



**HAL**  
open science

# Induction de signaux calciques dans les cellules gliales de la substance noire réticulée par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique

Céline Bouyssières

## ► To cite this version:

Céline Bouyssières. Induction de signaux calciques dans les cellules gliales de la substance noire réticulée par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00414218

**HAL Id: tel-00414218**

**<https://theses.hal.science/tel-00414218>**

Submitted on 10 May 2010

**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.

Thèse de l'Université Joseph Fourier, Grenoble  
Spécialité : Neurosciences

Pour obtenir le grade de Docteur de L'université Joseph Fourier

# Induction de signaux calciques dans les cellules gliales de la substance noire réticulée par la stimulation électrique du noyau sous- thalamique

**Céline BOUYSSIERES**

Soutenue publiquement le 28 Janvier 2009 devant le jury composé de :

Mr Rémy SADOUL,	Président du Jury
Mme Lydia KERKERIAN-LE GOFF,	Rapporteur
Mr Laurent VENANCE,	Rapporteur
Mr Michel DESARMENIEN,	Examineur
Mr Marc SAVASTA,	Examineur
Mme Mireille ALBRIEUX,	Directeur de Thèse

## Sommaire

Abréviations.....	1
Préambule.....	3
Contexte scientifique.....	5
<b>I. Ganglions de la base</b> .....	<b>5</b>
1. <i>Anatomie des ganglions de la base</i> .....	6
1.1 <i>Le striatum</i> .....	6
1.1.1 <i>Les neurones striataux</i> .....	6
1.1.2 <i>Les systèmes afférents</i> .....	7
1.2 <i>Le Globus pallidus</i> .....	8
1.2.1 <i>Les neurones pallidaux</i> .....	8
1.2.2 <i>Afférences et efférences du globus pallidus</i> .....	8
1.3. <i>Le noyau sous-thalamique</i> .....	9
1.3.1 <i>Localisation et organisation fonctionnelle</i> .....	9
1.3.2 <i>Organisation cellulaire</i> .....	10
1.3.3 <i>Afférences et efférences du noyau sous-thalamique</i> .....	10
1.4. <i>La substance noire réticulée</i> .....	12
1.4.1 <i>Localisation et organisation fonctionnelle</i> .....	12
1.4.2 <i>Organisation cellulaire neuronale</i> .....	12
1.4.3 <i>Afférences et efférences de la substance noire réticulée</i> .....	15
1.5. <i>Connexions entre noyau sous-thalamique et substance noire réticulée</i> ...16	
2. <i>Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base et maladie de Parkinson</i> .....	17
2.1. <i>Le schéma « classique » des ganglions de la base</i> .....	18
2.1.1 <i>En situation physiologique</i> .....	18
2.1.2 <i>En situation pathologique</i> .....	19
2.2. <i>Réactualisation du schéma « classique »</i> .....	21
3. <i>Traitements de la maladie de Parkinson</i> .....	24
3.1. <i>Traitements pharmacologiques</i> .....	24
3.2. <i>Les traitements chirurgicaux</i> .....	25

3.2.1 Les thérapies lésionnelles .....	25
3.2.2. La stimulation cérébrale profonde .....	26
4. Noyau sous-thalamique et troubles du mouvement .....	29
4.1. Noyau sous-thalamique, hémiballisme et dyskinésies .....	29
4.2. Noyau sous-thalamique et maladie de Parkinson .....	30
4.3. Noyau sous-thalamique et stimulation électrique à haute fréquence: un traitement de la maladie de Parkinson .....	30
5. Conséquences de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique sur l'activité de la substance noire réticulée.....	33
<b>II. Communication neurone-glie.....</b>	<b>36</b>
1. Les cellules gliales : populations et caractéristiques.....	36
1.1. Les astrocytes.....	37
1.2. Les oligodendrocytes.....	38
1.3. Les cellules microgliales.....	39
1.4. Les cellules NG2 positives.....	40
2. Acteurs potentiels impliqués dans la communication neurone-glie .....	41
2.1 Le glutamate .....	41
2.1.1 Synthèse et libération .....	41
2.1.2 Récepteurs .....	42
2.1.3 Transporteurs .....	45
2.2 Le GABA.....	47
2.2.1 Synthèse et libération .....	47
2.2.2 Récepteurs .....	48
2.2.3 Transporteurs .....	49
2.3 L'ATP.....	49
2.3.1 Synthèse et libération .....	49
2.3.2 Récepteurs .....	50
2.4 Localisation cellulaire des différents récepteurs et transporteurs .....	52
2.4.1 Les récepteurs gliaux .....	52
2.4.2 Les récepteurs neuronaux de la substance noire réticulée .....	53
3. Communication entre les cellules gliales et les cellules neuronales.....	55
3.1 Communication des cellules gliales vers les cellules gliales.....	56
3.2 La synapse tripartite.....	57
3.3 Signalisation des neurones vers les cellules gliales.....	58
3.4 Signalisation des cellules gliales vers les neurones.....	60
<b>III. Signalisation calcique.....</b>	<b>63</b>

---

1. Généralités.....	63
1.1 L'ion calcium.....	63
1.2 Les stocks calciques : le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.....	65
2. Activité calcique dans les cellules neuronales.....	66
3. Activité calcique dans les cellules gliales.....	68
<b>Objectifs.....</b>	<b>71</b>
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>73</b>
<b>I. Animaux.....</b>	<b>73</b>
<b>II. Préparation des tissus.....</b>	<b>73</b>
1. Principe du modèle utilisé : la tranche aigue de cerveau.....	73
2. Protocole expérimental.....	73
<b>III. Validation du modèle de tranche de cerveau.....</b>	<b>74</b>
1. Mesure de la viabilité cellulaire.....	74
2. Traçage de voies.....	75
<b>IV. Identification des populations cellulaires présentes dans la substance noire réticulée.....</b>	<b>75</b>
1. Marquages immunohistochimiques.....	75
2. Fixation du Fluo-4.....	77
3. Marquages des astrocytes et des progéniteurs des oligodendrocytes à l'aide d'un dipeptide.....	77
4. Détermination des pourcentages de cellules de chaque type cellulaire au sein de la substance noire réticulée.....	78
<b>V. Imagerie calcique.....</b>	<b>78</b>
1. Principe de l'imagerie calcique.....	78
2. Chargement des tranches de cerveau en sonde calcique.....	79
3. Montage expérimental.....	80
4. Protocole d'enregistrement des activités calciques.....	81
4.1 Stimulation du noyau sous-thalamique.....	82
4.2 Application d'agents pharmacologiques.....	83
4.2.1 Actions sur les récepteurs glutamatergiques.....	84

4.2.1 Actions sur les récepteurs GABAergiques .....	85
4.2.1 Actions sur les récepteurs purinergiques .....	86
5. Traitement des résultats et analyses statistiques des données expérimentales.....	86
5.1 Analyse des fichiers bruts par l'utilisation du logiciel d'analyse Calsignal .....	86
5.2 Analyse statistique des données d'imageries calciques.....	87
<b>VI. Patch-clamp.....</b>	<b>88</b>
1. Généralités.....	88
2. Technique du patch clamp.....	88
3. Montage expérimental.....	89
3.1 Matériel.....	91
3.2 Protocole Expérimental.....	91
3.3 Mesure des caractéristiques électrophysiologiques des neurones .....	92
3.4 Mesure en voltage imposé.....	93
<b>VII. Mesure de libération de glutamate par biocapteur ampérométrique.....</b>	<b>93</b>
1. Principe de fonctionnement.....	93
2. Protocole expérimental.....	94
Résultats.....	97
<b>I. Validation du modèle expérimental.....</b>	<b>97</b>
1. Traçages des voies subthalamo-nigrales.....	97
2. Mise au point de la technique d'imagerie calcique.....	99
3. Mesure de la viabilité des cellules.....	100
4. Evaluation de l'activation des cellules microgliales.....	101
<b>II. Description des différents types cellulaires présents dans la substance noire réticulée .....</b>	<b>103</b>
1. Caractérisation immunohistochimique des cellules présentes au niveau de la substance noire réticulée.....	103
1.1 Les cellules neuronales.....	103
1.2 Les cellules gliales.....	104
2. Caractérisation des populations cellulaires chargées avec la sonde calcique....	106
2.1 Les cellules neuronales chargées.....	106
2.2 Les cellules gliales chargées.....	106

<b>III. Mesure des activités calciques des cellules de la substance noire réticulée.....</b>	<b>109</b>
1. <i>La stimulation du noyau sous thalamique entraîne une activité calcique dans les cellules de la substance noire réticulée.....</i>	<i>109</i>
2. <i>Mise en évidence de l'implication de certains récepteurs et canaux exprimés par les cellules gliales de la substance noire réticulée.....</i>	<i>111</i>
3. <i>Implication des acteurs de signalisation calcique présents sur les cellules gliales dans la réponse à la stimulation électrique du noyau sous-thalamique.....</i>	<i>113</i>
<b>IV. Implication de l'ATP, du glutamate et du GABA dans la réponse calcique induite par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique.....</b>	<b>114</b>
1. <i>Vérification de la spécificité des antagonistes.....</i>	<i>114</i>
2. <i>Effet de l'inhibition des récepteurs purinergiques, glutamatergiques et GABAergiques sur les réponses calciques induites par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique.....</i>	<i>115</i>
<b>V. Etude de l'impact de l'activité des cellules gliales sur l'activité des neurones.....</b>	<b>117</b>
1. <i>Etude de la libération de glutamate dans la substance noire réticulée lors de la stimulation du noyau sous-thalamique.....</i>	<i>117</i>
2. <i>Enregistrement de l'activité électrique des neurones GABAergiques de la substance noire réticulée.....</i>	<i>119</i>
2.1 <i>Caractéristiques électrophysiologiques des populations neuronales ...</i>	<i>120</i>
2.2 <i>Enregistrement de l'activité neuronale sous stimulation électrique du noyau sous-thalamique.....</i>	<i>120</i>
Discussion.....	125
<b>I. Pertinence du modèle d'étude et intérêt de la technique d'imagerie calcique .....</b>	<b>125</b>
1. <i>Choix et validité du modèle d'étude .....</i>	<i>125</i>
2. <i>Limites et avantages de l'imagerie calcique rencontrés lors de notre étude expérimentale. ....</i>	<i>128</i>
<b>II. Caractérisation des populations cellulaires présentes au sein de la substance noire réticulée .....</b>	<b>130</b>
1. <i>Présence d'une population importante et diversifiée de cellules gliales dans la substance noire réticulée .....</i>	<i>130</i>

---

2. <i>Caractérisation fonctionnelle de certains acteurs présents au niveau des cellules gliales de la substance noire réticulée.</i> .....	131
<b>III. Réponses des cellules gliales de la substance noire réticulée suite à la stimulation électrique du noyau sous-thalamique</b> .....	<b>134</b>
1. <i>Participation du glutamate, de l'ATP et du GABA dans l'activation des cellules gliales de la substance noire réticulée lors de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique</i> .....	134
1.1 <i>Le glutamate</i> .....	134
1.2 <i>L'ATP</i> .....	135
1.3 <i>Le GABA</i> .....	136
2. <i>Mesures de l'effet de la stimulation sur la libération de glutamate et l'activité neuronale</i> .....	139
<b>IV. Perspectives : rôle des cellules gliales dans les effets de la stimulation électrique du noyau sous thalamique dans la maladie de Parkinson : un partenariat entre cellules gliales et neuronales ?</b> .....	<b>142</b>
1. <i>Ouverture possible à d'autres techniques d'imagerie</i> .....	142
2. <i>Etude de la communication entre neurones et cellules gliales</i> .....	144
3. <i>Implication des cellules gliales dans la maladie de Parkinson</i> .....	148
3.1. <i>Rôle des cellules gliales dans la maladie de Parkinson</i> .....	148
3.2. <i>Etude des effets de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique sur les cellules gliales dans un modèle de la maladie de Parkinson</i> .....	149
Conclusion.....	153
Bibliographie.....	155

**IAbréviations**

AMPA : acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique  
ATP : adénosine tri-phosphate  
ATV : aire tegmentale ventrale  
BMI : bicuculine méthiodine  
Ca<sup>2+</sup> : calcium  
Cl<sup>-</sup> : chlore  
CM/PF : complexe centro-médian préfasciculaire  
CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione  
DAPI : di-aminido phényl indol  
D-AP5 : (R)-2-amino-5-phosphonopentanoate  
DiI : 1,1'-dioctadécyl-3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate  
EAAT : transporteurs d'acides aminés excitateurs  
EP : noyau entopédunculaire  
EPSC : courant post-synaptique excitateur  
GABA : acide gamma-aminobutyrique  
GAT : transporteur du GABA  
GFAP : protéine acide fibrillaire d'origine gliale  
GLAST : transporteur glutamate/aspartate  
GLT-1 : transporteur au glutamate  
Glu : glutamate  
GP : globus pallidus  
Gpe : globus pallidus externe  
InsP<sub>3</sub> : inositol triphosphate  
K<sup>+</sup> : potassium  
LAP-3 : L-2-amino-3-phosphonopropionate  
L-DOPA : levo-dopa  
mGluR : récepteur métabotrope au glutamate  
MPTP : 1 - méthyl 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine  
Na<sup>+</sup> : sodium  
NAADP : acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate.  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
NPP : noyau pédonculo-pontin  
NST (ou STN) : noyau sous-thalamique  
RE : réticulum endoplasmique  
RyR : récepteur de la ryanodine  
SHF : stimulation haute fréquence  
SNc : substantia nigra pars compacta  
SNC : système nerveux central  
SNr : substantia nigra pars reticulata  
VGLUT : transporteur vésiculaire du glutamate  
6-OHDA : 6-hydroxydopamine



Chez l'homme, le cerveau ne compte pas moins de 100 milliards de neurones et cent fois plus de cellules gliales qui forment un réseau avec des connexions extrêmement efficaces. C'est grâce à ce formidable réseau de cellules que nous pouvons, entre autres, bouger, apprécier un bon film, tomber amoureux ou résoudre une énigme. Cependant, comme tous les organes du corps humain, le cerveau peut parfois dysfonctionner et être à l'origine de maladies neurologiques comme, par exemple, la maladie de Parkinson.

Cette maladie neurodégénérative est un modèle de dysfonctionnement cérébral qui touche un réseau de structures – les ganglions de la base – impliqué notamment dans le contrôle du mouvement. La diminution de libération de dopamine dans ces structures suite à la dégénérescence de neurones dopaminergiques, perturbe l'ensemble du réseau, modifiant les taux de neurotransmetteurs libérés (glutamate, GABA) et l'activité électrique neuronale dans différentes structures, conduisant à une modification des informations envoyées au cortex moteur. Ce dysfonctionnement est la cause des troubles du mouvement connus chez les patients parkinsoniens.

Il existe à l'heure actuelle, deux traitements médicaux principaux de cette pathologie qui reposent d'une part sur une approche pharmacologique de nature supplétive (administration de L-DOPA, précurseur de la dopamine) et d'autre part sur une approche chirurgicale qui est la stimulation cérébrale profonde à haute fréquence du noyau sous-thalamique. Cette approche thérapeutique soulève de nombreuses questions fondamentales d'ordre physiopathologique concernant les interactions entre les réseaux des neurones des différentes voies des ganglions de la base.

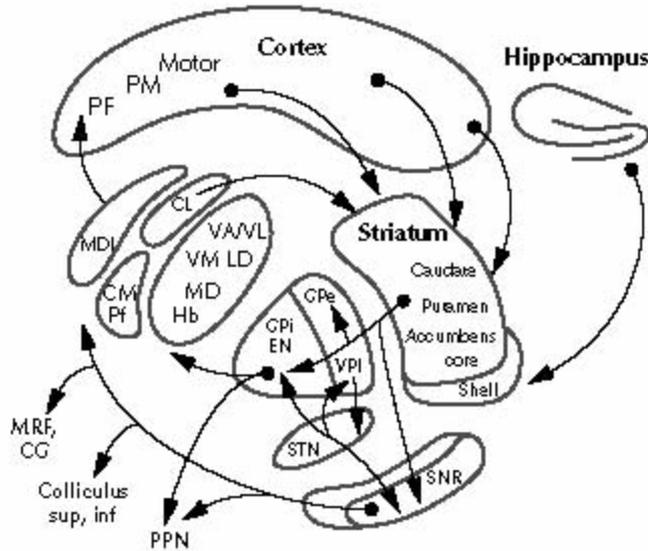
C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon sujet de thèse qui vise à aborder la question des effets de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique sous un aspect cellulaire et moléculaire, par le développement d'une approche d'imagerie calcique *in vitro*. Mon étude s'est focalisée essentiellement sur l'implication des cellules gliales et des transmetteurs libérés au sein de la SNr dans les mécanismes cellulaires qui sous-tendent les effets thérapeutiques de cette stimulation. J'ai également abordé la question du rôle des interactions neurone-glie dans la modulation des activités neuronales de la SNr par une approche électrophysiologique. L'intérêt porté aux cellules gliales a connu un essor ces dernières années et l'étude de leur fonctionnement et de leur rôle dénote l'importance de ces cellules dans la modulation de la transmission des informations entre les neurones. Je me propose de développer toutes ces notions dans la suite de ce mémoire.



## I. Ganglions de la base

Les ganglions de la base, également appelés noyaux gris centraux, forment un ensemble de structures sous-corticales anatomiquement interconnectées. Ils constituent un système majeur d'intégration, et sont impliqués dans l'initiation et la régulation de certains paramètres du mouvement (direction et amplitude) mais également dans l'apprentissage, l'exécution et la mémorisation de séquences motrices (Mink, 1996; Boraud et al., 2002). Les ganglions de la base ont longtemps été considérés comme essentiellement impliqués dans le contrôle du mouvement. Toutefois, au cours de la dernière décennie, les connaissances acquises sur leur anatomie et leurs propriétés fonctionnelles soulignent également leur implication dans des processus cognitifs, émotionnels et motivationnels, essentiels au contrôle adaptatif du comportement (Boussaoud et al., 1997; Redgrave et al., 1999). De par leurs connexions, ils traitent une diversité d'informations considérables provenant de l'ensemble du cortex cérébral, ainsi que des noyaux intra-laminaires et centraux du thalamus, de l'hippocampe et de l'amygdale. En retour, *via* les voies efférentes, les ganglions de la base contrôlent l'excitabilité du réseau du tronc cérébral prémoteur, des aires principalement motrices du cortex cérébral et du thalamus (Fig. 1). Ce dernier est lui-même connecté aux cortex moteur, prémoteur, préfrontal et, va ainsi agir en retour sur leur activité (Slaght et al., 2002). Le caractère unidirectionnel des connexions majeures impose au système une polarité fonctionnelle définie : l'information circule d'une structure d'entrée vers une structure de sortie.

Chez les rongeurs, les ganglions de la base sont constitués : du striatum (ou caudé-putamen), du noyau sous-thalamique (NST), du globus pallidus (GP ou partie externe du globus pallidus chez l'homme et le primate), du noyau entopédonculaire (EP correspondant au globus pallidus interne chez le primate) et de la substance noire composée d'une partie compacte (SNc) et d'une partie réticulée (SNr). On peut inclure en plus dans ce système, l'aire tegmentale ventrale (ATV) qui contribue à l'innervation dopaminergique du striatum dans sa partie limbique ventrale (pour revue, voir Deniau., 2003).



**Figure 1 : Les différentes structures des ganglions de la base et leur connexions.** (Pour plus de clarté, les connexions corticales et thalamiques du NST ne sont pas représentées). CG : noyau gris central; colliculus sup, inf : colliculus supérieur et inférieur; CM : noyau centro-médian du thalamus; CL : noyau centro-latéral du thalamus; EN : noyau entopédonculaire; GPe : globus pallidus externe; GPi : globus pallidus interne; Hb : habenula; LD : noyau dorso-latéral du thalamus; MD : noyau dorso-médian du thalamus; MDI : subdivision paralamellaire du noyau dorso-médian du noyau du thalamus; MRf : formation réticulée mesencéphalique; Pf : noyau parafasciculaire du thalamus; PF : cortex préfrontal; PM : cortex prémoteur; PPN : noyau pédoculo-pontin; SNR : substance noire réticulée; STN : noyau sous-thalamique; VA/VL : noyaux ventro-antérieur et ventro-latéral du thalamus; VM : noyau ventro-médian du thalamus; VPI : pallidum ventro-latéral (Slaughter et al., 2002).

thalamus; MRf : formation réticulée mesencéphalique; Pf : noyau parafasciculaire du thalamus; PF : cortex préfrontal; PM : cortex prémoteur; PPN : noyau pédoculo-pontin; SNR : substance noire réticulée; STN : noyau sous-thalamique; VA/VL : noyaux ventro-antérieur et ventro-latéral du thalamus; VM : noyau ventro-médian du thalamus; VPI : pallidum ventro-latéral (Slaughter et al., 2002).

## 1. Anatomie des ganglions de la base

### 1.1 Le striatum

#### 1.1.1 Les neurones striataux

Le striatum comprend deux grandes familles de neurones à savoir les neurones efférents, représentant 95% des neurones totaux, et les interneurones (5% des neurones striataux).

Les neurones efférents sont de taille moyenne (10 à 20  $\mu\text{m}$  de diamètre), présentant une arborisation locale importante, avec de nombreuses collatérales et portent de nombreuses épines dendritiques. Ils sont appelés « medium spiny neurons » (Smith and Bolam, 1990). Ils utilisent le GABA comme neurotransmetteur et co-expriment des neuropeptides différents selon les structures qu'ils innervent. Deux populations distinctes peuvent être mises en évidence : 1) les neurones striato-pallidaux qui expriment la glutamate décarboxylase 67 (GAD 67, enzyme de synthèse du GABA), et les enképhalines, 2) les neurones striato-nigraux et striato-entopédonculaires qui co-expriment la GAD 67, la substance P et la dynorphine.

Les interneurones striataux n'ont pas d'épines dendritiques. On distingue quatre catégories de ces neurones en fonction des neuromédiateurs qu'ils expriment : 1) les

interneurones cholinergiques (2% de la population neuronale striatale totale), 2) les interneurones GABAergiques non épineux de taille moyenne qui expriment le neuropeptide Y et la somatostatine, 3) les interneurones GABAergiques avec une arboration dendritique rayonnante qui expriment la parvalbumine, et enfin 4) les interneurones GABAergiques qui expriment la calrétinine (pour revue voir Kawaguchi et al., 1995).

