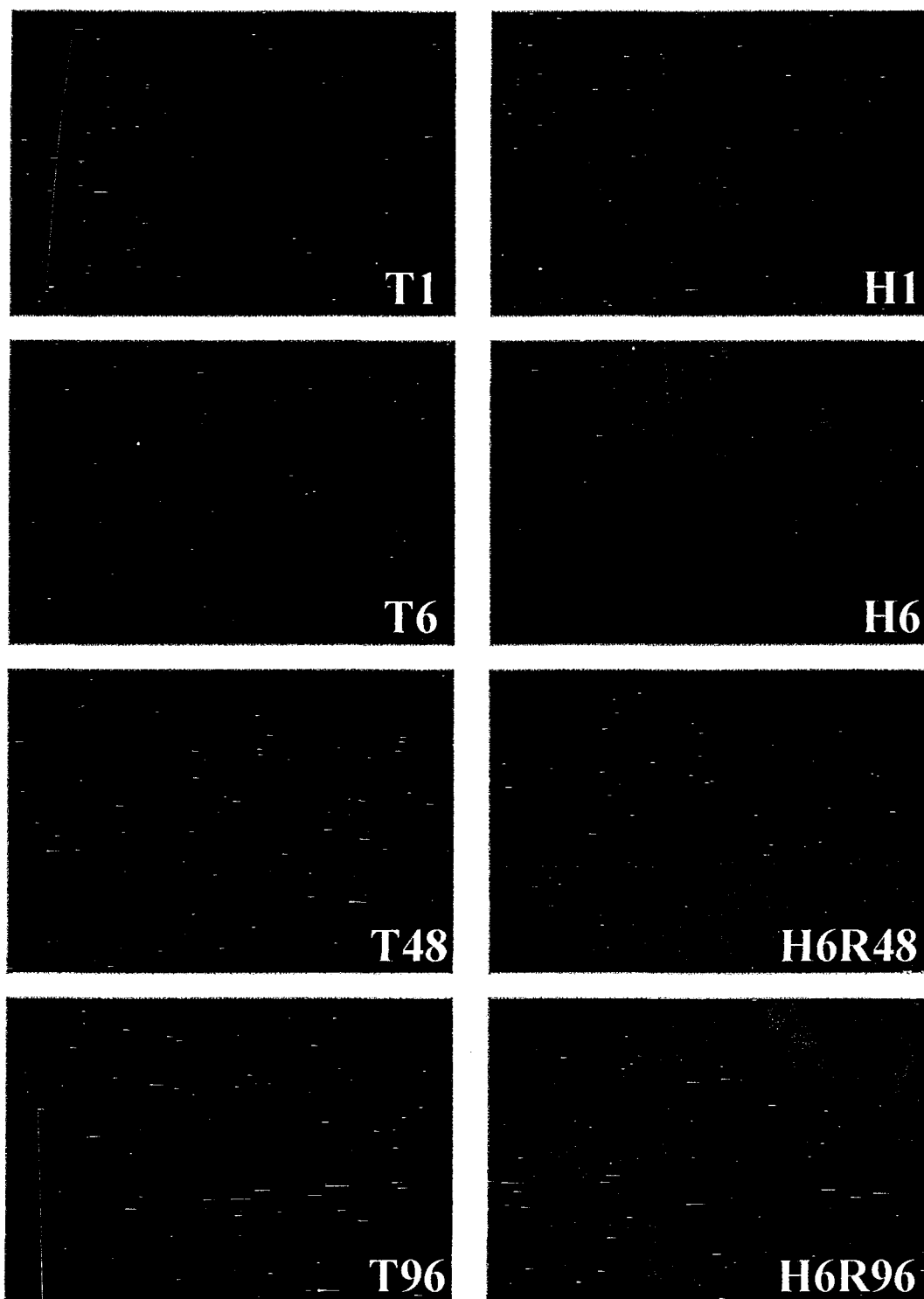


Figure 33 : Marquage immunohistochimique des membres de la famille Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1 et Fra-2) en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation.
T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

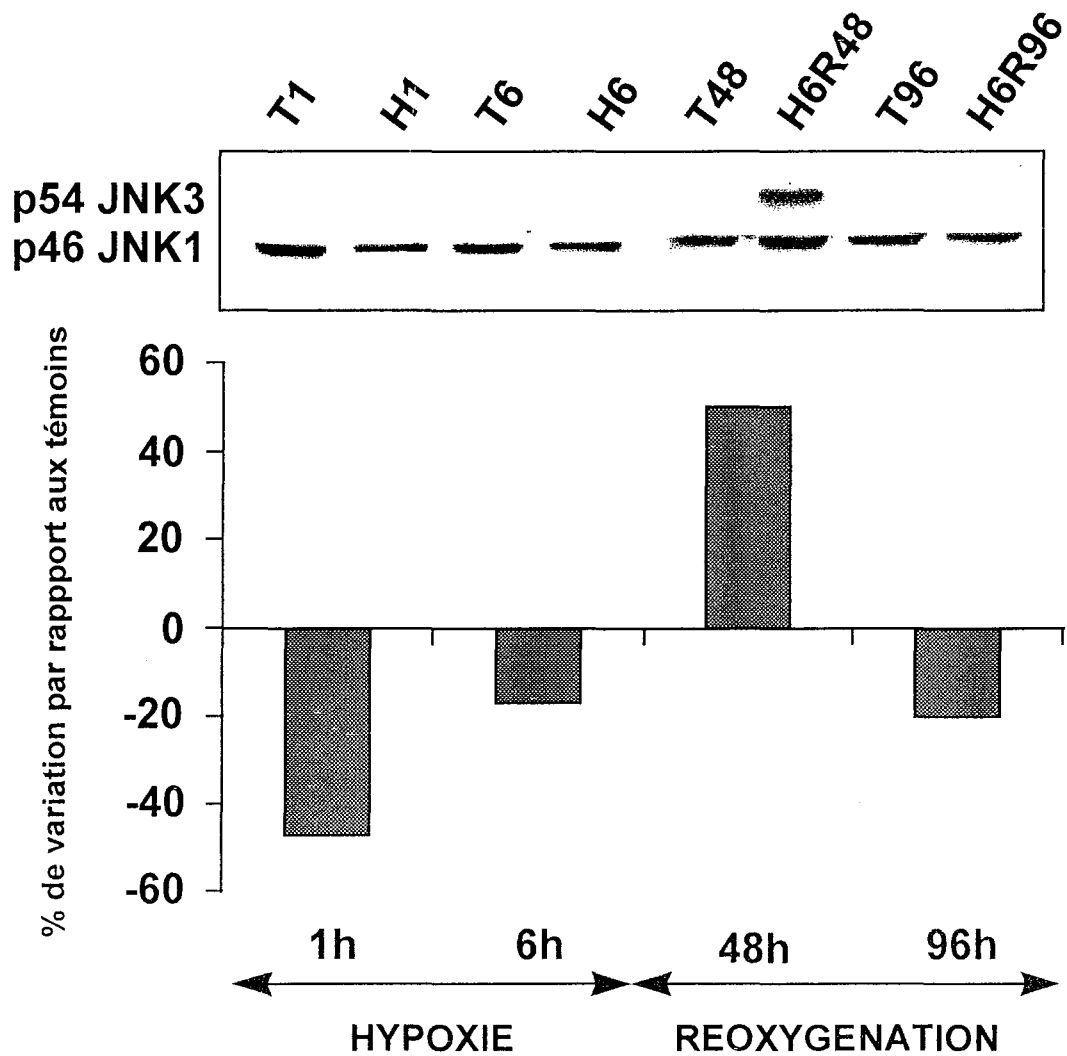


Figure 34 : Evolution de l'expression des kinases p46 JNK1 et p54 JNK3 au cours d'un épisode d'hypoxie/réoxygénation dans les neurones en culture primaire. T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

Le blot est représentatif de 3 préparations différentes. Les résultats correspondant aux analyses densitométriques sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux témoins.

B. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES DE LA FAMILLE MYC A LA SUITE D'UN EPISODE HYPOXIQUE

Aucune variation de l'expression de la protéine Max n'a été observée aux différents temps étudiés au cours de l'hypoxie puis de la réoxygénation des neurones. A titre d'illustration, **la figure 35** montre que l'expression de Max après 48 h de réoxygénation présente un niveau d'intensité de fluorescence similaire à celui observé dans les cultures témoins au même temps.

En revanche, l'analyse immunohistochimique des protéines c-Myc et Mad1 montre que leur expression spécifique varie différemment au cours de l'hypoxie/réoxygénation. Alors que l'expression de Mad1 est augmentée sensiblement durant l'hypoxie (1 h et 6 h) puis au cours de la réoxygénation (48 h et 96 h) (**figure 36**), celle de c-Myc a faiblement baissé après 1 h d'hypoxie. Elle a ensuite augmenté à 6 h avant de diminuer progressivement pendant la période de réoxygénation (**figure 37**). Toutefois, il est à noter que les variations d'expression de c-Myc sont faibles au cours de l'hypoxie.

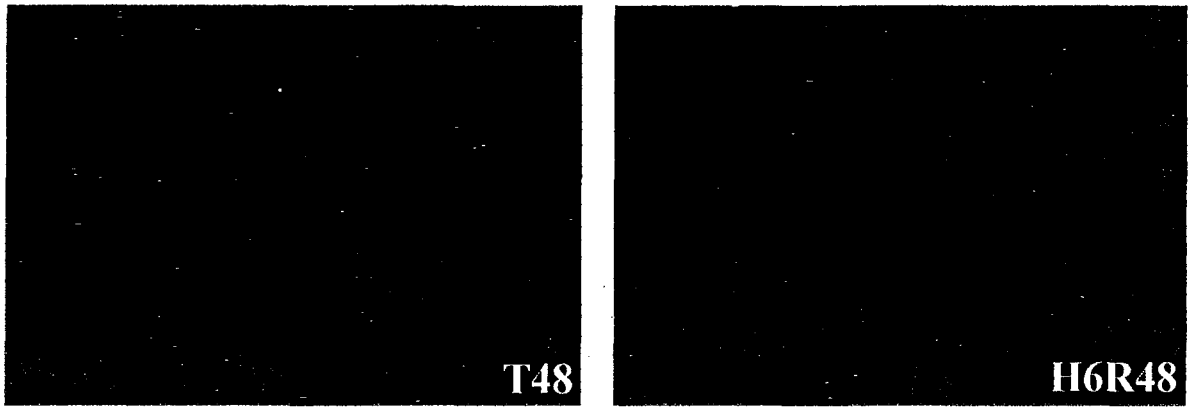


Figure 35 : Marquage immunohistochimique de la protéine Max dans des neurones en culture primaire exposés pendant 6 h à l'hypoxie et réoxygénés pendant 48 h. T : témoins, H : hypoxie, R : réoxygénation.

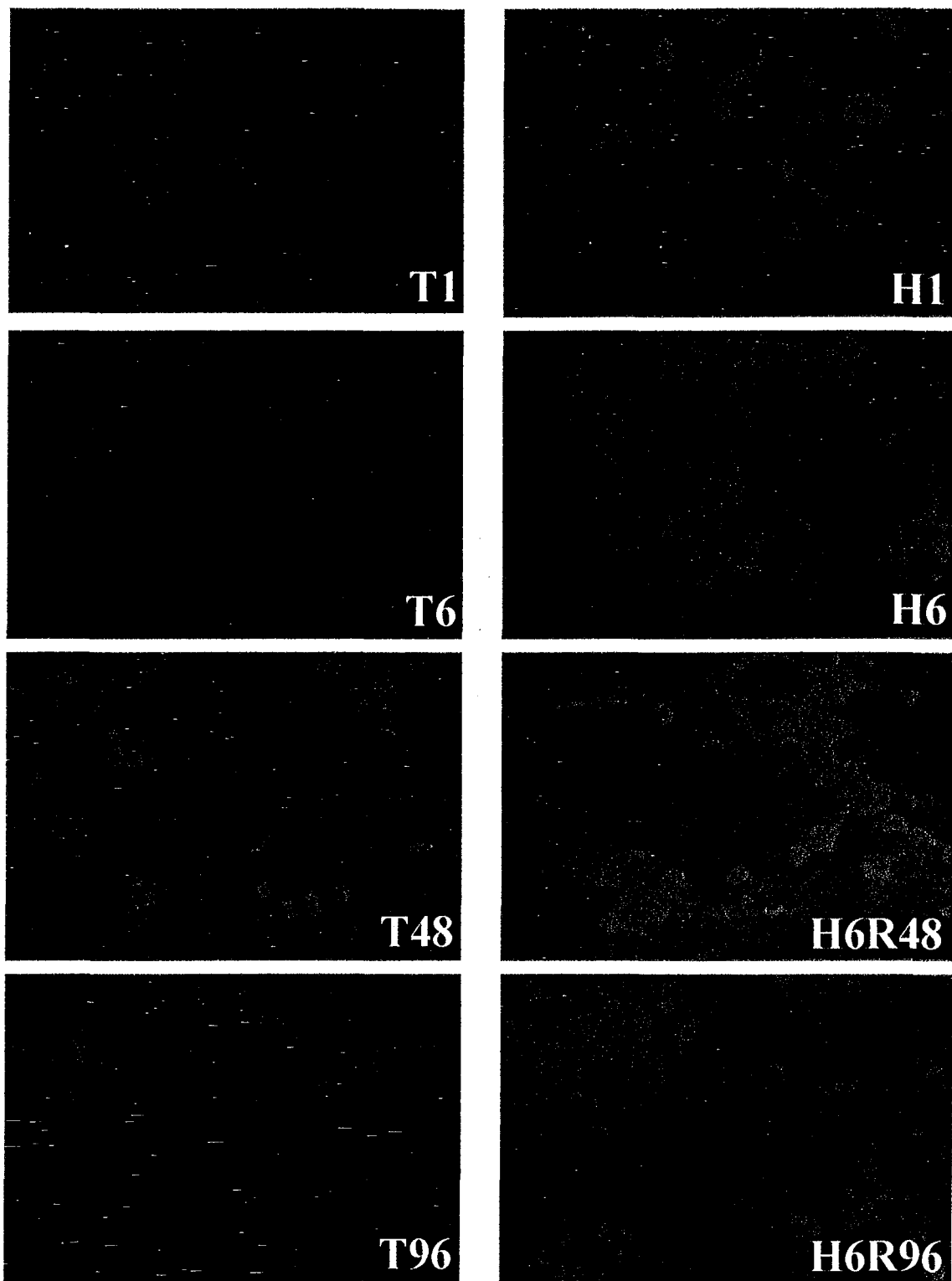


Figure 36 : Marquage immunohistochimique de la protéine Mad en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation. T: témoin, H: hypoxie, R: réoxygénation.

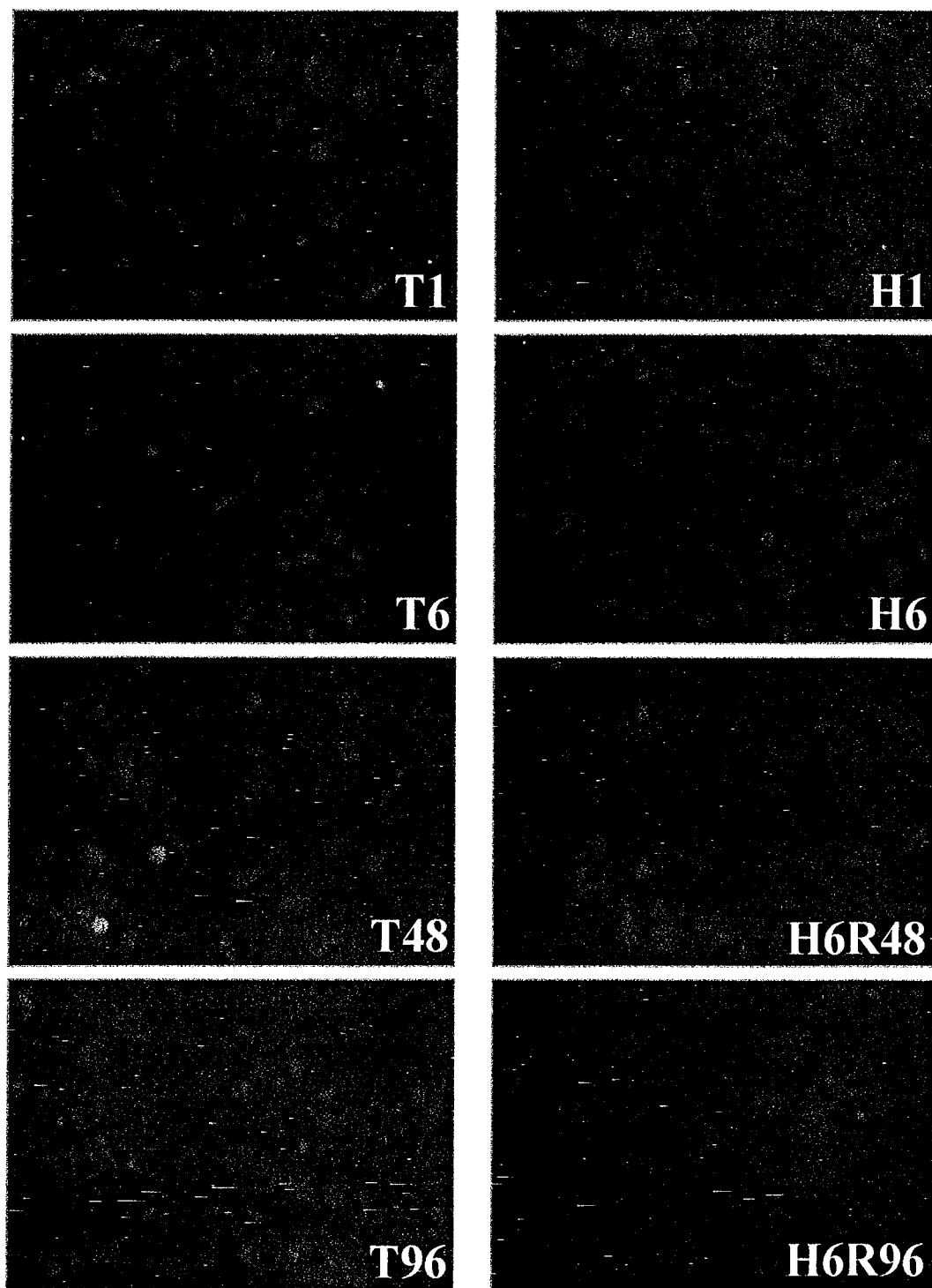


Figure 37 : Marquage immunohistochimique de la protéine c-Myc en fonction du temps dans les neurones en culture primaire exposés à un épisode d'hypoxie/réoxygénation.
T: témoins, H: hypoxie, R: réoxygénation.

DISCUSSION

I. EXAMEN CRITIQUE DU MODELE D'ETUDE

A. AVANTAGES

De nombreux laboratoires étudient les conséquences de l'hypoxie/ischémie en utilisant des modèles *in vivo* qui permettent d'avoir une description globale des phénomènes cérébraux consécutifs à l'agression. Cependant, la complexité du cerveau *in situ*, la diversité phénotypique et l'influence des mécanismes adaptatifs ne permettent pas toujours d'appréhender des mécanismes particuliers comme par exemple ceux impliqués dans les conséquences de l'hypoxie seule ou encore la contribution d'un seul acide aminé excitateur.

Pour s'affranchir des contraintes inhérentes aux modèles *in vivo*, l'utilisation de cultures cellulaires de neurones offre un avantage certain. Les avantages des cultures cellulaires consistent en la possibilité de reproduire une étape d'un processus complexe pour l'étudier indépendamment des autres. La culture permet de contrôler les conditions expérimentales et de modifier l'environnement cellulaire à loisir, y compris par introduction de molécules exogènes dont on cherche à connaître l'action. De plus, il est possible de préparer des milieux de culture très proches des milieux naturels et les milieux de composition chimiquement définie permettent d'éviter l'influence de facteurs non contrôlés tels que les molécules trophiques présentes dans le sérum.

En outre, le modèle de culture primaire de neurones centraux de rat foetal, développé au laboratoire, présente une pureté et une viabilité très élevées (supérieures à 90% dans nos conditions expérimentales). Les neurones sélectionnés sont issus de territoires cérébraux particulièrement sensibles à une privation en oxygène (hippocampe, cortex et striatum). De plus, des études morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques ont montré que les neurones en culture primaire présentent, dans ces conditions les plus favorables, les mêmes caractéristiques que leurs homologues *in situ*. Ce type de modèle permet d'éviter les problèmes rencontrés dans les modèles *in vivo* où les effets d'une privation en oxygène peuvent être masqués par des changements au

niveau de la circulation sanguine. De plus, les différents éléments qui peuvent influencer l'état métabolique des neurones via les hormones ou les changements dans la composition du plasma (taux du glucose, par exemple) n'interviennent pas. Ce modèle offre donc l'opportunité d'étudier dans les meilleures conditions et avec toute la reproductibilité nécessaire les effets d'une privation transitoire en oxygène sur les neurones centraux et d'analyser l'influence de la maturation cellulaire.

B. LIMITES

Les modèles *in vitro* présentent des limites qui peuvent rendre difficile l'interprétation des résultats. En particulier, ils ne permettent pas de conserver ni de recréer la configuration tridimensionnelle ni la richesse des interactions entre les différents éléments en présence. Par ailleurs, la contribution des cellules gliales en réponse à l'hypoxie/ischémie *in vivo* ne peut être déniée et il a été montré que les cellules gliales en co-culture protégeaient les neurones des conséquences de divers types d'agression (Mattson et Rychlik, 1990; Giulian *et al.*, 1993). Cependant, leur activation pourrait aussi contribuer aux lésions neuronales (Giulian *et al.*, 1990; Gehrmann *et al.*, 1992; Beilharz *et al.*, 1995), possibilité qui sera discutée lors de l'analyse de nos propres résultats.