### *1.1.2 Les systèmes afférents*

Le striatum reçoit une innervation massive du cortex cérébral mais aussi du thalamus, de la substance noire compacte et du noyau dorsal du raphé. Enfin, le striatum reçoit également des projections quantitativement mineures provenant de structures telles que l'amygdale, le noyau pédonculo-pontin (NPP), le NST ainsi que le globus pallidus (Veening et al., 1980; Parent, 1990). Nous ne rappellerons ici que les afférences principales : les cortico-striées, les thalamo-striées, les dopaminergiques et les sérotoninergiques.

Les afférences cortico-striées utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (pour revue voir (Fonnum, 1984)). Les terminaisons neuronales forment des synapses de type symétrique, majoritairement sur les épines des neurones striataux efférents et, de moindre façon sur les troncs dendritiques (Smith et al., 1994). L'ensemble des territoires corticaux projette de manière topographique et bilatérale sur le striatum même si la projection unilatérale est prépondérante (McGeorge and Faull, 1989).

Les afférences thalamo-striées constituent la seconde source majeure d'afférences du striatum. Elles proviennent en majorité des noyaux intralaminaires du thalamus et plus particulièrement du complexe centro-médian parafasciculaire (CM/PF) (Deschenes et al., 1995). Elles utilisent le glutamate comme neurotransmetteur et les terminaisons nerveuses forment des synapses asymétriques sur les troncs dendritiques des neurones efférents (Mouroux and Feger, 1993). Elles projettent de façon ipsilatérale sur le striatum (Berendse et al., 1990) et s'organisent selon une topographie très précise (Veening et al., 1980).

Les afférences dopaminergiques sont issues principalement de la SNc mais aussi de l'ATV ainsi que de l'aire rétro-rubrale. Les projections nigro-striées innervent principalement la partie dorsale du striatum alors que celles issues de l'ATV et l'aire rétro-rubrale innervent préférentiellement la partie ventrale. Ces afférences nigro-striées dopaminergiques respectent également une topographie précise (Veening et al., 1980) qui répond de manière adéquate à la modulation des informations corticales (Smith et al., 1994 ; Parent and Hazrati, 1995).

Les afférences sérotoninergiques sont issues du noyau dorsal du noyau raphé (pour revue Soghomonian et al., 1987). Cette innervation sérotoninergique du striatum est hétérogène et présente un gradient dorso-ventral et antéro-postérieur.

## *1.2 Le Globus pallidus*

### *1.2.1 Les neurones pallidaux*

Les neurones pallidaux sont de taille variable et utilisent le GABA comme neurotransmetteur. Ces neurones ne portent pas d'épines dendritiques et ont un soma de grande taille par rapport à ceux portant des épines (Kita and Kitai, 1994). La majorité de ces neurones GABAergiques co-expriment la GAD 67 avec la parvalbumine (Kita and Kitai, 1994).

### *1.2.2 Afférences et efférences du globus pallidus*

Les efférences pallidales projettent massivement sur le NST (Smith and Bolam, 1990). Ces projections respectent une topographie médiolatérale et rostrocaudale (Parent and Hazrati, 1995). Les axones pallidaux projettent sur les structures de sortie des ganglions de la base, l'EP et la SNr (Smith and Bolam, 1990 ; Kita and Kitai 1994). Les neurones du GP innervent également le striatum (Beckstead, 1983) ainsi que le noyau réticulaire du thalamus (Haber et al., 1985).

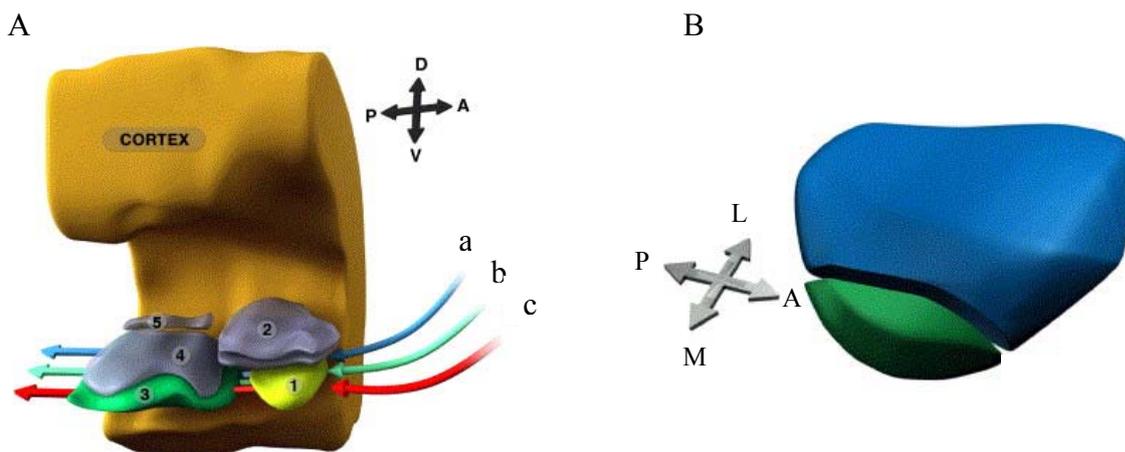
Les neurones du GP reçoivent des afférences inhibitrices GABAergiques en provenance du striatum et des afférences excitatrices glutamatergiques en provenance du NST et du CM/PF. Les projections striatales représentent la plus grosse partie des afférences du GP. Les neurones de la voie striato-pallidale co-expriment la GAD 67 et les enképhalines. Les terminaisons nerveuses striatales forment des synapses symétriques avec les neurones pallidaux (pour revue voir Parent and Hazrati, 1995). Les projections subthalamiques forment des synapses asymétriques sur les neurones pallidaux. Le GP reçoit également des afférences glutamatergiques du CM/PF du thalamus (Deschênes et al., 1996) formant des synapses asymétriques sur les neurones pallidaux. Enfin le GP reçoit des afférences dopaminergiques provenant de la SNc (Gauthier et al., 1999).

### 1.3. Le noyau sous-thalamique

Je m'attarderai davantage dans la description de cette structure puisqu'elle fait partie des structures auxquelles je me suis plus particulièrement intéressée au cours de ma thèse. Je ferai de même avec la substance noire réticulée.

#### 1.3.1 Localisation et organisation fonctionnelle

Le NST est un petit noyau fortement vascularisé qui contient une population neuronale dense, il est composé de 25 000 cellules pour un volume approximatif de 0,8 mm<sup>3</sup> chez le rat (560 000 cellules pour un volume de 240 mm<sup>3</sup> chez l'humain, Temel et al., 2005; Tan et al., 2006). Ce noyau ovoïde se situe dans la portion caudale du diencephale, entre la partie ventrale de la zona incerta et la substance noire (Fig. 2A). Il est entouré d'un paquet de fibres myélinisées composant la capsule interne.



**Figure 2 : Localisation et organisation fonctionnelle du noyau sous-thalamique chez le rat.** A) Position anatomique du NST au sein du mésencéphale de rat (représentation sagittale). Le NST (1) est relativement petit, délimité dorsalement par la zona incerta (2) et antérieurement par la substance noire divisée en deux parties : la SNr (3 en vert), la SNc (4), la SN pars lateralis faisant partie de la SNc (5). Les flèches indiquent les circuits thalamo-corticaux moteur (a), associatif (b) et limbique (c) (Temel et al., 2005). B) Subdivisions fonctionnelles du noyau sous-thalamique de rat. Le NST est subdivisé en deux : une partie sensorimotrice dorso-latérale (en bleu) et une partie limbique et associative ventro-médiane (en vert) (Tan et al., 2006).

Tout comme le striatum, le NST présente des territoires fonctionnels distincts, qui sont le reflet de l'organisation topographique de ses afférences (Groenewegen and Berendse, 1990). Chez le rat, deux parties se distinguent : la partie médiane, interconnectée avec le

pallidum ventral, correspondant aux territoires limbique et associatif des ganglions de la base, et la partie latérale, connectée avec les zones plus dorsales des ganglions de la base, correspondant aux fonctions sensorimotrices (Tan et al., 2006), (Fig. 2B).

### *1.3.2 Organisation cellulaire*

Le NST a la particularité d'être la seule structure glutamatergique des ganglions de la base. Il est composé de neurones glutamatergiques possédant un long axone de projection. La majorité des axones émerge directement des corps cellulaires dont certains forment des axones collatéraux sur les neurones sous-thalamiques voisins (Sato et al., 2000; Shen and Johnson, 2006). Ces neurones possèdent généralement 3 à 4 dendrites primaires qui se ramifient ensuite en prolongements fins partiellement recouverts d'épines dendritiques. Les ramifications dendritiques s'étendent principalement dans le plan parasagittal du noyau, le champ dendritique épouse la forme et les limites du NST. Cependant, chez le rat, certaines dendrites sortent des limites dorsales, médianes et ventrales (Hammond and Yelnik, 1983; Kita et al., 1983). On parle alors de « noyau ouvert », ce qui n'est pas le cas chez le primate ou le chat où le noyau est dit « fermé », c'est-à-dire que les dendrites restent à l'intérieur des limites anatomiques du NST (Hammond and Yelnik, 1983).

Si la majorité des neurones du NST sont glutamatergiques, il semble qu'il y ait également quelques interneurones GABAergiques présents dans ce noyau (Hassler et al., 1982) : ce sont des cellules avec moins de dendrites, plus fines et moins ramifiées. Des travaux réalisés sur l'humain en post-mortem ont permis d'isoler une faible population de cellules de taille plus petite que les neurones de projection et positives à l'immuno-marquage de la glutamine décarboxylase (GAD) spécifique des neurones GABAergiques (Levesque and Parent, 2005).

En condition physiologique, les neurones de ce noyau possèdent un patron de décharge régulier de 5 à 15 Hz (Bevan et al., 2006), avec des « bursts » d'activité irrégulière dans environ 50% d'entre eux (Magill et al., 2000).

### *1.3.3 Afférences et efférences du noyau sous-thalamique*

Les principales afférences du NST proviennent du cortex (Kitai and Deniau, 1981) et du GP (Carter and Fibiger, 1978). Il reçoit également des afférences du noyau CM/PF et du complexe centro-médian du thalamus de nature glutamatergique, des afférences en provenance de la SNc et de l'ATV de type dopaminergique, du noyau pédonculo-pontin de nature cholinergique et glutamatergique, et du raphé dorsal de nature sérotoninergique (Tan et

al., 2006). Les projections en provenance du cortex sont massives et glutamatergiques. Chez le rat, la source majeure des afférences corticales provient des cortex moteurs et somato-sensoriels primaires, du cortex préfrontal et du cortex cingulaire médian (Canteras et al., 1990). Le cortex moteur primaire projette sur toute l'étendue du NST selon une organisation rostro-caudale et médio-latérale précise (Afsharpour, 1985). Le NST reçoit également des connexions massives en provenance du GP qui sont de nature GABAergiques et qui établissent des contacts synaptiques sur l'ensemble de ses neurones (Kita and Kitai, 1994).

Concernant les efférences du NST, elles sont de nature glutamatergique excitatrice sur chacune des structures cibles. Elles se projettent principalement vers la SNr, l'EP et le GP mais également sur le striatum, la SNc et le NPP (Hammond and Yelnik, 1983; Tan et al., 2006). Les projections subthalamo-nigrales forment des synapses asymétriques essentiellement au niveau des dendrites et peu avec les corps cellulaires des neurones de la SNr (Parent and Hazrati, 1995). Une étude récente a également mis en évidence des projections du NST vers le cortex cérébral et plus précisément au niveau des aires sensori-motrice et préfrontale. Il a été proposé que cette boucle NST-cortex pourrait contribuer à la propagation de phénomènes oscillatoires pathologiques favorables à l'émergence d'activités électriques synchronisées anormales notamment dans la maladie de Parkinson ou l'épilepsie (Degos et al., 2008).

Longtemps considéré comme un simple relais dans la voie indirecte des ganglions de la base, qui est une voie reliant le striatum et les structures de sorties des ganglions de la base par l'intermédiaire de deux relais (le NST et le globus pallidus externe), le NST représente aujourd'hui une structure d'entrée directe dans ce circuit, capable d'intégrer directement les informations d'origine corticale. L'une des évolutions majeures du schéma classique d'organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base, initialement proposé par Albin et collaborateurs (1989), est de placer le NST au même niveau fonctionnel que le striatum (Albin et al., 1989), (cf Contexte Scientifique I.2.2.2). Les études récentes sur son implication dans des fonctions motrices et cognitives montrent que le NST est une structure centrale à l'intérieur des ganglions de la base et que la majorité des circuits thalamo-corticaux passent à travers ce noyau (Temel et al., 2005). Il est également de plus en plus étudié pour son implication dans les circuits limbiques et associatifs, notamment dans les processus motivationnels (Baunez et al., 2007). Son implication dans ces processus a été confirmée par des études cliniques montrant que les bénéfices moteurs engendrés par la stimulation du NST chez les patients parkinsoniens s'accompagnent de modifications comportementales fréquentes de type perte d'attention, perte de mémoire et difficulté verbale, diminution des

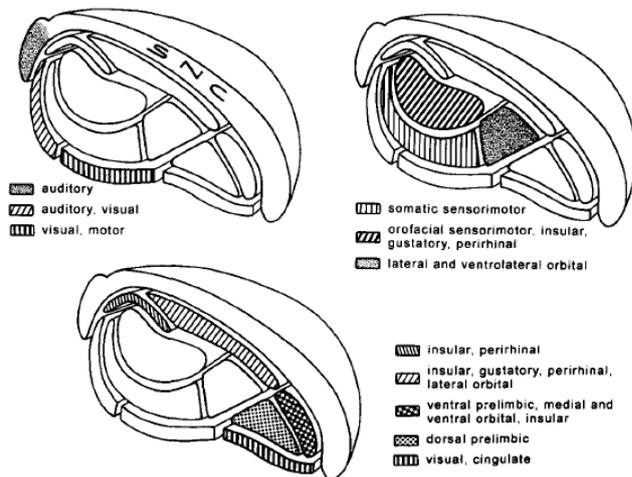
facultés de mémorisation mais également des symptômes de type dépression, perte de motivation ou apathie (Temel, 2008).

#### 1.4. La substance noire réticulée

##### 1.4.1 Localisation et organisation fonctionnelle

La substance noire est située dans le mésencéphale ventral et elle se divise en deux parties : la substance noire compacte (SNc) qui représente la partie la plus dorsale de cette structure et qui contient de nombreux corps cellulaires de nature dopaminergique, et la substance noire réticulée (SNr) située ventralement par rapport à la SNc. Elle est plus volumineuse mais présente une plus faible densité de corps cellulaires (Oades and Halliday, 1987) et elle représente l'une des structures de sortie des ganglions de la base.

L'organisation topographique des projections cortico-striatales permet de conserver la mosaïque fonctionnelle corticale de manière ordonnée au niveau du striatum (McGeorge and Faull, 1989). Chez le rat, les différents territoires striataux sont représentés au niveau de la SNr sous la forme d'une série de lames courbes organisées à la manière de pelures d'oignon (Deniau et al., 2007). Selon cette représentation, la fonction associative implique les parties dorsales et médianes tandis que la partie ventrale est surtout impliquée dans la fonction sensorimotrice (Fig. 3).

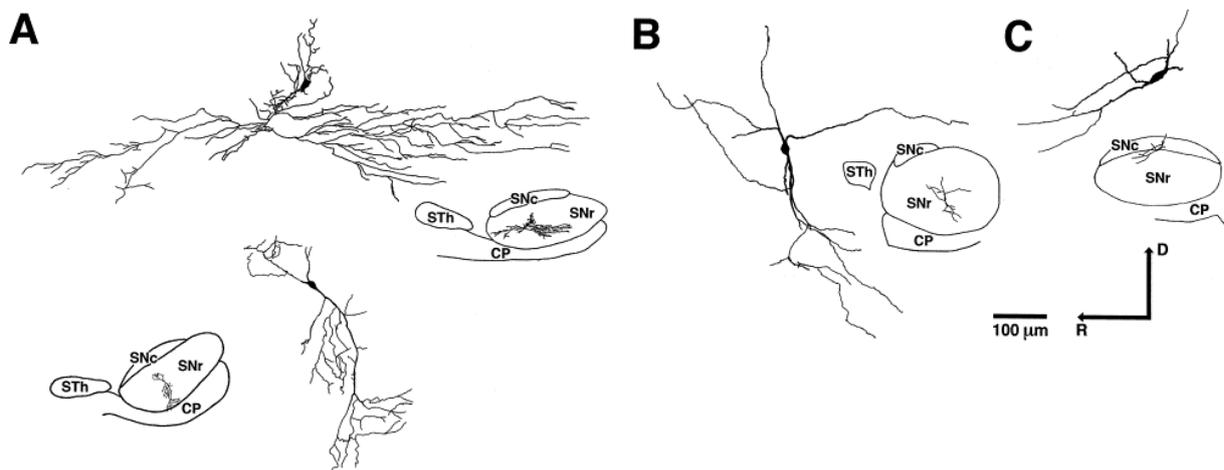


**Figure 3 :** Représentations schématiques, dite de « pelures d'oignon », de la mosaïque corticale au sein de la SNr de rat (Deniau et al., 1996).

##### 1.4.2 Organisation cellulaire

La SNr est une structure essentiellement GABAergique, constituée de neurones multipolaires GABAergiques caractérisés par des corps cellulaires de taille variable et de formes particulièrement irrégulières (Richards et al., 1997), (Fig. 4A). Ils possèdent une

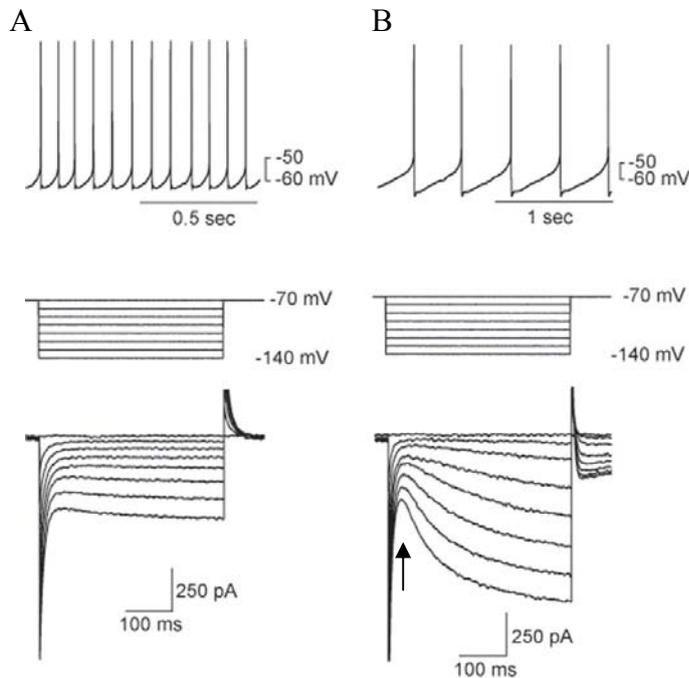
arborisation dendritique très importante pouvant s'étendre jusqu'à 1,5 mm dans l'axe rostro-caudal. Un neurone GABAergique peut ainsi recouvrir 50 à 80% de la longueur de la SNr et 70% de sa largeur. L'orientation du champ dendritique d'un neurone dépend de la position de celui-ci à l'intérieur de la structure. Les neurones de la partie dorsale ont des dendrites qui s'étendent suivant les 3 axes alors que les neurones de la partie ventrale ont des dendrites qui restent confinés dans le plan ventral de la structure (Mailly et al., 2003). La SNr contient également des neurones dopaminergiques et quelques neurones cholinergiques. Les neurones dopaminergiques sont essentiellement localisés au niveau de la partie caudale et ventrale de la structure où ils sont regroupés en clusters (Deniau et al., 1996) et, contrairement aux neurones GABAergiques, ils ont une arborisation dendritique plus restreinte avec des dendrites primaires beaucoup plus longues que celles des neurones GABAergiques (Fig. 4B), (Richards et al., 1997).



**Figure 4: Reconstitution morphologique de neurones de la SNr et de la SNC de rat.** A) Neurones GABAergiques de la SNr. B) Neurone dopaminergique de la SNr. C) Neurone dopaminergique de la SNC (Richards et al., 1997).

Chez le rat, les neurones GABAergiques et dopaminergiques de la SNr possèdent des caractéristiques électrophysiologiques propres. Les neurones GABAergiques possèdent une activité spontanée de 10 à 20 Hz *in vitro* et expriment un fort courant potassique rectifiant activé par hyperpolarisation (Fig. 5A). Les neurones dopaminergiques, quant à eux, ont une activité spontanée d'une fréquence beaucoup plus faible, de 2 à 12 Hz *in vitro*, avec de larges potentiels d'action et expriment un courant  $I_h$  (Nakanishi et al., 1987; Richards et al., 1997). Ce courant  $I_h$  est un courant entrant activé par hyperpolarisation et qui met en jeu deux cations monovalents, le sodium ( $Na^+$ ) et le potassium ( $K^+$ ) (Fig. 5B). Ce courant est également

nommé courant pace-maker car il régule l'activité rythmique de nombreux processus cellulaires (Mercuri et al., 1995).



**Figure 5 :** *Caractéristiques électrophysiologiques des neurones GABAergiques et dopaminergiques de la SNr. Le panneau A) représente les caractéristiques des neurones GABAergiques avec, en haut, l'enregistrement de l'activité spontanée d'environ 12.5 Hz (mesure en courant imposé,  $I = 0$ ) et en bas, l'enregistrement des réponses à l'application de sauts de voltages (400 ms) entre -70 et -140 mV (sauts de 10 mV). On note un très faible courant  $I_h$ . De la même façon, le panneau B) représente l'activité spontanée des neurones dopaminergiques d'environ 2.5 Hz et un fort courant  $I_h$  (flèche noire) (Shen and Johnson, 2006).*

*In vitro*, la SNr possède une activité spontanée autonome due à l'activité spontanée des neurones GABAergiques et dopaminergiques. L'activité pace-maker de ces neurones serait due à des mécanismes contribuant à dépolariiser les cellules de la SNr au seuil de déclenchement des potentiels d'action, impliquant un courant lent sodique dépendant du voltage sensible à la tétrodoxtine (TTX) et un courant insensible à la TTX médié en partie par le sodium (Atherton and Bevan, 2005). Cette activité autonome serait également sous la dépendance de canaux calciques de type L et de l'activation tonique de récepteurs NMDA (Ibanez-Sandoval et al., 2007).

Les neurones GABAergiques nigraux exercent un fort contrôle de l'activité spontanée des neurones dopaminergiques et GABAergiques, par l'intermédiaire de collatérales, tout en étant eux-mêmes sous le contrôle de l'inhibition GABAergique pallidale (Celada et al., 1999). Durant la préparation du mouvement c'est l'inhibition GABAergique striatale sur les neurones de la SNr qui serait à l'origine de la désinhibition des neurones cibles du thalamus, nécessaire à l'élaboration du mouvement. Cette désinhibition requiert que les neurones de la SNr aient une activité basale tonique et régulière (Deniau et al., 2007).

### 1.4.3 Afférences et efférences de la substance noire réticulée

La SNr est la principale structure de sortie des ganglions de la base : elle reçoit principalement des afférences GABAergiques en provenance du striatum, du GP (Chevalier and Deniau, 1990) et des afférences glutamatergiques en provenance du NST (Kita and Kitai, 1987). Les afférences striato-nigrales ont une organisation topographique très précise et la somatotopie des projections corticales sur le striatum est conservée au niveau de la SNr (comme décrit ci-dessus, Deniau et al., 1996). Ces afférences forment des synapses symétriques qui projettent essentiellement au niveau des parties distales des dendrites des neurones GABAergiques de la SNr. Quant aux projections pallido-nigrales, elles forment des synapses symétriques de grande taille sur les parties distales et proximales des dendrites des neurones GABAergiques de la SNr (Deniau et al., 2007). La localisation proximale des synapses pallido-nigrales suggère que le GP pourrait avoir un impact significatif sur les taux de décharge des neurones de la SNr (Deniau et al., 2007). Les afférences glutamatergiques issues du NST forment des contacts synaptiques asymétriques sur les parties distales de ces dendrites (Kita and Kitai, 1987). A l'intérieur de la SNr, les fibres subthalamo-nigrales forment une importante arborisation, augmentant les contacts dendritiques (Bevan et al., 1994). Ces afférences contribuent à l'activité tonique des neurones de la SNr (Feger and Robledo, 1991). Des approches anatomiques et électrophysiologiques ont montré que les projections du NST convergent, avec les terminaisons striato-nigrales et pallido-nigrales, vers les mêmes neurones de la SNr (pour revue voir, Deniau et al., 2007).

La SNr reçoit également des afférences glutamatergiques en provenance du cortex moteur, du CM/PF du thalamus et de l'amygdale, des afférences sérotoninergiques en provenance du raphé dorsal et des afférences cholinergiques en provenance du noyau pédonculo-pontin (Gerfen et al., 1982). Enfin, elle est également sous influence dopaminergique par l'intermédiaire de libération de dopamine par des dendrites de la SNc qui passent dans la SNr (Gauthier et al., 1999). Ces différentes afférences permettent la régulation de la balance excitatrice et inhibitrice exercée par les afférences du striatum, du GP du NST et des circuits intrinsèques de la SNr (Deniau et al., 2007).

Les efférences nigrales sont des projections de type GABAergique principalement dirigées vers le thalamus et plus particulièrement, chez le rat, vers le noyau ventro-médian (Beckstead et al., 1979). La SNr envoie également des projections vers le PF (Beckstead et al., 1979), vers la SNc (Tepper et al., 1995), le NPP ou encore le colliculus supérieur (Beckstead et al., 1979; Parent and Hazrati, 1995a). Les neurones GABAergiques de la SNr sont également interconnectés entre eux par la formation d'un réseau local de collatérales

d'axones qui innervent à la fois la SNr et la SNc. Les interactions entre les neurones de la SNr peuvent contribuer à une désynchronisation des taux de décharge de neurones innervant une même cible et à renforcer la nature tonique de leur influence synaptique. Du fait de l'activité spontanée régulière et élevée de ses neurones, la SNr exerce un effet inhibiteur tonique sur ses structures cibles, et c'est en modulant cette influence inhibitrice que les ganglions de la base contrôlent l'excitabilité du circuit thalamocortical responsable du comportement et du mouvement (Deniau et al. 2007).

### *1.5 Connexions entre noyau sous-thalamique et substance noire réticulée.*

Comme nous l'avons vu, le NST est la seule structure glutamatergique des ganglions de la base et c'est de cette structure que partent les principales projections glutamatergiques vers les structures de sortie des ganglions de la base. Chez les rongeurs, les projections du NST vers la SNr proviennent de l'ensemble du noyau (Deniau et al., 1978; Groenewegen and Berendse, 1990). En accord avec la nature glutamatergique de cette transmission, l'activation pharmacologique du NST, par désinhibition des neurones avec une injection de bicuculline (Robledo and Feger, 1990), ou la stimulation électrique de celui-ci (Nakanishi et al., 1987) induit des potentiels postsynaptiques excitateurs pouvant conduire à des décharges de potentiels d'action au niveau des neurones de la SNr (Nakanishi et al., 1987; Robledo and Feger, 1990). *In vivo*, l'influence excitatrice du NST contribue à l'activité tonique des neurones de la SNr, comme le montre la diminution du taux de décharge des neurones de la SNr suite à une inhibition pharmacologique des neurones du NST (Feger and Robledo, 1991). De même, l'ablation des neurones du NST par une immunotoxine, modifie le patron et le taux de décharge des neurones de la SNr (Yasoshima et al., 2005). Ainsi, l'influence synaptique excitatrice du NST vers la SNr est bien caractérisée et montre que les projections glutamatergiques du NST vers la SNr participent au contrôle de l'activité électrique des neurones GABAergiques de cette structure.

L'effet du glutamate sur les cellules de la SNr est médié par les trois principaux types de récepteurs au glutamate : les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique (AMPA), les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et les récepteurs métabotropiques (Chatha et al., 2000; Marino et al., 2001; Hedberg et al., 2003). L'étude de la sensibilité des neurones de la SNr à l'activation des récepteurs AMPA, NMDA et métabotropiques glutamatergiques, souligne le rôle essentiel des récepteurs NMDA dans la régulation des taux de décharge de l'activité spontanée de ces neurones (Deniau et al., 2007).

Des études conduites par Rosales et al. (1997) ont également permis de mettre en évidence que l'augmentation de l'activité des neurones du NST (induite par une injection *in situ* d'un agoniste cholinergique) provoque une augmentation de la libération à la fois de glutamate, de GABA et de dopamine au sein de la SNr : la libération de glutamate par les projections subthalamo-nigrales viendrait provoquer la libération de dopamine des neurones de la SNc, agissant à son tour sur les récepteurs D1 des terminaisons striato-nigrales responsables d'une libération accrue de GABA dans la SNr (Rosales et al., 1997). Des résultats comparables ont été obtenus lors de la stimulation à haute fréquence du NST, montrant une augmentation des taux de glutamate et de GABA dans la SNr (Windels et al. 2000; Savasta et al., 2002) : le glutamate provenant d'une libération directe des terminaisons subthalamo-nigrales, et le GABA pouvant provenir de la stimulation électrique des fibres pallido-nigrales et/ou d'une activation des collatérales de neurones GABAergiques de la SNr, par le glutamate libéré.

Ainsi, l'étude de la transmission glutamatergique du NST vers la SNr montre l'importance fonctionnelle de l'influence du NST sur l'activité de la SNr, et indique qu'une augmentation de l'activité des neurones du NST peut induire une augmentation de glutamate et de GABA dans la SNr.

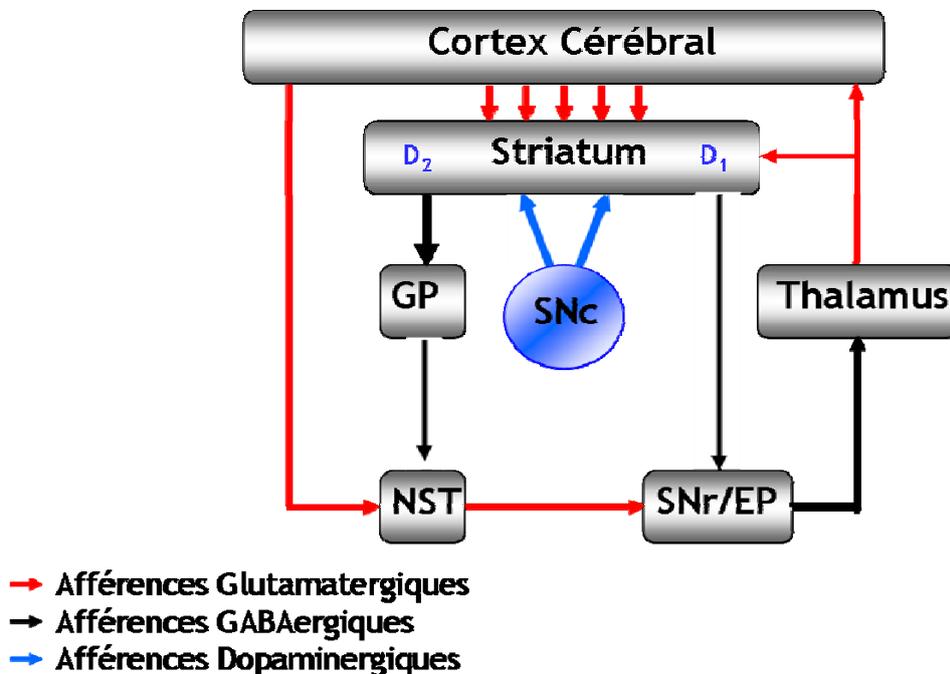
## *2. Organisation anatomo-fonctionnelle des ganglions de la base et maladie de Parkinson*

Initialement décrite en 1817 par James Parkinson, la maladie de Parkinson représente l'affection neurodégénérative la plus répandue après la maladie d'Alzheimer. Elle débute en moyenne entre cinquante et soixante ans, et en raison du vieillissement démographique actuel, sa prévalence tend à augmenter. C'est une maladie handicapante consécutive à la dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques de la SNc, qui concerne environ une personne sur 700 en France. Elle représente la deuxième cause de handicap moteur chez le sujet âgé après les accidents vasculaires cérébraux. La maladie de Parkinson se caractérise par une triade de symptômes moteurs invalidants qui apparaissent lorsque plus de 60-70% des neurones dopaminergiques de la SNc ont dégénéré (pour revue voir, Obeso et al., 2000; Olanow et al., 2004). Ces symptômes sont : la rigidité, l'akinésie (perte d'initiation du mouvement) et le tremblement de repos. Il est à noter que les signes moteurs de la maladie de Parkinson varient d'un moment à l'autre, et ce tout au long de la pathologie. La motivation ou la charge émotionnelle peuvent sensiblement améliorer les déficits moteurs alors que le stress

a généralement une influence négative sur ces symptômes. De façon surprenante, les signes cliniques disparaissent au cours du sommeil (Arnulf, 2003).

### 2.1. Le schéma « classique » des ganglions de la base

Le schéma « classique » anatomo-fonctionnel d'organisation des ganglions de la base a été proposé initialement par Albin et collaborateurs (1989) et repris ensuite par Alexander et Crutcher (Alexander and Crutcher, 1990), puis par DeLong (1990). Ce schéma fournit une explication concernant le contrôle du mouvement au sein des ganglions de la base, à l'état normal et dans des situations pathologiques, à l'origine des troubles moteurs de type hypo ou hyperkinétique (Fig. 6).



**Figure 6:** Représentation schématique des circuits des ganglions de la base chez le rat. GP : Globus pallidus, SNc : Substance Noire compacte, NST : Noyau Sous-Thalamique, SNr : Substance Noire réticulée, EP : Noyau Entopédonculaire

#### 2.1.1 En situation physiologique

Ce schéma dit « classique » repose sur une organisation en double circuit parallèle de la boucle motrice, modulée d'une manière différentielle par l'innervation dopaminergique (Fig. 6, 7A). Le striatum, qui constitue la structure d'entrée des ganglions de la base, reçoit des afférences du cortex cérébral. Il est connecté aux structures de « sortie » qui sont l'EP et la SNr, par l'intermédiaire de 2 voies dites « directe » et « indirecte ». La

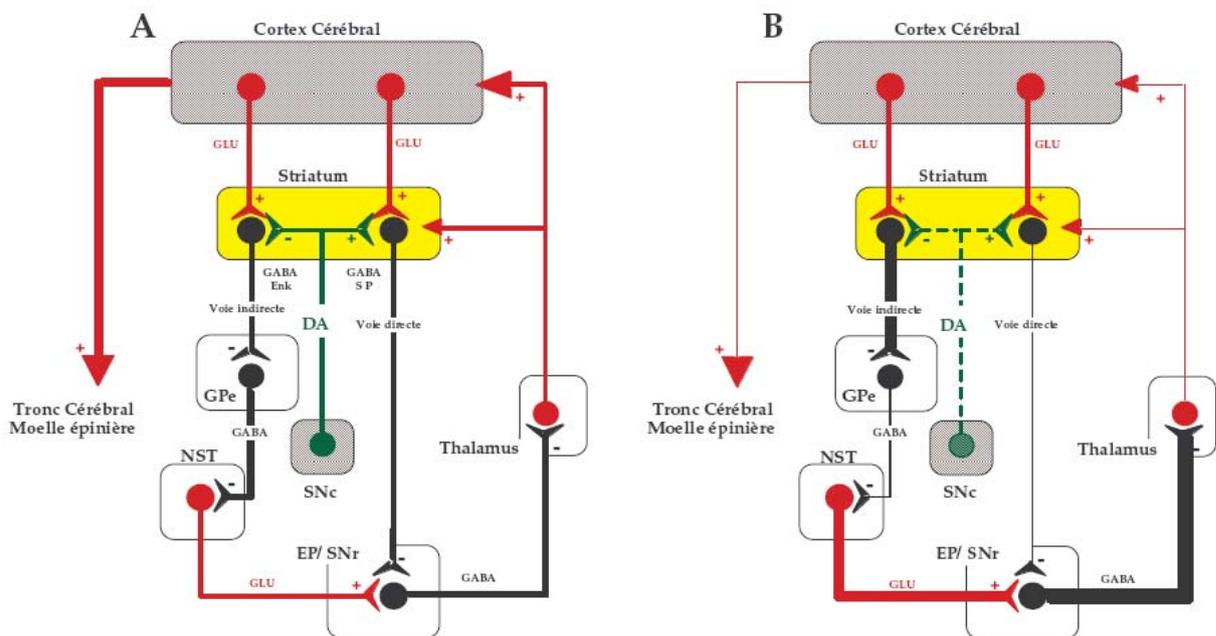
voie directe, globalement inhibitrice, est composée de neurones striataux qui expriment le GABA co-localisé avec la substance P et/ou la dynorphine, et projettent sur ces structures de sortie. La voie indirecte est constituée de deux chaînons inhibiteurs et d'un chaînon excitateur. Le premier chaînon est représenté par les neurones striataux exprimant le GABA et les enképhalines qui projettent sur le GP. Le second chaînon est constitué par les neurones pallidaux qui projettent sur le NST et utilisent le GABA comme neurotransmetteur. Le dernier chaînon est représenté par les projections glutamatergiques du NST sur les structures de sortie, l'EP et la SNr, qui ont, elles, une action inhibitrice sur le thalamus. Celui-ci exerce un effet exciteur sur le cortex cérébral activant les aires motrices. La dopamine libérée au niveau striatal par les terminaisons nigro-striées agirait de manière antagoniste selon le type de récepteur dopaminergique activé. Elle activerait la voie « directe » *via* les D1 et inhiberait la voie « indirecte » *via* les D2 (Gerfen and Engber, 1992).

Schématiquement, l'activation de la voie « directe » a une action inhibitrice, alors que celle de la voie « indirecte » exerce un effet activateur sur les structures de sortie, conduisant respectivement à l'activation et à l'inhibition de la boucle motrice récurrente sous-cortico-thalamo-corticale. Le fonctionnement physiologique du réseau correspond donc à un équilibre entre l'activité de la voie « directe » et celle de la voie « indirecte ». Une pause dans l'activité des structures de sortie permettrait le déclenchement du mouvement (Chevalier and Deniau, 1990).

### 2.1.2 *En situation pathologique*

Toujours sur la base de ce modèle dit « classique », le syndrome parkinsonien serait la résultante des modifications induites en cascade par la suppression de l'action de la dopamine sur les neurones striataux, conduisant à une augmentation excessive de l'influence inhibitrice exercée sur le thalamus par la SNr et l'EP (Fig. 7B), (Obeso et al., 2002). La perte progressive des neurones dopaminergiques de la SNc induit la disparition progressive de la voie dopaminergique vers le striatum aboutissant à une diminution massive des contenus en dopamine au niveau du striatum. Ceci se traduit par une hyperactivité pathologique des structures de sortie des ganglions de la base, cette hyperactivité étant à l'origine des troubles moteurs (Lang and Lozano, 1998). Des études menées *in vivo* chez le rat ont montré que l'activité électrique des neurones de la SNr était profondément altérée lors de l'interruption de la transmission dopaminergique : le taux de décharge tonique et régulier devient irrégulier avec des « bursts » à haute fréquence et des pauses silencieuses (Degos et al., 2005).

Au niveau cellulaire, la diminution massive des contenus en dopamine dans le striatum entraîne une dérégulation des voies « directe et indirecte », qui relie l'ensemble des structures des ganglions de la base et se traduit notamment par un dysfonctionnement de la transmission glutamatergique du NST vers la SNr. Cela entraîne une hyperactivité des neurones sous-thalamiques qui conduit en aval à une hyperactivité pathologique des neurones de la substance noire réticulée (Ibanez-Sandoval et al., 2006). L'augmentation d'activité des structures de sortie des ganglions de la base s'explique donc par un effet double : d'une part, la réduction de l'influence inhibitrice exercée par les neurones de la voie directe striatale et d'autre part d'une activation de la voie striato-pallidale conduisant à un hypo-fonctionnement du GP qui, par conséquent, induit une activation anormale des neurones du NST, par un processus de levée d'inhibition (Fig. 7B).



**Figure 7: Représentation schématique d'après DeLong (TINS 1990) de l'organisation anatomo-fonctionnelle « classique » des ganglions de la base en condition physiologique (A) et en cas de maladie de Parkinson (B) (dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée). EP : noyau entopédonculaire ; SNr : substance noire réticulée ; SNc substance noire compacte ; NST : noyau sous-thalamique ; DA : dopamine ; Enk : enképhaline ; SP : substance P ; GLU : glutamate (DeLong, 1990).**

D'après certains auteurs (Bevan et al., 2002), ce modèle « classique » pourrait expliquer les symptômes de perte de contrôle du mouvement (akinésie et bradykinésie) par l'augmentation de l'inhibition des voies de sorties nigrales et pallidales, secondaire à des

modifications des taux de décharges de différents noyaux des ganglions de la base. En effet, il a été montré que de nombreux neurones des structures des ganglions de la base possèdent des propriétés pace-maker intrinsèques (Bevan et al., 2002). Ainsi, des oscillations autonomes des neurones du NST et du GPe soulignent une activité tonique importante dans l'intégration synaptique tandis que des rythmes anormaux en bursts, à basse fréquence, sont caractéristiques de la maladie de Parkinson. Des oscillations dans la gamme de fréquence bêta (de 15 à 25 Hz) ont été enregistrées chez des patients parkinsoniens, or il existe un lien étroit entre la génération de mouvements volontaires et la désynchronisation de ces oscillations dans le NST. Dans ce modèle, la dopamine jouerait également un rôle important dans la modulation des activités oscillantes (Hutchison et al., 2004).

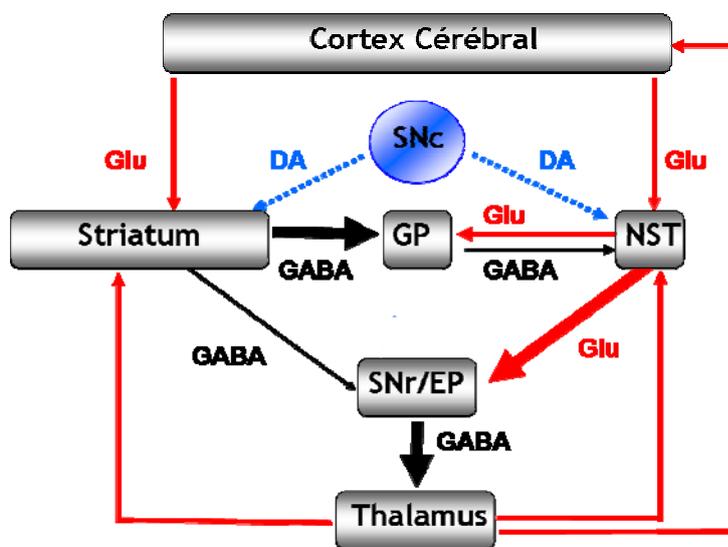
## 2.2. Réactualisation du schéma « classique »

Le modèle « classique », qui date des années 90, doit être réévalué par un certain nombre de connaissances acquises récemment et il semble que la situation soit beaucoup plus complexe. En effet, il a été mis en évidence que les neurones efférents du striatum à l'origine de la voie « directe » et « indirecte », présentent de nombreuses collatérales. Ces projections peuvent être considérées comme interconnectées et non plus ségréguées par le type de neuropeptide qu'elles expriment. Il a été montré que certaines terminaisons striatales dans le GP étaient immunoréactives pour la substance P (Reiner et al., 1999), suggérant ainsi que les neurones striataux de la voie « directe » peuvent émettre un certain nombre de collatérales sur le GP. De façon symétrique, les terminaisons immuno-positives pour les enképhalines sont retrouvées dans l'EP et la SNr (Wu et al., 2000), suggérant que les neurones de la voie « indirecte » forment des collatérales directement sur les structures de sorties de ganglions de la base.

Par ailleurs, le concept de la ségrégation striatale des récepteurs D1 et D2 à la voie « directe » et « indirecte », peut être remis en cause. En effet, des études d'hybridation *in situ* ont montré qu'il existait une co-localisation de l'expression des transcrits des récepteurs D1 et D2 dans la plupart des neurones striataux (Surmeier et al., 1996; Aizman et al., 2000; Smith and Villalba, 2008), même si le niveau d'expression de chaque type de récepteur était différent selon les neurones observés, striato-pallidiaux ou striato-nigraux (Gerfen and Young, 1988; Gerfen et al., 1990; Le Moine and Bloch, 1995).