De même, un état pathologique *in vivo* ne peut être reproduit fidèlement dans sa globalité par des cultures cellulaires. Ainsi, "*les cellules en culture ne sont pas un organe, et toute découverte utilisant les cultures est seulement un moyen de comprendre ce qui se passe réellement in vivo*" (Cestelli *et al.*, 1992). Bien que le modèle d'hypoxie/réoxygénation développé au laboratoire constitue un outil tout à fait adapté à l'étude d'un organe aussi complexe que le cerveau, il est nécessaire de garder une certaine prudence quant aux extrapolations *in vivo*.

II. CONTRIBUTION DE L'EXCITOTOXICITE AUX CONSEQUENCES D'UNE HYPOXIE TRANSITOIRE

A. NEURONES IMMATURES

Les dommages cérébraux consécutifs à l'hypoxie-ischémie ont été généralement attribués aux AAE, le glutamate en particulier. Les propriétés excitotoxiques du glutamate ont été incriminées dans de nombreuses perturbations neurologiques, y compris celles associées à l'hypoxie. *In vivo*, dans les modèles d'hypoxie-ischémie périnatale, l'animal immature est très sensible aux différents analogues du glutamate, particulièrement le NMDA (MacDonald et Johnston, 1990). Une sensibilité maximale a été rapportée pour le NMDA, l'AMPA et le kaïnate durant le développement (MacDonald *et al.* 1988 ; Erdö et Wolff, 1989). Certaines études réalisées *in vitro* ont également montré le développement de l'excitotoxicité des AAE (Frandsen et Schousboe, 1990; Gunasekar *et al.*, 1995; Durkin *et al.*, 1996; Mizuta *et al.*, 1998). La susceptibilité neuronale à l'hypoxie-ischémie au cours du développement serait corrélée à la sensibilité au NMDA. La vulnérabilité particulière du cerveau de l'animal immature vis-à-vis de l'hypoxie-ischémie pourrait s'expliquer par la surexpression transitoire des récepteurs NMDA pendant le développement cérébral (Johnston, 1993). En outre, dans un modèle d'hypoxie foetale chez le cobaye, une modification des sites modulateurs des récepteurs NMDA a été mise en évidence (Mishra et Delivoria-Papadopoulos, 1992). De même, une hypoxie réalisée *in utero*, provoque l'augmentation du nombre de canaux sodiques voltage-dépendants dont l'ouverture est entraînée par les différents agonistes du glutamate dans le cerveau de rats nouveau-nés (Xia et Haddad, 1994). Cependant, l'expression des récepteurs des AAE n'est pas suffisante pour leur procurer la capacité de médier l'excitotoxicité et le glutamate n'est certainement pas seul en cause dans l'origine des dommages neuronaux hypoxiques ou ischémiques. En effet, les modèles d'hypoxie-ischémie (globale ou focale), les espèces animales étudiées, l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, la formation d'oedèmes

et les effets d'autres neurotransmetteurs sont autant de variables qui peuvent avoir une influence sur le devenir neuronal après hypoxie-ischémie (Choi et Rothman, 1990).

Dans les cultures de neurones de 6 jours, le glutamate, utilisé à 100 μM pendant 6 heures, n'altère pas l'intégrité neuronale. Ni le métabolisme énergétique, ni la synthèse protéique ne sont modifiés et le marquage nucléaire par le fluorochrome DAPI ne montre aucun signe de fragmentation de la chromatine associée au glutamate.

Au même stade maturationnel des neurones *in vitro* (6 jours), une hypoxie de 6 h qui diminue la PO_2 de 80% entraîne une mort neuronale retardée. Dans nos conditions expérimentales, les altérations caractéristiques de l'apoptose ont été montrées, avec notamment condensation de la chromatine et induction biphasique de la synthèse protéique. L'inhibiteur de la synthèse protéique (CHX) a un effet bénéfique puisqu'il inhibe la mort causée par l'hypoxie dans notre modèle et le devenir des neurones immatures dépendrait de la synthèse de macromolécules impliquées dans la mort cellulaire programmée (Shigeno *et al.*, 1990; Pittman *et al.*, 1993; Bossenmeyer *et al.*, 1998). Toutefois, la CHX ne protège pas totalement les neurones puisqu'elle augmente par elle-même le nombre de cellules nécrotiques. Cependant, sa présence au cours de l'hypoxie abolit l'augmentation du taux d'apoptose normalement observée après hypoxie/réoxygénation. Les taux de nécrose enregistrés dans les neurones hypoxiques sont, quant à eux, similaires à ceux mesurés dans les neurones témoins maintenus en normoxie.

Différents travaux ont montré que les antagonistes des récepteurs du glutamate ne protégeaient pas nécessairement des dommages neuronaux dus à une privation en oxygène (Aitken *et al.*, 1988; Schurr *et al.*, 1995) et la participation du glutamate dans l'hypoxie-ischémie est de plus en plus remise en question (Hossmann, 1994; Uto *et al.*, 1995). Les effets de l'hypoxie responsables de la mort neuronale emprunteraient des voies indépendantes de l'activation des récepteurs du glutamate (Newell *et al.*, 1995). Une étude a montré que la concentration extracellulaire du glutamate reste inférieure à 2 μM

après exposition des neurones en culture à une hypoxie de 7 heures (Uchiyama-Tsuyuki *et al.*, 1995).

La participation d'un phénomène de mort active de type apoptotique dans les conséquences d'une hypoxie ou ischémie cérébrales est de plus en plus évidente (Linnik *et al.*, 1993; Beilharz *et al.*, 1995; Islam *et al.*, 1995) et nos résultats concernant l'hypoxie sur les cultures "immatures" vont dans ce sens.

Cependant, l'apoptose observée dans ces cultures ne s'accompagne pas de dégradation internucléosomale de l'ADN décelable sur gel d'agarose par une image caractéristique en échelle, suggérant qu'une telle dégradation n'est pas systématiquement liée à la morphologie apoptotique. En effet, la fragmentation de l'ADN en échelle ne permet pas à elle seule d'affirmer que la mort cellulaire est de type apoptotique et ce n'est qu'en rassemblant différentes informations caractéristiques de l'apoptose qu'on peut s'en assurer. En effet, la dégradation de l'ADN en oligonucléosomes, bien qu'utilisée par plusieurs équipes, ne constitue pas une preuve en soi. Il a été suggéré que des endonucléases intervenant dans la nécrose couperaient au niveau des sites internucléosomaux, mimant ainsi la fragmentation en échelle; enfin, la présence d'apoptose a été rapportée en l'absence de dégradation internucléosomale de l'ADN (Tominaga *et al.*, 1993; Beilharz *et al.*, 1995; Walker et Sikorska, 1997).

Pour notre part, même si la mort cellulaire d'origine hypoxique dans les neurones de 6 jours ne s'accompagne pas d'une fragmentation en échelle, nous pouvons affirmer qu'il s'agit d'une mort par apoptose. D'une part, nous avons détecté une morphologie nucléaire caractéristique de l'apoptose grâce à la technique de marquage par le DAPI. D'autre part, nous avons observé une stimulation des taux de synthèse des ARN et des protéines ainsi qu'une inhibition de la mort neuronale en présence de cycloheximide, ce qui reflète un phénomène programmé (Johnson et Deckwerth, 1993; Bossenmeyer *et al.*, 1998). De plus, Bax et ICE, deux protéines dont l'implication dans l'apoptose a été démontrée (Oltvai *et al.*, 1993; Yuan *et al.*, 1993; Kumar, 1995; Srinivasan *et al.*, 1996;

Tamatani *et al.*, 1998) sont surexprimées dans notre modèle (Bossenmeyer *et al.*, 1998). Tous ces arguments concourent en faveur d'un mécanisme apoptotique.

Par ailleurs, les hausses significatives de LDH consécutives à l'hypoxie peuvent être attribuées à l'apoptose. Non seulement, les taux détectés sont faibles, mais les cellules engagées dans un processus apoptotique *in vitro* perdraient leur contenu cytoplasmique puisqu'elles ne seront pas phagocytées, à l'inverse de la situation *in vivo* où les cellules apoptotiques seraient phagocytées (Bonfoco *et al.*, 1995).

Comme précédemment mentionné dans le chapitre "Examen critique du modèle", notre modèle fait appel à des cultures enrichies en neurones. Il permet ainsi d'étudier le devenir des neurones et les mécanismes impliqués dans leur réponse à une agression hypoxique, en dehors de l'intervention d'autres éléments cellulaires tels les cellules gliales. Cependant, alors que les cellules gliales peuvent exercer des effets neuroprotecteurs *in vivo*, leur activation peut être couplée à la mort neuronale par apoptose chez le rat immature ou dans des modèles de coculture (Beilharz *et al.*, 1995; Tamatani *et al.*, 1998). Des cytotoxines, comme l'oxide nitrique, le peroxyde d'hydrogène ou encore des cytokines peuvent être libérées par les cellules gliales et contribuer ainsi à la dégénérescence neuronale (Urban *et al.*, 1986; Giulian *et al.*, 1990, 1993; Gehrmann *et al.*, 1992; Lees, 1993; Tamatani *et al.*, 1998).

Dans notre modèle et en accord avec d'autres études (Wahl *et al.*, 1991), les neurones cultivés pendant 6 jours *in vitro* expriment un système glutamatergique fonctionnel et un nombre important de récepteurs (Oillet *et al.*, 1995). Nos résultats montrent que les neurones sont résistants à la toxicité du glutamate alors qu'ils sont sensibles à l'hypoxie (**figure 38**). En outre, le blocage de l'activité de la PKC par la staurosporine rend les neurones de 6 jours vulnérables au glutamate et une autre étude *in vitro* a montré que l'inhibition pharmacologique de la PKC rend les neurones corticaux immatures de 6-8 jours vulnérables aux effets toxiques du glutamate (Durkin *et al.*, 1997).

Neurones de 6 jours

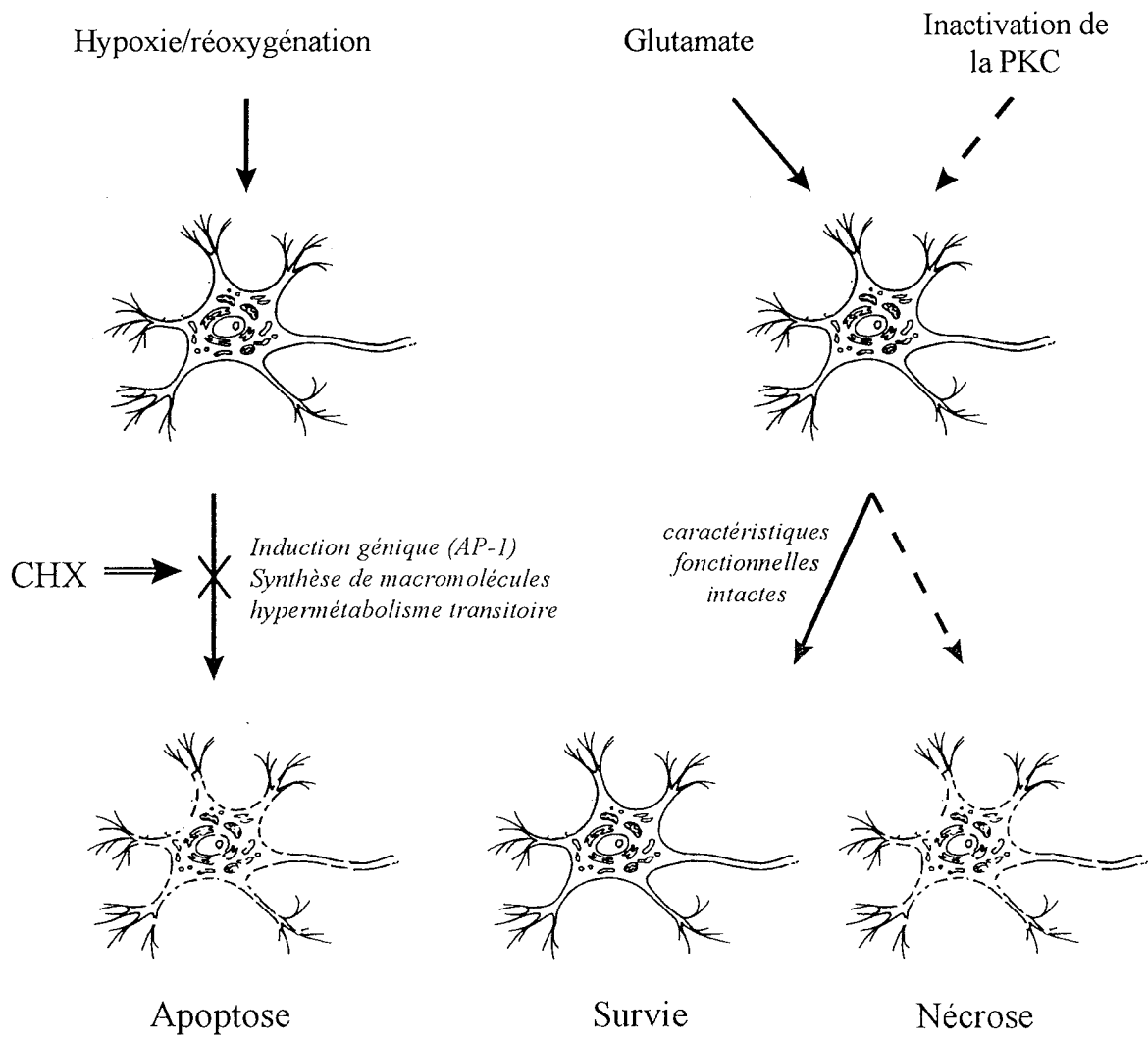


Figure 38 : Résumé des principaux effets d'une exposition de 6 h à une hypoxie ou au glutamate des neurones centraux immatures (6 jours *in vitro*).

La perte de l'activité de la PKC membranaire apparaît ainsi être un processus nécessaire à la médiation de la mort induite par les AAE dans les neurones en culture (Durkin *et al.*, 1996, 1997). Les événements cellulaires faisant le lien entre l'influx calcique induit par le glutamate et l'inactivation de la PKC ne seraient pas développés dans les neurones immatures.

B. NEURONES "PLUS MATURES"

Lorsque les cultures de neurones ont été utilisées après 13 jours *in vitro*, une hypoxie de 6 h a induit une diminution significative de la viabilité cellulaire à partir de 24 h post-réoxygénation et un efflux de LDH dès la fin de l'hypoxie. Le métabolisme énergétique était stimulé transitoirement à 6 h pour baisser ensuite progressivement, tandis qu'une augmentation significative de la synthèse protéique a été enregistrée uniquement à 48 h après réoxygénation. Le nombre de neurones apoptotiques et nécrotiques a augmenté progressivement et il était significativement plus élevé par rapport aux cultures témoins. Lorsque l'hypoxie a été réalisée en présence de CHX, la viabilité a baissé de façon non significative par rapport aux cultures traitées à la CHX seule. Les taux élevés de nécrose étaient également identiques à ceux des témoins.

De même, les neurones de 13 jours sont sensibles à l'excitotoxicité induite par le glutamate ou le NMDA. La toxicité du glutamate, utilisé à 100 μ M pendant 6 h, est caractérisée par des altérations morphologiques, une diminution de la viabilité cellulaire, un efflux prononcé de LDH et une diminution du métabolisme énergétique, détectables dès la fin de l'exposition.

L'action du glutamate est plus rapide que celle de l'hypoxie. L'acide aminé a altéré les caractéristiques cellulaires dès la fin de l'exposition, avec une diminution progressive de la viabilité neuronale atteignant 30% à 72 h. De même, le métabolisme énergétique a été définitivement réduit à la fin des 6 h d'exposition. Comparée à celle enregistrée dans les témoins, l'incorporation de leucine tritiée a significativement diminué de 20% 1 h après le début de l'exposition. Elle est ensuite restée en dessous des valeurs

témoins. Contrairement aux cultures de 6 jours, le traitement par l'inhibiteur de la synthèse protéique n'a pas amélioré le devenir des neurones de 13 jours. En effet, dans ce cas, la viabilité était davantage réduite et les taux de nécrose enregistrés sont restés élevés et identiques à ceux correspondant au glutamate seul.

Nos résultats confirment la dépendance de l'excitotoxicité médiée par le glutamate vis-à-vis de l'âge des cultures (Frandsen et Schousboe, 1990). Celle-ci pourrait s'expliquer par la faible concentration intracellulaire en Ca^{2+} dans le cerveau immature associée à une conductance membranaire réduite pour ces ions, alors que dans les cellules plus matures, l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire est soutenue (Wahl *et al.*, 1989).

L'inactivation de la PKC semble également impliquée dans l'excitotoxicité. En effet, cette inactivation apparaît comme une conséquence commune aux modèles d'ischémie focale et globale (Louis *et al.*, 1988; Cardell *et al.*, 1990; Crumrine *et al.*, 1990; Domanska-Janik et Zalewska, 1992; Cardell et Wieloch, 1993). De plus, l'activité de la PKC est réduite dans un modèle d'ischémie simulée utilisant des tranches d'hippocampe (Small *et al.*, 1996), de même que dans les cultures de neurones corticaux exposées aux AAE (Durkin *et al.*, 1996). La PKC serait inactivée par l'influx du Ca^{2+} via les récepteurs NMDA, AMPA et les récepteurs dépendants du voltage, l'utilisation d'agents bloquant les canaux calciques, tels que la nifedipine et nitrendipine, empêchant l'inactivation de l'enzyme induite par les AAE et montrant des propriétés neuroprotectrices (Durkin *et al.*, 1996).

En outre, la perte d'activité de l'enzyme se produirait en absence de tout changement dans les taux de PKC présents dans les membranes cellulaires et il a été montré que le glutamate n'altère pas les taux de PKC dans les neurones en culture (Vaccarino *et al.*, 1987; Faravon *et al.*, 1990). Toutefois, l'analyse de la distribution de la PKC dans les neurones *in vitro* indique qu'une grande partie de l'enzyme associée à la membrane est sous forme inactive. Ainsi, la résistance des neurones de 6 jours à l'excitotoxicité observée proviendrait du blocage d'un ou plusieurs événements responsables de l'inactivation de la PKC, vraisemblablement en aval de l'entrée du Ca^{2+} . Il

est probable qu'après stimulation des récepteurs du glutamate, l'inactivation de la PKC membranaire serait liée à la présence d'un inhibiteur localisé au voisinage des récepteurs du glutamate. Dans les membranes cellulaires, l'existence d'un inhibiteur endogène de la PKC a été rapportée (Chakravarthy *et al.*, 1995) et il est possible que certaines ou toutes les PKC des neurones centraux en culture soient réduites par un tel composé.

Par ailleurs, l'inactivation de la PKC induite par le Ca^{2+} dans les neurones "plus matures" dépendrait de la présence de sous-unités particulières des récepteurs du glutamate. Il est actuellement établi que les changements dans la composition des récepteurs du glutamate est un processus important dans le cerveau de rat en développement (Pellegrini-Giampetro *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1994) et qu'une évolution temporelle similaire aurait lieu dans les cultures de neurones (Mattson *et al.*, 1991). Mizuta *et al.* (1998) ont récemment rapporté que de tels changements dans la composition des sous-unités des récepteurs participeraient à l'émergence de la neurotoxicité liée au glutamate dans les neurones de souris en culture primaire. Par conséquent, l'incapacité des récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate à induire l'inactivation de la PKC et la mort des neurones de 6 jours pourrait être liée au statut des différentes sous-unités des récepteurs qui diffère de celui des neurones de 13 jours.

Toutefois, le profil des altérations cellulaires observées dans les neurones plus matures après exposition au glutamate contraste avec celui associé à l'hypoxie. En particulier, nous avons observé une réduction persistante de la synthèse protéique à partir de 1 h après l'addition du glutamate. Aussi, à 72 h post-exposition, le pourcentage de cellules apoptotiques ne diffère pas de celui mesuré dans les cultures témoins, alors que le nombre de cellules nécrotiques est plus élevé, suggérant que le glutamate entraîne un processus nécrotique dans les cultures de neurones de 13 jours. En revanche, les conséquences d'une hypoxie, à ce stade de maturation, impliqueraient aussi bien l'apoptose que la nécrose. En effet, le nombre de cellules nécrotiques est très important à la fin de la période de réoxygénation et les changements séquentiels de la synthèse protéique, comme les effets de la CHX (bien qu'ils soient moins importants que dans les neurones immatures) sont en faveur de la participation d'une composante génétique.

Contrairement à l'hypoxie et à l'ischémie (Papas *et al.*, 1992; Linnik *et al.*, 1993), l'excitotoxicité ne nécessiterait pas une synthèse protéique *de novo*, dans la mesure où un inhibiteur de la synthèse protéique (l'anisomycine) ne permet pas de réduire la neurotoxicité médiée par les récepteurs du glutamate (Leppin *et al.*, 1992). Certains auteurs ont néanmoins suggéré que l'activation des récepteurs du glutamate régulerait l'expression génétique dans les neurones en cultures primaires (Condorelli *et al.*, 1994; Panchision *et al.*, 1995). D'autres ont montré que la mort neuronale par excitotoxicité dans le cerveau immature impliquerait aussi bien l'apoptose que la nécrose (Portera-Cailliau *et al.*, 1997). En outre, l'utilisation d'inhibiteurs de transcription, de traduction ou encore des inhibiteurs d'endonucléases, dans des cultures de cellules granulaires du cervelet exposées au glutamate, a montré que la mort neuronale induite par celui-ci ne manifeste pas les caractéristiques de l'apoptose (Dessi *et al.*, 1994).