La remise en cause du concept des voies « directe » et « indirecte » est attestée par des données anatomiques montrant l'existence de projections directes du GP sur les structures de

sorties, l'EP et la SNr (Parent and Hazrati, 1995). Ainsi, contrairement au modèle classique, le GP interagit avec les structures de sortie sans relais anatomique représenté par le NST. De plus, les relations entre GP et NST semblent plus complexes qu'un « simple relais » entre le striatum et les structures de sortie. Il apparaît, en effet, que les neurones du NST, recevant spécifiquement des afférences du GP, projettent de façon récurrente sur les neurones pallidiaux, à l'origine d'une boucle de contrôle rétroactive de la voie « indirecte » (Robledo and Feger, 1990 ; Parent and Hazrati, 1995 ; Smith et al., 1998). Enfin, il a également été mis en évidence des projections directes du cortex sur le NST (Feger et al., 1994; Bevan and Bolam, 1995; Smith et al., 1998; Orioux et al., 2002, pour revue voir Deniau, 2003). Dès lors, le NST peut être considéré comme une structure d'entrée au même titre que le striatum (Fig. 8). De plus et pour conclure, il a été montré que les neurones du GP projetaient sur les noyaux réticulaires du thalamus, suggérant que le GP pourrait influencer la fonction motrice indépendamment des structures de sortie (Shammah-Lagnado et al., 1996).



**Figure 8 :** *Représentation schématique d'un modèle alternatif pour décrire la physiopathologie de la maladie de Parkinson.* Le NST trouve dans ce modèle une position centrale au même niveau que le striatum. Les flèches épaisses indiquent une augmentation de la transmission, les flèches fines représentent une diminution, suite à la dégénérescence des neurones dopaminergiques de la SNc. La résultante est une augmentation de l'action inhibitrice sur les structures de sortie, principalement le thalamus (modifié d'après Hirsch et al., 2000).

La réactualisation de ce modèle « classique » soulève la question de l'hypoactivité du GP et de l'origine de l'hyperactivité du NST après dénervation dopaminergique. L'activation anormale du NST après déplétion dopaminergique serait, selon le modèle « classique », attribuable à une baisse d'activité du GP, réduisant ainsi le contrôle inhibiteur du GP sur le NST. Or, de nos jours, plusieurs études neuroanatomiques et neurochimiques fonctionnelles remettent en cause l'hypoactivité du GP. En effet, bien que des études décrivent une réduction

de décharge des neurones du GP aussi bien chez le modèle de singe MPTP (1-méthyl 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine, une neurotoxine induisant les symptômes parkinsoniens) que chez le modèle de rat parkinsonien (rat 6-OHDA, injection de 6-hydroxydopamine dans la SNc, afin de léser totalement les neurones dopaminergiques) (Pan and Walters, 1988; Filion and Tremblay, 1991), d'autres études réalisées chez le singe et l'homme ne montrent aucune variation d'activité GABAergique ou métabolique des neurones du GP (Levy et al., 1997; Vila et al., 1997). Des études similaires suggèrent même une hyperactivité du GP chez le singe MPTP et le rat 6-OHDA (Kincaid et al., 1992; Soghomonian and Chesselet, 1992; Herrero et al., 1996). De même, des études électrophysiologiques montrent que la lésion du GP n'induit qu'une faible augmentation de 20% de l'activité de décharge des neurones du NST en comparaison avec l'augmentation induite par la lésion dopaminergique (Hassani et al., 1996). Les études de microdialyse intranigrale conduites au laboratoire ont par ailleurs confirmé ces données en montrant qu'une lésion du GP n'induisait pas de libération accrue de glutamate à partir des terminaisons subthalamo-nigrales (Windels et al., 2005).

L'ensemble de ces données suggère donc que l'activation du NST en situation parkinsonnienne n'est pas exclusivement due à une hypoactivité du GP. Compte tenu de la réciprocité d'innervation entre le NST et le GP (Parent et Hazrati, 1995 ; Smith et al., 1998, Plenz et al., 1998; Plenz and Kital, 1999), l'absence de modification d'activité du GP peut être expliquée fonctionnellement par une double influence antagoniste, de l'afférence striatale inhibitrice, d'une part, et de l'afférence subthalamique excitatrice, d'autre part (Windels et al., 2005).

De nombreuses évidences expérimentales montrent une modification du patron de décharge des neurones du NST après dénervation dopaminergique (Hollerman and Grace, 1992; Hassani et al., 1996; Kreiss et al., 1997; Ni et al., 2000). De façon intéressante, des études de traçage rétrograde couplées à l'hybridation *in situ* mesurant les niveaux d'expression des ARNm de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (CoI) montrent que la lésion dopaminergique induit une augmentation d'activité du NPP et des noyaux CM/PF du thalamus projetant sur le NST (Orieux et al., 2000). Au contraire, une baisse d'activité des neurones cortico-subthalamiques est observée par ces mêmes auteurs après lésion dopaminergique (Orieux, 2002). Ces modifications pourraient dès lors jouer un rôle important dans la genèse du patron d'activité neuronale du NST dans la situation parkinsonnienne. De même, la dégénérescence des neurones de la SNc et des projections dopaminergiques nigro-subthalamique participeraient également à l'activation du NST (Kreiss et al., 1997; Hassani and Feger, 1999).

Sur la base de cet ensemble de données anatomiques et fonctionnelles récentes, les ganglions de la base ne peuvent plus être considérés comme un système composé d'une chaîne de structures relais, mais au contraire, ils représentent un réseau complexe de structures intégratives. L'une des évolutions majeures du modèle « classique » a été de placer le NST au même niveau fonctionnel que le striatum. Jusque là considéré comme un simple relais, le NST devient une « structure d'entrée » capable d'intégrer directement les informations corticales (Bevan et Bolam, 1995; Mink 1996; Smith et al., 1998; Maurice et al., 1999; 2003; Nambu et al., 2000). Dès lors, les ganglions de la base peuvent être considérés comme un circuit à double entrée : une entrée « inhibitrice », le striatum, et une entrée « excitatrice », le NST (Levy et al., 1997, Obeso et al., 2000, Hirsch et al., 2000), premiers maillons d'un ensemble de boucles cortico-baso-corticales dont l'activité est régulée par des « circuits internes » de modulation (Fig. 8).

### *3. Traitements de la maladie de Parkinson*

#### *3.1. Traitements pharmacologiques*

C'est dans les années 1960 que le traitement pharmacologique de la maladie de Parkinson a connu une avancée majeure grâce à l'introduction de la levo-dopa (L-DOPA), un précurseur de la dopamine (Cotzias et al., 1969). La L-DOPA permet de compenser le déficit en dopamine et améliore grandement la qualité de vie des patients. Cependant, si l'apport de L-DOPA est très bénéfique sur le plan symptomatique, ce traitement n'arrête pas la progression de la maladie et sa prise au long cours entraîne une perte d'efficacité notoire, provoquant des fluctuations motrices « on- off » très invalidantes, ainsi que des mouvements anormaux involontaires, les dyskinésies (Ahlskog and Muentner, 2001; Lang and Lozano, 1998). Les complications motrices qui apparaissent suite à la prise au long cours du traitement L-DOPA seraient principalement dues à la stimulation non physiologique des récepteurs dopaminergiques.

À partir de 1970, l'utilisation d'agonistes dopaminergiques en synergie avec la L-DOPA, a permis de moduler et de réduire les fluctuations motrices liées à ce traitement (Goetz et al., 1985). Les agonistes dopaminergiques les plus utilisés à ce jour sont des agonistes spécifiques des récepteurs D2, ce sont ceux présentant le moins d'effets indésirables (apomorphine, pramipexole et ropinirole).

Par ailleurs, d'autres traitements non dopaminergiques, visant à intervenir sur les systèmes de neurotransmission non dopaminergiques touchés par la maladie de Parkinson (cholinergique, adrénergique, sérotoninergique, glutamatergiques) se sont également développés. Les antagonistes glutamatergiques ont été proposés dans le traitement de la maladie de Parkinson sur la base de données obtenues à partir d'études sur l'hyperactivité du NST dans la maladie de Parkinson et l'apparition des symptômes parkinsoniens. Cela a permis de suggérer que la réduction de la transmission glutamatergique, particulièrement celle médiée par les récepteurs NMDA, pourrait être bénéfique sur la symptomatologie de la maladie de Parkinson et ralentir le processus dégénératif (Greenamyre et al., 1994). Cependant, compte-tenu des effets secondaires induits par la prise chronique de ces molécules (confusion mentale, hallucinations), les antagonistes glutamatergiques, qui sont actuellement peu utilisés chez l'homme, sont généralement prescrits en association avec un traitement L-DOPA.

Ainsi, la L-DOPA reste à ce jour, le traitement pharmacologique le plus utilisé chez les patients parkinsoniens.

### *3.2. Les traitements chirurgicaux*

#### *3.2.1 Les thérapies lésionnelles*

Le traitement neurochirurgical de la maladie de Parkinson a débuté de façon empirique avant l'ère de la L-DOPA, essentiellement à partir des années 50, avec la pallidotomie ou la thalamotomie (Hassler and Riechert, 1954; Cooper and Poloukhine, 1956).

De nombreuses études ont depuis montré l'efficacité de la pallidotomie dans l'amélioration des tremblements, de la bradykinésie, de la rigidité et dans la suppression des dyskinésies induites par la L-DOPA (Laitinen et al., 1992; Baron et al., 1996; Lang et al., 1997). Les améliorations produites restent stables au long terme malgré l'évolution de la maladie (Hariz and Bergenheim, 2001). Enfin, une revue récente a révélé que des effets secondaires (paralysie faciale, dégradation de la parole, perte de champ visuel, confusion) apparaissaient dans 30% des cas suite à une pallidotomie unilatérale et que 14% d'entre eux restent permanents. Ces pourcentages sont augmentés pour des pallidotomies bilatérales avec notamment des effets marqués sur la parole et des désordres cognitifs (De Bie et al., 2002).

Les lésions du thalamus et plus particulièrement du thalamus ventro-médian ont également montré une efficacité particulière dans le traitement des tremblements essentiels et parkinsoniens (Schuurman et al., 2000). Leurs effets sur la rigidité et la bradykinésie sont en

général modérés ce qui diminue leur intérêt dans la maladie de Parkinson. Cependant, des lésions de parties plus antérieures du thalamus (noyau ventro-antérieur) peuvent améliorer le tremblement et la rigidité de façon concomitante. Comme pour la pallidotomie, les effets délétères de la thalamotomie sont plus importants pour les interventions bilatérales qu'unilatérales et se manifestent essentiellement par des hypophonies, des dysarthries, des dysphagies et des déficits cognitifs (Matsumoto et al., 1984).

La description de patients parkinsoniens ayant présenté des améliorations motrices suite à une lésion accidentelle du NST, a servi de base au développement de la subthalamotomie dans les années 1960 (Andy et al., 1963). Par la suite, la pratique de lésions chirurgicales du NST chez des singes MPTP a montré une amélioration importante des symptômes moteurs de ces animaux (Bergman et al., 1990). Les études menées chez les malades parkinsoniens montrent que la subthalamotomie améliore la symptomatologie parkinsonienne (Gill and Heywood, 1997), principalement du côté controlatéral à l'intervention avec un effet important sur le tremblement et une diminution de 50% du traitement médical (Patel et al., 2003). Cependant, la subthalamotomie reste encore peu pratiquée car elle peut induire l'apparition d'hémiballismes permanents (Guridi and Obeso, 2001).

### *3.2.2. La stimulation cérébrale profonde*

C'est dans les années 90 que le renouveau du traitement neurochirurgical de la maladie de Parkinson voit le jour sous la forme de la stimulation haute fréquence (SHF) de structures des ganglions de la base (Walter and Vitek, 2004). Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce retour. Tout d'abord, les limites du traitement dopaminergique au long cours, en particulier le défi thérapeutique que représentent les fluctuations motrices "ON-OFF" et les dyskinésies. Ensuite, la démonstration que la pallidotomie sélective entraîne une amélioration nette des signes parkinsoniens, ceci avec un risque opératoire et des complications post-opératoires devenues faibles (Laitinen et al., 1992). Et enfin, les progrès réalisés dans les techniques de chirurgie stéréotaxique, notamment grâce à l'utilisation de micro-électrodes d'enregistrement et aux nouvelles méthodes d'imagerie médicale, particulièrement l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

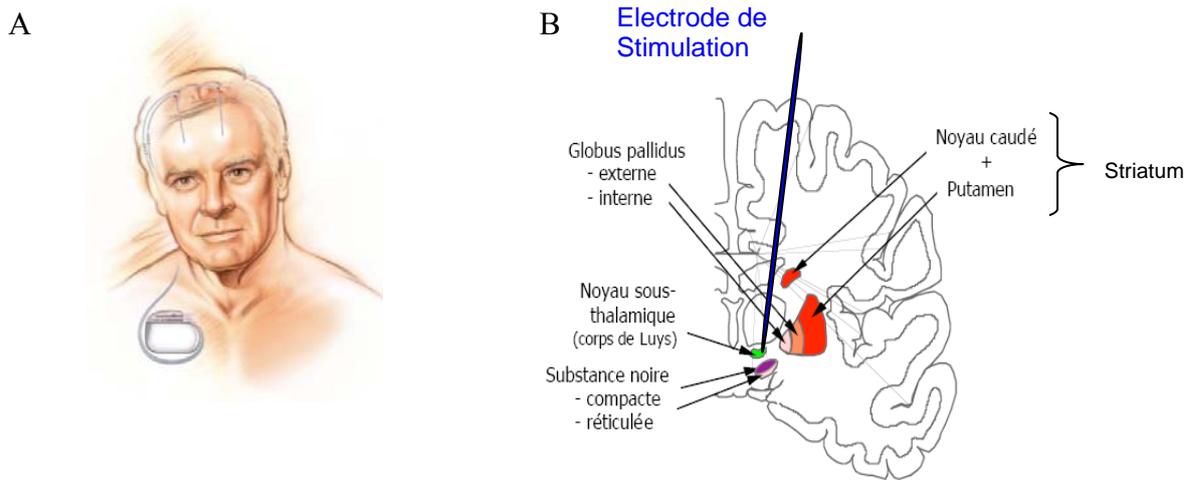
La première cible de la SHF a été le noyau ventro-médian intermédiaire du thalamus. La stimulation chronique du thalamus avait déjà été utilisée pour traiter certaines douleurs

chroniques avant d'être proposée dans le traitement de la maladie de Parkinson (Ray and Burton, 1980). Une stimulation chronique unilatérale à haute fréquence (130 Hz) du noyau ventro-médian du thalamus fut ensuite réalisée chez des patients parkinsoniens atteints de tremblements sévères et ayant déjà subi une thalamotomie (Benabid et al., 1987). Depuis, la stimulation thalamique a prouvé son efficacité dans le traitement des tremblements parkinsoniens et essentiels alors que ses effets sur la bradykinésie et la rigidité sont moindres (Caparros-Lefebvre et al., 1993; Koller et al., 1997). Aujourd'hui, la stimulation thalamique a supplanté la thalamotomie car elle présente l'avantage d'être plus facile à pratiquer de façon bilatérale (Fig. 9A), tout en induisant moins d'effets secondaires (Blond and Siegfried, 1991; Nguyen and Degos, 1993; Benabid et al., 1996; Schuurman et al., 2000).

Cependant, la stimulation thalamique n'agit que sur le tremblement parkinsonien et n'empêche pas l'apparition secondaire ou l'aggravation, chez les patients suivis au long cours, des autres signes de la maladie, ni la survenue de dyskinésies et de fluctuations motrices. Les limites de la stimulation thalamique ont donc conduit à rechercher d'autres cibles chirurgicales.

Plusieurs groupes ont ainsi développé la stimulation pallidale en alternative à la pallidotomie (Siegfried and Lippitz, 1994; Gross et al., 1997; Volkmann et al., 1998). La stimulation du pallidum apparaît efficace sur l'ensemble des symptômes moteurs parkinsoniens, les dyskinésies et les dystonies (Siegfried et Lippitz, 1994 ; Volkmann et al., 1998 ; Burchiel et al., 1999). Cependant, ces effets ne sont pas stables au long cours (Volkmann et al., 2004), ce qui entraîne parfois le remplacement de la stimulation pallidale par celle du NST (Houeto et al., 2000; Vitek, 2002).

L'essor de la stimulation du noyau sous-thalamique est venu des limites ou des difficultés rencontrées avec la stimulation thalamique ou pallidale. Le choix de cette nouvelle cible s'appuie sur des données récentes relatives au fonctionnement des ganglions de la base (Fig. 9B). En effet, une amélioration des symptômes parkinsoniens a été observée chez des singes traités au MPTP après lésion ou stimulation du NST (Bergman et al., 1990; Aziz et al., 1991; Benazzouz et al., 1993) La première investigation clinique de la stimulation du NST s'est faite à Grenoble, il y a plus de 15 ans (Pollak et al., 1993).



**Figure 9 : Implantation bilatérale d'électrodes de stimulation dans le noyau sous-thalamique, chez l'homme.** A) Représentation du système d'implantation d'électrodes reliées au stimulateur (modèle Activa, Medtronic). B) Représentation des ganglions de la base et de l'implantation de l'électrode de stimulation dans le noyau sous-thalamique chez l'homme.

Depuis, la SHF du NST est devenue une approche thérapeutique de choix pour le traitement des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Ces effets sont similaires à ceux induits par un traitement L-DOPA et persistent au long cours (Vingerhoets et al., 2002). Ainsi, une amélioration de l'akinésie, de la rigidité, de la marche et des périodes de dystonie et de tremblement est observée sous stimulation du NST (Limousin et al., 1995a; Limousin et al., 1995b; Pollak et al., 1996; Thobois et al., 2002; Krack et al., 2003). L'apparition de mouvements involontaires a été reportée dans quelques cas, mais ces effets secondaires peuvent facilement être supprimés en modifiant les paramètres de stimulation (Limousin et al., 1996). Enfin, la stimulation du NST permet de réduire de façon considérable voire de supprimer les doses quotidiennes de médicaments dopaminergiques (L-DOPA et agonistes dopaminergiques) prescrits aux patients, ce qui conduit à une amélioration des dyskinésies induites par la L-DOPA (Krack et al., 1997).

Les effets distincts produits par la stimulation haute fréquence du thalamus, du pallidum et du noyau sous-thalamique sur les différents symptômes de la maladie de Parkinson montre que la thérapie neurochirurgicale doit être ajustée au profil symptomatique de chaque patient (Tab.1).

	Thalamus		Pallidum		Noyau sous-thalamique	
	lésion	SHF	lésion	SHF	lésion	SHF
<b>Bradykinésie</b>	-	-	+	+	+	+
<b>Tremblement</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Rigidité</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Dyskinésies</b>	+/-	+/-	+	+	+	+
<b>Réduction du traitement</b>	-	-	-	-	+	+

**Tableau 1 : Récapitulatif des principaux effets de la lésion ou de la stimulation haute fréquence du thalamus, du globus pallidus et du noyau sous-thalamique sur les principaux symptômes moteurs de la maladie de Parkinson (D'après Thobois et al., 2005).**

L'application de ce traitement thérapeutique de la SHF s'étend actuellement à d'autres maladies neurologiques, telles que les dystonies (Ostrem and Starr, 2008), certains cas d'épilepsies (Chabardes et al., 2008), la maladie de Gilles de Tourette (Welter et al., 2008) ou les troubles obsessionnels compulsifs (Baker et al., 2007).

#### 4. Noyau sous-thalamique et troubles du mouvement

##### 4.1. Noyau sous-thalamique, hémiballisme et dyskinésies

La mise en évidence de l'implication du NST dans les pathologies liées au mouvement s'est faite grâce à des observations cliniques qui montraient que certains patients présentaient des mouvements hémiballiques après avoir subi un accident vasculaire cérébral affectant le NST (Whittier, 1947; Lee and Marsden, 1994). Ces mouvements anormaux ont pu être reproduits chez le primate non humain en lésant le NST par injection d'acide kaïnique ou par électrocoagulation (Whittier and Mettler, 1949; Hammond et al., 1979) permettant ainsi de corréler clairement la lésion du NST à la génération de mouvements anormaux de type hémiballique. Paradoxalement, l'injection locale d'antagonistes GABAergiques au niveau du NST était capable de reproduire l'apparition de ces mêmes mouvements hémiballiques chez le singe (Crossman et al., 1980; Crossman, 1987) et chez le rat (Perier et al., 2002).

#### *4.2. Noyau sous-thalamique et maladie de Parkinson*

Durant ces vingt dernières années, les études expérimentales conduites sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson (rat 6-OHDA ou singe MPTP) ont permis de mieux comprendre les conséquences induites par la dégénérescence de la voie dopaminergique nigro-striée. Plusieurs de ces études ont démontré que le NST était impliqué dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Ainsi, l'étude menée par Bergman et collaborateurs a montré qu'une lésion neurotoxique de cette structure supprimait les symptômes moteurs parkinsoniens induits par l'injection de MPTP chez le singe (Bergman et al., 1990). Par la suite, de nombreux travaux menés chez le rat 6-OHDA, le singe MPTP et chez l'homme ont montré que le NST était le siège de multiples altérations propres à l'état parkinsonien. Ces altérations se caractérisent d'un point de vue électrophysiologique par une augmentation de la synchronisation et de la fréquence de décharge des neurones du NST et la mise en place d'une activité en « bouffées » (Bergman et al., 1994). D'un point de vue métabolique, on observe une surexpression des ARNm codant pour la sous-unité I de la cytochrome oxydase (Hirsch et al., 2000) attestant d'une hyperactivité métabolique. De plus, des études, menées chez le rat 6-OHDA, ont montré qu'une lésion du NST abolissait les comportements rotatoires induits par l'apomorphine (Burbaud et al., 1995; Blandini et al., 1997), normalisait la fréquence et le profil de décharge des neurones de la SNr (Murer et al., 1997) et prévenait, au niveau du striatum, de l'EP et du GP, les modifications d'expression de la GAD 67 induites par la lésion de la SNc (Delfs et al., 1995).

Ainsi, sur la base de ces observations, l'hyperactivité du NST s'est révélée comme un élément clé dans l'apparition des symptômes moteurs observés dans la maladie de Parkinson. L'inhibition de cette hyperactivité sous thalamique, ou du moins ses conséquences, ont fait l'objet d'un enjeu thérapeutique majeur dans le traitement de la maladie de Parkinson, notamment par le développement d'approches neurochirurgicales que nous avons déjà évoquées plus haut (cf Contexte Scientifique § I.3.2).

#### *4.3. Noyau sous-thalamique et stimulation électrique à haute fréquence: un traitement de la maladie de Parkinson*

La SHF du NST représente à ce jour le traitement chirurgical le plus efficace des différents types de perturbations motrices du malade parkinsonien (Benabid et al., 1991 ; Krack et al. 1997) et des dyskinésies tardives induites par la L-DOPA (Limousin et al., 1995; Krack et al., 1997). Toutefois, les mécanismes par lesquels la SHF du NST contribue à la

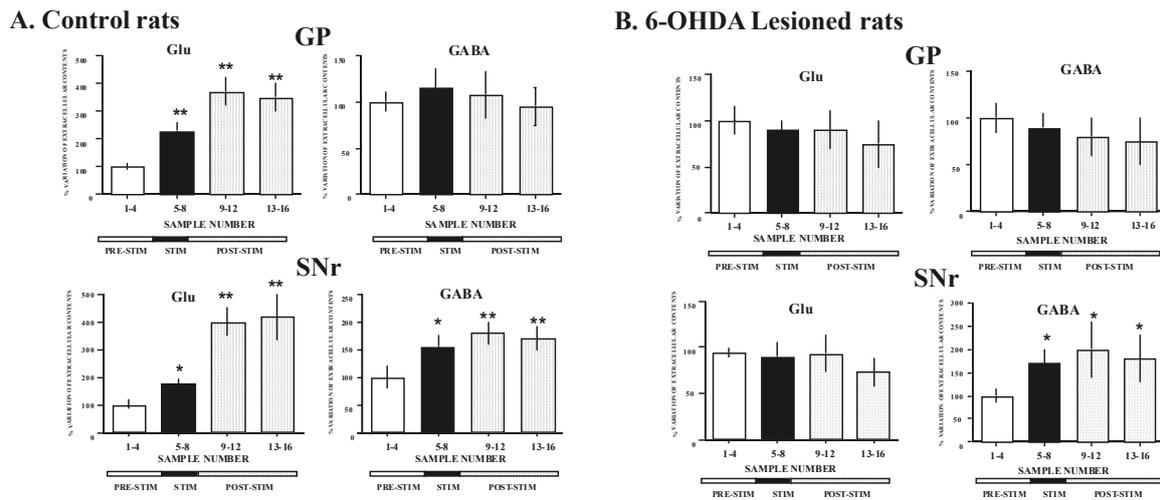
restauration fonctionnelle des processus moteurs impliquant les ganglions de la base sont encore mal connus et suscitent de nombreuses discussions dans la littérature internationale (Benabid et al., 1994; Lozano et al., 2002).

La similitude des effets produits par la lésion et la stimulation du NST a initialement mené à penser que la SHF induisait une inhibition des neurones du NST *via* un phénomène de blocage de dépolarisation (Benazzouz et al., 1995; Beurrier et al., 2001; Magarinos-Ascone et al., 2002). Ainsi, les premières hypothèses, appuyées par des enregistrements électrophysiologiques obtenus *in vivo* et *in vitro*, confirment la diminution de l'hyperactivité du NST par un processus d'inhibition (Beurrier et al., 2001; Magarinos-Ascone et al., 2002; Tai et al., 2003). Cette hypothèse a été renforcée par des études métaboliques et électrophysiologiques qui ont montré une diminution de l'expression des ARNm du CoI dans le NST (Bacci et al., 2004; Tai et al., 2003). Une baisse de l'activité de la SNr et de l'EP chez le rat après SHF a également été mise en évidence (Benazzouz et al., 1995).

D'autres études électrophysiologiques menées sur des tranches de cerveau de rat montrent que la SHF (100-140 Hz) du NST induit une excitation des neurones du NST (Lee et al., 2003) mais montrent également que la SHF entraîne les neurones sur un mode d'activité en bouffées récurrentes (Garcia et al., 2003), à l'origine d'une « normalisation » fonctionnelle de l'activité des neurones de la SNr. Par ailleurs, des études ont montré que les neurones du NST pouvaient être activés par dépolarisation à des fréquences bien supérieures à celle utilisée en clinique humaine (Bevan and Wilson, 1999). L'ensemble de ces études a finalement abouti à la mise en place d'un consensus pour un mécanisme double, excitateur et inhibiteur, au niveau du NST (McIntyre et al., 2004b). Ainsi la SHF imposerait son rythme aux neurones du NST et par conséquent à l'ensemble du réseau des ganglions de la base.

Des données neurochimiques obtenues *in vivo* ont révélé de façon première la complexité des mécanismes de la SHF, montrant que la stimulation du NST induit une augmentation des taux de glutamate dans le GPe et la SNr de rats sains (Windels et al., 2000, 2003, 2005; Boulet et al., 2006) et des données électrophysiologiques obtenues chez le singe ont montré que la SHF du NST induit une augmentation de l'activité des neurones du GPi, structure de projection du NST (Hashimoto et al., 2003). D'autres études *in vivo* suggèrent que la SHF pourrait également recruter et activer des fibres GABAergiques pallido-nigrales passant à proximité du NST (Dostrovsky and Lozano, 2002; Vitek, 2002). D'autre part, on note une forte augmentation des taux extracellulaires de GABA dans la SNr, consécutive à la stimulation du NST (Fig. 10A), (Windels et al., 2000) qui serait responsable de l'inhibition des neurones de la SNr (Maurice et al., 2003). Ces effets seraient davantage associés à la mise en jeu des fibres

GABAergiques pallidales ou intranigrales (Kita et al., 2005; Windels et al., 2005) plutôt qu'aux changements d'activités des neurones du NST. Chez des modèles de rats 6-OHDA, les données neurochimiques mettent en évidence une augmentation de GABA dans la SNr sans modification des taux de glutamate ni dans la SNr, ni dans le GP (Fig. 10B). La résultante de la stimulation électrique du NST est donc différente chez les animaux sains et les animaux lésés.



**Figure 10 :** Variations extracellulaires des taux de glutamate et de GABA collectés dans le GP et la SNr, de manière ipsilatérale à la SHF A, chez des rats sains ( $n = 12$ ) et B, chez des rats ayant subi des lésions totales de la SNc ( $n = 6$ ) (Savasta et al. 2002).

Au final, la question de l'effet inhibiteur ou excitateur de la SHF du NST ne semble pas posséder une réponse simple. Au niveau du NST, un consensus s'accorde à dire que la SHF supprimerait l'activité spontanée et pathologique de celui-ci pour la remplacer par un patron d'activité plus régulier calqué sur la stimulation elle-même (Garcia et al., 2003, 2005). Cependant, la SHF n'affecte pas de la même façon le soma et les axones, de même que les fibres passant à travers ou à proximité de la structure stimulée (McIntyre et al., 2004 a, b). De plus, des études comportementales, électrophysiologiques et neurochimiques montrent que les effets de la SHF sont largement dépendants des paramètres de stimulation utilisés. À basse fréquence (10-50 Hz), la stimulation du NST n'améliore pas, voire aggrave, les symptômes moteurs parkinsoniens (Rizzone et al., 2001; Moro et al., 2002) et ne permet pas de normaliser l'activité pathologique du NST, quelle que soit la valeur des autres paramètres de stimulation (Garcia et al., 2005). Cette absence d'effet s'accompagne d'une absence de

modifications des taux de Glu et de GABA dans la SNr et le GP chez le rat (Windels et al., 2003).

#### *5. Conséquences de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique sur l'activité de la substance noire réticulée*

En lien direct avec le NST, la substance noire réticulée représente, avec l'EP, la structure principale de sortie du réseau des ganglions de la base. Des études comportementales, électrophysiologiques et neurochimiques montrent que les effets de la SHF sur les activités cellulaires de la SNr sont largement dépendants des paramètres de stimulation utilisés. Ainsi, Maurice et collaborateurs (2003) ont montré que l'activité des neurones de la SNr de rats sains anesthésiés dépend de l'intensité de stimulation (Fig. 11A). Pour de fortes intensités ( $>80 \mu\text{A}$ ), les neurones sont activés, alors qu'ils sont inhibés pour de faibles intensités ( $20\text{-}80 \mu\text{A}$ ) (Maurice et al., 2003). Pour des raisons liées aux lois de l'électricité, le champ électrique créé au niveau de la pointe de l'électrode est corrélé à la densité du courant appliqué (McIntyre et al., 2004a). La diffusion de ce courant dépend lui, de la densité des tissus au niveau de la localisation de l'électrode. La non-uniformité du champ à la surface du pôle de stimulation peut expliquer la co-existence de phénomènes d'excitation et d'inhibition au sein de la même structure (Gimsa et al., 2006). Il semblerait que la SHF active préférentiellement les fibres plutôt que les corps cellulaires au sein du NST (McIntyre et al., 2004b). En fonction de l'intensité de stimulation, il semble compréhensible que ce recrutement de fibres soit plus ou moins important à l'intérieur et autour du NST. Ceci expliquerait l'effet à la fois excitateur et inhibiteur sur les neurones de la SNr, par recrutement des fibres glutamatergiques subthalamo-nigrales et GABAergiques pallido-nigrales (Kita et al., 2005), mais également intranigrales (Maurice et al., 2003). Les augmentations mixtes des taux de glutamate et de GABA mesurées chez les rats sains au niveau de la SNr vont également dans ce sens (Windels et al., 2000).

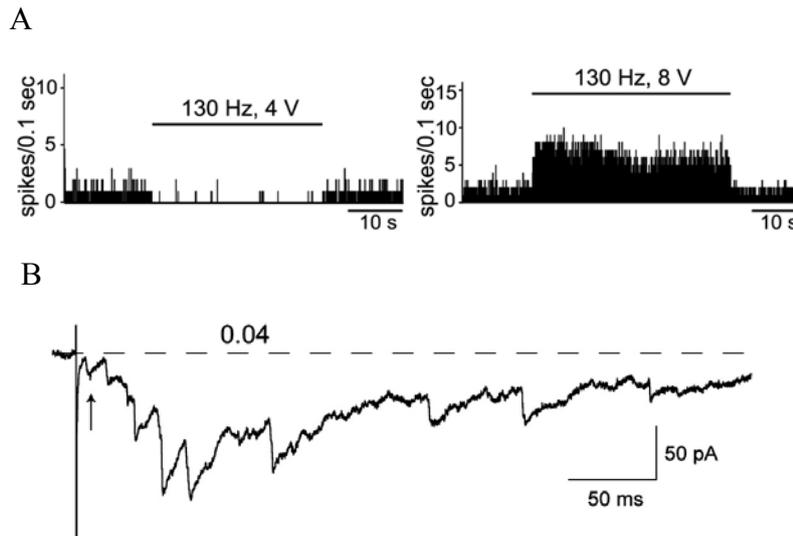
Ainsi, pour des paramètres classiquement utilisés en clinique humaine (130-185 Hz, 60-100  $\mu\text{s}$ , 1-3 mA), il est aujourd'hui admis que la résultante des mécanismes de la SHF du NST correspond à une inhibition des voies de sortie des ganglions de la base (GPi/EP et SNr) dans laquelle l'activation de la transmission GABAergique semble jouer un rôle primordial. Certaines études réalisées chez l'homme montrent une diminution de l'activité des neurones de la SNr, avec des paramètres de stimulation de 140 Hz, 60  $\mu\text{s}$ , 2 mA (Maltete et al., 2007).

Les résultats d'un nombre croissant d'études vont dans ce sens. En effet, des données

électrophysiologiques obtenues chez le rat anesthésié ont montré que l'application iontophorétique de bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, au sein de la SNr permettait d'abolir l'inhibition d'activité initialement induite au sein de cette structure par la SHF du NST (Maurice et al., 2003). D'autre part, des études de microdialyse réalisées chez le rat 6-OHDA ont permis d'observer qu'une SHF du NST d'une heure induisait une augmentation des taux de GABA au sein de la SNr (Windels et al., 2005). La voie GABAergique pallido-nigrale semble directement impliquée dans l'inhibition de l'activité des voies de sortie induite par la SHF du NST. En effet, la lésion du GPe permet de prévenir l'augmentation des taux de GABA observée dans la SNr de rats anesthésiés durant la stimulation du NST (Windels et al., 2005). De même, le blocage de l'activité du GPe par une application locale de gabazine, un antagoniste des récepteurs GABA<sub>A</sub>, permet de bloquer l'inhibition des neurones du GPi induite par la SHF du NST chez le singe (Kita et al., 2005).

Cependant, des études réalisées chez des patients parkinsoniens stimulés (130 Hz, 60  $\mu$ s, 4-6 mA), mettent en évidence que la SHF du NST peut entraîner une augmentation du taux de décharge des neurones de la SNr, mais également une modification du patron de décharge de ces neurones nigraux, suggérant une activation des fibres glutamatergiques des neurones sous-thalamiques chez l'homme (Galati et al., 2006). Il semblerait que ces variations puissent être dues à des paramètres et des volumes (intensité et surface) de stimulation différents (Maltete et al. 2007). Malgré tout, des données électrophysiologiques récentes réalisées *in vitro* chez le rat, montrent également que la stimulation électrique du NST induit une activation des neurones de la SNr. En effet, des courants post-synaptiques excitateurs (EPSCs) ont été enregistrés, par la technique du patch-clamp, au niveau des neurones de la SNr, après une stimulation unique de 100 $\mu$ s, à 20-150  $\mu$ A, des neurones du NST (Fig. 11B). Ces EPSCs sont formés de deux phases : une phase précoce monosynaptique due à une activation de récepteurs AMPA (représentée par la flèche Fig. 11B) et une phase tardive polysynaptique impliquant l'activation de collatérales du NST et l'activation de récepteurs NMDA. Ces EPSCs sont donc complexes et sont, de plus, sous le contrôle d'une inhibition GABAergique tonique (Shen et coll., 2006).

Enfin des travaux réalisés *in vivo* chez le rat ont mis en évidence que l'activité électrique des neurones de la SNr était profondément altérée lors de l'interruption de la transmission dopaminergique, avec passage d'une activité tonique et régulière vers une activité irrégulière, et que dans ces conditions, la SHF du NST entraîne soit une augmentation soit une diminution des activités spontanées des neurones de la SNr. L'ensemble de ces modifications conduit à une régulation du patron de décharge de la SNr (Degos et al., 2005).



**Figure 11: Effets de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique sur l'activité des neurones de la SNr.** A) L'activité des neurones de la SNr varie en fonction de l'intensité de stimulation du NST. Ils sont inhibés pour des intensités  $< 80 \mu\text{A}$  et activés pour des intensités  $> 80 \mu\text{A}$  (Maurice et al., 2003). B) La stimulation du NST induit des courants post-synaptiques excitateurs au niveau des neurones de la SNr (Shen and Johnson, 2006).

Ainsi, les conséquences de la SHF du NST ne sont pas attribuables à la simple suppression de l'influence exercée par le noyau sous-thalamique sur les structures cibles. Au niveau de la SNr, les données suggèrent la mise en œuvre conjointe d'une excitation des neurones glutamatergiques du NST et une implication des fibres de passages GABAergiques provenant du GPe et passant au voisinage de la zone sous-thalamique stimulée.

De façon intéressante, les récentes recherches réalisées sur les mécanismes de la SHF du NST portent un intérêt particulier à la synchronisation des activités électriques au sein des ganglions de la base. En effet, il a été montré que des activités pathologiques synchrones de fréquence 3-7 Hz se développaient dans le GPi et le NST de singe traité au MPTP ainsi que chez des patients parkinsoniens présentant des tremblements de repos. Une activité oscillatoire de haute fréquence (15-25 Hz), dans la gamme de fréquence bêta, a également été observée dans le NST et le GP de ces mêmes malades (Hutchison et al., 2004). Bien que l'existence de relations directes entre ces activités et la maladie de Parkinson ne soit pas encore démontrée, la capacité de la SHF à induire une désynchronisation de l'activité des neurones présents au sein du NST et d'autres structures des ganglions de la base pourrait expliquer en partie son efficacité thérapeutique (Meissner et al., 2005; Foffani et al., 2006).

*Sur la base des observations de changement d'activité neuronales de la SNr lors de la stimulation électrique du NST, et dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes intéressés à l'implication possible des cellules gliales dans ces modifications d'activités au sein de la SNr. Ainsi, dans l'optique de cette étude, je présenterai dans la suite de cette introduction, une description détaillée des différents types de cellules gliales présentes au sein du système nerveux central, ainsi que les différents modes de communication entre neurones et cellules gliales.*

## **II. Communication neurone-glie**

Les cellules gliales ont longtemps été considérées comme des cellules passives du système nerveux central (SNC), cantonnées au rôle de cellules nourricières des cellules neuronales. Le début des années 90 a vu cette notion changer suite à l'observation de vagues calciques astrocytaires en réponse au glutamate (Cornell-Bell et al., 1990). Il est maintenant admis que les astrocytes répondent à une grande variété de neurotransmetteurs et leur liste est aussi longue que celle des molécules activant les récepteurs neuronaux.

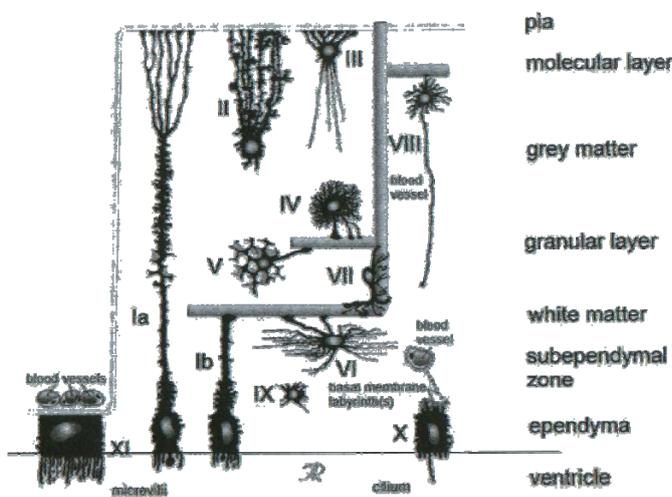
### *1. Les cellules gliales : populations et caractéristiques*

Une des différences fondamentales entre cellules gliales et neuronales est leur excitabilité électrique : les neurones sont électriquement excitables contrairement aux cellules gliales qui sont incapables de générer un potentiel d'action. Bien qu'elles possèdent une majorité de canaux membranaires identiques aux canaux présents sur les cellules neuronales, le niveau d'expression de certains canaux est trop faible pour garantir une activité électrique en réponse à différents stimuli (Perea and Araque, 2005). Leur silence électrique est essentiellement dû à une faible proportion de canaux sodiques dépendants du voltage et une forte proportion de canaux potassiques qui empêchent la génération de potentiel d'action (Butt and Kalsi, 2006). Ces canaux potassiques, majoritairement de type rectifiant entrant (« inward rectifier»), maintiennent un potentiel de repos proche du potentiel d'équilibre du potassium, c'est-à-dire entre -80 et -90 mV, et jouent un rôle important dans la régulation de la concentration de potassium extracellulaire (Butt and Kalsi 2006). Les cellules gliales sont nombreuses, elles représentent environ 90% des cellules du cerveau humain, et sont diverses. Dans le SNC, il y a trois grands types de cellules gliales : les astrocytes et les

oligodendrocytes, issus du tissu neural, et la microglie issue des macrophages (tissu mesodermal). A ces trois principaux types s'ajoute une population de cellules plus récemment découvertes, les cellules NG2 (Nishiyama et al., 2002).

### 1.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus nombreuses et il en existe divers types (Fig. 12) dont les astrocytes protoplasmiques, les astrocytes fibreux, les cellules de Müller (cellules gliales radiaires), les cellules de Bergmann...



**Figure 12 : Morphologie des différents types d'astrocytes.**

*Ia: tanocyte de la pia (cellule intermédiaire entre l'astrocyte et l'épendymocyte), Ib: tanocyte vasculaire, II: astrocyte radial, III: astrocyte marginal, IV: astrocyte protoplasmique, V: astrocyte velaté, VI: astrocyte fibreux, VII: astrocyte périvasculaire, VIII: astrocyte intralaminaire, IX: astrocyte immature, X: épendymocyte, XI: cellule du plexus choroïde (pour revue, voir Verkhratsky A and Butt A, 2007).*

L'apparence morphologique typique des astrocytes est due à l'expression de filaments intermédiaires qui forment le cytosquelette. Les principales protéines formant ces filaments sont la « Glial Fibrillary Acidic Protein » (GFAP) et la vimentine. Ces cellules expriment également une protéine dimérique, S100, dont la sous-unité  $\beta$  est sélectivement synthétisée par les astrocytes. C'est une protéine intracytosolique qui fixe le calcium et participe activement à la régulation de l'organisation structurale de la cellule en interagissant avec différentes protéines du cytosquelette, et notamment la GFAP. Lorsqu'elle est sécrétée dans le milieu extracellulaire par les astrocytes, elle favorise la croissance neuritique et la prolifération astrocytaire (Chatfield et al., 2002). La GFAP et la protéine S100 $\beta$  sont deux marqueurs spécifiques des astrocytes, cependant si toutes les cellules astrocytaires expriment S100 $\beta$ , seuls les astrocytes activés expriment la GFAP (Nishiyama et al., 2005). Ce concept est cependant remis en cause (Wang and Bordey, 2008). En effet, certains auteurs ont montré

que la protéine S100 $\beta$  est exprimée uniquement par un sous-type d'astrocytes matures et par les cellules exprimant NG2. D'autre part, la protéine GFAP serait également exprimée par des cellules ne faisant pas partie de la famille propre des astrocytes (ex : les cellules épendymales).