La **figure 39** résume les principaux effets d'une exposition à l'hypoxie ou au glutamate dans les cultures de neurones de 13 jours. Nos données montrent que l'exposition au glutamate au stade le plus mature induit un processus nécrotique des cellules en culture, probablement consécutif à une perte de l'homéostasie calcique et une surcharge en Ca^{2+} , entraînant la lyse des cellules et la libération de leur contenu, reflétée par une libération accrue de LDH. Parmi les agonistes des récepteurs du glutamate testés, le NMDA s'est révélé le plus efficace pour induire la nécrose des neurones de 13 jours. A ce stade de maturation, l'action des antagonistes des récepteurs suggère fortement que la composante nécrotique de l'hypoxie est liée à un mécanisme excitotoxique. En effet, la nécrose induite dans les neurones "matures" suite à l'hypoxie est beaucoup moins importante en présence du MK-801 ou du NBQX que celle enregistrée après hypoxie seule, les taux d'apoptose n'étant pas modifiés. De plus, la présence de MK-801 durant l'hypoxie diminue l'efflux de LDH, confirmant l'implication majeure de la nécrose induite par le glutamate dans les dommages neuronaux à ce stade de développement. En présence des antagonistes des récepteurs du glutamate, les taux extracellulaires de LDH consécutifs à l'hypoxie restent plus élevés que les valeurs témoins, même s'ils sont fortement réduits. Comme nous l'avons mentionné précédemment, cela pourrait être la conséquence de la

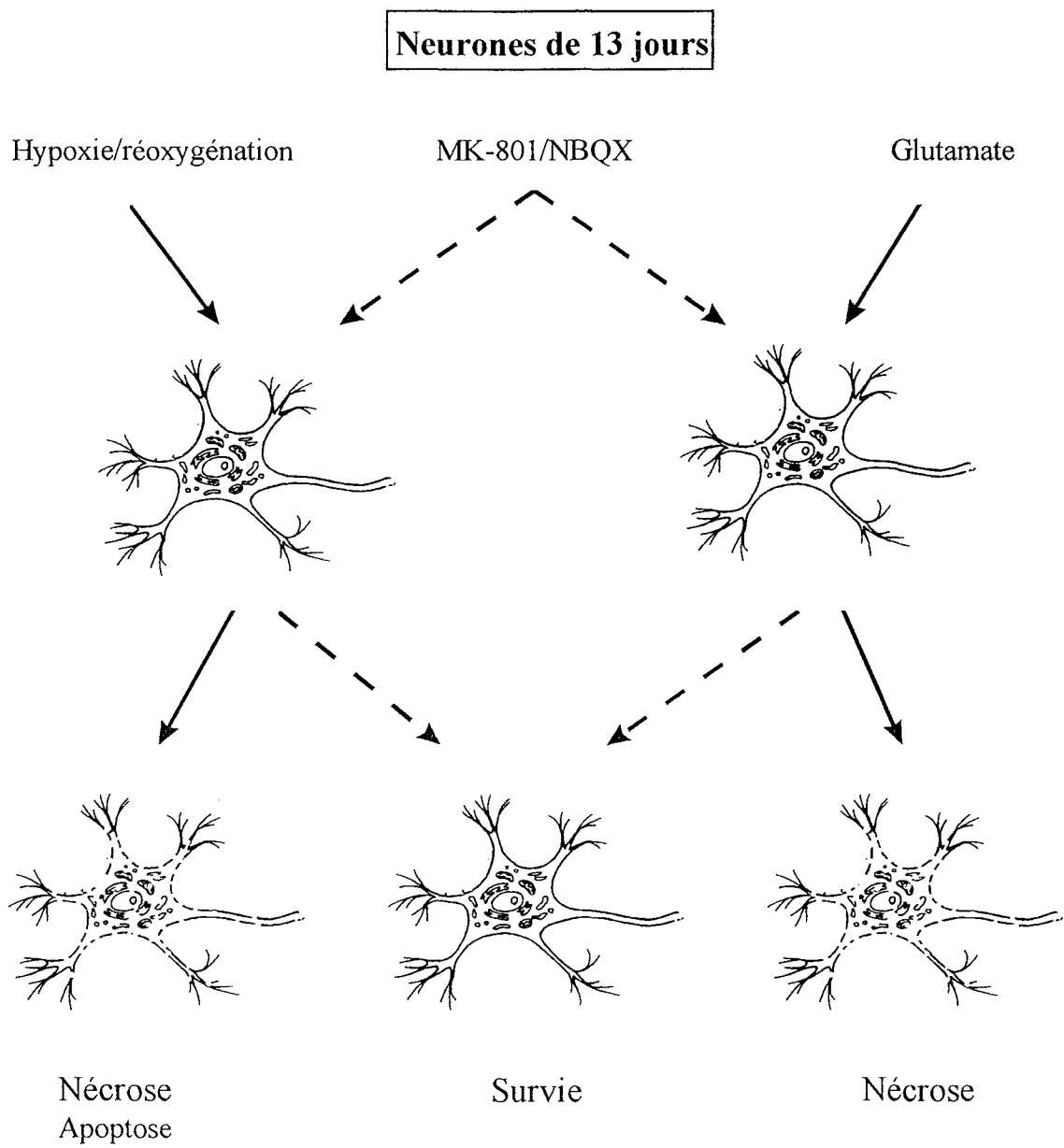


Figure 39 : Résumé des principaux effets d'une exposition de 6 h à une hypoxie ou au glutamate des neurones centraux de 13 jours *in vitro*.

composante apoptotique de l'hypoxie, les cellules apoptotiques pouvant elles aussi libérer la LDH dans des conditions de culture cellulaire. Il a été montré que les deux antagonistes que nous avons utilisés protégeaient les neurones dans le cerveau adulte soumis à une hypoxie-ischémie (Buchan *et al.*, 1991; Pittman *et al.*, 1993; Schurr *et al.*, 1995) et nos résultats confirment la participation des récepteurs NMDA et non NMDA à la souffrance neuronale (Frandsen *et al.*, 1989; Pelligrini-Giampietro *et al.*, 1994).

Comme pour les cultures de 6 jours, nous n'avons pas observé de fragmentation internucléosomale d'ADN caractéristique de l'apoptose sur les gels d'agarose à la suite de l'hypoxie, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que la mort neuronale d'origine hypoxique est à ce stade de maturation majoritairement de type nécrotique.

Ainsi, dans les cultures plus matures, les effets toxiques du glutamate diffèrent en partie de ceux d'une hypoxie transitoire dans le même modèle. Par conséquent, l'excitotoxicité du glutamate n'apparaît pas comme une composante majeure des dommages cellulaires observés. De plus, ces résultats soulignent l'importance du degré de maturation des neurones dans l'origine des mécanismes lésionnels associés à l'hypoxie.

Il est actuellement établi que le cerveau immature tolère mieux des périodes transitoires de privation en oxygène que le cerveau adulte (Duffy *et al.*, 1975; Friedman et Haddad, 1993). Cette propriété pourrait s'expliquer en partie par une induction génétique et une expression protéique sélectives. Les excitotoxines, par contre, n'activeraient pas la cascade apoptotique dans les cellules "immatures" comme dans les cellules "plus matures" en cultures.

III. EXPRESSION DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AU COURS DE L'HYPOXIE/REOXYGENATION

A. LE FACTEUR AP-1

Le complexe protéique AP-1 joue un rôle de régulateur transcriptionnel en se liant à des séquences spécifiques présentes au niveau de nombreux gènes. Aussi nous avons tenté d'évaluer son rôle dans les effets de l'hypoxie transitoire sur les cultures de neurones de 6 jours où la mort programmée semble jouer un rôle déterminant.

1. Expression basale

Nous avons détecté une liaison du facteur AP-1 à la fois dans les cultures témoins maintenues en normoxie et celles exposées à l'hypoxie/réoxygénation. Ainsi, les neurones en culture expriment spontanément le facteur AP-1 et les techniques d'immunohistochimie et de western blot révèlent la présence des différentes protéines qui le composent dans les neurones témoins. Il a été rapporté que les cultures primaires de neurones corticaux expriment constitutivement certains composants du complexe AP-1 (Murphy *et al.*, 1991; Barron *et al.*, 1995). Les gènes c-fos, c-jun et jun B étant connus pour être régulés dans le cerveau en développement (Kaminska *et al.*, 1995), l'expression basale du facteur AP-1 dans les cellules neuronales refléterait des changements maturationnels dans les neurones *in vitro*. Les protéines concernées coordonnent les altérations de l'expression des gènes cibles et, par conséquent, les modifications de l'activité neuronale (Murphy *et al.*, 1991; Agoston *et al.*, 1995).

Si les facteurs de transcription contribuent au développement et à la plasticité des neurones centraux, leurs cibles génétiques peuvent également participer à la mort cellulaire spontanée. Dans notre modèle, en effet, une petite fraction de neurones meurt

naturellement par apoptose. *In vivo*, il a été montré qu'une forte expression de c-Fos et c-Jun dans le cerveau de rat en développement est associée au programme de mort cellulaire (Gonzalez Martin *et al.*, 1991, 1992; Ferrer *et al.*, 1996; Messina *et al.*, 1996).

2. Altérations de la composition du complexe AP-1 au cours de l'hypoxie/réoxygénation

Dans les modèles expérimentaux d'hypoxie-ischémie, c-fos et c-jun sont activés dans les neurones des régions cérébrales vulnérables et l'expression de c-Fos est augmentée d'une manière substantielle dans les neurones hippocampiques et corticaux avant que ceux-ci ne dégèrent (An *et al.*, 1993; Gubits *et al.*, 1993; Munell *et al.*, 1994). L'ensemble des modifications d'expression observées dans notre modèle d'hypoxie-réoxygénation rejoint ces données.

Les variations des réponses cellulaires sont régies par l'activité de liaison du complexe AP-1, essentielle pour la régulation génique, mais il est également envisageable que les changements de la composition du complexe contribuent à ces modifications (Hope *et al.*, 1994; Kasof *et al.*, 1995; Kaminska *et al.*, 1996). L'hypoxie/réoxygénation induit des modifications séquentielles de l'expression des différentes protéines susceptibles de faire partie du facteur AP-1. Toutes les protéines étudiées sont surexprimées après 1 h d'hypoxie suggérant que leur coexpression serait médiée par les mêmes voies de transduction et impliquant les mêmes récepteurs. A ce titre, il a été rapporté une stimulation des récepteurs glutamatergiques, dopaminergiques et adrénergiques ainsi qu'une forte accumulation de Ca^{2+} après hypoxie ou ischémie (Stein et Vannucci, 1988; Gordon *et al.*, 1990). Une telle expression généralisée des gènes précoces n'est pas nécessairement délétère pour les neurones dans la mesure où une hypoxie de 3 h entraîne une induction génétique similaire sans affecter les neurones (Bossenmeyer-Pourie *et al.*, 1998, sous presse). De plus, comme l'apoptose induite par l'hypoxie ne semble pas impliquer la toxicité du glutamate à ce stade de maturation (6 jours), l'induction précoce des facteurs de transcription observée après 1 h d'hypoxie pourrait constituer un marqueur

de survie plutôt que de souffrance neuronale. L'hypoxie, à travers l'induction de gènes spécifiques, pourrait promouvoir la ré-entrée dans le cycle cellulaire qui nécessite aussi bien les protéines Fos que Jun (Kovary et Bravo, 1991; Steller, 1995), ceci avant d'activer le processus apoptotique quand l'agression est suffisamment sévère (Bossenmeyer-Pourié *et al.*, 1998, sous presse).

La suractivation prolongée de c-Jun a souvent été associée au phénomène d'apoptose (Dragunow *et al.*, 1993; Estus *et al.*, 1994; Ferrer *et al.*, 1996; Herdegen *et al.*, 1997). A cet égard, nous avons montré après 6 h d'hypoxie puis pendant toute la période de réoxygénation, une augmentation de l'expression de la protéine dans les neurones où les premiers signes d'apoptose commencent à être décelables à partir de 48 h post-réoxygénation. De plus, la suppression de cette expression par stratégie anti-sens ou par l'administration d'anticorps anti-c-Jun permet d'éviter la mort cellulaire programmée des neurones en développement (Estus *et al.*, 1994; Ham *et al.*, 1995).

En revanche, l'expression des autres composantes du complexe AP-1 varie fortement durant l'hypoxie/réoxygénation. Alors que l'expression de Jun B et Jun D décline progressivement après une surexpression transitoire pendant l'agression hypoxique, celle de c-Fos augmente de façon soutenue au cours de l'hypoxie pour être finalement pratiquement identique que dans les témoins à la fin de la période de réoxygénation. De telles altérations spécifiques pourraient être d'un intérêt considérable puisque divers travaux suggèrent que cette activation des facteurs de transcription influencerait les réponses neuronales et donc le devenir des neurones (Hope *et al.*, 1994; Kasof *et al.*, 1995; Kaminska *et al.*, 1996).

L'orientation des cellules vers la survie ou l'apoptose serait régie par les différentes combinaisons protéiques qui peuvent être sous forme d'homo- ou d'hétérodimères. Les propriétés de liaison à l'ADN, la demi-vie des dimères et le contrôle de la transcription sont ainsi d'un grand intérêt. Par exemple, c-Jun est capable d'interagir avec la protéine CREB et se fixer ainsi au site CRE. En présence de Fos, c-Jun a une spécificité préférentielle pour le site AP-1 et l'association Fos-Jun B, contrairement aux

autres combinaisons, aurait un rôle d'inhibiteur de la transcription. De même, Fra-1 peut causer la répression de la transcription médiée par SRE (Rauscher *et al.*, 1988; Chiu *et al.*, 1988; Sonnenberg *et al.*, 1989; Schutte *et al.*, 1989; Morgan et Curran, 1991). En conséquence, les réponses cellulaires, qu'elles soient immédiates ou retardées, peuvent être interprétées comme des processus de relations directes et indirectes entre des facteurs de transcription variés.

La **figure 40** illustre les interactions possibles entre les différentes protéines de la famille AP-1 qui participeraient à la mort neuronale par apoptose à l'issue des 96 h de réoxygénation.

B. IMPLICATION DE JNK1 ET JNK3 DANS LA MORT NEURONALE D'ORIGINE HYPOXIQUE

Les modifications post-traductionnelles sont d'une grande importance quant au devenir des cellules en réponse à un stimulus environnemental. Aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, les kinases JNK dont l'activité est régulée par différents stress, pourraient contribuer à l'induction de l'apoptose neuronale en phosphorylant la protéine c-Jun (Chen *et al.*, 1996a,b; Virdee *et al.*, 1997). Dans notre modèle, l'expression de JNK1 est réduite durant l'hypoxie. Elle augmente sensiblement au moment de l'apparition des premiers signes d'apoptose et de l'induction de JNK3 (48 h). L'hypoxie entraîne donc une activation retardée des deux JNK étudiées. Associée à la surexpression de c-Jun, cette activation précède la mort neuronale apoptotique dans ce modèle. Cette association a été démontrée dans de nombreux systèmes mais la participation de JNK dans l'apoptose reste controversée à l'heure actuelle. Alors que certaines études ont montré l'implication de la cascade des JNK dans l'apoptose, suggérant que l'activation des SAPK/JNK est nécessaire au processus apoptotique (Xia *et al.*, 1995; Verheij *et al.*, 1996), d'autres ont postulé que l'activation de JNK n'est pas nécessaire (Lenczowski *et al.*, 1996; Virdee *et al.*, 1997) ou encore insuffisante (Park *et al.*, 1996; Virdee *et al.*, 1997). Par ailleurs, une étude récente souligne le rôle potentiel de JNK3, qui est sélectivement exprimée dans le système nerveux central, dans la réponse cérébrale au stress. En effet, la déficience du

Membres de la famille AP-1

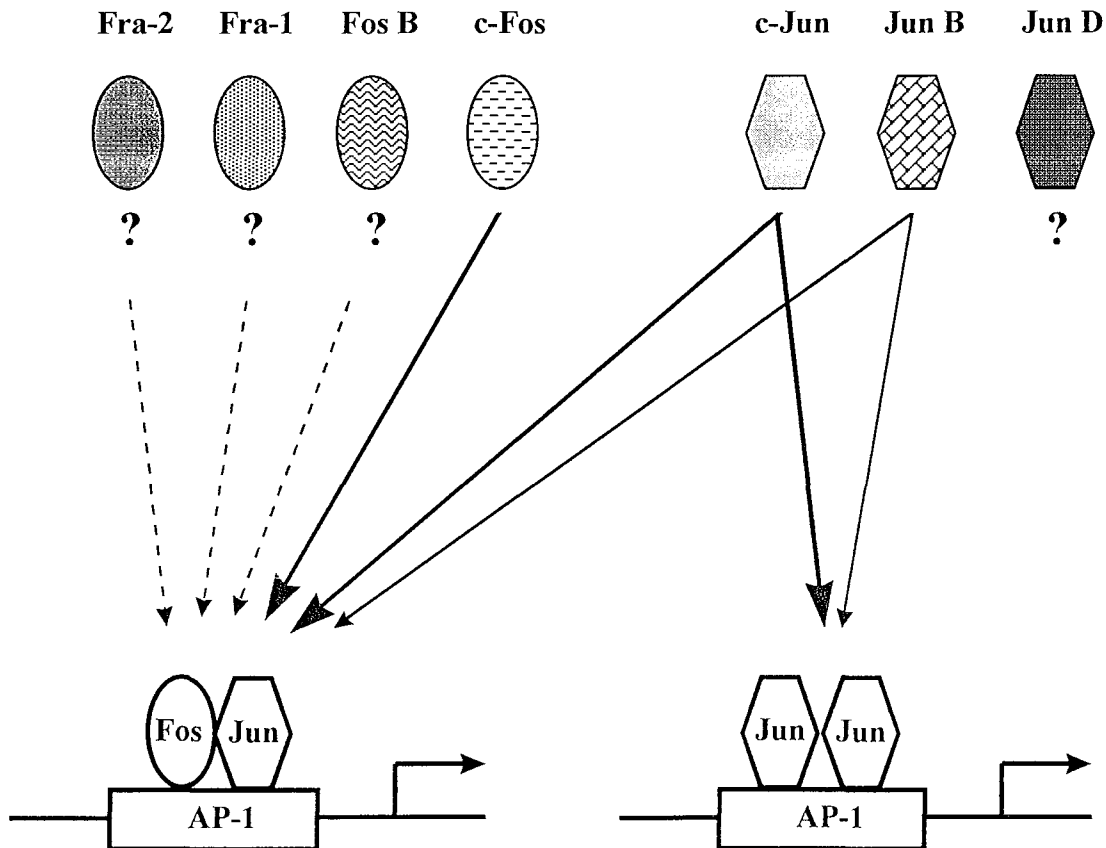


Figure 40 : Interactions possibles entre protéines des familles Fos et Jun intervenant potentiellement dans la composition du facteur de transcription AP-1 à la fin de l'épisode d'hypoxie-réoxygénation.

D'après nos résultats, la mort neuronale d'origine hypoxique pourrait être médiée par des dimères c-Jun-c-Jun et c-Fos-c-Jun et, peut-être dans une moindre mesure, associant la protéine Jun B. Jun D ne semble pas ou peu impliquée dans ce mécanisme. En revanche, la participation des Fras et Fos B nécessite d'être étudiée par leur analyse individuelle.

gène JNK3 entraîne la résistance des neurones de l'hippocampe vis-à-vis de l'apoptose (Yang *et al.*, 1997). De plus, la translocation nucléaire de JNK3 est spécifiquement observée dans les neurones cérébraux sensibles des patients humains présentant des désordres hypoxiques, suggérant que JNK3 peut représenter une voie de signalisation critique dans l'agression induite par l'hypoxie (Zhang *et al.*, 1998).

En outre, la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique p53 par JNK1, JNK2 et JNK3 jouerait un rôle important dans la transduction du signal vers le noyau en réponse aux stimuli environnementaux (Hu *et al.* 1997). Ainsi, les activités de p53 et c-Jun seraient modulées par les JNK en réponse à un signal apoptotique.

En conclusion, des altérations dynamiques des différentes composantes du facteur AP-1, en association avec l'activation retardée de JNK1 et de JNK3, sont induites par l'hypoxie et pourraient contribuer à la mort des neurones par apoptose. Ces données supportent l'idée que l'activation retardée des JNK, spécialement JNK3, peut participer aux dommages neuronaux consécutifs à l'hypoxie transitoire dans le cerveau en développement.

C. EXPRESSION DES PROTEINES DE LA FAMILLE MYC

L'analyse immunohistochimique des protéines de la famille Myc ne montre pas de variation notable de c-Myc au cours de l'épisode d'hypoxie/réoxygénation, sauf à 96 h post-réoxygénation où l'inhibition est évidente. Ceci suggère que c-Myc ne jouerait pas un rôle déterminant dans les dernières étapes conduisant à la dégénérescence neuronale. Toutefois, son expression est inhibée au cours de l'hypoxie ce qui suggère que pendant l'agression, les dimères Max-Mad prédomineraient. Ces derniers auraient plutôt un rôle d'inhibiteurs de la transcription médiée par Myc-Max.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Rosenbaum *et al.* (1994) qui ont montré que l'antisens de c-myc n'a pas d'effet sur l'apoptose induite par l'hypoxie dans les cultures de ganglions cervicaux supérieurs de rats nouveau-nés, ce qui laisse penser que le

gène c-myc n'interviendrait pas dans la cascade entraînant la mort cellulaire. Cependant, c-myc est généralement considéré comme un gène pro-apoptotique dans des types cellulaires tels que les fibroblastes ou les lignées lymphoïdes (Heikkila *et al.*, 1987; Shi *et al.*, 1992; Fanidi *et al.*, 1992) et les études de l'implication de c-myc dans la mort neuronale d'origine hypoxique sont rares.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Un des objectifs de notre travail consistait à étudier l'influence de l'état maturationnel des neurones en culture sur les réponses cellulaires induites à court et à moyen terme par une agression hypoxique. Nos résultats ont montré que les neurones "immatures" (6 jours *in vitro*) sont sensibles à l'hypoxie et que cette sensibilité se traduit par une mort neuronale de type apoptotique. En revanche, les cultures de neurones "plus matures" (13 jours *in vitro*) présentent une sensibilité différente à l'hypoxie transitoire dont les conséquences impliqueraient à la fois l'apoptose et la nécrose (**figures 38 et 39**).