Morphologiquement, le terme d'astrocyte est un terme large qui englobe de nombreux types astrogliaux. Ainsi, dans le groupe le plus large comprenant les « astrocytes vrais », les cellules ont une morphologie classique en étoile. Le second groupe est formé par les cellules gliales radiaires qui sont des cellules bipolaires avec un corps cellulaire ovoïde et un long prolongement (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007, chapitre 3.1). En plus de ces deux grands groupes d'astrocytes, il existe des petites populations d'astrocytes spécialisés, localisés dans les régions spécifiques du SNC, et possédant pour la plupart de nombreux prolongements. Bien que les astrocytes soient tous issus de cellules germinales astrocytaires, ils sont donc très hétérogènes (Volterra and Meldolesi, 2005).

Au-delà des différences de répartition en fonction des différentes structures du cerveau, il existe également une grande variabilité dans l'évolution des astrocytes à travers les espèces. Les cellules gliales sont apparues très tôt dans la phylogénie, même chez des animaux invertébrés, mais l'évolution du système nerveux central est associée à une augmentation remarquable du nombre et de la complexité de ces cellules (Oberheim et al., 2006). Les données morphologiques concernant le cortex sont les plus fiables et elles montrent que l'humain est l'espèce où le ratio neurone-glie est le plus élevé. Pour donner un exemple, le ratio cellule gliale/neurone chez la souris est de 0,3/1 contre 1,65/1 chez l'humain (Sherwood et al., 2006). Ainsi dans le cerveau humain, les cellules gliales sont majoritaires et il est admis qu'elles sont plus nombreuses que les neurones. Il a été proposé que l'augmentation de leur nombre au cours de l'évolution des espèces puisse signifier une implication de plus en plus importante dans la régulation de la transmission au sein du système nerveux central.

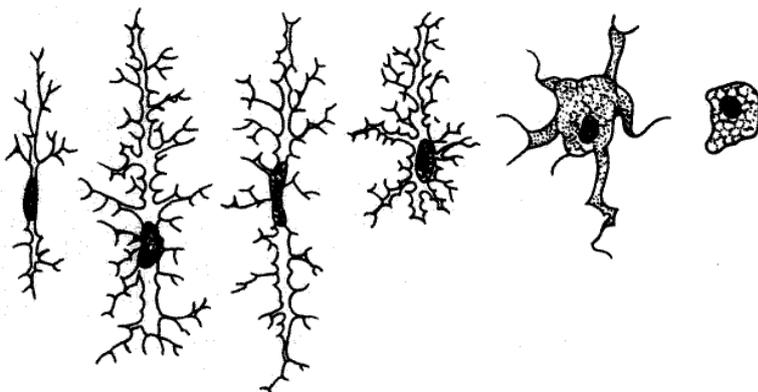
### *1.2. Les oligodendrocytes*

Les oligodendrocytes sont des cellules avec peu de prolongements, ils sont plus petits que les astrocytes et possèdent des noyaux moins denses. Leur cytoplasme contient du reticulum endoplasmique rugueux, des polyribosomes et des microtubules mais pas de glycogène ni de GFAP (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007, chapitre 3.1). Leur rôle principal est la production de myéline qui isole les axones du SNC (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007, chapitre 3.2).

Quatre grandes classes (de I à IV) ont été décrites en 1982 par Del Rio Hortega, en fonction de leur apparence morphologique, du nombre de prolongements et de la taille des axones qu'ils entourent (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007, chapitre 3.2). Ils sont tous issus de progéniteurs communs (OPCs : Oligodendrocyte Progenitor Cells). Les cellules gliales exprimant NG2 sont également des cellules participant à l'oligodendrogenèse car elles possèdent des marqueurs des progéniteurs d'oligodendrocytes.

### 1.3. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont des cellules immunocompétentes résidant dans tout le système nerveux central, même si elles sont exprimées à plus forte densité dans l'hippocampe, le télencéphale olfactif, les ganglions de la base et la substance noire (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007, chapitre 3.5). Ces cellules représentent le système immunitaire du cerveau, elles s'activent dans divers cas de lésions cérébrales ou de pathologies, et représentent environ 10% des cellules gliales en condition physiologique (Kreutzberg, 1996). Dans le SNC mature, les cellules microgliales peuvent être présentes sous trois états : 1) au repos (en condition physiologique), avec un petit soma et de nombreux prolongements fins et très branchés partant dans toutes les directions, 2) sous forme de cellules activées avec des prolongements beaucoup moins longs et plus épais, et un corps cellulaire plus gros. Elles deviennent alors mobiles par des déplacements de type amiboïde pour rejoindre le site de lésion. Enfin, si le dommage cellulaire persiste, les cellules microgliales se transforment en cellules phagocytaires (3), sans prolongement (fig. 13, pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007, chapitre 9.3).



**Figure 13: Représentation des différentes morphologies de cellules microgliales lors de la transformation d'une cellule au repos vers une cellule phagocytaire** (Kreutzberg, 1996).

Les cellules microgliales possèdent de nombreux récepteurs et des sites de reconnaissance de molécules immunes, faisant d'elles des détecteurs parfaits de l'état des tissus du SNC (Kreutzberg, 1996).

#### 1.4. Les cellules NG2 positives

Un quatrième type de cellules gliales peut être décrit au niveau du système nerveux central, les cellules NG2, caractérisées par l'expression d'un chondroïte sulfate protéoglycane, le NG2. Elles représentent environ 10% de la population cellulaire du SNC. Ce sont des cellules mitotiques progénitrices qui participent à l'oligodendrogenèse (Dawson et al., 2000), à la neurogenèse (Aguirre and Gallo, 2004) ainsi qu'au support physiologique des neurones et à la signalisation synaptique (Greenwood and Butt, 2003; Lin et al., 2005). Les cellules immunopositives au NG2 expriment des marqueurs spécifiques des cellules progénitrices des oligodendrocytes et sont généralement considérées comme des cellules de la même lignée, mais elles n'expriment pas les mêmes marqueurs que les oligodendrocytes matures. Les cellules gliales NG2 peuvent ainsi générer des oligodendrocytes pendant le développement du SNC, mais elles génèrent également des neurones et des astrocytes (Wigley et al., 2007) et peuvent être considérées comme des cellules adultes multipotentes. Elles expriment de nombreux canaux dépendants du voltage, impliquant probablement une communication active avec les neurones (Lin and Bergles, 2004). Comme les astrocytes, les cellules gliales NG2 ont une morphologie en étoile avec de nombreux prolongements mais elles n'expriment pas les mêmes marqueurs antigéniques, elles proviennent de sources différentes et se développent selon des chemins différents (Nishiyama et al., 2005) : elles semblent former une population indépendante de celle des astrocytes. Le rôle des cellules NG2 n'est pas encore bien défini, elles ne possèdent pas de transporteur au glutamate et ne sont donc pas impliquées dans la régulation de la transmission glutamatergique comme les astrocytes (cf Contexte Scientifique § III.3), (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007). Cependant, les cellules NG2 peuvent former des contacts avec les astrocytes et les neurones. L'activité neuronale peut induire une augmentation calcique dans les cellules NG2 et il a été mis en évidence que l'ATP est un médiateur dans la communication entre astrocytes et cellules NG2. Ainsi, neurones, astrocytes et cellules NG2 sont fonctionnellement connectés (Wigley et al., 2007). Le glutamate libéré au niveau synaptique pourrait servir à maintenir les cellules NG2 dans un stade quiescent (Yuan et al., 1998) tandis que l'ATP pourrait stimuler leur prolifération et leur différenciation (Ishibashi et al., 2006). Les cellules NG2 sont encore peu connues mais si aucun rôle direct dans la régulation de l'activité neuronale n'a été décrit, elles ont par contre été impliquées dans la « cicatrisation gliale » en réponse à une lésion du SNC et à la régénération des oligodendrocytes participant à la remyélinisation des fibres nerveuses (Dawson et al., 2000).

## 2. Acteurs potentiels impliqués dans la communication neurone-glie

La communication neurone-glie met en jeu de nombreux transmetteurs, à la fois gliaux et neuronaux, qui vont agir sur les récepteurs présents au niveau de ces deux familles de cellules du SNC. Je vais présenter brièvement l'implication de trois transmetteurs principaux auxquels je me suis particulièrement intéressée au cours de mon étude : le glutamate, le GABA et l'ATP.

### 2.1 Le glutamate

Le glutamate est une molécule très simple (acide aminé) qui peut, cependant, exercer une gamme d'effets complexes. La spécialisation de ces effets repose en partie sur la grande variété de récepteurs du glutamate et sur leur localisation subcellulaire. Certains sont directement couplés à un canal ionique (récepteurs ionotropiques), d'autres activent des cascades de signalisation par un couplage avec des protéines G qui peuvent entraîner de nombreux processus de régulation (récepteurs métabotropiques).

#### 2.1.1. Synthèse et libération

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur le plus abondant du système nerveux central. Il est synthétisé au niveau du SNC car il ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. Il existe deux principales voies de synthèse possibles : 1) par désamination de la glutamine ou 2) par transamination de l' $\alpha$ -cétoglutarate. La voie de désamination de la glutamine est la voie principale de production de glutamate. La glutamine, d'origine gliale, représente le précurseur majeur de la synthèse du glutamate. Elle est synthétisée dans les cellules gliales par la glutamine synthétase, puis libérée dans le milieu extracellulaire et captée par les terminaisons axonales pour être transformée en glutamate par la glutaminase neuronale, une enzyme mitochondriale (Purves et al. 2003 ; Rodriguez Diaz et al., 2005). L' $\alpha$ -cétoglutarate est un produit de dégradation du glucose par le cycle de Krebs. Sa transamination par l'aspartate aminotransférase permet la production de glutamate.

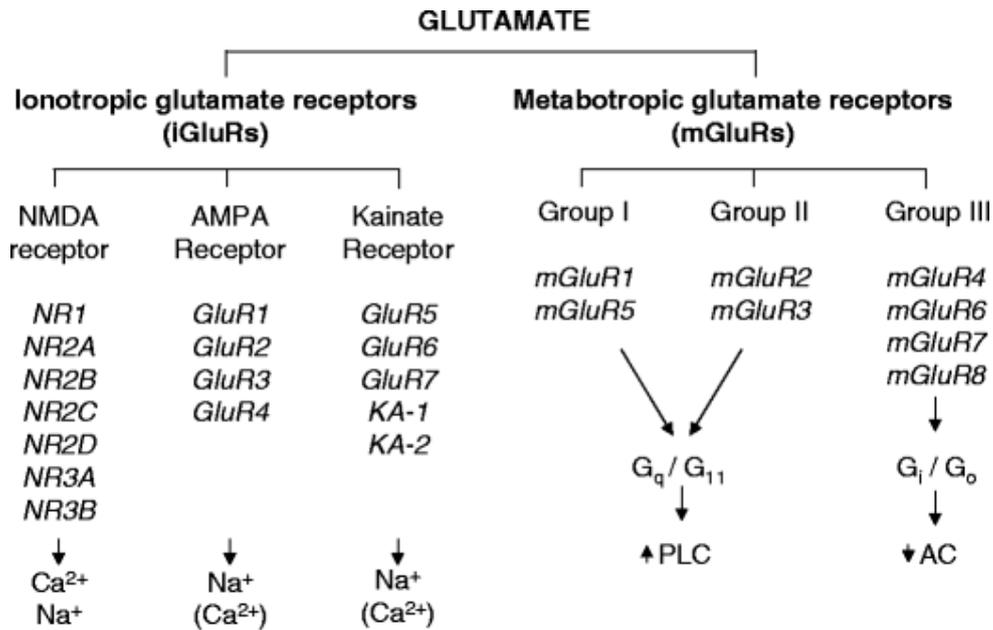
Le glutamate peut ensuite être libéré dans le milieu extracellulaire selon deux modes : 1) une libération vésiculaire, par exocytose dépendante du calcium et du potentiel de membrane, et 2) une libération non vésiculaire, essentiellement gliale, moins bien connue. Si la libération vésiculaire neuronale est la plus connue, certains auteurs laissent supposer que la libération la plus importante de glutamate s'effectue de façon non-vésiculaire (Jabaudon et al., 1999). Cette dernière peut être neuronale ou gliale. Elle peut se faire par diffusion à travers des

canaux impliqués dans le maintien du volume de la cellule (VRACs : Volume Regulated Anions Channels), laissant ainsi passer le glutamate afin de maintenir une concentration constante dans la cellule (pour revue Danbolt, 2001). Au niveau des astrocytes, il existe six mécanismes de libération de glutamate connus : 1) une diffusion par ouverture de canaux anioniques VRACs impliqués dans la régulation du volume de la cellule, notamment lors de phénomène d'hypoosmose, 2) une exocytose dépendante du calcium, 3) une libération par un anti-pore cystine en échange avec une cystine, 4) une libération à travers des récepteurs purinergiques et notamment le P2X<sub>7</sub>, 5) un passage par des « héli-canaux » membranaires (connexines) ou 6) une libération par des transporteurs au glutamate fonctionnant en mode reverse, libérant du glutamate dans le milieu extracellulaire par échange d'acides aminés excitateurs tels que le D-aspartate, le L-aspartate ou le L-cystéate, mais ce transport n'a pas été observé en condition physiologique. Il a été mis en évidence durant des périodes d'ischémies ou de blocage de métabolique (Malarkey et al., 2008). Une libération de gliotransmetteurs par une voie lysosomale a également été décrite *in vitro*. Bien que dépendante du calcium, la libération par les lysosomes ne dépend pas de l'activité cellulaire. Elle est relativement lente car elle nécessite une libération de calcium par les stocks interne des astrocytes et, de ce fait, elle est beaucoup moins rapide que les phénomènes de neurotransmission. Elle serait sans doute impliquée dans des phénomènes de protection par libération de molécules anti-inflammatoire (cytokines, adénosine,...) mais une libération de glutamate par ce système lysosomal n'est pas exclue (Li et al., 2008).

Une fois libéré dans le milieu extracellulaire, le glutamate va agir sur ses récepteurs présents au niveau neuronal et glial, mais il va également être en partie recapté par des transporteurs à haute affinité essentiellement gliaux (GLT-1, GLAST), (Danbolt, 2001), ou par les récepteurs purinergiques dont le P2X<sub>7</sub> (Pankratov et al., 2008).

### 2.1.2. Récepteurs

Le glutamate libéré au niveau des terminaisons nerveuses agit sur deux types de récepteurs (Fig. 14) : les récepteurs ionotropiques, qui comportent un canal ionique intrinsèque activé par le ligand et qui ont une cinétique d'activation très rapide, et les récepteurs métabotropiques, couplés à différents messagers intracellulaires *via* l'activation des protéines G (Ozawa et al., 1998). La cinétique d'action des récepteurs métabotropiques est beaucoup plus lente que celle des ionotropiques.



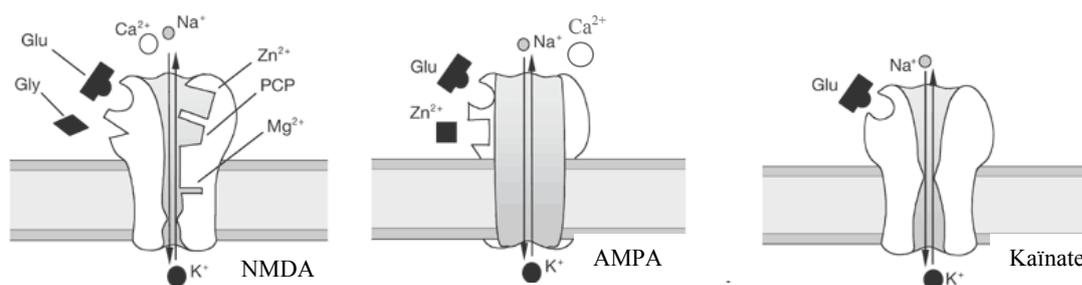
**Figure 14 : Vue générale des différentes familles de récepteurs glutamatergiques.** Présentation des sous-unités respectives des récepteurs glutamatergiques ionotropiques et des principaux modes de transduction des récepteurs métabotropiques. Les récepteurs ionotropiques sont perméables à différents ions mono ou divalents tandis que les récepteurs métabotropiques sont couplés à des protéines G activatrices ou inhibitrices (PLC : phospholipase C, AC : adénylate cyclase) (Kew and Kemp, 2005).

- Les récepteurs ionotropiques forment une famille de canaux cationiques qui sont principalement perméables aux ions sodium ( $\text{Na}^+$ ) et potassium ( $\text{K}^+$ ) mais également, pour certains, aux ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Ils ont été subdivisés historiquement sur la base de leur affinité pour différents agents pharmacologiques (essentiellement des agonistes), en deux groupes principaux : les récepteurs NMDA (activables sélectivement par le N-méthyl-D-aspartate) et les récepteurs de type non-NMDA (insensibles au N-méthyl-D-aspartate). Les récepteurs non-NMDA sont eux-même subdivisés en deux sous-groupes, les récepteurs AMPA (activés sélectivement par l'acide  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionique) et les récepteurs kaïnate (qui présentent une plus grande affinité pour l'acide kaïnique), (Ozawa et al., 1998).

Les récepteurs NMDA fonctionnels sont des hétéromères, composés de l'assemblage de plusieurs sous-unités : NR1, NR2<sub>A-D</sub> et NR3<sub>A-B</sub> (Fig. 14). Ces sous-unités forment une structure tétramérique où la sous-unité NR1 se combine à NR2<sub>A-D</sub> ou à NR3<sub>A-B</sub> (Fig. 15). Le canal est perméable principalement à l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  mais également aux ions  $\text{K}^+$  et  $\text{Na}^+$ . Il possède une structure complexe qui lui confère des propriétés singulières notamment un site de liaison

pour le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) dans le canal ionique. Au potentiel de repos de la membrane, l'ion  $Mg^{2+}$  bloque le canal et empêche le passage d'ions. Une dépolarisation membranaire est alors nécessaire pour lever cette inhibition et activer le récepteur. Le glutamate permet alors l'ouverture du canal cationique, et ce, avec une cinétique relativement lente qui permet une action durable. Ces récepteurs possèdent également un site de liaison pour des co-agonistes tels que la glycine ou la D-sérine, un site de modulation par les polyamines qui sont des composés organiques possédant plusieurs amines, ainsi qu'un site de liaison pour le zinc permettant le contrôle de l'ouverture du canal (effet inhibiteur), (Cull-Candy et al., 2001). Au niveau du canal, on trouve également un site sensible à la phencyclidine, dont l'activation entraîne une ouverture continue du canal.

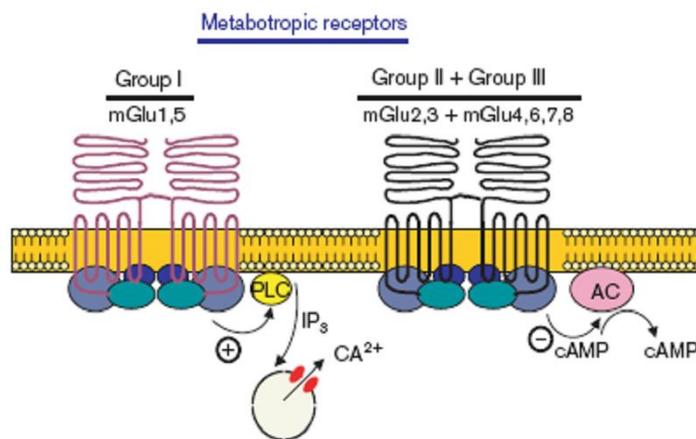
Les récepteurs AMPA forment un canal perméable principalement aux ions  $Na^+$  et  $K^+$ , et véhiculent les courants glutamatergiques excitateurs rapides (Fig. 15). Ils sont constitués de sous-unités différentes qui forment un pentamère. A ce jour, quatre sous-unités distinctes ont été clonées, appelées GluR<sub>1-4</sub> (Hollmann and Heinemann, 1994). Les propriétés du canal changent en fonction des sous-unités qui le composent. En effet, alors que la plupart des récepteurs du SNC contiennent la sous-unité GluR<sub>2</sub>, il existe des récepteurs résultant de l'assemblage des sous-unités GluR<sub>1</sub>, GluR<sub>3</sub> et GluR<sub>4</sub>, qui confère aux récepteurs AMPA une perméabilité aux ions  $Na^+$ ,  $K^+$  mais également au  $Ca^{2+}$ . La présence de la sous-unité GluR<sub>2</sub> rend au contraire le canal imperméable au  $Ca^{2+}$  (Burnashev et al., 1995).



**Figure 15: Représentation des différents types de récepteurs ionotropiques glutamatergiques.** Chaque type de récepteur est formé de 4 à 5 sous-unités qui déterminent les propriétés fonctionnelles du canal. Les récepteurs AMPA et kainate sont préférentiellement perméables au sodium ( $Na^+$ ) et au potassium ( $K^+$ ) tandis que les récepteurs NMDA sont fortement perméables au calcium ( $Ca^{2+}$ ).

Enfin, les récepteurs kaïnate résultent de l'assemblage de cinq sous-unités, nommées GluR<sub>5-7</sub> et KA<sub>1-2</sub>. Les récepteurs kaïnate peuvent former des complexes homomériques fonctionnels à partir des sous-unités GluR<sub>5</sub> et GluR<sub>6</sub> (Egebjerg et al., 1991), les sous-unités KA seules ne pouvant former un canal fonctionnel (Kew and Kemp, 2005). Ils sont principalement perméables aux ions Na<sup>+</sup> et K<sup>+</sup> (Fig. 15).

- Les récepteurs métabotropiques glutamatergiques, nommés mGluRs, sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G (Ozawa et al., 1998). A ce jour, huit d'entre eux ont été clonés (mGluR<sub>1-8</sub>). Sur la base de similitudes de séquence, de leur profil pharmacologique et de leur mode de signalisation intracellulaire, ils ont été classés en trois groupes I, II et III (Fig. 16). Le groupe I comprend les récepteurs mGluR<sub>1</sub> et mGluR<sub>5</sub>, le groupe II, les mGluR<sub>2</sub> et mGluR<sub>3</sub> et le groupe III, les mGluR<sub>4</sub>, mGluR<sub>6</sub>, mGluR<sub>7</sub> et mGluR<sub>8</sub>. Les récepteurs du groupe I sont positivement couplés à la phospholipase C et activent ainsi la production d'inositol trisphosphate (InsP<sub>3</sub>) ; les groupes II et III sont négativement couplés à l'adénylyl-cyclase et leur stimulation conduit donc à une diminution des taux intracellulaires d'AMPc (Fagni et al., 2000).



**Figure 16: Représentation des différentes classes de récepteurs métabotropiques glutamatergiques.** Les récepteurs du groupe I sont couplés à une protéine activatrice, couplée à la phospholipase C, qui va ainsi produire de l'inositol triphosphate (InsP<sub>3</sub>) pouvant entraîner une sortie de calcium des stocks internes. Les récepteurs des groupes II et III sont couplés à une protéine G inhibitrice permettant la production d'adénosine monophosphate cyclique (cAMP).

### 2.1.3 Transporteurs

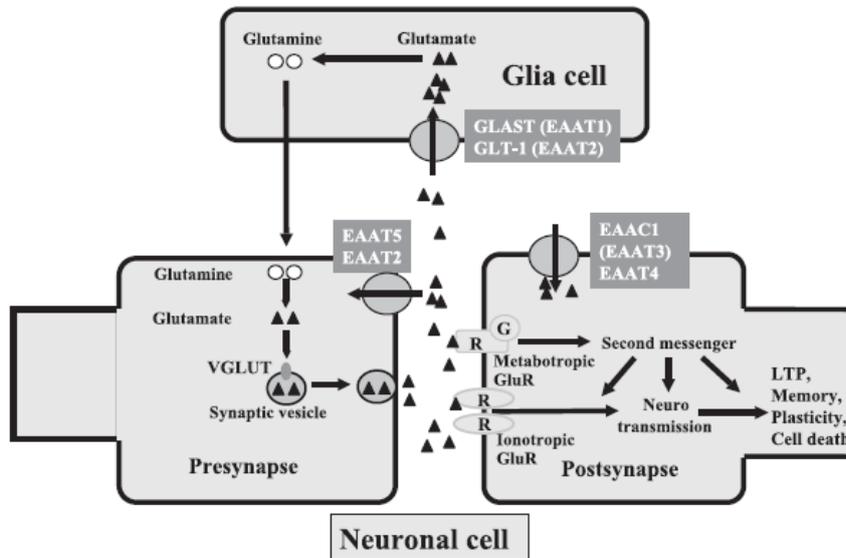
Le glutamate n'est pas dégradé dans la fente synaptique. Suite à sa libération, il est activement recapté par les neurones et les cellules gliales. Le système de recapture a pour rôle de maintenir une concentration basse de glutamate dans l'espace synaptique et pérисynaptique, condition nécessaire à une transmission synaptique efficace et à la protection des cellules d'un excès de glutamate extracellulaire.

- *Les transporteurs de la membrane plasmique*

Les transporteurs membranaires comprennent plusieurs types dont cinq ont été clonés à ce jour. La nomenclature actuelle utilise le terme d'EAAT pour « Excitatory Amino Acid Transporter ». On distingue ainsi : EAAT1 (ou GLAST), EAAT2 (ou GLT-1), EAAT3 (ou EAAC<sub>1</sub>), EAAT4, EAAT5. Ces cinq protéines catalysent le transport de L-glutamate (mais aussi de L- et D-aspartate) en utilisant, comme source d'énergie, les gradients de Na<sup>+</sup> et de K<sup>+</sup> (pour revue, Danbolt, 2001). Les transporteurs GLAST (Glutamate/Aspartate Transporter) et GLT-1 (Glutamate Transporter 1) sont des transporteurs gliaux qui jouent un rôle prépondérant dans le maintien des concentrations extracellulaires de glutamate à un faible niveau afin d'éviter les phénomènes d'excitotoxicité (Rothstein et al., 1996) tandis que EAAC1, et EAAT4 sont exprimés par les neurones (Galvan et al., 2006), (Fig. 17). Les EAAT5 sont exprimés uniquement au niveau de la rétine.

- *Les transporteurs vésiculaires*

Ces transporteurs sont exprimés au niveau des vésicules de sécrétions dans les terminaisons neuronales et permettent l'endocytose du glutamate dans ces vésicules (Shigeri et al., 2004). Ils n'interviennent donc pas dans la régulation des taux de glutamate extracellulaire mais ils permettent une régulation des concentrations de glutamate à l'intérieur des terminaisons synaptiques. A ce jour, trois types de transporteurs vésiculaires ont été clonés VGLUT1, VGLUT2 et VGLUT3. Ce transport vésiculaire est indépendant du sodium et du potassium. Les transporteurs possèdent une faible affinité pour le glutamate, mais une haute sélectivité pour le L-glutamate, et sont activés par une faible concentration de chlore (pour revue Danbolt, 2001). Par contre l'activité des VGLUTs dépend du gradient électrochimique de protons au niveau des vésicules, généré par une ATPase à proton vésiculaire. Ces transporteurs ont été décrits essentiellement au niveau des terminaisons neuronales, les VGLUT1 et 2 étant présents par des neurones glutamatergiques tandis que les VGLUT 3 sont exprimés par des neurones non glutamatergiques (Shigeri et al., 2004).



**Figure 17:** Représentation schématique de l'ensemble des mécanismes de la recapture de glutamate au niveau d'une terminaison synaptique (Shigeri 2004). La présence et la localisation des principaux récepteurs et transporteurs sont représentées.

## 2.2 Le GABA

L'acide gamma-amino butyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. C'est un neuromodulateur qui est reconnu comme étant inhibiteur à l'âge adulte mais qui est excitateur lors du développement embryonnaire. Il intervient dans de nombreux processus physiologiques, notamment au niveau du contrôle moteur, de la vision ou encore dans les phénomènes de contrôle d'anxiété et de la peur. Il a une action dépolarisante excitatrice sur les cellules gliales.

### 2.2.1. Synthèse et libération

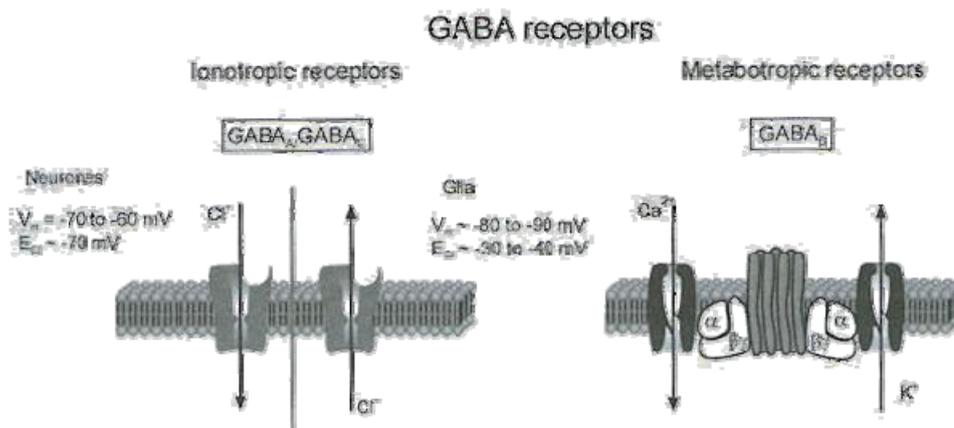
Le GABA est synthétisé par décarboxylation du glutamate grâce à une enzyme, la glutamate décarboxylase (GAD), présente exclusivement au niveau des neurones et plus particulièrement au niveau des terminaisons axonales GABAergiques. Il existe deux isoformes de la GAD issues de deux gènes différents (Erlander et al., 1991) : la GAD 65, localisée préférentiellement au niveau axonal, et la GAD 67 localisée plutôt au niveau somato-dendritique (Jenkins and Simmons, 2006). Stocké dans les granules des terminaisons présynaptiques, et libéré dans la fente synaptique, le GABA agit sur des récepteurs spécifiques de type GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>B</sub> situés au niveau postsynaptique mais également sur les cellules gliales. Une partie du GABA libéré est recaptée par des transporteurs présents au niveau des terminaisons présynaptiques (recapture neuronale), une autre partie diffuse et est partiellement captée par les cellules gliales (capture gliale). Les mitochondries des cellules

gliales transforment, grâce à la GABA transaminase, le GABA en acide succinique semi-aldéhyde, lui-même transformé en acide succinique, qui permet d'alimenter le cycle de Krebs (voie d'entrée) afin de produire de l'énergie.

### 2.2.2. Récepteurs

Le GABA va agir à la fois sur des récepteurs ionotropiques et sur des récepteurs métabotropiques (Fig. 18).

Les récepteurs ionotropiques sont des canaux ioniques perméables au chlore. Ils sont divisés en deux sous-types, les récepteurs GABA<sub>A</sub> largement répandus dans le SNC, et les récepteurs GABA<sub>C</sub> essentiellement concentrés au niveau de la rétine (Bormann, 2000). Ils sont constitués de plusieurs sous-unités qui forment un pentamère et les propriétés physiologiques et pharmacologiques spécifiques des récepteurs dépendent de l'assemblage des sous-unités (Hevers et al., 1998). De nombreuses sous-unités des récepteurs GABA ionotropiques ont été caractérisées : les sous-unités  $\alpha$ 1-  $\alpha$ 6,  $\beta$ 1-  $\beta$ 4,  $\gamma$ 1-  $\gamma$ 3,  $\rho$ 1-  $\rho$ 3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$  (Galvan et al., 2006). Les récepteurs GABA<sub>A</sub> les plus communs sont formés de deux sous-unités  $\alpha$ , deux  $\beta$  et une sous-unités  $\gamma$ , tandis que les GABA<sub>C</sub> sont formés de sous-unités  $\rho$  (Bormann, 2000). La fixation du GABA sur les récepteurs GABA<sub>A</sub> présents à la surface des neurones provoque l'ouverture du canal et conduit à une entrée de Cl<sup>-</sup> dans la cellule. A l'inverse, l'activation de ces récepteurs sur les cellules gliales va entraîner une sortie de Cl<sup>-</sup>, car le gradient de chlore est inversé dans ces cellules (cf Contexte Scientifique II.2.4.1), (Fig. 18).



**Figure 18 :** Les récepteurs au GABA sont composés de récepteurs ionotropiques et métabotropiques. Les récepteurs GABA<sub>A</sub> et GABA<sub>C</sub> sont liés à des canaux chlore (Cl<sup>-</sup>) et leur activation va induire des mouvements de Cl<sup>-</sup> en accord avec le gradient électrochimique des cellules : une entrée de Cl<sup>-</sup> dans les neurones et une sortie dans les cellules gliales. Les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont couplés à des protéines G contrôlant l'ouverture de canaux calciques et potassiques (pour revue, Verkhratsky and Butt, 2007, Chapitre 5).

Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs transmembranaires couplés à une protéine G associée à des canaux calciques dépendants du voltage ou à des canaux potassiques rectifiants (Fig. 18). Ils sont représentés par une seule famille, les récepteurs GABA<sub>B</sub>, composés de deux sous-unités GABA<sub>B</sub> R1 et GABA<sub>B</sub> R2, formant un hétérodimère. L'activation des récepteurs couplés à un canal Ca<sup>2+</sup>, entraîne une diminution des courants calciques et donc, une diminution de la libération de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons associées. L'activation des récepteurs couplés à un canal K<sup>+</sup> augmente la conductance aux ions K<sup>+</sup> et induit donc une hyperpolarisation des neurones post-synaptiques. Dans les deux cas, on observe une diminution de l'excitabilité et de l'activité cellulaire.

### 2.2.3 Transporteurs

Après libération dans la fente synaptique, le GABA est recapté par des transporteurs sélectifs exprimés par les neurones GABAergiques et les cellules gliales. Ces transporteurs sont des protéines membranaires de 12 segments transmembranaires. Le transport du GABA est dépendant des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup>. L'ion Cl<sup>-</sup> se fixe sur un site proche du site de fixation du GABA et augmente l'affinité du transporteur pour son substrat. Le gradient Na<sup>+</sup> est nécessaire au transport du GABA dans la cellule (symport 2 Na<sup>+</sup> / 1 GABA), (Clausen et al., 2006). A ce jour, 4 types de transporteurs membranaires ont été caractérisés : GAT-1, GAT-2, GAT-3 et BGT-1 (Betaine/GABA transporter ou GAT-4).

Il existe également un transporteur vésiculaire du GABA (VIAAT : vesicular inhibitory amino acid transporter ou VGAT), (McIntire et al., 1997). Ce transporteur est très peu connu mais des études montrent qu'il est fortement concentré au niveau des terminaisons synaptiques des neurones GABAergiques (Chaudhry et al., 1998).

## 2.3 L'ATP

L'ATP est une molécule ubiquitaire présente dans toutes les cellules, notamment dans les mitochondries où il est produit pour fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule. Le rôle de l'ATP en tant que transmetteur excitateur rapide au sein du système nerveux central est aujourd'hui bien établi (Burnstock, 2006; Pankratov et al., 2006).

### 2.3.1. Synthèse et libération

L'ATP est produit au cours de la respiration mitochondriale. Dans la cellule, une grande partie de l'énergie produite dans les voies cataboliques se retrouve sous forme de

NADH et de FADH<sub>2</sub>. L'oxydation de ces facteurs par des complexes de la chaîne mitochondriale entraîne la production d'électrons et la libération de H<sup>+</sup> formant un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. L'énergie produite par ce gradient de protons permet la synthèse d'ATP, à partir d'adénosine diphosphate (ADP), et grâce à l'ATP synthase mitochondriale qui catalyse la réaction.

L'ATP peut être libéré au niveau extracellulaire *via* différents mécanismes. Le mécanisme le plus connu est une libération par exocytose dépendante du calcium, qui peut avoir lieu au niveau neuronal et glial (Pankratov et al., 2006). Il peut également être libéré au niveau des cellules gliales par 1) des transporteurs, comme par exemple des transporteurs type « ATP-Binding Cassette » (Higgins, 1995) ou des canaux chlores activés par un étirement de la membrane (canaux stretch), et 2) une étude montre également la possibilité de libération d'ATP par l'ouverture transitoire de connexines (hémi-canaux) membranaires non-sélectifs (Arcuino et al., 2002), cette simple diffusion d'ATP pouvant réguler la propagation des vagues calciques (pour revue, Fields and Stevens, 2002).

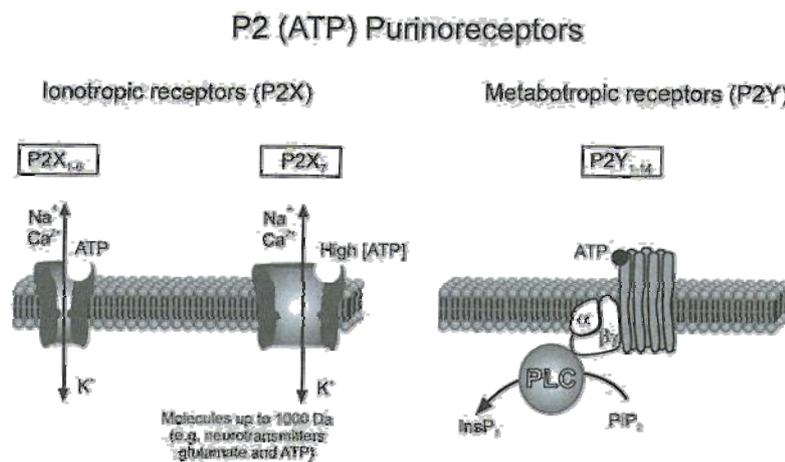
L'ATP peut être stocké dans des vésicules propres ou dans des vésicules mixtes en présence d'autres neurotransmetteurs, comme par exemple le glutamate ou le GABA (Fields and Stevens, 2000). Une fois libéré, l'ATP va agir sur des récepteurs purinergiques à l'ATP de type P2X et/ou P2Y (Ralevic and Burnstock, 1998), présents à la surface des neurones et des cellules gliales. Une partie de l'ATP va être rapidement dégradée par les ectonucléases en ADP puis en AMP et enfin en adénosine (Burnstock, 2006). L'adénosine est elle-même un transmetteur qui va agir sur des récepteurs à l'adénosine de type métabotropiques couplés à des protéines G et qui exercent de nombreux effets au niveau cellulaire : une modulation de type inhibition de la transmission synaptique, un effet neuroprotecteur en cas de dommage cérébral (Benarroch, 2008). Au niveau des astrocytes, l'activation des récepteurs à l'adénosine va conduire à une modulation du métabolisme du glycogène, des transporteurs au glutamate ou encore du phénomène d'astroglie (Daré et al., 2007).

### 2.3.2. Récepteurs

Les récepteurs purinergiques se divisent en deux principaux types : les récepteurs ionotropiques P2X, et les récepteurs métabotropiques P2Y (Fig. 19).

Les récepteurs purinergiques ionotropiques P2X sont des canaux cationiques perméables au Ca<sup>2+</sup>, au Na<sup>+</sup> et au K<sup>+</sup> (Ralevic and Burnstock, 1998) dont l'activation est extrêmement rapide (de l'ordre de 10 ms environ). Ce sont des récepteurs homo ou hétéromériques qui doivent être composés d'au moins trois monomères pour être

fonctionnels. Il existe à ce jour sept sous-unités connues au niveau du SNC : P2X<sub>1-7</sub> (Burnstock, 2007), (Fig. 19). La multitude de combinaisons possibles par assemblage des sous-unités permet de produire une palette de récepteurs avec des propriétés biophysiques différentes : ainsi les récepteurs composés des sous unités P2X<sub>1</sub> et P2X<sub>3</sub> présentent une désensibilisation très rapide et une reprise d'activité très lente (Pankratov et al., 2008). Le récepteur P2X<sub>7</sub>, une fois activé, forme un large pore pouvant laisser passer de grosses molécules de 900-1000 Daltons, dont le glutamate. Son activation nécessite de fortes concentrations en ATP et il est particulièrement abondant sur les cellules microgliales (pour revue Verkhratsky and Butt, 2007). L'entrée de Na<sup>+</sup> et de K<sup>+</sup> va conduire à une dépolarisation de la cellule et l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage (James and Butt, 2002). Cette entrée de Ca<sup>2+</sup> va induire une libération de calcium par les stocks internes (CICR, Calcium Induced Calcium Release).



**Figure 19 : Représentation des récepteurs purinergiques à l'ATP.** Les P2X sont des récepteurs ionotropiques dont l'activation par l'ATP va conduire à un changement de configuration rapide permettant le passage d'ions sodiques (Na<sup>+</sup>), potassiques (K<sup>+</sup>) et calciques (Ca<sup>2+</sup>) à travers le pore du canal. Le récepteur P2X<sub>7</sub> forme un large pore pouvant laisser passer des molécules de 1 kDa. Les P2Y sont des récepteurs métabotropiques avec sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G et à des phospholipases C, conduisant à la formation d'InsP<sub>3</sub>.

Les récepteurs métabotropiques P2Y sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (Fig. 19). Huit sous-types ont été clonés : P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub> et P2Y<sub>14</sub>, et ils sont tous présents au niveau du SNC. La stimulation de ces récepteurs va activer de nombreuses cascades de signalisation associées à de nombreuses enzymes (comme la phospholipase C, l'adénylate ou la guanylate cyclase, ...), et/ou à des canaux membranaires (pour revue Pankratov et al., 2008). Ils ont donc une

cinétique de réaction beaucoup plus lente que les P2X. Ces cascades de signalisation vont, à leur tour, conduire à une régulation des activités cellulaires (prolifération, activité synaptique...) par la libération de calcium des stocks internes (pour revue voir Pankratov et al., 2008).

#### 2.4 Localisation cellulaire des différents récepteurs et transporteurs

Tous les récepteurs décrits ci-dessus peuvent être exprimés par les cellules gliales et neuronales. Je vais décrire, d'une manière générale, la localisation des récepteurs au niveau des cellules gliales. La localisation des récepteurs neuronaux au sein des ganglions de la base étant bien étudiée, je décrirai plus spécifiquement leur distribution au sein de la SNr.

##### 2.4.1 Les récepteurs gliaux

Les récepteurs ionotropiques sont abondants au niveau des cellules gliales dans l'ensemble du cerveau. La présence de récepteurs AMPA a été clairement mise en évidence au niveau des astrocytes. Ils sont composés essentiellement des sous-unités GluR1, GluR3 et GluR4, et sont donc perméables au calcium (Porter and McCarthy, 1997). La présence des récepteurs NMDA a, quant à elle, été décrite *in situ* au niveau des cellules astrogliales du cortex et de la moelle épinière (Verkhratsky and Kirchhoff, 2007b). Contrairement aux récepteurs NMDA neuronaux, les récepteurs NMDA gliaux possèdent un très faible blocage par l'ion magnésium et peuvent être ainsi activés à un potentiel beaucoup plus bas que le potentiel de +30 mV nécessaire pour l'activation des récepteurs neuronaux.

Les récepteurs métabotropiques exprimés à la surface des cellules gliales sont essentiellement des mGluR1, mGluR3 et mGluR5, et leur activation aboutit à une augmentation de calcium, *via* une libération des stocks internes et une régulation des réactions dépendantes de l'AMP cyclique (Verkhratsky and Steinhauser, 2000).

Les cellules gliales expriment également des récepteurs GABA<sub>A</sub> mais la résultante fonctionnelle de leur activation est très différente de celle des récepteurs neuronaux. En effet les cellules gliales contiennent beaucoup plus d'ions chlore Cl<sup>-</sup> que les neurones matures (35 mM *versus* 3-5 mM) car le gradient de Cl<sup>-</sup> est inversé par l'expression de co-transporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2 Cl<sup>-</sup> et de l'échangeur Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Kettenmann and Schachner, 1985). Ainsi le potentiel de réversion du Cl<sup>-</sup> est de -35 mV dans les cellules gliales et l'ouverture des canaux Cl<sup>-</sup> induit un efflux de Cl<sup>-</sup> qui est dépolarisant. L'activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> va donc induire une dépolarisation membranaire suffisante pour induire une entrée de calcium *via* les

canaux calciques dépendants du voltage. L'expression des récepteurs GABA<sub>B</sub> est beaucoup plus faible que celle des GABA<sub>A</sub> dans les cellules gliales (Verkhratsky and Steinhauser, 2000).

Les cellules gliales ont la particularité d'exprimer des récepteurs purinergiques en abondance (Fields and Burnstock, 2006). Elles expriment les deux types différents de récepteurs : les ionotropiques P2X et les métabotropiques P2Y, bien que ces derniers soient prédominants. L'activation de ces récepteurs par l'ATP va induire une augmentation de calcium cytoplasmique et contribue notamment à la propagation de vagues calciques inter-astrocytaires (pour revue, Verkhratsky et Butt, 2007). Elles expriment également des récepteurs à l'adénosine (Dare et al., 2007).