De plus, nous avons montré que les neurones "immatures" sont résistants à la toxicité du glutamate et d'agonistes sélectifs de ses récepteurs (NMDA, AMPA/kainate et *trans*-ACPD), bien que dans nos conditions expérimentales, les neurones expriment des récepteurs glutamatergiques fonctionnels. La résistance des neurones immatures à l'excitotoxicité serait en partie due à leur incapacité à développer un processus permettant l'inactivation de la protéine kinase C, événement qui semble nécessaire à la médiation de l'excitotoxicité (**figure 38**).

A l'inverse des neurones "immatures", les neurones "plus matures" apparaissent sensibles au glutamate et à ses analogues. Cette sensibilité se traduit essentiellement par un processus nécrotique. Aussi, les effets du glutamate ne correspondent pas à ceux de l'hypoxie à ce même stade de maturation (13 jours) puisqu'une hypoxie transitoire induit aussi bien l'apoptose que la nécrose et que les modifications fonctionnelles étudiées suite aux deux agressions sont différentes (**figure 39**).

Dans nos conditions expérimentales, il semblerait qu'il n'y ait pas de régulation génétique associée au processus excitotoxique dans les cultures de neurones primaires et que la composante génétique soit impliquée plutôt dans la réponse à l'hypoxie. Toutefois, l'hypoxie dans les cultures "matures" utiliserait un mécanisme excitotoxique médié aussi bien par les récepteurs NMDA que non-NMDA, l'action des antagonistes MK-801 et NBQX protégeant les neurones de la souffrance cellulaire.

En résumé, ces résultats suggèrent que l'excitotoxicité du glutamate n'aurait pas un rôle majeur dans les dommages hypoxiques décelés dans les neurones encore immatures et soulignent l'importance du degré de maturation des cellules nerveuses en culture dans leur sensibilité aux agressions.

La perturbation de la biosynthèse neuronale des ARN et des protéines avec des variations multiphasiques caractéristiques et le développement d'une mort neuronale par apoptose des cultures de 6 jours soulignent la participation d'une composante génétique dans un épisode hypoxique. L'étude de l'expression du facteur de transcription AP-1, par sa capacité à se fixer à son site de liaison au niveau de l'ADN, révèle sa présence dans notre modèle. Une approche "supershift" devrait nous permettre d'établir exactement les modifications dynamiques de sa composition, susceptibles de jouer un rôle non négligeable dans les conséquences de l'agression hypoxique. Néanmoins, nous avons pu étudier l'expression des protéines du facteur AP-1 individuellement par immunohistochimie et par western blot. L'augmentation persistante de l'expression de la protéine c-Jun durant toute la période d'hypoxie puis au cours de la réoxygénation fait apparaître clairement que cette protéine jouerait un rôle essentiel dans la mort neuronale retardée observée dans le modèle. Parallèlement, l'augmentation de l'expression de p46 JNK1 et surtout l'induction transitoire de p54 JNK3 au moment de l'apparition des premiers signes d'apoptose constituent probablement un des événements clés du mécanisme de dégénérescence d'origine hypoxique. En outre, il semblerait que le proto-oncogène c-myc ne serait pas impliqué dans ce mécanisme bien que la protéine Max pourrait se dimériser avec Myc ou Mad1 dans ce modèle d'hypoxie/réoxygénation.

La voie de transduction des signaux de la membrane plasmique vers les facteurs de transcription au niveau du noyau n'est pas complètement établie. En ce sens et pour compléter cette étude, il est envisageable d'étudier l'implication éventuelle des autres voies associées aux MAPK, à savoir ERK et p38 et d'analyser ainsi leur possible contribution à l'apoptose induite par une hypoxie. L'identification des signaux

responsables est cruciale dans la mesure où ils définissent les cibles génomiques responsables de la survie ou de la mort neuronale.

Par ailleurs, l'implication des radicaux libres dans de nombreuses pathologies est maintenant acceptée (Cohen, 1988; Balazs et Leon, 1994) et les caractéristiques du cerveau en font une cible privilégiée de l'attaque radicalaire au cours d'un stress oxydatif. Le cerveau est ainsi particulièrement exposé à la production de radicaux dérivés de l'oxygène dont les conséquences délétères connues impliquent des modifications de structure. L'implication de la production d'entités réactives a pu être mise en évidence dans l'ischémie cérébrale ainsi que dans les dommages neuronaux d'origine épileptique.

Afin d'établir un modèle pathologique cohérent qui nous permettra à terme de proposer des stratégies thérapeutiques, des travaux complémentaires pourront s'articuler autour des entités réactives dérivées de l'oxygène qui s'accumulent durant l'hypoxie et au cours de la réoxygénation dans notre modèle (Oillet *et al.*, 1996). Dans ce sens, il a été rapporté qu'une réoxygénation progressive a des effets protecteurs par rapport à une réoxygénation rapide (Sher et Hu, 1992), confirmant le rôle que pourraient jouer les radicaux libres dans la mort neuronale d'origine hypoxique. De plus, l'inactivation d'enzymes protectrices vis-à-vis des radicaux libres par l'iodoacétate entraîne une mort neuronale retardée indépendamment de la voie excitotoxique (Uto *et al.*, 1995). Il s'agira d'étudier le système de défense développé par les neurones au cours de l'hypoxie/réoxygénation en analysant l'expression des enzymes tels que la superoxyde dismutase et la catalase, ainsi que la production intracellulaire de l'oxide nitrique (NO). L'étude du potentiel délétère du NO au cours de l'hypoxie/réoxygénation serait d'un grand intérêt vu l'importance de l'activité de la NO synthase et de la production du NO dans la mort neuronale d'origine hypoxique-ischémique (Verrecchia *et al.*, 1994; Mésenge *et al.*, 1996; Grandati *et al.*, 1997) ou non (Estévez *et al.*, 1998).

L'étude du facteur de transcription NFκB pourrait également aider à la compréhension des mécanismes de dégénérescence neuronale suite à une privation en oxygène. L'activation du facteur NFκB implique la phosphorylation et la dégradation de

son partenaire I κ B dans le cytoplasme permettant la translocation de NF κ B vers le noyau pour se lier à son motif d'ADN (Baeuerle et Baltimore, 1996). Alors que l'implication des modifications d'expression de NF κ B dans les désordres neurologiques a été suggérée, le rôle direct de l'activation de ce facteur est moins établi (Kaltschmidt *et al.*, 1993). La régulation de gènes pro-apoptotiques par NF κ B semble être un événement de la mort neuronale retardée, mais il a été rapporté que NF κ B serait un facteur de survie neuronale (Tagliabatella *et al.*, 1997). Enfin, l'activité de NF κ B, comme celle d'AP-1, suggère l'importance de l'homéostasie oxydative dans le système nerveux en coordonnant l'expression génétique impliquée dans les mécanismes de mort neuronale activés par le stress oxydatif. Par ailleurs, il est évident que le calcium joue un rôle prépondérant dans la cascade apoptotique, mais certains travaux incriminent aussi l'AMPc dans la régulation de la réponse neuronale (Reh fuss *et al.* 1991; Vaccarino *et al.* 1993; Firth *et al.* 1995). L'analyse des effets de l'hypoxie sur la production d'AMPc est à envisager en corrélation avec l'expression des facteurs CREB/ATF.

Une étude réalisée au laboratoire (Bossenmeyer-Pourrié *et al.* 1998, sous presse) a montré que les neurones s'engagent dans un processus de mort neuronale ou de neurogenèse selon la durée de l'épisode hypoxique. Alors dans les deux conditions d'hypoxie (3 h et 6 h), nous envisageons de réaliser les objectifs décrits ci-dessus.

En conclusion, en dehors de l'analyse par western blot des protéines de la famille Myc qui viendrait compléter nos résultats, les principales perspectives qui se dégagent de ce travail consisteraient à prolonger l'étude du facteur de transcription AP-1, par la recherche des modifications dynamiques de sa composition qui se produisent au cours de l'épisode d'hypoxie/réoxygénation par la technique de supershift. Cette recherche pourrait également être réalisée dans les cultures de neurones de 13 jours qui présentent une réponse différente de celle des neurones de 6 jours après hypoxie. L'activation du facteur NF κ B associée à l'étude des mécanismes de défense enzymatique au cours de l'hypoxie et surtout pendant la réoxygénation pourront également être appréhendées et il serait intéressant d'envisager une étude de la participation des différentes voies des MAPK dans la réponse du cerveau en développement à l'hypoxie.

D'un autre côté, plusieurs travaux soulignent l'importance des cellules gliales dans les dommages neuronaux (Beilharz *et al.*, 1995; Tamatani *et al.*, 1998). Aussi, serait-il intéressant d'étudier leur rôle sur les trois versants: stress oxydant, apoptose et excitotoxicité en s'intéressant particulièrement à l'oxide nitrique, le peroxyde d'hydrogène et certaines cytokines pouvant être libérées par ces cellules (Giulian *et al.*, 1990, 1993; Lees, 1993; Tamatani *et al.*, 1998).

ANNEXE

Publications relatives au travail présenté:

Chihab R., Bossenmeyer C., Oillet J., and Daval J.L. Lack of correlation between the effects of transient exposure to glutamate and those of hypoxia/reoxygenation in immature neurons in vitro. *J. Neurochem.* (1998) **71**: 1177-1186

Chihab R., Oillet J., Bossenmeyer C., and Daval J.L. Glutamate triggers cell death specifically in mature central neurons through a necrotic process. *Mol. Genet. Metab.* (1998) **63**:142-147.

Chihab R., Ferry C., Koziel V., Monin P., and Daval J.L. Sequential activation of AP-1-related transcription factors and JNK protein kinases may contribute to apoptotic death induced by transient hypoxia in developing brain neurons. *Mol. Brain Res.* (1998). **Sous presse.**

Bossenmeyer C., **Chihab R.**, Muller S., Schroeder H., and Daval J.L. Hypoxia/Reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in cultured rat brain neurons. *Brain Res.* (1998) **787**:107-116.

Bossenmeyer-Pourié C., **Chihab R.**, Schroeder H., and Daval J.L. Transient hypoxia may lead to neuronal proliferation in the developing mammalian brain : from apoptosis to cell cycle completion. *Neuroscience* (1998). **Sous presse.**

BIBLIOGRAPHIE

Abate C., Luk D., Gentz R., Rauscher F.J., Curran T. Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1990) **87** : 1032-1036.

Abe K., Tanzi R.E., Kogure K. Induction of hsp70 mRNA after transient ischemia in gerbil brain. *Neurosci. Lett.* (1991) **125** : 166-168.

Adler V., Schaffer A., Kim J., Dolan L., Ronai Z. UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways. *J. Biol. Chem.* (1995) **270** (44): 26071-26077.

Agoff S.N., Hou J., Linzer D.I.H., Wu B. Regulation of the human hsp70 promoter by p53. *Science* (1993) **259** : 84-86.

Agoston D.V., Palkovits C.G., Fitzgerald S.F., Brenneman D.E. Developmental changes in the inducibility of *fos*-like immunoreactivity in primary embryonic spinal cord cultures. *Dev. Brain Res.* (1995) **89** : 173-186.

Aitken P.G., Balestrino M., Somjen G.G. NMDA antagonists: lack of protective effect against hypoxic damage in CA1 region of hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* (1988) **89**: 187-192.

Aizenman Y., Weichsel M.E.J., De Vellis J. Changes in insulin and transferrin requirements of pure brain neuronal cultures during embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) **83** : 2263-2266.

Alicke B. and Schwartz-Bloom R.D. Rapid down-regulation of GABA-A receptors in the gerbil hippocampus following transient cerebral ischemia. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 2808-2811.

Alling C. Biochemical maturation of the brain and the concept of vulnerable periods. *Alcohol and the developing brain*, Rydberg U. *et al.* Editors, Raven Press, New York, (1985) pp. 5-10.

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

Altman F.P. Tetrazolium salts and formazans. *Prog. Histochem. Cytochem.* (1976) **9**: 1-56.

Amador E., Dorfman L.E., Wacker W.E.C. Serum lactic dehydrogenase : an analytical assesment of current assays. *Clin. Chem.* (1963) **9**: 391-398.

Ameisen, J.C. Le suicide des cellules. *Pour la science.* (1996) **224**: 52-59.

An G., Lin T.N., Liu J.S., Xue J.J., He Y.Y., Hsu C.Y. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann. Neurol.* (1993) **33** : 457-464.

Anderson A.J., Pike C.J., Cotman C.W. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by β -amyloid (A β): Association of c-Jun with A β -induced apoptosis. *J. Neurochem.* (1995) **65** : 1487-1498.

Angel P., Hattori R., Smeal T., Karin M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* (1988) **55** : 875-885.

Aoki M., Abe K., Yoshida T., Hattori A., Kogure K., Itoyama Y. Early immunohistochemical changes of microtubule based motor proteins in gerbil hippocampus after transient ischemia. *Brain Res.* (1995) **669** : 189-196.

Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. Apoptosis: The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* (1990) **136** : 593-596.

Ascher P. and Nowak L. Calcium permeability of the channels activated by N-methyl-D-aspartate (NMDA) in isolated mouse central neurons. *J. Physiol.* (1986) **377** 35

Ascher P. and Nowak L. Electrophysiological studies of NMDA receptors. *Trends Neurosci.* (1987) **10** : 284-288.

Askew D.S., Ashmun R.A., Simmons B.C., Cleveland J.L. Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene* (1991) **6** : 1915-1922.

Ausserer W.A., Bourrat-Floek B., Green C.J., Laderoute K.R., Sutherland R.M. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol. Cell. Biol.* (1994) **14** (8): 5032-5042.

Ayer D.E. and Eisenman R.N. A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. *Genes Dev.* (1993) **7**: 2110-2119.

Ayer D.E., Kretzner L., Eisenman R.N. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. *Cell* (1993) **72**: 211-222.

Bading H., Ginty D.D., Greenberg M.E. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signaling pathways. *Science* (1993) **260**: 181-185.

Baeuerle P.A. and Baltimore D. NF- κ B: ten years after. *Cell* (1996) **87**: 13-20.

Balazs L. and Leon M. Evidence of an oxidative challenge in the Alzheimer's brain. *Neurochem. Res.* (1994) **19**: 1131-1137.

- Barber J.R. and Verma I.M.** Modifications of fos proteins: Phosphorylation of c-fos, but not v-fos, is stimulated by 12-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and serum. *Mol. Cell. Biol.* (1987) 7 : 2201-2211.
- Barron S., Serratosa J., Tusell J.M.** Regulation of c-fos expression by convulsants and hexachlorocyclohexane isomers in primary cultures of cortical neurons. *J. Neurochem.* (1995) 64 : 1708-1714.
- Barron S., Tusell J.M., Sola C., Serratosa J.** Convulsant agents activate c-fos induction in both a calmodulin-dependent and calmodulin-independent manner. *J. Neurochem.* (1995) 65 : 1731-1739.
- Bartel D., Sheng M., Lau L.F., Greenberg M.E.** Growth factors and membrane depolarization activate distinct programs of early response gene expression: dissociation of fos and jun induction. *Genes Dev.* (1989) 3 : 304-313.
- Beal M.F.** Role of excitotoxicity in human neurological disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* (1992) 2 : 657-662.
- Beilharz E.J., Williams C., Dragunow M., Sirimanne E., Gluckman P.D.** Mechanisms of delayed cell death following hypoxic-ischemic injury in the immature rat: evidence for apoptosis during selective neuronal loss. *Mol. Brain Res.* (1995) 29 : 1-14.
- Benbrook D. and Jones N.** Heterodimer formation between CREB and Jun proteins. *Oncogene* (1990) 6 : 317-325.
- Bendinelli P., Piccoletti R., Maroni P., Bernelli-Zazzera A.** The MAP kinase cascades are activated during post-ischemic liver reperfusion. *FEBS Lett.* (1996) 398 : 193-197.
- Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer N.H.** Elevation of the extracellular concentrations of glutamate in rat hippocampus during transient cerebral ischaemia monitored by intracerebral microdialysis. *J. Neurochem.* (1984) 43 : 1369-1374.
- Bickler P.E., Gallego S.M., Hansen B.M.** Developmental changes in intracellular calcium regulation in rat cerebral cortex during hypoxia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1993) 13 : 811-819.
- Bishop J.M.** Viral oncogenes. *Cell* (1985) 42 : 23-38.
- Black M.A., Tremblay R., Mealing G., Ray R., Durkin J.P., Whitfield J.F., Morley P.** N-methyl-D-aspartate- or glutamate-mediated toxicity in cultured rat cortical neurons is antagonised by FPL 15896AR. *J. Neurochem.* (1995) 65 : 2170-2177.
- Blackwood E.M., Kretzner L., Eisenman R.N.** Myc and Max function as a nucleoprotein complex. *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1996)

Blanton M.G. and Kriegstein A.R. Spontaneous action potential activity and synaptic currents in the embryonic turtle cerebral cortex. *J. Neurosci.* (1991) **11** : 3907-3923.

Blumenfeld K.S., Welsh F.A., Harris V.A., Pesenson M.A. Regional expression of c-fos and heat shock protein-70 mRNA following hypoxia-ischemia in immature rat brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1992) **12** : 987-995.

Boespflug O. and Swaiman K.F. Neurotransmitter changes during development of cortical neuronal cultures. *Dev. Neurosci.* (1986) **8** : 102-110.

Bonavista V. Molecular evolution of lactate dehydrogenase in the developing neurons tissue. *Prog. Brain Res.* (1964) **4** : 254-272.

Bonfoco E., Krainic D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1995) **92** : 7162-7166.

Borg J., Spitz B., Hamel G., Mark J. Selective culture of neurons from rat cerebral cortex: morphological characterization, glutamate uptake and related enzymes during maturation in various culture media. *Dev. Brain Res.* (1985) **18** : 37-49.

Bossenmeyer C., Chihab R., Muller S., Schroeder H., Daval J.L. Hypoxia/Reoxygenation induces apoptosis through biphasic induction of protein synthesis in cultured rat brain neurons. *Brain Res.* (1998) **787**: 107-116.

Bossenmeyer-Pourié C., Chihab R., Schroeder H., Daval J.L. Transient hypoxia may lead to neuronal proliferation in the developing mammalian brain: from apoptosis to cell cycle completion. *Neuroscience* (1998). *Sous presse.*

Bottenstein J.E. Growth and differentiation of neural cells in defined media. *Cell culture in the neurosciences.* Bottenstein JE, Sato G, editors. New York, Plenum Press (1985) **1**: pp. 3-43.

Bottenstein J.F. and Sato G. Growth of a neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1979) **76** : 514-517.

Bravo R., Burckhardt J., Curran T., Müller R. Stimulation and inhibition of growth by EGF in different A431 cell clones is accompanied by the rapid induction of c-fos and c-myc proto-oncogenes. *EMBO J.* (1985) **4** : 1193-1197.

Bright J. and Khar A. Apoptosis: Programmed cell death in health and disease. *Biosci. Reports* (1994) **14** (2): 67-81.

Brugg B., Michel P.P., Agid Y., Ruberg M. Ceramide induces apoptosis in cultured mesencephalic neurons. *J. Neurochem.* (1996) **66**: 733-739.

Buchan A.M. Do NMDA antagonists protect against cerebral ischaemia: are clinical trials warranted? *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* (1990) **2** : 1-26.

Buchan A.M., Xue D., Huang Z.G., Smith K.H., Lesiuk H. Delayed AMPA receptor blockade reduces cerebral infarction induced by focal ischemia. *NeuroReport* (1991) **2** : 473-476.

Burgard E.C. and Hablitz J.J. Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* (1993) **69** (1): 230-240.

Butcher S., Bullock R., Graham D.I., McCulloch J. Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke* (1990) **21** : 1727-1733.

Buttayan R., Zakeri Z., Lockshin R., Wolgemuth D. Cascade induction of c-fos, c-myc and heat shock 70 K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol. Endocrinol.* (1988) **2** : 650-657.

Campochiaro P. and Coyle J.T. Ontogenetic development of kainate neurotoxicity: correlates with glutamatergic innervation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1978) **75** (4): 2025-2029.

Cano E., Hazzalin C.A., Kardalidou E., Buckle R.S., Mahadevan L.C. Neither ERK nor JNK/SAPK MAP kinase subtypes are essential for histone H3/HMG-14 phosphorylation or c-fos and c-jun induction. *J. Cell. Sci.* (1995) **108** (11): 3599-3609.

Cardell M., Bingren H., Wieloch T., Zivin J., Saitoh T. Protein kinase C is translocated to cell membranes during cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* (1990) **119** : 228-232.

Cardell M. et Wieloch T. Time course of the translocation and inhibition of protein kinase C during complete cerebral ischemia in the rat. *J. Neurochem.* (1993) **61**: 1308-1314.

Carmignoto G. and Vicini S. Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science* (1992) **258** : 1007-1011.

Carter C.J., Rivy J.P., Scatton B. Ifenprodil and SL820715 are antagonists at the polyamine site of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* (1989) **146** : 611-612.

Caubert J. c-fos proto-oncogene expression in the nervous system during mouse development. *Mol. Cell. Biol.* (1989) **9** : 2269-2272.

Cestelli A., Savattieri G., Salemi G., Di Liegro I. Neuronal cell cultures: a tool for investigations in developmental neurobiology. *Neurochem. Res.* (1992) 17 : 1163-1180.

Chakravarthy B.R., Wong J., Durkin J.P. Evidence that the modulation of membrane-associated protein kinase C activity by an endogenous inhibitor plays a role in N1E-115 murine neuroblastoma cell differentiation. *J. Neurochem.* (1995) 65: 1569-1579.

Chariaut-Marlangue C., Pollard H., Kadri-Hassani N., Khrestchatisky M., Moreau J., Dessi F., Kang K.I., Ben-Ari Y. Increase in specific proteins and mRNAs following transient anoxia-aglycaemia in rat CA1 hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.* (1992) 4: 766-776.

Chen J., Willingham T., Margraf L.R., Schreiber Agus N., DePinho R.A., Nisen P.D. Effects of the MYC oncogene antagonist, MAD, on proliferation, cell cycling and the malignant phenotype of human brain tumour cells. *Nature Med.* (1995) 1 (7): 638-643.

Chen J., Zhu R.L., Nakayama M., Kawaguchi K., Jin K., Stetler R.A., Simon R.P., Graham S.H. Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J. Neurochem.* (1996) 67: 64-71.

Chen Y.R., Meyer C.F., Tan T.H. Persistent activation of c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* (1996a) 271 (2): 631-634.

Chen Y.R., Wang X., Templeton D., Davis R.J., Tan T.H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J. Biol. Chem.* (1996b) 271 (50): 31929-31936.

Chin L., Schreiber-Agus N., Pellicer I., Chen K., Lee H.W., Dudast M., Cordon-Cardo C., DePinho R.A. Contrasting roles for Myc and Mad proteins in cellular growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1995) 92: 8488-8492.

Chiu R., Boyle W., Meek J., Smeal T., Hunter T., Karin Y. The c-fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1-responsive genes. *Cell* (1988) 54: 541-552.

Choi D.W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* (1987) 7(2): 369-379.

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

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

Choi D.W., Maulucci-Gedde M., Kriegstein A.R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* (1987) 7 (2): 357-368.

Choi D.W. and Rothman S.M. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* (1990) 13: 171-182.

Christine C.W. and Choi D.W. Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J. Neurosci.* (1990) 10: 108-116.

Cohen D.R. and Curran T. fra-1: A serum inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8: 2063-2069.

Cohen D.R., Ferreira P.C.P., Gantz R., Franza B.R.J., Curran T. The product of a Fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev.* (1989) 3: 173-184.

Cohen G. Oxygen radicals and Parkinson's disease. *Oxygen radicals and tissue injury.* Haliwell B, editors. (1988) pp. 130-135.

Cole M.D. The myc oncogene: its role in transformation and differentiation. *Annu. Rev. Genet.* (1986) 20: 361-384.

Collingridge G.L. and Lester R.A.J. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* (1989) 40 (2): 143-210.

Comb M.C., Birnberg N.C., Seasholtz A., Herbert E., Goodman H.M. A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element. *Nature* (1986) 323: 353-356.

Combs D.J., Dempsey R.J., Donaldson D., Kindy M.S. Hyperglycemia suppresses *c-fos* messenger RNA expression following transient cerebral ischemia in gerbils. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1992) 12: 169-172.

Condorelli D.F., Dell'Albani P., Amico C., Kaczmarek L., Nicoletti F., Lukasiuk K., Stella A.M.G. Induction of primary response genes by excitatory amino acid receptor agonists in primary astroglial cultures. *J. Neurochem.* (1993) 60: 877-885.

Condorelli D.F., Dell'Albani P., Amico C., Lukasiuk K., Kaczmarek L., Giuffrida-Stella A.M. Glutamate receptor-driven activation of transcription factors in primary neuronal cultures. *Neurochem. Res.* (1994) 19: 489-499.

Condorelli D.F., Kaczmarek L., Nicoletti F., Arcidiacono A., Dell'Albani P., Ingrao F., Magri G., Malaguarnera L., Avola R., Messina A., Giuffrida Stella A.M. Induction of proto-oncogene *fos* by extracellular signals in primary glial cell cultures. *J. Neurosci. Res.* (1989) 23: 234-239.

Connors B.W., Benardo L.S., Prince D.A. Coupling between neurons of the developing rat neocortex. *J. Neurosci.* (1983) **3**: 773-782.

Cox J.A., Lysko P.G., Henneberry R.C. Excitatory amino acid neurotoxicity at the NMDA receptor in cultured neurons: role of the voltage dependent magnesium block. *Brain Res.* (1989) **499**: 267-272.

Coyle J.T. Biochemical aspects of neurotransmission in the developing brain. *Int. Rev. Neurobiol.* (1977) **20**: 65-103.

Crumrine R.C., Dubyak G., LaManna J.C. Decreased protein kinase C activity during cerebral ischemia and after reperfusion in the adult rat. *J. Neurochem.* (1990) **55**: 2001-2007.

Crumrine R.C., Thomas A.L., Morgan P.F. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1994) **14**: 887-891.

Cummings M. Increased c-fos expression associated with hyperthermia-induced apoptosis of a Burkitt lymphoma cell line. *Int. J. Radiat. Biol.* (1995) **68**: 687-692.

Curran T. The fos oncogene. *The oncogene handbook*. Reddy E, Skalka A, Curran T, editors. Elsevier Science Biomedical Division (1988) **16**: pp. 307-325.

Curran T. Nobel oncogenes. *New Biologist* (1989) **1**: 229-231.

Curran T., Gordon M.B., Rubino K.L., Sambucetti L.C. Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* (1987) **2**: 79-84.

Curran T., MacConnell W.P., Van Straaten F., Verma I.M. Structure of the FBJ murine osteosarcoma virus genome. Molecular cloning of its associated helper virus and the cellular homolog of the v-fos gene from mouse and human cells. *Mol. Cell. Biol.* (1983) **3**: 914-921.

Curran T. and Morgan J.I. Barium modulates c-fos expression and post-translational modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) **83**: 8521-8524.

Curran T. and Morgan J.I. Memories of fos. *BioEssays* (1987) **7**: 255-258.

Curran T. and Teich N.M. Candidate product of the FBJ murine osteosarcoma virus oncogene. Characterization of a 55,000 dalton phosphoprotein. *J. Virol.* (1982) **42**: 114-122.

Curran T., Van Beveren C., Ling N., Verma I.M. Viral and cellular fos proteins are complexed with a 39,000 dalton cellular protein. *Mol. Cell. Biol.* (1985) **5**: 167-172.

Curran T. and Verma I. The FBR murine osteosarcoma virus. I. Molecular analysis and characterization of a 75,000 gag-fos fusion product. *Virology* (1984) **135**: 218-228.

D'Allest A.M. and André M. Maturation et souffrance neurologique néonatale. *Neurophysiol. Clin.* (1992) **22**: 159-177.

Dang C.V. c-myc oncoprotein function. *Biochim. Biophys. Acta.* (1991) **1072**: 103-113.

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

Daval J.L., Nehlig A., Nicolas F. Physiological and pharmacological properties of adenosine: therapeutic implications. *Life Sci.* (1991) **49**: 1435-1453.

Daval J.L. and Nicolas F. Opposite effects of cyclohexyladenosine and theophylline on hypoxic damage in cultured neurons. *Neurosci. Lett.* (1994) **175**: 114-116.

Daval J.L., Pereira de Vasconcelos A., Lartaud I. Morphological and neurochemical effects of diazepam and phenobarbital on selective culture of neurons from fetal rat brain. *J. Neurochem.* (1988) **50**: 665-672.

Davies J., Evans R.H., Herrling P.L., Jones A.W., Olverman H.J. CPP, a new potent and selective NMDA antagonist. Depression of central neuron responses, affinity for D-³H]AP5 binding sites on brain membranes and anticonvulsant activity. *Brain Res.* (1986) **382**: 169-173.

Davis P.K., Dudek S.M., Johnson G.V.W. Select alterations in protein kinases and phosphatases during apoptosis of differentiated PC12 cells. *J. Neurochem.* (1997) **68**: 2338-2347.

Delbarre G., Delbarre B., Barrau Y. A suitable method to select gerbils with incomplete circle of Willis. *Stroke.* (1988) **19(1)**: 126

Deshpande J., Bergstedt K., Linden T., Kalimo H., Wieloch T. Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia- evidence against programmed cell death. *Exp. Brain Res.* (1992) **88**: 91-105.

Dessi F., Ben-Ari Y., Chariout-Marlangue C. Riluzole prevents anoxic injury in cultured cerebellar granule neurones. *Eur. J. Pharmacol.* (1993) **250**: 325-328.

Dessi F., Chariout-Marlangue C., Ben-Ari Y. Anisomycin and cycloheximide protect cerebellar neurons in culture. *Brain Res.* (1992) **581**: 323-326.

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

Dérillard B., Hibi M., Wu I.H., Barrett T., Su B., Deng T., Karin M., Davis R.J. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* (1994) 76: 1025-1037.

Dickson D.W. Apoptosis in the brain: Physiology and Pathology. *Am. J. Pathol.* (1995) 146: 1040-1044.

Didier M., Roux P., Piechaczyk M., Verrier B., Bockaert J., Pin J.P. Cerebellar granule cell survival and maturation induced by K⁺ and NMDA correlate with *c-fos* proto-oncogene expression. *Neurosci. Lett.* (1989) 107: 55-62.

Dienel G. Regional accumulation of calcium in post-ischemic brain. *J. Neurochem.* (1984) 43: 913-925.

Dignam J.D., Lebovitz R.M., Roeder R.G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* (1983) 11: 1475-1489.

Dobbing J. and Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum. Dev.* (1979) 3: 79-83.

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

Domanska-Janik K. and Zalewska T. Effect of brain ischemia on protein kinase C. *J. Neurochem.* (1992) 58: 1432-1439.

Doriat J.F., Cortey A., Daval J.L. Selective alterations in binding kinetic parameters and allosteric regulation of *N*-methyl-D-aspartate receptors after prolonged seizures in the developing rat brain. *Pediatr. Res.* (1998) 43: 1-6.

Doucet J.P., Squinto S.P., Bazan N.G. Fos-Jun and the primary genomic response in the nervous system: possible physiological role and pathophysiological significance. *Molecular Neurobiology*. Bazan N, editors. The Humana Press Inc. (1990) pp. 27-55.

Dragunow M., Beilharz E.J., Sirimanne E., Lawlor P., Williams C., Bravo R., Gluckman P. Immediate-early gene protein expression in neurons undergoing delayed death, but not necrosis, following hypoxic-ischaemic injury to the young rat brain. *Mol. Brain Res.* (1994) 25: 19-33.

Dragunow M. and Preston K. The role of inducible transcription factors in apoptotic nerve cell death. *Brain Res. Rev.* (1995) 21: 1-28.

Dragunow M. and Robertson H.A. Brain injury induces c-fos protein(s) in nerve and glial-like cells in adult mammalian brain. *Brain Res.* (1988) 455: 295-299.

- Dragunow M., Young D., Hughes P., MacGibbon G., Lawlor P., Singleton K., Sirimanne E., Beilharz E., Gluckman P.** Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury. *Mol. Brain Res.* (1993) **18(4)**: 347-352.
- Drejer J., Benveniste H., Diemer N.H., Schousboe A.** Cellular origin of ischemia induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *J. Neurochem.* (1985) **45**: 145-151.
- Duffy T.E., Kohle S.J., Vannucci R.C.** Carbohydrate and energy metabolism in perinatal rat brain: relation to survival in anoxia. *J. Neurochem.* (1975) **24**: 271-276.
- Duffy T.E. and Vannucci R.C.** Metabolic aspects of cerebral anoxia in the fetus and newborn. *Brain, Fetal and Infant*, Bernberg S.R. editors, The Hague, Martinus Nijhoff, (1977) pp. 316-323.
- Dulic V., Kaufmann W.K., Wilson S.J., Tlsty T.D., Lees E., Harper J.W., Elledge S.J., Reed S.I.** p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* (1994) **76**: 1013-1023.
- Durkin J.P., Tremblay R., Buchan A., Blosser J., Chakravarthy B., Mealing G., Morley P., Song D.** An early loss in membrane protein kinase C activity precedes the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* (1996) **66**: 951-962.
- Durkin J.P., Tremblay R., Chakravarthy B., Mealing G., Morley P., Small D., Song D.** Evidence that the early loss of membrane protein kinase C is a necessary step in the excitatory amino acid-induced death of primary cortical neurons. *J. Neurochem.* (1997) **68**: 1400-1412.
- Eastman A.** Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* (1993) **121**: 160-164.
- Ebraldize A.K., Rossi D.J., Tonegawa S., Slater N.T.** Modification of NMDA receptor channels and synaptic transmission by targeted disruption of the NR2C gene. *J. Neurosci.* (1996) **16**: 5014-5025.
- Erdö S.L. and Wolff J.R.** Transient increase in ligand binding to quisqualate and kainate sites in cerebral cortex of immature rats. *Neurosci. Lett.* (1989) **104**: 161-166.
- Estévez A.G., Spear N., Manuel S.M., Radi R., Henderson C.E., Barbeito L., Beckman J.S.** Nitric Oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation. *J. Neurosci.* (1998) **18(3)**: 923-931.
- Estus S., Zaks W.J., Freeman R.S., Gruda M., Bravo R., Johnson E.M.** Altered gene expression in neurons during programmed cell death: identification of c-jun as necessary for neuronal apoptosis. *J. Cell. Biol.* (1994) **127**: 1717-1727.

Evan G.I. and Littlewood T.D. The role of c-myc in cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.* (1993) **3**: 44-49.

Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z., Hancock D.C. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* (1992) **69**: 119-128.

Evans R.H., Evans S.J., Pook P.C., Sunter D.C. A comparison of excitatory amino acid antagonists acting at primary afferent C fibers and motoneurons of the isolated spinal cord of the rat. *Br. J. Pharmacol.* (1987) **91**: 531-537.

Fagg G.E. and Foster A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathway in the mammalian central nervous system. *Neurosci.* (1983) **9**: 701-709.

Fanidi A., Harrington E.A., Evan G.I. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* (1992) **359**: 554-556.

Farooqui A.A. and Horrocks L.A. Excitatory amino acid receptors, neural membrane phospholipid metabolism and neurological disorders. *Brain Res. Rev.* (1991) **16**: 171-191.

Farooqui A.A. and Horrocks L.A. Involvement of glutamate receptors, lipases, and phospholipases in long term potentiation and neurodegeneration. *J. Neurosci. Res.* (1994) **38**: 6-11.

Favaron M., Manev H., Siman R., Bertolino M., Szekely A.M., DeErasquin G., Guidotti A., Costa E. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1990) **87**: 1983-1987.

Fazekas J.F., Alexander F.A.D., Himwich H.E. Tolerance of the newborn to anoxia. *Am. J. Physiol.* (1941) **134**: 281-287.

Ferrer I., Ballabriga J., Pozas E. Transient forebrain ischemia in the adult gerbil is associated with a complex c-Jun response. *NeuroReport* (1997) **8** (11): 2483-2487.

Ferrer I., Olive M., Ribera J., Planas A.M. Naturally occurring (programmed) and radiation-induced apoptosis are associated with selective c-Jun expression in the developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.* (1996) **8**: 1286-1298.

Ferrer I., Soriano M.A., Planas A.M. Survival of parvalbumin-immunoreactive neurons in gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia does not depend on HSP-70 protein induction. *Brain Res.* (1995) **692**: 41-46.

Ferrer I., Tortosa A., Macay A., Sierra A., Moreno D., Munell F., Blanco R., Squier W. Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the rat brain and transient forebrain ischemia in the adult gebil. *Brain Pathol.* (1994) 4: 115-122.

Firth J.D., Ebert B.L., Ratcliffe P.J. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and c-AMP response elements. *J. Biol. Chem.* (1995) 270: 21021-21027.

Fisch T.M., Prywes R., Roeder R.G. c-fos sequences necessary for basal expression and induction by epidermal growth factor, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate, and the calcium ionophore. *Mol. Cell. Biol.* (1987) 7: 3490-3502.

Flood D.G., Walton K.M., Contreras P.C., Dionne C.A., Miller M.S., Bhat R.V. Immunolocalization of MEK1, MAPK, MEK4 and JNK1 in rat CNS. *Society for Neuroscience* (1997) 23: 164.14. *Abstract.*

Frandsen A., Drejer J., Schousboe A. Direct evidence that excitotoxicity in cultured neurons is mediated via NMDA as well as non-NMDA receptors. *J. Neurochem.* (1989) 53: 297-299.

Frandsen A. and Schousboe A. Time and concentration dependency of the toxicity of excitatory amino acids on cerebral neurones in primary culture. *Neurochem. Int.* (1987) 10 (4): 583-591.

Frandsen A. and Schousboe A. Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* (1990) 8: 209-216.

Franza B.R.J., Rauscher F.J., Josephs S.F., Curran T. The Fos complex and Fos-related antigens recognise sequence elements that contain AP-1 sites. *Science* (1988) 239: 1150-1153.

Franza B.R.J., Sambucetti L.C., Cohen D.R., Curran T. Analysis of Fos protein complexes and Fos-related antigens by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Oncogene* (1987) 1: 213-221.

Freeman R.S., Estus S., Johnson Jr E.M. Analysis of cell cycle-related gene expression in post-mitotic neurons: selective induction of cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron* (1994) 12: 345-355.

Freytag S.O., Dang C.V., Lee W.M. Definition of the activities and properties of c-myc required to inhibit cell differentiation. *Cell Growth Differ.* (1990) 1: 339-343.

Friedman J.E. and Haddad G.G. Major differences in Ca_i^{2+} response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of Ca_0^{2+} and Na_0^+ . *J. Neurosci.* (1993) 13: 63-72.

Fukumoto Y., Kaibuchi K., Oku N., Hori Y., Takai Y. Activation of c-fos serum-response element by the activated c-HA-ras protein in a manner independent of protein kinase and c-AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* (1990) **265** : 774-780.

Furuya S. and Hirabayashi Y. Ceramide activates JNK/SAPK in cerebellar neurons. *Society for Neuroscience* (1997) **23**: 458.8. *Abstract*.

Gajate C., Alonso M.T., Schimmang T., Mollinedo F. C-Fos is not essential for apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) **218**: 267-272.

Gass P., Spranger M., Herdegen T., Bravo R., Kock P., Hacke W., Kiessling M. Induction of Fos and Jun proteins after focal ischemia in the rat: differential effect of the NMDA receptor antagonist MK-801. *Acta Neuropathol.* (1992) **84**: 545-553.

Gehrmann J., Bonnekoh P., Miyazawa T., Hossmann K.A., Kreutzberg G.W. Immunocytochemical study of an early microglial activation in ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1992) **12**: 257-269.

Gibson G., Toral-Barza L., Zhang H. Selective changes in cell bodies and growth cones of nerve growth factor-differentiated PC12 cells induced by chemical hypoxia. *J. Neurochem.* (1997) **69**: 603-611.

Gilman M.Z., Wilson R.N., Weinberg R.A. Multiple protein binding sites in the 5' flanking region regulate c-fos expression. *Mol. Cell. Biol.* (1986) **6**: 4305-4316.

Giulian D., Chen J., Ingeman J.E., George J.K., Noponen M. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J. Neurosci.* (1989) **9**: 4416-4429.

Giulian D. and Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann. Neurol.* (1990) **27**: 33-42.

Giulian D., Vaca K., Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J. Neurosci.* (1993) **13**: 29-37.

Gloldberg M.P., Weiss J.H., Pham P.C., Choi D.W. NMDA receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1987) **243**: 784-791.

Gluckman P.D. and Williams C.E. When and why do brain cells die ? *Dev. Med. Child Neurol.* (1992) **34**: 1010-1014.

Gonzalez Martin C., de Deigo I., Crespo D., Fairen A. Transient c-fos expression accompanies naturally occurring cell death in the developing interhemispheric cortex of the rat. *Dev. Brain Res.* (1992) **68**: 83-95.

Gonzalez Martin C., De Diego I., Fairen A., Mellströ B., Naranjo J.R. Transient expression of c-fos during the development of the rat cerebral cortex. *Dev. Brain Res.* (1991) **59**: 109-112.

Gordon K., Statman D., Johnston M.V., Robinson T.E., Becker J.B., Silverstein F.S. Transient hypoxia alters striatal catecholamine metabolism in immature brain: an *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* (1990) **54**: 605-611.

Gorman A.M., Scott M.P., Rumsby P.C., Meredith C., Griffiths R. Excitatory amino acid-induced cytotoxicity in primary cultures of mouse cerebellar granule cells correlates with elevated; sustained c-fos proto-oncogene expression. *Neurosci. Lett.* (1995) **191**: 116-120.

Goto K., Ishige A., Sekigushi K., Iizuka S., Sugimoto A., Yuzurihara T., Aburada M., Hosoya E., Kogure K. Effects of cycloheximide on delayed neuronal death in rat hippocampus. *Brain Res.* (1990) **534**: 299-302.

Grandati M., Verrecchia C., Revaud M.L., Allix M., Boulu R.G., Plotkine M. Calcium-independant NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br. J. Pharmacol.* (1997) **122(4)**: 625-630.

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

Greenberg M.E. and Ziff E.B. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* (1984) **311**: 433-438.

Gressens, P., Cilio, M.R., Schlogel, X., Evrard, P. Les mécanismes de la souffrance cérébrale du fœtus et du prématuré. Des espoirs de prévention et de traitement. *Progrès en Néonatalogie.* (1991) **11**: 203-226.

Gressens, P., Marret S., Evrard, P. Developmental spectrum of the excitotoxic cascade induced by ibotenate: a model of hypoxic insults in fetus and neonates. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* (1996) **22(6)**: 498-502.

Gschwind M. and Huber G. Apoptosis techniques and protocols, Neuromethods. Poirier J, editor. Totowa; Humana Press; (1997) p 13.

Gubits R.M., Burke R.E., McIntosh G.C., Bandele A., Munell F. Immediate early gene induction after neonatal hypoxia-ischemia. *Mol. Brain Res.* (1993) **18**: 228-238.

Gubits R.M., Hazelton J.L., Simantov R. Variations in c-fos gene expression during rat brain development. *Mol. Brain Res.* (1988) **3**: 197-202.

Gubits R.M., Smith T.M., Fairhurst J.L., Yu H. Adrenergic receptors mediate changes in c-fos mRNA levels in brain. *Mol. Brain Res.* (1989) **6**: 39-45.

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

Gunn R.M., Dragunow M., Faull R.L., Gluckman P.D. Effects of hypoxia-ischemia and seizures on neuronal and glial-like c-fos protein levels in the infant rat. *Brain Res.* (1990) **531**: 105-116.

Gupta S., Barrett T., Whitmarsh A.J., Cavanagh J., Sluss H.K., Dérijard B., Davis R.J. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.* (1996) **15(11)**: 2760-2770.

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

Hai T. and Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991) **88**: 3720-3724.

Halazonetis T.D. and Kandil A.N. Determination of the c-Myc DNA-binding site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991) **88**: 6162-6166.

Ham J., Babij C., Whitfield J., Pfarr C.M., Lallemand D., Yaniv M., Rubin L.L. A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* (1995) **14**: 927-939.

Hann S.R., Abrams H.D., Rohrschneider L.R., Eisenman R.N. Proteins encoded by the v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell line. *Cell* (1983) **34**: 789-798.

Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* (1989) **119**: 203-210.

Hansson E., Rönnbäck L., Persson L.I., Loventhal A., Noppe M., Alling C., Karlsson B. Cellular composition of primary cultures from cerebral cortex, striatum, hippocampus, brain stem and cerebellum. *Brain Res.* (1984) **300**: 9-18.

Harris E.W., Ganong A.H., Monaghan D.T., Watkins J.C., Cotman C.W. Action of 3-(C⁺)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonic acid (CPP): a new and highly potent antagonist of N-methyl-D-aspartate receptors in the hippocampus. *Brain Res.* (1986) **382**: 174-177.

Hartley D.M. and Choi D.W. Delayed rescue of NMDA receptor mediated neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1989) **250 (2)**: 752-758.

Headley P.M. and Grillner S. Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *TIPS Special Report* (1991): 30-36.

Heikkila R.G., Schwab G., Wickstrom E., Lohie S.L., Pliznik D.H., Watt R., Nacres L.M. A c-myc antisense oligonucleotide inhibits entry into S phase but not progression from G0 to G1. *Nature* (1987) **328**: 445-449.

Herdegen T., Skene P., Bähr M. The c-Jun protein-transcriptional mediator of neuronal survival, regeneration and death. *Trends Neurosci.* (1997) **20**: 227-231.

Hermeking H. and Eick D. Mediation of c-myc-induced apoptosis by p53. *Science* (1994) **265**: 2091-2093.

Héron A., Pollard H., Dessi F., Moreau J., Lasbennes F., Ben-Ari Y., Chariat-Marlangue C. Regional variability in DNA fragmentation after global ischemia evidenced by combined histological and gel electrophoresis observations in the rat brain. *J. Neurochem.* (1993) **61**: 1973-1976.

Hill A. and Volpe J.J. Seizures, hypoxic-ischemic brain injury, and intraventricular hemorrhage in the newborn. *Ann. Neurol.* (1981) **10**: 109-121.

Hill A. and Volpe J.J. Hypoxic-ischemic brain injury in the newborn. *Semin. Perinatol.* (1982) **6**: 25-41.

Hirai S., Bouracho B., Yaniv M. Both Jun and Fos contribute to transcription activation by the heterodimer. *Oncogene* (1990) **5**: 39-46.

Hirata Y., Hagiwara M., Kiuchi K. Manganese induces apoptosis and activates JNK pathways in PC12 cells. *Society for Neuroscience* (1997) **23**: 252.13. *Abstract.*

Hockenbery D.M., Oltvai Z.N., Yin X.M., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* (1993) **75**: 241-251.

Hollmann M. and Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* (1994) **17**: 31-108.

Honkaniemi J., Sagar S.M., Pyykönen I., Hicks K.J., Sharp F.R. Focal brain injury induces multiple immediate early genes encoding zinc finger transcription factors. *Mol. Brain Res.* (1995) **28**: 157-163.

Honma N., Uchida A., Hirose H., Srsen V., Kishimoto T., Hisanaga S.I. Two types of apoptotic cell death of rat central nervous system-derived neuroblastoma B50 and B104 cells: Apoptosis induced during proliferation and after differentiation. *J. Neurochem.* (1996) **67**: 1856-1865.

Hope B.T., Kelz M.B., Duman R.S., Nestler E.J. Chronic electroconvulsive seizure (ECS) treatment results in expression of a long-lasting AP-1 complex in brain with altered composition and characteristics. *J. Neurosci.* (1994) 14(7): 4318-4328.

Horvitz H., Ellis H., Sternberg P. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci. Comment.* (1982) 1: 56-65.

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

Hsieh K.M. and Blumenthal H.T. Serum lactic dehydrogenase levels in various disease states. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1956) 91: 626-630.

Hu M.C., Qiu W.R., Wang Y.P. JNK1, JNK2 and JNK3 are p53 N-terminal serine 34 kinases. *Oncogene* (1997) 15 (19): 2277-2287.

Hu Y., Metzler B., Xu Q. Discordant activation of stress-activated protein kinases or c-Jun NH₂-terminal protein kinases in tissues of fea-stressed mice. *J. Biol. Chem.* (1997) 272 (14): 9113-9119.

Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell* (1997) 88: 333-346.

Ikeda K., Araki K., Takayama C., Inoue Y., Yagi T., Aizawa S., Mishina M. Reduced spontaneous activity of mice defective in $\epsilon 4$ subunit of the NMDA receptor channel. *Mol. Brain Res.* (1995) 33: 61-71.

Insel T.R., Miller L.P., Gelhard R.E. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat brain. I. *N*-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neurosci.* (1990) 35: 31-43.

Ishige N., Pitts L.H., Carlson S., Berry I., Nishimura M.C., Moseley M.E. Effects of hypoxia on rat brain with traumatic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1987) 7: S1-S638.

Ishitani R., Sunaga K., Hirano A., Saunders P., Katsube N., Chuang D.M. Evidence that Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in age-induced apoptosis in mature cerebellar neurons in culture. *J. Neurochem.* (1996) 66: 928-935.

Islam N., Aftabuddin M., Moriwaki A., Hori Y. Detection of DNA damage induced by apoptosis in the rat brain following incomplete ischemia. *Neurosci. Lett.* (1995) 188: 159-162.

Jacquier-Sarlin M.R., Jornot L., Polla B.S. Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J. Biol. Chem.* (1995) 270(23): 14094-14099.

Jacobson M.D., Weil M., Raff M.C. Programmed cell death in animal development. *Cell* (1997) **88**: 347-354.

Jahr C.E. and Lester R.A.J. Synaptic excitation mediated by glutamate-gated ion channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* (1992) **2**: 270-274.

Jahr C.E. and Stevens C.F. Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* (1987) **325**: 522-525.

Jamal S. and Ziff E. Transactivation of c-fos and beta-actin genes by raf as a step in early response to transmembrane signals. *Nature* (1990) **344**: 463-466.

Janknecht R. and Hunter T. Activation of the Sap-1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* (1997) **272**(7): 4219-4224.

Jarrot D.M. and Domer F.R. A gerbil model of cerebral ischaemia suitable for drug evaluation. *Stroke* (1980) **11**: 203-209.

Jenkins R., McMahon S.B., Bond A.B., Hunt S.P. Expression of c-Jun as a response to dorsal-root and peripheral-nerve section in damaged and adjacent intact primary sensory neurons in the rat. *Eur. J. Neurosci.* (1993) **5**: 751-759.

Jilek L. The reaction and adaptation of the central nervous system to stagnant hypoxia and anoxia during ontogeny. *Developmental Neurobiology*. Himwich W.A., editors. Springfield, Charles C. Thomas, (1970) pp. 391-420.

Johnson E.M. and Deckwerth T.L. Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci.* (1993) **16**: 31-46.

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

Johnson N.L., Gardner A.M., Diener K.M., Lange-Carter C.A., Gleavy J., Jarpe M.B., Minden A., Karin M., Zon L.I., Johnston G.L. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase kinase induce cell death. *J. Biol. Chem.* (1996) **271**: 3229-3237.

Johnston M.E. Cellular alterations associated with perinatal asphyxia. *Clin. Invest. Med.* (1993) **16**: 122-132.

Johnston M.V. Neurotransmitter alterations in a model of perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Ann. Neurol.* (1983) **13**: 511-518.

Jordân J., Galindo M.F., Prehn J.H.M., Weichselbaum R.R., Beckett M., Ghadge G.D., Roos R.P., Leiden J.M., Miller R.J. p53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron cultures. *J. Neurosci.* (1997) **17(4)**: 1397-1405.

Jorgenson M., Deckert J., Wright D., Gehlert D. Delayed c-fos proto-oncogene expression in the rat hippocampus induced by transient global cerebral ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res.* (1989) **484**: 393-398.

Kaczmarek L. and Kaminska B. Molecular biology of cell activation. *Exp. Cell Res.* (1989) **183**: 24-35.

Kahn A. Bcl-2 inhibe-t-il l'apoptose en s'opposant à l'action des radicaux oxygénés? *Med. Sci.* (1994) **10**: 208-209.

Kaltschmidt B., Baeuerle P.A., Kaltschmidt C. Potential involvement of the transcription factor NF- κ B in neurological disorders. *Mol. Aspects Med.* (1993) **14**: 171-190.

Kaminska B., Kaczmarek L., Chaudhuri A. Visual stimulation regulates the expression of transcription factors and modulates the composition of AP-1 in visual cortex. *J. Neurosci.* (1996) **16(12)**: 3968-3978.

Kaminska B., Mosienak G., Gierdalski M., Kossut M., Kaczmarek L. Elevated AP-1 transcription factor DNA binding activity at the onset of functional plasticity during development of rat sensory cortical areas. *Mol. Brain Res.* (1995) **33**: 295-304.

Kaplan B., Brint S., Tanabe J., Jacewicz M., Wang X.J., Pulsinelli W. Temporal thresholds for neocortical infarction in rats subjected to reversible focal cerebral ischemia. *Stroke* (1991) **22**: 1032-1039.

Kasof G.M., Mandelzys A., Maika S.D., Hammer R.E., Curran T., Morgan J.I. Kainic acid-induced neuronal death is associated with DNA damage and a unique immediate-early gene response in c-fos-lacZ transgenic rats. *J. Neurosci.* (1995) **15(6)**: 4238-4249.

Kato G.J. and Dang C.V. Function of the c-Myc oncoprotein. *FASEB J.* (1992) **6**: 3065-3072.

Keinanen K., Wisden W., Sommer B., Werner P., Herb A., Verdoorn T.A., Sakmann B., Seeburg P. A family of AMPA-selective glutamate receptors. *Science* (1990) **249**: 556-560.

Kemp J.A., Foster A.C., Leeson P.D., Priestley T., Tridgett R., Iversen L.L. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1988) **85**: 6547-6550.

Kerpolla T.K. and Curran T. Fos-Jun heterodimers and jun homodimers bend DNA in opposite directions: implications for transcription factor cooperativity. *Cell* (1991) **66**: 317-326.

Kerr J.F.R. et Harmon B.V. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. *Apoptosis. The molecular basis of cell death*. Tomei LD, Cope FO, editors. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1991) pp. 5-29.

Kerr J.F.R., Searle J., Karmin B.V., Bishop C.J. Perspectives on mammalian cell death. *Apoptosis*. Poken CS, editors. New York, Oxford University Press (1987) pp. 93-128.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide range implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* (1972) **26**: 239-250.

Kharmalov E., Cagnoli C.M., Atabay C., Ikonovic S., Grayson D.R., Manev H. Opposite effect of protein synthesis inhibitors on potassium deficiency-induced apoptotic cell death in immature and mature neuronal cultures. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 1395-1398.

Khazipov R., Ragozzino D., Bregestovski P. Kinetics and Mg^{2+} block of N-methyl-D-aspartate receptor channels during postnatal development of the hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Neurosci.* (1995) **69**: 1057-1065.

Kiessling M. and Gass P. Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* (1994) **4**: 77-83.

Kiessling M., Stumm Y., Xie Y., Herdegen T., Aguzzi A., Bravo R., Gass P. Differential transcription and translation of immediate early genes in the gerbil hippocampus after transient global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1993) **13(6)**: 914-924.

Kiessling M., Xie Y., Ullrich B., Thilmann R. Are the neuroprotective effects of the protein synthesis inhibitor cycloheximide due to prevention of apoptosis? *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1991) **11**: S357

Kinouchi H., Sharp F.R., Chan P.H., Koistinaho J., Sagar S.M., Yoshimoto T. Induction of c-fos, jun B, c-jun and hsp mRNA in cortex, thalamus, basal ganglia, and hippocampus following middle cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1994) **14**: 808-817.

Kirino T., Tamura A., Sano K. Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol.* (1984) **64**: 139-147.

Kleckner N.W. and Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *Science* (1988) **241**: 835-837.

Kleihues P. and Hossmann K.A. Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res.* (1971) **35**: 409-418.

Kley N., Chung R.Y., Fay S., Loeffler J.P., Seizinger B.R. Repression of the basal c-fos promoter by wild-type p53. *Nucleic Acids Res.* (1992) **20**: 4083-4087.

Knight R.J. and Buxton D.B. Stimulation of c-Jun kinase and mitogen-activated protein kinase by ischemia and reperfusion in the perfused rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1996) **218** (1): 83-88.

Koh J.Y. and Choi D.W. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate deshydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Meth.* (1987) **20**: 83-90.

Konig H., Ponta H., Rahmsdorf U., Buscher M., Schontal A. Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression. *EMBO J.* (1989) **8**: 2559-2566.

Kovary K. and Bravo R. The Jun and Fos protein families are both required for the cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* (1991) **11**: 4466-4472.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature Med.* (1997) **3**: 614-620.

Kruijer W., Schubert D., Verma I.M. Induction of the proto-oncogene fos by nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1985) **82**: 7330-7334.

Kumar S. ICE-like proteases in apoptosis. *Trends Biochem. Sci.* (1995) **20**: 198-202.

Kusumoto M., Dux E., Paschen W., Hossmann K.A. Susceptibility of hippocampal and cortical neurons to Argon-mediated in vitro ischemia. *J. Neurochem.* (1996) **67**: 1613-1621.

Labouesse M. C. *elegans*, les promesses d'un petit animal intelligent: "small is beautiful". *Med. Sci.* (1994) **10**: 337-341.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* (1970) **227**: 680-685.

Larm J.A., Cheung N.S., Beart P.M. Apoptosis induced via AMPA-selective glutamate receptors in cultured murine cortical neurons. *J. Neurochem.* (1997) **69**: 617-622.

Larroche, J.C. Lésions cérébrales foetales et néonatales. Quelques aspects méconnus. *Progrès en Néonatalogie.* (1991) **11**: 227-230.

Larsson L.G., Pettersson M., Oberg F., Nilsson K., Lüscher B. Expression of mad, mx1, max and c-myc during induced differentiation of hematopoietic cells: opposite regulation of mad and c-myc. *Oncogene* (1994) **9**: 1247-1252.

Lau L.F. and Nathans D. Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: Coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1987) **84**: 1182-1186.

Laurie D.J., Putzke J., Ziegelsbänger W., Seeburg P.H., Tölle T.R. The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Mol. Brain Res.* (1995) **32**: 94-108.

Leah J.D., Herdegen T., Bravo R. Selective expression of Jun proteins following axotomy and axonal-transport block in peripheral-nerves in the rat: evidence for a role in the regeneration process. *Brain Res.* (1991) **566**: 198-207.

LeBlanc A. Increased production of 4 kDa amyloid beta peptide in serum deprived human primary neuron cultures: possible involvement of apoptosis. *J. Neurosci.* (1995) **15(12)**: 7837-7846.

Lee S., Christakos S., Small M.B. Apoptosis and signal transduction: clues to a molecular mechanism. *Curr. Opin. Cell. Biol.* (1993) **5**: 286-291.

Lees G.J. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J. Neurol. Sci.* (1993) **114**: 119-122.

Lehmann J., Hutchison A.J., McPherson S., Mondadori C., Schmutz M. CGS 19755, a selective and competitive N-methyl-D-aspartate-type excitatory amino acid receptor antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1988) **246**: 65-72.

Lehmann J., Schneider J., McPherson S., Murphy D.E., Bernard P. CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: characterization *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1987) **240**: 737-746.

Lenczowski J.M., Domingez L., Eder A.M., King L.B., Zacharchuk C.M., Ashwell J.D. Lack of a role for Jun kinase and AP-1 in Fas-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* (1996) **17**: 170-181.

Leppin C., Finiels-Marlier F., Crawley J.N., Montpied P., Paul S.M. Failure of a protein synthesis inhibitor to modify glutamate receptor-mediated neurotoxicity *in vivo*. *Brain Res.* (1992) **581**: 168-170.

Lerea L.S., Butler L.S., McNamara J.O. NMDA and non-NMDA receptor-mediated increase of c-fos mRNA in Dentate Gyrus neurons involves calcium influx via different routes. *J. Neurosci.* (1992) **12(8)**: 2973-2981.

Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* (1997) **88**: 323-331.

Li Y., Chopp M., Jiang N., Zaloga C. In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice. *Mol. Brain Res.* (1995) **28**: 164-168.

Li Y., Chopp M., Zhang Z.G., Zagola C., Nievenhuis L., Guatam S. p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* (1994) **25**: 849-856.

Limbrick Jr D.D., Churn S.B., Sombati S., DeLorenzo R.J. Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death. *Brain Res.* (1995) **690**: 145-156.

Linnik M.D., Zobrist R.H., Hatfield M.D. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* (1993) **24**: 2002-2009.

Lipton S.A. and Rosenberg P.A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New Engl. J. Med.* (1994) **330** (9): 613-622.

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

Lodge D. and Johnson K.M. Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists. *TIPS Special Report* (1991): 13-18.

Louis J.C., Magal E., Yavin E. Protein kinase C alterations in the fetal rat brain after global ischemia. *J. Biol. Chem.* (1988) **263**: 19282-19285.

Lowry O.H., Rosebrough, Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* (1951) **193**: 265-275.

Lucas D.R. and Newhouse J.P. The toxic activity of sodium-L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch. Ophthalmol.* (1957) **58**: 193-201.

Lüscher B. and Eisenman R.N. New light on Myc and Myb. I. *Myc. Genes Dev.* (1990) **4**: 2025-2035.

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

Macario A.J. Heat-shock proteins and molecular chaperone: implication for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Clin. Lab. Res.* (1995) **25**: 59-70.

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

MacDonald J.W., Johnston M.V., Young A.B. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp. Neurol.* (1990) **110**: 237-247.

MacDonald J.W., Silverstein F.S., Johnston M.V. Neurotoxicity of *N*-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. *Brain Res.* (1988) **459**: 200-203.

MacManus J.P., Hill I.E., Rasquinha I., Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci. Lett.* (1993) **164**: 89-92.

Magny, J.F., Cloup, M., Lewin, F., Moriette, G., and Tchobroutsky, C. Asphyxie périnatale chez le nouveau-né à terme. *9ème séminaire Guigoz.* Deauville. (1994)

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

Mailhos C., Howard M.K., Latchman D.S. Heat shock proteins hsp90 and hsp70 protect neuronal cells from thermal stress but not from programmed cell death. *J. Neurochem.* (1994) **63**: 1787-1795.

Maki Y., Bos T.J., Davis C., Starbuck M., Vogt P.K. Avian sarcoma virus 17 carries a new oncogene, jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1987) **84**: 2848-2852.

Mansour S.J., Matten W.T., Hermann A.S., Candia J.M., Rong S., Fukasawa K., Vande Woud G.F., Ahn N.G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* (1994) **265**: 966-970.

Marini A.M., Kozuka M., Lipsky R.H., Nowark T.S. 70-kilodalton heat shock protein induction in cerebellar astrocytes and cerebellar granules cells *in vitro*: comparison with immunocytochemical localization after hyperthermia *in vivo*. *J. Neurochem.* (1990) **54**: 1509-1516.

Marret S., Gressens P., Gadisseux J.F., Evrard P. Prevention by Magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies. *Dev. Med. Child Neurol.* (1995a) **37(6)**: 473-484.

Marret S., Gressens P., Evrard P. Arrest of neuronal migration by excitatory amino acids in hamster developing brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1996) **93(26)**: 15463-15468.

Marret S., Mukendi R., Gadisseux J.F., Gressens P., Evrard P. Effect of ibotenate on brain development: an excitotoxic mouse model of microgyria and posthypoxic-like lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* (1995b) **54(3)**: 358-370.

Martinou J.C., Dubois-Dauphin M., Staple J.K., Rodriguez I., Frankowski H., Missotten M., Albertini P., Talabot D., Catsicas S., Pietra C., Huarte J. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* (1994) **13**: 1017-1030.

Maruno M. and Yanagihara T. Progressive loss of messenger RNA and delayed neuronal death following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci. Lett.* (1990) **115**: 155-160.

Massieu L., Morales-Villagran A., Tapia R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an *in vivo* microdialysis study. *J. Neurochem.* (1995) **64**: 2262-2272.

Mattson M.P. Evidence for the involvement of protein kinase C in neurodegenerative changes in cultured human cortical neurons. *Exp. Neurol.* (1991) **112**: 95-103.

Mattson M.P., Lovell M.A., Furukawa K., Markesbery W.R. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca^{2+} concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 1740-1751.

Mattson M.P. and Rychlik B. Glia protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced degeneration: involvement of fibroblast growth factor. *Int. J. Dev. Neurosci.* (1990) **8**: 399-415.

Mattson M.P., Wang H., Michaelis E.K. Developmental expression, compartmentalization, and possible role in excitotoxicity of a putative NMDA receptor protein in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* (1991) **565**: 94-108.

Mayers M.L. and Miller R.J. Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. *TIPS Special Report* (1991): 36-42.

Mayers M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* (1984) **309**: 261-263.

McGeer P.L., Eccles J.C., McGeer E.G. Putative excitatory neurons: Glutamate and Aspartate. *Molecular neurobiology of the mammalian brain*. McGeer PL, Eccles JC, McGeer EG, editors. 2nd ed. New York, London, Plenum Press (1987) **6**: pp. 175-195.

Meichle A., Philipp A., Eilers M. The functions of Myc proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* (1992) **1114**: 129-146.

Meikrantz W. and Schlegel R. Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell. Biochem.* (1995) **58**: 160-174.

Mesner P.W., Winters T.R., Green S.H. Nerve growth factor withdrawal-induced cell death in neuronal PC12 cells resembles that in sympathetic neurons. *J. Cell. Biol.* (1992) **119**: 1669-1680.

Messina A., Jaworowski A., Bell C. Detection of jun but not fos protein during developmental cell death sympathetic neurons. *J. Comp. Neurol.* (1996) **372(4)**: 544-550.

Mésenge C., Verrecchia C., Allix M., Boulu R.R., Plotkine M. Reduction of the neurological deficit in mice with traumatic brain injury by nitric oxide synthase inhibitors. *J. Neurotrauma.* (1996) **13(4)**: 209-214.

Michel P.P. and Agid Y. Chronic activation of the cyclic AMP signaling pathway promotes development and long-term survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* (1996) **67**: 1633-1642.

Mignon A., Rouquet N., Joulin V. Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain? *Med. Sci.* (1998) **14**: 9-17.

Miller L.P., Johnson A.E., Gelhard R.E., Insel T.R. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in the rat forebrain. II. Kainic acid receptors. *Neuroscience* (1990) **35**: 45-51.

Miller R.J. The control of neuronal Ca²⁺ homeostasis. *Prog. Neurobiol.* (1991) **37**: 255-285.

Mills J.C., Nelson D., Erecinska M., Pittman R.N. Metabolic and energetic changes during apoptosis in neurons cells. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 1721-1730.

Mishra O.P. and Delivoria-Papadopoulos M. NMDA receptor modification in the fetal guinea pig brain during hypoxia. *Neurochem. Res.* (1992) **17 (12)**: 1211-1216.

Mishra O.P. and Delivoria-Papadopoulos M. Modification of modulatory sites of NMDA receptor in the fetal guinea pig brain during development. *Neurochem. Res.* (1992) **17**: 1223-1228.

Mitani A., Kadoya F., Nakamura Y., Kataoka K. Visualization of hypoxia-induced glutamate release in gerbil hippocampal slice. *Neurosci. Lett.* (1991) **122**: 167-170.

Mitani A., Takeyasu S., Yanase H., Nakamura Y., Kataoka K. Changes in intracellular Ca²⁺ and energy levels during *in vitro* ischemia in the gerbil hippocampal slice. *J. Neurochem.* (1994) **62**: 626-634.

Mitani A., Yanase H., Namba S., Shudo M., Kataoka K. In vitro ischemia-induced intracellular Ca²⁺ elevation in cerebellar slices: a comparative study with the values found in hippocampal slices. *Acta Neuropathol.* (1995) **89**: 2-7.

Miura M., Zhus H., Rotello R., Hartweig E.A., Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β -converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* (1993) **75**: 653-660.

Mizukami Y., Yoshioka K., Morimoto S., Yoshida K. A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** (26): 16657-16662.

Mizuta I., Katayama M., Watanabe M., Mishina M., Ishii K. Developmental expression of NMDA receptor subunits and emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral cortical neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* (1998) **54**(7): 721-725.

Monaghan D.T., Bridges R.J., Cotman C.W. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1989) **29**: 365-402.

Monaghan D.T., Yao D., Olverman H.J., Watkins J.C., Cotman C.W. Autoradiography of D-[³H]2-amino-5-phosphopentanoate binding-sites in rat brain. *Neurosci. Lett.* (1984) **52**: 253-258.

Montminy M.R., Sevarino K.A., Wagner R.H., Mandel G., Goodman R.H. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) **83**: 6682-6686.

Monyer H., Burnashev N., Laurie D.J., Sakmann B., Seeburg P.H. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* (1994) **12**: 529-540.

Monyer H., Sprengel R., Schoepfer R., Herb A., Higuchi M., Lomeli H., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P.H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* (1992) **256**: 1217-1221.

Morgan J.I., Cohen D.R., Hempstead J.L., Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science* (1987) **237**: 192-197.

Morgan J.I. and Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature* (1986) **322**: 552-555.

Morgan J.I. et Curran T. Role of the immediate early genes, c-fos and c-jun, in stimulus-transcription coupling in the mammalian central nervous system. *The assembly of the nervous system*. Liss A, editors. Alan R. Liss, Inc. (1989) **15**: 235-246.

Morgan J.I. and Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Ann. Rev. Neurosci.* (1991) **14**: 421-451.

Morgane P.J., Austin-Lafrance R.J., Bronzino J.D., Tonkiss J., Galler J.R. Malnutrition and the developing central nervous system. *The vulnerable brain and environmental risks. Vol. 1: Malnutrition and hazard assessment.* Isaacson R.L., and Jensen K.F. Plenum Press, New York (1992) pp. 3-44.

Mori H. and Mishina M. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacol.* (1995) **34**: 1219-1237.

Morin A.M., Hattori H., Wasterlain C.G., Thomson D. [³H]MK-801 binding sites in neonate rat brain. *Brain Res.* (1989) **487**: 376-379.

Moriyoshi K., Masu M., Ishii T., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* (1991) **354**: 31-37.

Morrison-Bogorad M., Zimmerman A.L., Pardue S. Heat-Shock 70 messenger RNA levels in human brain: Correlation with agonal fever. *J. Neurochem.* (1995) **64**: 235-246.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.* (1983) **65**: 55-63.

Munell F., Burke R.E., Bandele A., Gubits R.M. Localisation of c-fos, c-jun and hsp70 mRNA expression in brain after neonatal hypoxia-ischemia. *Dev. Brain Res.* (1994) **77**: 111-121.

Murphy T.H., Worley P.F., Nakabeppu Y., Christy B., Castel J., Baraban J.M. Synaptic regulation of immediate early gene expression in primary cultures of cortical neurons. *J. Neurochem.* (1991) **57**: 1862-1872.

Muttitt S.C., Taylor M.J., Kobayashi J.S., MacMillan L., Whyte H.E. Serial visual evoked potentials and outcome in term birth asphyxia. *Pediatr. Neurol.* (1991) **7**: 86-90.

Müller J.M., Krauss B., Kaltschmidt C., Baeuerle P.A., Rupec R.A. Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** (37): 23435-23439.

Müller R., Bravo R., Burckhardt J., Curran T. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* (1984) **312**: 716-720.

Müller R., Bravo R., Muller D., Kurz C., Reiz M. Different types of modifications of c-fos and its associated protein p39: modulation of DNA binding by phosphorylation. *Oncogene Res.* (1987) **2**: 19-32.

Myers K.M., Fiskum G., Liu Y., Simmens S.J., Bredesen D.E., Murphy A.N. Bcl-2 protects neural cells from cyanide/Aglycemia-induced lipid oxidation, mitochondrial injury, and loss of viability. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 2432-2440.

Nakajima M., Kashiwagi K., Ohta J., Furukawa S., Hayashi K., Kawashima T., Hayashi Y. Etoposide induces programmed death in nervous tissue cultured from the fetal rat central nervous system. *Brain Res.* (1994) **641**: 350-352.

Nedergaard M. Mechanisms of brain damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.* (1988) **77**: 81-101.

Neuberg M., Schuermann M., Hunter J., Müller R. Two functionally different regions in fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. *Nature* (1989) **338**: 589-590.

Newell D.W., Barth A., Papermaster V., Malouf A.T. Glutamate and non-glutamate receptor mediated toxicity caused by oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *J. Neurosci.* (1995) **15** (11): 7702-7711.

Ni R., Tomita Y., Matsuda K., Ichihara A., Ishimura K., Ogasawara J., Nagata S. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp. Cell Res.* (1994) **215**: 332-337.

Nicolas F. and Daval J.L. Expression of adenosine A1 receptors in cultured neurons from fetal rat brain. *Synapse* (1993) **14**: 96-99.

Nicoletti F., Iadarola M.J., Wroblewski J.T., Costa E. Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with α_1 -adrenoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) **83**: 1931-1935.

Nishina H., Sato H., Suzuki T., Sato N., Iba H. Isolation and characterization of fra-2: A new member of the fos gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1990) **87**: 3619-3623.

Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbet A., Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature* (1984) **307**: 462-465.

Nowak T.S.J., Ikeda J., Nakajima T. 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke* (1990) **21**: 107-111.

Ohtani K.I., Sakurai H., Oh E., Iwata E., Tsuchiya T., Tsuda M. Involvement of protein kinase C in Ca^{2+} -signaling pathways to activation of AP-1 DNA-binding activity evoked via NMDA- and voltage-gated Ca^{2+} channels. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 605-614.

Oillet J., Koziel V., Vert P., Daval J.L. Influence of post-hypoxia reoxygenation conditions on energy metabolism and superoxide production in cultured neurons from the rat forebrain. *Pediatr. Res.* (1996) **39** (4): 598-603.

- Oillet J., Nicolas F., Koziel V., Daval J.L.** Analysis of glutamate receptors in primary cultured neurons from fetal rat forebrain. *Neurochem. Res.* (1995) **20**: 761-768.
- Okamoto M., Matsumoto M., Ohtsuki T., Taguchi A., Mikoshiba K., Yanagihara T., Kamada T.** Internucleosomal DNA cleavage involved in ischemia-induced neuronal death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) **196**: 1356-1362.
- Olney J.W.** Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* (1969) **164**: 719-721.
- Oltvai Z.N., Millman C.L., Korsmeyer S.J.** Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* (1993) **74**: 609-619.
- Olverman H.J., Jones A.W., Mewett K.N., Watkins J.C.** Structure/activity relations of N-methyl-D-aspartate receptor ligands as studied by their inhibition of [³H]D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid binding in rat brain membranes. *Neurosci.* (1988) **26**: 17-31.
- Omri B., Crisanti P., Marty M., Alliot F., Fagard R., Molina T., Pessac B.** The Lck tyrosine kinase is expressed in brain neurons. *J. Neurochem.* (1996) **67**: 1360-1364.
- Onodera H., Kogure K., Ono Y., Igarashi K., Kiyota Y., Nagaoka A.** Proto-oncogene c-fos is transiently induced in the rat cerebral cortex after forebrain ischemia. *Neurosci. Lett.* (1989) **98**: 101-104.
- Onodera H., Sato G., Kogure K.** Lesions to schaffer collaterals prevent ischaemic death of CA1 pyramidal cells. *Neurosci. Lett.* (1986) **68**: 169-174.
- Oppenheim R.W.** Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* (1991) **14**: 453-501.
- Orrenius S. and Nicotera P.** The calcium ion and cell death. *J. Neural Transm.* (1994) **43**: 1-11.
- Ostwald K., Hagberg H., Andiné P., Karlsson J.O.** Upregulation of calpain activity in neonatal rat brain after hypoxic-ischemia. *Brain Res.* (1993) **630**: 289-294.
- Panchision D.M., Gerwin C.M., DeLorenzo R.J., Jakoi E.R.** Glutamate receptor activation regulates mRNA of both transcriptional and posttranscriptional levels. *J. Neurochem.* (1995) **65**: 969-977.
- Papas S., Grépel V., Hasboun D., Chinestera P., Ben-Ari Y.** Cycloheximide reduces the effects of anoxic insult in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* (1992) **4**: 758-765.

Park D.S., Stefanis L., Yan C.Y.I., Farinelli S.E., Greene L.A. Ordering the cell death pathway. Differential effects of BCL-2, an interleukin-1-converting enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells. *J. Biol. Chem.* (1996) 271 (36): 21898-21905.

Park D.S., Morris E.J., Stefanis L., Troy C.M., Shelanski M.L., Geller H.M., Greene L.A. Multiple pathways of neuronal death induced by DNA-damaging agents, NGF deprivation, and oxidative stress. *J. Neurosci.* (1998) 18(3): 830-840.

Paschen W. Comparison of biochemical disturbances in hippocampal slices of gerbil and rat during and after in vitro ischemia. *Neurosci. Lett.* (1995) 199: 41-44.

Paschen W. and Djuricic B. Comparison of in vitro ischemia-induced disturbances in energy metabolism and protein synthesis in the hippocampus of rats and gerbils. *J. Neurochem.* (1995) 65: 1692-1697.

Patel A.J., Sanfeliu C., Hunt A. Development and regulation of excitatory amino acid receptors involved in the release of arachidonic acid in cultured hippocampal neural cells. *Dev. Brain Res.* (1990) 57: 55-62.

Pearigen P., Gwinn R., Simon R.P. The effects in vivo of hypoxia on brain injury. *Brain Res.* (1996) 725: 184-191.

Pedata F., Latini S., Pazzagli M., Pepeu G. Adenosine outflow from hippocampal slices evoked by ischemic-like conditions: effect of the excitatory amino-acid antagonists. *Drug Dev. Res.* (1993) 28: 395-398.

Pelligrini-Giampietro D.E., Bennett M., Zukin S. Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991) 88: 4157-4161.

Pelligrini-Giampietro D.E., Pulsinelli W.A., Zukin R.S. NMDA and non-NMDA receptor gene expression following global brain ischemia in rats: effect of NMDA and non-NMDA receptor antagonists. *J. Neurochem.* (1994) 62: 1067-1073.

Penn L.J., Brooks M.W., Laufer E.M., Land H. Negative autoregulation of c-myc transcription. *EMBO J.* (1990) 9: 1113-1121.

Penning D.H., Goh J.W., El Beheiry H., Brien J.F. Effect of hypoxia on glutamate efflux and synaptic transmission in the guinea pig hippocampus. *Brain Res.* (1993) 620: 301-304.

Pennypacker K.R., Thai L., Hong J.S., McMillian M.K. Prolonged expression of AP-1 transcription factors in the rat hippocampus after systemic kainate treatment. *J. Neurosci.* (1994) 14(7): 3998-4006.

- Peterson C.L., Thompson M.A., Martin D., Nadler J.V.** Modulation of aspartate and glutamate release from slices of hippocampal area CA1 by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *J. Neurochem.* (1995) **64**: 1152-1160.
- Pittman R.N., Wang S., Di Benedetto A.J., Mills J.C.** A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J. Neurosci.* (1993) **13**: 3669-3680.
- Polla B.S., Kantengwa S., François D., Salvioli S., Franceschi C., Marsac C., Cossarizza A.** Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1996) **93 (13)**: 6458-6463.
- Popovici T., Represa A., Crépel V., Barbin G., Beaudoin M., Ben-Ari Y.** Effects of kainic acid-induced seizures and ischemia on c-fos-like proteins in rat brain. *Brain Res.* (1990) **536**: 183-194.
- Portera-Cailliau C., Price D.L., Martin L.J.** N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies. *J. Neurochem.* (1996) **66**: 692-700.
- Portera-Cailliau C., Price D.L., Martin L.J.** Excitotoxic neuronal death in the immature brain is an apoptosis-necrosis morphological continuum. *J. Comp. Neurol.* (1997) **378**: 70-87.
- Prabhakar N.R., Shenoy B.C., Simonson M.S., Cherniack N.S.** Cell selective induction and transcriptional activation of immediate early genes by hypoxia. *Brain Res.* (1995) **697**: 266-270.
- Pratt J., Rataud J., Bardot F.** Neuroprotective actions of Riluzole in rodent models of global and focal cerebral ischaemia. *Neurosci. Lett.* (1992) **140**: 225-230.
- Prendergast G.C., Lawe D., Ziff E.B.** Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and Ras cotransformation. *Cell* (1991) **65**: 395-407.
- Prywes R. and Roeder R.G.** Purification of the c-fos enhancer binding protein. *Mol. Cell. Biol.* (1987) **7**: 3482-3489.
- Pulsinelli W., Brierley J.B., Plum F.** Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.* (1982) **11**: 491-498.
- Pulsinelli W.A. and Brierley J.B.** A new model of bilateral hemispheric ischaemia in the unanaesthetized rat. *Stroke* (1979) **10**: 499-509.
- Raff M.C.** Social controls of cell survival and cell death. *Nature* (1992) **356**: 345-348.

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

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

Rataud J., Debarnot F., Mary V. Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convulsions in rodents. *Neurosci. Lett.* (1994) **172**: 19-23.

Rauscher F.J., Cohen D.R., Curran T., Bos T.J., Vogt P.K., Bohmann D., Tjian R., Franza B.R.J. Fos-associated protein is the product of the jun proto-oncogene. *Science* (1988a) **240**: 1010-1016.

Rauscher F.J., Voulalas P.J., Franza B.R.J., Curran T. Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: Reconstitution in vitro. *Genes Dev.* (1988b) **2**: 1687-1699.

Regan R.F., Panter S.S., Witz A., Tilly J.L., Giffard R.G. Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. *Brain Res.* (1995) **705**: 188-198.

Reh fuss R.P., Walton K.M., Coriaux M.M., Goodman R.H. The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J. Biol. Chem.* (1991) **266**: 18431-18434.

Renz M., Verrier B., Kurz C., Müller R. Chromatin association and DNA binding properties of the c-fos proto-oncogenes product. *Nucleic Acids Res.* (1987) **15**: 277-292.

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

Ricci G.F., Mecarelli O., De Feo M.R. Ontogenesis of GABAergic and glutamatergic receptors in the developing brain. *Neonatal seizures*. Wasterlain CG, Vert P, editors. New York, Raven Press (1990) pp. 209-220.

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

Roche E. and Prentki M. Calcium regulation of immediate-early response genes. *Cell Calcium* (1994) **16**: 331-338.

Rosenbaum D.M., Michaelson M., Batter D.K., Doshi P., Kessler J.A. Evidence for hypoxia-induced, programmed cell death of cultured neurons. *Ann. Neurol.* (1994) **36**: 864-870.

- Rothman S.M.** Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* (1983) **220**: 536-537.
- Rothman S.M.** Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J. Neurosci.* (1984) **4**: 1884-1891.
- Rothstein J.D., Jin L., Dykes-Hoberg M., Kuncl R.W.** Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1993) **90**: 6591-6595.
- Ruppert C. and Wille W.** Proto-oncogene c-fos is highly induced by disruption of neonatal but not of mature brain tissue. *Mol. Brain Res.* (1987) **2**: 51-56.
- Ryder K., Lanahan A., Perez-Albuerne E., Nathans D.** Jun-D: A third member of the Jun gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1989) **86**: 1500-1503.
- Ryder K., Lau L.F., Nathans D.** A gene activated by growth factors is related to the oncogene v-jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1988) **885**: 1487-1491.
- Sagar S.M., Sharp F.R., Curran T.** Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* (1988) **240**: 1328-1331.
- Sahai S.** Glutamate in the mammalian CNS. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* (1990) **240**: 121-133.
- Sakamuro D., Elliott K.J., Wechsler-Reya R., Prendergast G.C.** Bin1 is a novel Myc-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nature Genet.* (1996) **14**: 69-77.
- Sakamuro D., Eviner V., Elliott K.J., Showe L., White E., Prendergast G.C.** c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene* (1995) **11**: 2411-2418.
- Sanchez-Prieto J. and Gonzalez P.** Occurrence of a large Ca²⁺-independent release of glutamate during anoxia in isolated nerve terminals (synaptosomes). *J. Neurochem.* (1988) **50**: 1322-1324.
- Sanderson C. and Murphy S.** Glutamate binding in the rat cerebral cortex during ontogeny. *Dev. Brain Res.* (1982) **2**: 329-339.
- Sassone-Corsi P., Ransone L., Verma I.M.** Cross-talk in signal transduction: TPA-inducible factor jun/AP-1 activates cyclic AMP-responsive elements. *Oncogene* (1990) **5**: 427-431.
- Sassone-Corsi P., Sisson J., Verma I.** Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* (1988) **334**: 314-319.

- Scatton B.** The NMDA receptor complex. *Fundam. Clin. Pharmacol.* (1993) 7: 389-400.
- Shankaran S., Woldt E., Koedke T., Bedard M.P., Nandyal R.** Acute neonatal morbidity and long-term central nervous system sequelae of perinatal asphyxia in term infants. *Early human Dev.* (1991) 25: 135-148.
- Schoepp D., Bockaert J., Sladeczek F.** Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* (1990) 11: 508-515.
- Schoepp D. and Conn P.J.** Metabotropic glutamate receptor in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* (1993) 14: 13-20.
- Schurr A., Payne R.S., Rigor B.M.** Protection by MK-801 against hypoxia-, excitotoxin-, and depolarisation-induced neuronal damage in vitro. *Neurochem. Int.* (1995) 26 (5): 519-525.
- Schurr A. and Rigor B.M.** The mechanism of neuronal resistance and adaptation to hypoxia. *FEBS Lett.* (1987) 224: 4-8.
- Schurr A. and Rigor B.M.** The mechanism of cerebral hypoxic-ischemic damage. *Hippocampus* (1992) 2: 221-228.
- Schutte J., Viallet J., Nau M., Segal S., Fedorko J., Minna J.** Jun-B inhibits and c-Fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* (1989) 59: 987-997.
- Schwarzschild M.A., Cole R.L., Hyman S.E.** Glutamate, but not dopamine, stimulates stress-activated protein kinase and AP-1-mediated transcription in striatal neurons. *J. Neurosci.* (1997) 17: 3455-3466.
- Seko Y., Takahashi N., Tobe K., Kadowaki T., Yazaki Y.** Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate p65PAK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and stress-activated protein kinase (SAPK) in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1997) 239 (3): 840-844.
- Setoyama C., Frunzio R., Liau G., Mudryj M., de Crombrughe B.** Transcription activation encoded by the v-fos gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) 83: 3213-3217.
- Sharp J.W., Sagar S.M., Hisanaga K., Jasper P., Sharp F.R.** The NMDA receptor mediates cortical induction of fos and fos-related antigens following cortical injury. *Exp. Neurol.* (1990) 109: 323-332.
- Sheng M., Cummings J., Roldan L.A., Jan Y.N., Jan L.Y.** Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* (1994) 368: 144-147.

Sheng M., Dougan S.T., McFadden G., Greenberg M. Calcium and growth factor pathways of c-fos transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* (1988) 8: 2787-2796.

Sheng M. and Greenberg M.E. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* (1990) 4: 477-485.

Sheng M., McFadden G., Greenberg M.E. Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* (1990) 4 : 571-582.

Sher P.K. Chronic hypoxia in neuronal cell culture: metabolic consequences. *Brain Dev.* (1990) 12: 293-300.

Sher P.K. and Hu S. Neuroprotective effects of graded reoxygenation following chronic hypoxia in neuronal cell cultures. *Neuroscience* (1992) 47: 979-984.

Shi L., Nishioka W.K., Th'ng J., Bradbury E.M., Litchfield D.W., Greenberg A.H. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. *Science* (1994) 263: 1143-1145.

Shi Y., Glynn J.M., Guilbert L.J., Cotter T.G., Bissonnette R.P., Green D.R. Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science* (1992) 257: 212-217.

Shigeno T., Yamasaki Y., Kato G., Kusaka K., Mima T., Takakura K., Graham D.I. Reduction of delayed neuronal death by inhibition of protein synthesis. *Neurosci. Lett.* (1990) 120: 117-119.

Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Waguri S., Uchiyama Y., Matsuda H., Tsujimoto Y. Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* (1996) 13: 21-29.

Siesjö B.K. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1981) 1: 155-185.

Sikora E., Grassilli E., Radziszewska E., Bellesia E., Barbieri D., Franceschi C. Transcription factors DNA-binding activity in rat thymocytes undergoing apoptosis after heat-shock or dexamethasone treatment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1993) 197: 709-715.

Simon R.P., Swan J.H., Griffiths T., Meldrum B.S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischaemic brain damage in the brain. *Science* (1984) 226: 850-852.

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

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

Sluss H.K., Barrett T., Dérijard B., Davis R.J. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* (1994) **14** (12): 8376-8384.

Small D.L., Monette R., Chakravarthy B.R., Durkin J.P., Barbe G., Mealing G., Morley P., Buchan A.M. Mechanisms of 1S,3R-trans-ACPD-induced neuroprotection in rat hippocampal slices exposed to *in vitro* ischemia. *Neuropharmacol.* (1996) **35**: 1037-1048.

Smart J.L. Critical periods in brain development. *Ciba Foundation Symposium* (1991) **156**: 109-128.

Smeyne R.J., Vendrell M., Hayward M.D., Baker S.J., Miao G.G., Schilling K., Robertson L.M., Curran T., Morgan J.I. Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. *Nature* (1993) **363**: 166-169.

Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* (1994) **76**: 959-962.

Sonnenberg J.L., Macgregor-Leon P.F., Curran T., Morgan J.I. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizures. *Neuron* (1989) **3**: 359-365.

Spector R.G. Water content of the immature rat brain following cerebral anoxia and ischaemia. *Br. J. Exp. Pathol.* (1962) **43**: 472-479.

Srinivasan A., Foster L.M., Testa M.P., Ord T., Keane R.W., Bredesen D.E., Kayalar C. Bcl-2 expression in neural cells blocks activation of ICE/CED-3 family proteases during apoptosis. *J. Neurosci.* (1996) **16**: 5654-5660.

Stein D.T. and Vannucci R.C. Calcium accumulation during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1988) **8**: 834-842.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* (1995) **267**: 1445-1449.

Strasser A., Harris A.W., Jacks T., Cory S. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* (1994) **79**: 329-339.

Tagliatela G., Robinson R., Perez-Polo J.R. Inhibition of nuclear factor kappa B (NFκB) activity induces NGF-resistant apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* (1997) 47: 155-162.

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

Takei N. and Endo Y. Ca²⁺ ionophore-induced apoptosis on cultured embryonic rat cortical neurons. *Brain Res.* (1994) 652: 65-70.

Tamatani M., Ogawa S., Niitsu Y., Tohyama M. Involvement of Bcl-2 family and Caspase-3-like protease in NO-mediated neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* (1998) 71: 1588-1596.

Tamura A., Graham D.I., McCulloch J., Teasdale T.M. Focal cerebral ischaemia in the rat. I. Description of technique and early neuropathological consequences following median cerebral artery occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* (1981) 1: 53-60.

Tanaka M., Ito H., Adachi S., Akimoto H., Nishikawa T., Kasajima T., Marumo F., Hiroe M. Hypoxia induces apoptosis with enhanced expression of Fas antigen messenger RNA in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ. Res.* (1994) 75: 426-433.

Taniguchi T., Fukunaga R., Matsuoka Y., Kazuhiro T., Tooyama I., Kimura H. Delayed expression of c-fos protein in rat hippocampus and cerebral cortex following transient *in vivo* exposure to hypoxia. *Brain Res.* (1994) 640: 119-125.

Tombaugh G.C. Mild acidosis delays hypoxic spreading depression and improves neuronal recovery in hippocampal slices. *J. Neurosci.* (1994) 14: 5635-5643.

Tominaga T., Kure S., Narisawa K., Yoshimoto T. Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain Res.* (1993) 608: 21-26.

Towbin J., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1979) 76: 4350-4354.

Towfighi J., Yager J., Housman C., Vannucci R.C. Neuropathology of remote hypoxic-ischemic damage in the immature rat. *Acta Neuropathol.* (1991) 81: 578-587.

Towfighi J., Zec N., Yager J., Housman C., Vannucci R.C. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. *Acta Neuropathol.* (1995) 90: 375-386.

Treisman R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell* (1985) 42: 889-902.

Treisman R. Identification of a protein-binding site that mediates transcriptional response of the c-fos gene to serum factors. *Cell* (1986) **46**: 567-574.

Treisman R. Identification and purification of a polypeptide that binds the c-fos serum response element. *EMBO J.* (1987) **6**: 2711-2717.

Tremblay E., Roisin P.M., Represa A., Chariat-Marlangue C., Ben-Ari Y. Transient increased density of NMDA binding sites in the developing rat hippocampus. *Brain Res.* (1988) **461**: 393-396.

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

Uehara Y., Ono T., Kurishita A., Kokuryu H., Okada S. Age-dependent and tissue-specific changes of DNA methylation within and around the c-fos gene in mice. *Oncogene* (1989) **4**: 1023-1028.

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

Uemura Y., Kowall N.W., Moskowitz M.A. Focal ischemia in rats causes time dependence expression of c-fos protein immunoreactivity in wide spread region of ipsilateral cortex. *Brain Res.* (1991b) **552**: 99-105.

Urban J.L., Shepard H.M., Rothstein J.L., Sugarman B.J., Schreiber H. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) **83**: 5233-5237.

Uto A., Dux E., Kusumoto M., Hossmann K.A. Delayed neuronal death after brief histotoxic hypoxia in vitro. *J. Neurochem.* (1995) **64**: 2185-2192.

Vaccarino F.M., Guidotti A., Costa E. Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1987) **84**: 8707-8711.

Vaccarino F.M., Hayward M.D., Le H.N., Hartigan D.J., Duman R.S., Nestler E.J. Induction of immediate early genes by cyclic AMP in primary cultures of neurons from rat cerebral cortex. *Mol. Brain Res.* (1993) **19**: 76-82.

Vaux D.L. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1993) **90**: 786-789.

Verheij M., Bose R., Lin X.H., Yao B., Jarvis W.D., Grant S., Birrer M.J., Szabo E., Zon L.I., Kyriakis J.M., Haimovitz-Friedman A., Fuks Z., et al. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signaling in stress-induced apoptosis. *Nature* (1996) **380**: 75-79.

Verrecchia C., Buisson A., Lakhmeche N., Plotkine M., Boulu R.G. Nitric oxide and cerebral ischemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1994) **738**: 341-347.

Vierck C.J. and Meier G.W. Effects of prenatal hypoxia upon locomotor activity of the mouse. *Exp. Neurol.* (1963) **7**: 418-425.

Virdee K., Bannister A.J., Hunt S.P., Tolkovsky A.M. Comparison between the timing of JNK activation, c-Jun phosphorylation, and onset of death commitment in sympathetic neurones. *J. Neurochem.* (1997) **69**: 550-561.

Volpe J.J. Neurology of the newborn. 3th ed. Philadelphia; W.B. Saunders Company; (1995).

Wahl P., Honoré T., Drejer J., Schousboe A. Development of binding sites for excitatory amino acids in cultured cerebral cortex neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* (1991) **9**: 287-296.

Wahl P., Obrénovitch T.P., Hardy A.M., Plotkine M., Boulu R., Symon L. Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency. *J. Neurochem.* (1994) **63**: 1003-1011.

Wahl P., Schousboe A., Honoré T., Drejer J. Glutamate-induced increase in intracellular Ca²⁺ in cerebral cortex neurons is transient in immature cells but permanent in mature cells. *J. Neurochem.* (1989) **53**: 1316-1319.

Walker P.R. and Sikorska M. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* (1997) **75**: 287-299.

Walkinshaw G. and Waters C.M. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience* (1994) **63**: 975-987.

Watanabe M., Inoue Y., Sakimura K., Mishina M. Developmental changes in distribution of NMDA-receptor channel subunit mRNAs. *NeuroReport* (1992) **3**: 1138-1140.

Weiss S., Pin J.P., Sebben M., Kemp D.E., Sladeszek F., Gabrion J., Bockaert J. Synaptogenesis of cultured striatal neurons in serum-free medium: a morphological and biochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1986) **83**: 2238-2242.

Wenzel A., Fritschy J.M., Mohler H., Benke D. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J. Neurochem.* (1997) **68**: 469-478.

Wenzel A., Scheurer L., Künzi R., Fritschy J.M., Mohler H., Benke D. Distribution of NMDA receptor subunit proteins NR2A-D in rat brain. *NeuroReport* (1995) **7**: 45-48.

Wenzel A., Villa M., Mohler H., Benke D. Developmental and regional expression of NMDA receptor subtypes containing the NR2D subunit in rat brain. *J. Neurochem.* (1996) **66**: 1240-1248.

Wessel T.C., Joh T.H., Volpe B.T. In situ hybridization analysis of c-fos and c-jun expression in the rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res.* (1991) **567**: 231-240.

Wilson R.E. and Sutherland R.M. Enhanced synthesis of specific proteins, RNA, and DNA caused by hypoxia and reoxygenation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* (1989) **16** (4): 957-961.

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

Wisden W. and Seeburg P. Mammalian ionotropic glutamate receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* (1993) **3**: 291-298.

Wolvetang E.J., Johnson K.L., Kramer K., Ralph S.J., Linnane A.W. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Lett.* (1994) **339**: 40-44.

Wood K.A. and Youle R.J. The role of free radicals and p53 in neuron apoptosis in vivo. *J. Neurosci.* (1995) **15**(8): 5851-5857.

Wu X., Bishopric N., Disher D., Murphy B., Webster K. Physical and functional sensitivity of zinc-finger transcription factor to redox changes. *Mol. Cell. Biol.* (1996) **16**: 1035-1046.

Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* (1980) **284**: 555-556.

Xia Y. and Haddad G.G. Voltage-sensitive Na⁺ channels increase in number in newborn rat brain after *in utero* hypoxia. *Brain Res.* (1994) **635**: 339-344.

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R.J., Greenberg M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* (1995) **270**: 1326-1331.

- Xia Z., Dudek H., Miranti C.K., Greenberg M.E.** Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J. Neurosci.* (1996) **16** (17): 5425-5436.
- Xiong Y., Hannon G.J., Zhang H., Casso D., Kobayashi R., Beach D.** p21 is a universal inhibitor of cyclin dependent kinases. *Nature* (1993) **366**: 701-704.
- Yamamoto K., Gonzales G., Biggs W., Montimy M.** Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* (1988) **334**: 494-498.
- Yanagihara T.** Experimental stroke in gerbils: effect on translation and transcription. *Brain Res.* (1978) **158**: 435-444.
- Yang D.D., Kuan C., Whitmarsh A.J., Rincon M., Zheng T.S., Davis R.J., Pakic P., Flavell R.A.** Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* (1997) **389**: 865-870.
- Yavin E. and Yavin Z.** Attachment and culture of dissociated cells from rat embryo cerebral hemispheres on polylysine coated surface. *J. Cell. Biol.* (1974) **62**: 540-546.
- Yin T., Sandhu G., Wolfgang C.D., Burrier A., Webb R.L., Rigel D.F., Hai T., Whelan J.** Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J. Biol. Chem.* (1997) **272** (32): 19943-19950.
- Yonish-Rouach E., Deguin V., Zaitchouk T., Breugnot C., Mishal Z., Jenkins J.R., May E.** Transcriptional activation plays a role in the induction of apoptosis by transiently transfected wild-type p53. *Oncogene* (1995) **11**: 2197-2205.
- Young A.B. and Fagg G.E.** Excitatory amino acid receptors in the brain: membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *TIPS Special Report* (1991): 18-24.
- Younkin D.P.** Hypoxic-ischemic brain injury of the newborn. Statement of the problem and overview. *Brain Pathol.* (1992) **2**: 209-210.
- Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H.M., Horritz H.R.** The *C.elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell* (1993) **75**: 641-652.
- Zerial M., Toschi L., Ryseck R.P., Schuemann M., Müller R., Bravo R.** The product of a novel growth factor activated gene, *fosB*, interacts with Jun proteins enhancing their DNA binding activity. *EMBO J.* (1989) **8**: 805-813.
- Zhang Y. and Miller C.A.** Expression of the c-Jun N-terminal kinases (JNKs) in the human central nervous system (CNS) and identification of a novel substrate for the JNKs. *Society for Neuroscience* (1997) **23**: 556.4. *Abstract*.

Zhang Y., Zhou L., Miller C.A. A splicing variant of a death domain protein that is regulated by a mitogen-activated kinase is a substrate for c-Jun N-terminal kinase in the human central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1998) **95**: 2586-2591.

Zimmerman K.A. and Alt F.W. Expression and function of myc family genes. *Crit. Rev. Oncog.* (1990) **2**: 75-95.

Zimmerman K.A., Yancopoulos G.D., Collum R.G., Smith R.K., Kohl N.E., Denis K.A., Nau M.M., Witte O.N., Toran-Allerand D., Gee C.E., Minna J.D., Alt F.W. Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature* (1986) **319**: 780-783.



Nom, Prénom : C H I H A B Rifki

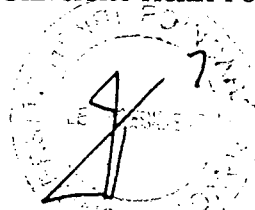
Nature de la thèse :

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

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 23 novembre 1998 n° 116

Le Président de l'Université-Henri Poincaré, Nancy 1



Jean Pierre FINANCE

Résumé

En dépit des progrès en obstétrique et néonatalogie, l'encéphalopathie hypoxique-ischémique périnatale demeure une situation pathologique majeure à l'origine d'événements métaboliques et hémodynamiques aux répercussions immédiates et à long terme. La suractivation des récepteurs glutamatergiques causée par la libération excessive du glutamate est un des mécanismes proposés dans la médiation des dommages hypoxiques-ischémiques. Cependant, le rôle de cet acide aminé excitateur dans les conséquences de l'hypoxie est aujourd'hui discuté. Un des objectifs de notre travail était d'évaluer la contribution de l'excitotoxicité liée au glutamate aux désordres cérébraux engendrés par un épisode hypoxique. L'hypoxie serait plus délétère chez le nouveau-né à terme que chez le prématuré et il a été rapporté que les animaux jeunes résistent mieux à une privation en oxygène que les adultes. En ce sens, nous avons étudié l'influence de la maturation cellulaire sur le devenir des neurones suite à une exposition à l'hypoxie ou au glutamate. Dans un second volet, nous avons analysé la séquence d'expression de certains facteurs de transcription impliqués dans l'adaptation cellulaire et dont l'interaction avec l'ADN influence la transcription génétique et donc le devenir neuronal. Nous avons également appréhendé une des voies de signalisation, celle des JNK (c-Jun N-terminal kinases).

Les études ont été réalisées *in vitro* sur un modèle utilisant des cultures de neurones centraux issus de territoires connus pour être sensibles (hippocampe, cortex, striatum) d'embryons de rat de 14 jours. L'agression hypoxique a été provoquée pendant 6 h par incubation des neurones, utilisés à deux stades de maturation (6 jours et 13 jours), dans une atmosphère dépourvue d'oxygène (95% N₂-5% CO₂). Par ailleurs, les effets du glutamate ont été évalués par addition au milieu de culture de l'acide aminé ou d'agonistes de ses récepteurs (100 µM). Les neurones ont été étudiés immédiatement, puis 24 h et 72 h après traitement. La viabilité cellulaire a été mesurée par la méthode au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide), le métabolisme énergétique par la mesure du prélèvement de 2-D-désoxyglucose [³H] (2DG), et la synthèse protéique par l'incorporation de leucine [³H]. L'apoptose et la nécrose ont été analysées par incorporation nucléaire d'un fluorochrome, le 4,6-diamidino-2-phénylindole (DAPI).

Les résultats montrent que la viabilité et les caractéristiques fonctionnelles des neurones de 6 jours n'ont pas été altérées par l'exposition au glutamate ou à ses analogues. Par contre, leur sensibilité à l'hypoxie s'est traduite par un hypermétabolisme transitoire, une augmentation biphasique de la synthèse protéique et par le développement d'un phénomène d'apoptose, lequel a été pratiquement aboli par un traitement avec un inhibiteur de la synthèse protéique, la cycloheximide (CHX, 1 µM). A ce stade, les neurones deviennent toutefois vulnérables au glutamate lorsqu'ils ont été traités par un inhibiteur de la protéine kinase C (staurosporine, 30 nM). Dans les cultures de neurones de 13 jours, l'hypoxie a induit une faible augmentation de l'apoptose (8,2%), tandis que le taux de nécrose atteignait 22,3%, 72 h après exposition. Le glutamate a réduit durablement le métabolisme énergétique dès la fin de l'exposition (26%). Alors que sous l'effet du glutamate, le taux d'apoptose est resté identique à celui des témoins, le pourcentage de nécrose a augmenté sensiblement pour atteindre 40,7% à 72 h après exposition. L'inhibition soutenue de la synthèse protéique et l'absence d'effet protecteur de la CHX confirment les résultats obtenus avec le DAPI. En outre, le traitement des neurones de 13 jours par des antagonistes des récepteurs NMDA et non-NMDA (respectivement MK-801 et NBQX, 10 µM) les a protégés de la nécrose induite par le glutamate et l'hypoxie.

Ainsi, les neurones "immatures", bien qu'ils possèdent un système glutamatergique fonctionnel, sont résistants à la toxicité du glutamate alors qu'ils sont sensibles à l'hypoxie. La perte de l'activité de la protéine kinase C semble être un processus nécessaire pour médier l'excitotoxicité. En revanche, dans les neurones "plus matures", les effets de l'hypoxie ne correspondent pas exactement à ceux engendrés par le glutamate, tandis que la composante nécrotique de l'hypoxie serait médiée par ce dernier.

L'apoptose se développe via un programme dépendant de la synthèse de macromolécules et implique l'expression de gènes capables de réguler les événements associés à la mort cellulaire. Sur les cultures de neurones de 6 jours, nous avons analysé par immunohistochimie et western blotting les effets de l'hypoxie/réoxygénation sur l'expression des protéines de la famille Myc (c-Myc, Max et Mad1) ainsi que celles liées au complexe nucléoprotéique AP-1, à savoir c-Fos, c-Jun, Jun B et Jun D.

Alors que l'expression de Max n'a pas été altérée au cours de l'hypoxie/réoxygénation, celle de c-Myc a été réprimée jusqu'à 96 h post-réoxygénation suggérant que cette protéine ne jouerait pas un rôle actif dans la mort neuronale induite par l'hypoxie. L'expression des produits protéiques qui composent le complexe AP-1 a subi des variations séquentielles, à l'exception de c-Jun dont l'expression a été augmentée de façon soutenue tout au long de l'étude. L'activité de liaison du complexe AP-1 a été détectée dans les neurones en culture. Par conséquent, les modifications dynamiques de la composition d'AP-1 et l'induction persistante de c-Jun pourraient être impliquées dans la mort neuronale retardée d'origine hypoxique. Par ailleurs, l'expression constitutive de JNK1 a diminué durant l'hypoxie pour ensuite augmenter transitoirement à 48 h après réoxygénation, ceci parallèlement à l'apparition de JNK3 et des premiers signes d'apoptose.

L'activation retardée de JNK1 et JNK3 couplée à l'expression soutenue de c-Jun suggèrent l'implication de la voie JNK dans la signalisation cellulaire entraînant l'apoptose induite par une hypoxie transitoire dans les neurones du cerveau en développement.

Mots clés : cultures de neurones - développement - hypoxie/réoxygénation - excitotoxicité - apoptose - nécrose - facteurs de transcription - c-Jun N-terminal kinases - protéine kinase C