Hormis ces principaux récepteurs, les cellules gliales possèdent à leur surface des transporteurs au glutamate GLT1 et GLAST qui jouent un rôle essentiel dans la régulation et la recapture du glutamate au niveau de la fente synaptique (Rothstein et al., 1996). Des transporteurs au GABA de type GAT3 sont présents sur les cellules gliales mais leur rôle n'est pas encore clairement défini. En complément de ces récepteurs et transporteurs, de nombreux canaux ioniques dépendants du voltage (canaux potassiques, canaux calciques, canaux sodiques, aquaporines...) sont présents ainsi que des récepteurs aux cytokines et chemokines, aux molécules du complément, des récepteurs à l'endothéline ou encore à la thrombine (pour revue, Verkhratsky et Butt, 2007, chapitre 5).

#### *2.4.2 Les récepteurs neuronaux présents au niveau de la substance noire réticulée*

La substance noire réticulée reçoit des afférences glutamatergiques en provenance du NST et des afférences GABAergiques en provenance du striatum et du GP. Nous allons donc décrire la distribution des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques au sein de cette structure.

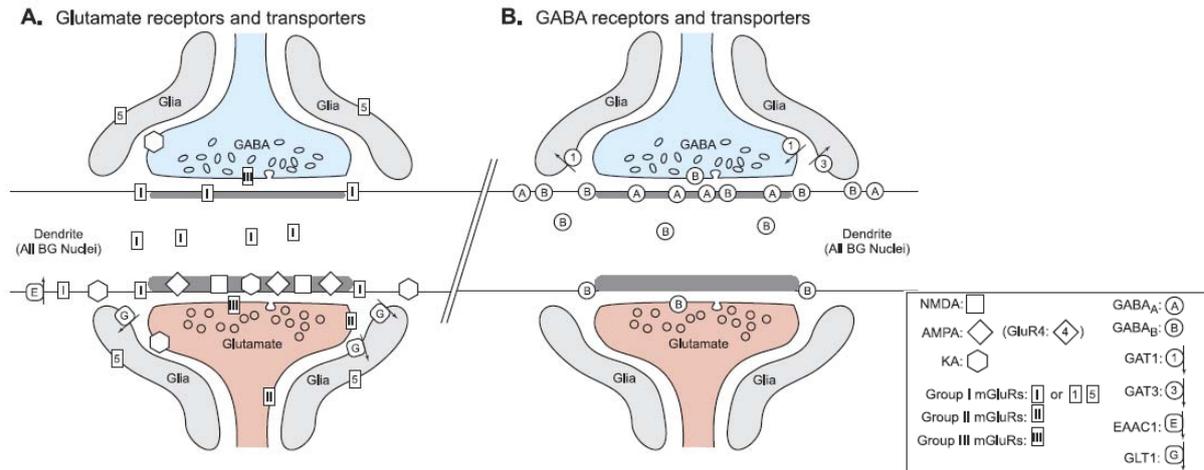
Les neurones de la SNr, essentiellement GABAergiques, expriment à leur surface des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, AMPA, kaïnate et des récepteurs métabotropiques. Les récepteurs AMPA sont constitués essentiellement des quatre sous-unités GluR1-4 et les récepteurs NMDA sont constitués des sous-unités NR1, NR2A/B. Ces récepteurs ionotropiques sont essentiellement localisés au niveau des synapses asymétriques glutamatergiques, jamais au niveau des synapses symétriques GABAergiques et très peu au niveau extrasynaptique (Galvan et al., 2006). Les récepteurs NMDA et AMPA sont souvent

co-localisés au niveau des synapses glutamatergiques mais la densité relative des récepteurs NMDA est faible dans la SNr (Albin and Greenamyre, 1992).

Les récepteurs métabotropiques exprimés au niveau de la SNr sont principalement des récepteurs du groupe I : mGluR1 et mGluR5. L'activation de ces récepteurs métabotropiques localisés au niveau postsynaptique va induire une excitation des neurones GABAergiques en entraînant une dépolarisation membranaire par diminution de la conductance potassique (Marino et al., 2001). A l'inverse, lorsqu'ils sont localisés au niveau présynaptique, l'activation de ces récepteurs va entraîner une diminution de la transmission excitatrice par inhibition de la libération de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons glutamatergiques (Wittmann et al., 2001). Les récepteurs des groupes II et III sont aussi présents mais ils sont exprimés essentiellement au niveau présynaptique où ils exercent une inhibition sur la transmission glutamatergique au niveau des contacts subthalamo-nigraux et sur la transmission GABAergique striato-nigrale (Deniau et al., 2007). On peut observer une ségrégation de la localisation des récepteurs sur les différents domaines synaptiques : les récepteurs ionotropiques forment des clusters proches des sites de libération des neurotransmetteurs tandis que les récepteurs métabotropiques sont plutôt péri ou extrasynaptiques (Fig. 20).

Les récepteurs GABA<sub>A</sub> ionotropiques sont majoritairement synaptiques, en accord avec leur capacité à médier l'inhibition phasique rapide, tandis que les récepteurs GABA<sub>B</sub> sont principalement extrasynaptiques et sont impliqués dans l'inhibition à long terme des neurones (Galvan et al., 2006), (Fig. 20). En fonction de leur localisation et de leur distance par rapport à la fente synaptique, ils vont être soumis à une concentration variable de neurotransmetteurs.

On note également l'expression faible et éparse de récepteurs purinergiques au niveau des corps cellulaires des neurones GABAergiques de la SNr. Ces récepteurs sont essentiellement composés des sous-unités P2X<sub>2/5</sub> / P2Y<sub>6/14</sub>. Mais il semble que, au sein de la SNr, les P2YR soient essentiellement exprimés par les cellules gliales. La proportion des P2X neuronaux et des P2Y gliaux augmente dans le modèle de rat 6-OHDA, parallèlement à un phénomène d'activation de cellules astrocytaires en réponse à la lésion des tissus cérébraux (Amadio et al., 2007).



**Figure 20:** Schéma représentant la localisation sub-synaptique des récepteurs et transporteurs neuronaux au glutamate (A) et au GABA (B) dans les ganglions de la base d'après des études en microscopie électronique (Galvan et al., 2006).

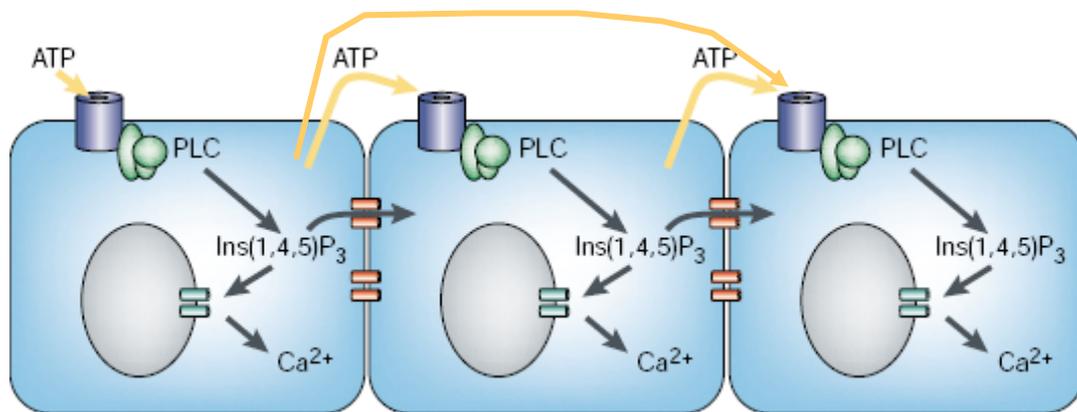
Comme les cellules gliales, les neurones de la SNr expriment des transporteurs au glutamate, majoritairement EAAC1 et des transporteurs au GABA de type GAT1 (Galvan et al., 2006). Les transporteurs EAAC1 sont présents principalement au niveau des terminaisons postsynaptiques et sont essentiellement extrasynaptiques. Ces transporteurs jouent un rôle de prévention de la neurotoxicité induite par le glutamate en recaptant le glutamate libéré au niveau de la fente synaptique. Les transporteurs GAT1 jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transmission GABAergique (Galvan et al., 2006).

### 3. Communication entre les cellules gliales et les cellules neuronales

Une des questions fondamentales dans la compréhension du fonctionnement cérébral concerne la communication des cellules du système nerveux. Après de nombreuses théories, il est aujourd'hui admis qu'il existe différents modes de communication entre les cellules du SNC. Premièrement, des connexions physiques directes entre cellules, notamment par les jonctions communicantes de type gap entre cellules gliales mais également entre neurones, et potentiellement entre neurones et cellules gliales. Deuxièmement, des connexions chimiques induites par la libération locale de neurotransmetteurs au niveau des synapses terminales mais également par diffusion à distance (Purves et al., 2003, Neuroscience, Chapitre 8, p165-185). La communication entre neurones et cellules gliales est bidirectionnelle avec des échanges synaptiques à la fois chimique et électrique (Araque et al., 1999; Araque et al., 2001; Perea and Araque, 2007).

### 3.1 Communication des cellules gliales vers les cellules gliales

Comme les cellules gliales ne peuvent pas produire de potentiels d'action, elles ont longtemps été considérées comme silencieuses. Il est aujourd'hui largement admis qu'elles communiquent entre elles et avec les autres cellules du SNC, principalement par la mise en œuvre d'une excitabilité de type calcique. La signalisation calcique est une fonction majeure dans la physiologie des cellules gliales, elle représente un élément important dans la communication cellulaire. Le phénomène de propagation de vagues calciques peut se produire selon un mécanisme extracellulaire (Cornell-Bell et al., 1990) impliquant les récepteurs présents à la surface des cellules gliales (cf II.2.2) et/ou par un mécanisme intercellulaire, *via* la mise en jeu de jonctions communicantes de type gap qui permettent une communication intercytoplasmique directe par échange d'ions et de petites molécules (Charles et al., 1991; Giaume and Venance, 1998). Ces deux mécanismes peuvent être liés car la propagation calcique intercellulaire est également à l'origine de la libération de messagers extracellulaires tels que l'ATP qui peut agir sur les récepteurs purinergiques des cellules gliales voisines (Charles, 1998; Haydon, 2001). L'ATP, considéré comme un neurotransmetteur (Burnstock, 2006), peut ainsi être libéré par les neurones et initier des vagues calciques dans les cellules gliales. En retour, les cellules gliales vont elles-mêmes libérer de l'ATP, en partie responsable de la propagation des vagues entre cellules gliales (Fig. 21).



**Figure 21: Mécanismes de génération de propagation de vagues calciques entre cellules gliales (Haydon, 2001).** La propagation intercellulaire peut être expliquée par différents mécanismes agissant séparément ou en combinaison :

- Les vagues calciques sont maintenues par la diffusion d'InsP<sub>3</sub> à travers les jonctions gap et entraînent une libération secondaire de calcium.
- Les vagues calciques sont maintenues par la régénération de calcium suite à la libération de gliotransmetteurs qui vont agir sur les cellules voisines par diffusion extracellulaire.
- les vagues calciques résultent d'une libération focale de gliotransmetteurs, qui va diffuser à longue distance (Haydon, 2001).

Cette communication particulière entre cellules gliales est primordiale dans la physiologie de ces cellules et possède de nombreuses implications fonctionnelles. Elle est notamment impliquée dans le dialogue glie-neurone à distance (Giaume and Venance, 1998), elle modifie l'état fonctionnel et le métabolisme des astrocytes (Tsacopoulos and Magistretti, 1996), elle semble importante en condition physiopathologique et semble être structurée en partie par l'activité neuronale (Froes and de Carvalho, 1998).

### *3.2 La synapse tripartite*

Les neurotransmetteurs comme le glutamate, l'ATP, le GABA sont les substrats de la transmission synaptique et, pendant de nombreuses années, la régulation de leur libération au sein du cerveau a été considérée comme propre aux neurones et aux cellules neuro-endocrines (pour revue, Verkhratsky et Butt, 2007, chapitre 5.6). Depuis les 15 dernières années, des expériences ont clairement démontré l'implication des cellules gliales dans cette neurotransmission, autant pour leur faculté à libérer des transmetteurs que par la présence de récepteurs et de transporteurs à leur surface (Fields and Stevens-Graham, 2002). La transmission chimique est donc un mécanisme universel pour la communication entre neurones et cellules gliales. Dans l'hippocampe de rat, il a été montré que les astrocytes se placent autour des membranes neuronales et spécifiquement au niveau des régions synaptiques (Ventura and Harris, 1999). Dans de nombreux cas, les membranes astrocytaires englobent partiellement ou complètement les terminaisons présynaptiques et les structures postsynaptiques. La proximité géographique des astrocytes par rapport aux structures synaptiques entraîne leur exposition aux neurotransmetteurs libérés à ce niveau (Vesce et al., 2001). D'un point de vue fonctionnel, les prolongements astrogliaux possèdent des récepteurs aux neurotransmetteurs, et leur modalité d'expression correspond précisément aux types de neurotransmetteurs libérés au niveau de la synapse qu'ils entourent (pour revue, Verkhratsky et Butt, 2007, chapitre 6.1). Par exemple, au niveau du cortex, les neurones pyramidaux et les astrocytes expriment les récepteurs au glutamate et à l'ATP tandis qu'au niveau des ganglions de la base, neurones et astrocytes sont préférentiellement plus sensibles à la dopamine. La proximité anatomique entre astrocytes et synapses, de même que l'expression fonctionnelle de récepteurs précis, a conduit à un nouveau concept de l'organisation synaptique nommé « synapse tripartite » (Araque et al., 1999) dans lequel les synapses sont formées de trois parties équivalentes : la terminaison présynaptique, la membrane neuronale postsynaptique et l'astrocyte environnant. La libération de neurotransmetteurs au niveau de la synapse va

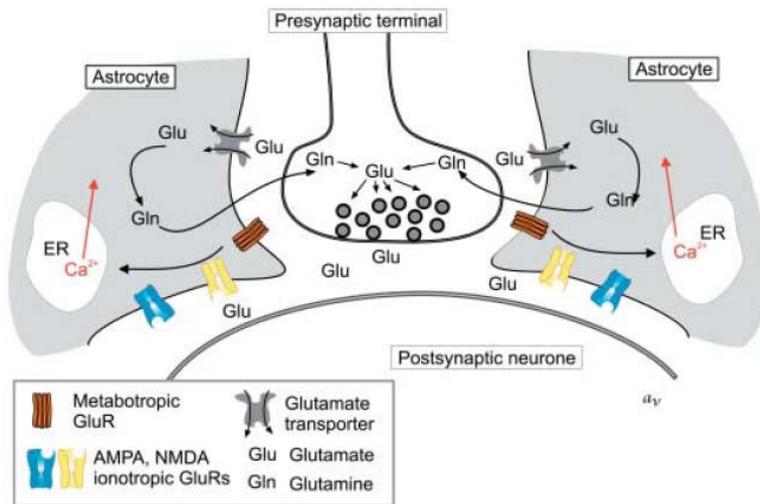
conduire à un potentiel postsynaptique au niveau du neurone et à un signal calcique au niveau de l'astrocyte, induisant la libération de « gliotransmetteurs », qui peuvent à leur tour modifier l'activité neuronale aussi bien au niveau pré que postsynaptique. Ce concept de synapse tripartite prédit une communication bidirectionnelle avec une signalisation partant des neurones vers les cellules gliales et une signalisation des cellules gliales vers les neurones (Araque et al., 1999; Fields and Stevens-Graham, 2002).

### 3.3 Signalisation des neurones vers les cellules gliales

Il est maintenant bien établi que la stimulation des neurones, ou des afférences neuronales, déclenche une cascade de signalisation calcique dans les astrocytes en culture et *in situ* sur des tranches de cerveau (Haydon, 2001). De plus, il a été montré que les astrocytes sont capables de distinguer l'intensité de l'activité neuronale : les oscillations calciques induites sont clairement dépendantes de la fréquence de la stimulation neuronale. Par exemple, des expériences *in vitro* dans l'hippocampe montrent que la fréquence des vagues calciques astrocytaires augmente à la suite d'une augmentation d'activité synaptique neuronale (Carmignoto, 2000). Il est important de préciser que les réponses calciques dans les prolongements astrocytaires sont asynchrones, ce qui indique l'existence de compartiments relativement isolés, capables de suivre l'activation d'une seule synapse ou de petits groupes de synapses (Perea and Araque, 2005). Les microdomaines de l'arbre astrocytaire, donnant lieu à des élévations plus ou moins localisées de  $Ca^{2+}$ , jouent un rôle fondamental dans l'extension de l'influence astrocytaire sur des synapses à distance (Haydon, 2001). L'un des transmetteurs principalement impliqués dans l'initiation de ces vagues calciques est le glutamate. Libéré au niveau des terminaisons synaptiques, il va agir sur les récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques présents à la surface des cellules gliales. Leur activation va ensuite conduire à une entrée de calcium extracellulaire et/ou à une libération des stocks internes des cellules (Haydon, 2001; Padmashri and Sikdar, 2008).

Les astrocytes sont également impliqués dans la recapture de neurotransmetteurs au niveau des synapses. Durant la transmission synaptique, 20% du glutamate libéré sont accumulés dans les neurones postsynaptiques et 80% sont recaptés au niveau des astrocytes pérисynaptiques par des transporteurs spécifiques (Verkhratsky and Kirchhoff, 2007a), (Fig. 22). Les astrocytes expriment à leur surface une forte proportion de transporteurs au glutamate GLAST et GLT-1. Ils possèdent des atouts pour une recapture de glutamate optimisée tels qu'un potentiel de repos très hyperpolarisé et un gradient électrochimique

favorable aux ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  (le transport d'une molécule de glutamate requiert l'influx de 3  $\text{Na}^+$  et la sortie d'1  $\text{K}^+$ ), (Huang and Bergles, 2004).



**Figure 22:** *Exemples de signalisations neurone-cellule gliale médiées par le glutamate.* Le glutamate libéré par le neurone au niveau synaptique va activer les récepteurs glutamatergiques gliaux et induire un signal calcique dans ces cellules. Le glutamate est également recapté par ces cellules et va être dégradé en glutamine disponible pour les cellules neuronales (Verkhatsky and Kirchoff, 2007a).

Le rôle des cellules gliales dans la recapture du GABA ne semble pas prédominant, car la majorité du GABA libéré pendant la neurotransmission va agir sur ses récepteurs au niveau postsynaptique ou être recapté par les neurones grâce aux transporteurs GABAergiques présents essentiellement au niveau présynaptique (cf Contexte Scientifique § II, 2.4.2). Cependant, ces cellules gliales expriment des transporteurs au GABA essentiellement de type GAT-1 et GAT-3, nécessitant un gradient électrochimique sodique (la recapture d'une molécule de GABA requiert le co-transport de 2  $\text{Na}^+$ ). Les astrocytes jouent également un rôle important dans le transport de la glycine, un neurotransmetteur inhibiteur au travers des récepteurs glycinergiques du système nerveux central, et un neuromodulateur (excitateur ou inhibiteur) des récepteurs NMDA (Danysz and Parsons, 1998). Ils expriment les transporteurs GlyT1 (Glycine transporteurs 1), couplés aux gradients électrochimiques du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Cl}^-$ . L'activation, même faible, des récepteurs  $\text{GABA}_A$  ou de la glycine peut entraîner une dépolarisation suffisante pour induire la sortie de glycine (par transport reverse) dans l'espace extracellulaire, modulant à son tour l'excitabilité neuronale (Dopico et al., 2006).

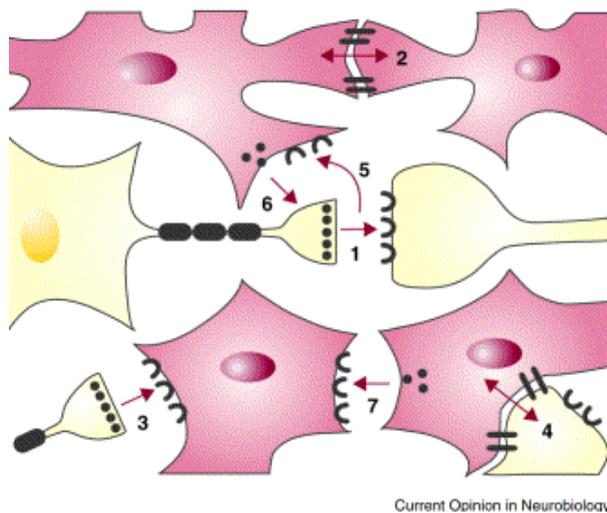
### 3.4 Signalisation des cellules gliales vers les neurones

Les signaux calciques spontanés (c'est-à-dire en dehors de toute activité neuronale) ou induits par l'activation de neurones voisins, sont capables de conduire à une libération de transmetteurs par les cellules gliales (Fig. 23). Ce qui est nouveau dans l'étude de la communication neurone-glie, c'est la notion que ces « gliotransmetteurs » peuvent agir directement sur les neurones et moduler, voire induire leur activité. Par exemple, des expériences *in vitro* (sur culture de neurones d'hippocampe) et *in situ* (sur tranches d'hippocampe), (Pasti et al., 1997) montrent que les astrocytes sont capables de libérer du glutamate pouvant entraîner une dépolarisation ou une augmentation de l'excitation des neurones à travers son action sur les récepteurs ionotropiques AMPA et NMDA (Bezzi and Volterra, 2001). Le glutamate peut également agir sur les récepteurs métabotropiques présynaptiques et ainsi moduler la transmission synaptique (Verkhratsky and Kirchhoff, 2007a). Cette capacité des astrocytes à induire une activité neuronale par le biais du glutamate suite à une augmentation calcique, est cependant remise en cause par certains auteurs (Fiacco et al., 2007). Ces derniers montrent, par le biais de tranche d'hippocampe de souris transgéniques pour un récepteur exprimé spécifiquement sur les astrocytes, qu'une augmentation de calcium astrocytaire de 80-90% n'entraîne pas d'augmentation calcique dans les neurones, ne produit pas de courant entrant dans ces neurones, et n'affecte pas l'activité synaptique.

Les astrocytes peuvent également moduler l'excitabilité des neurones par libération d'ATP : ce dernier peut entraîner une diminution de l'activité neuronale soit directement en agissant sur les récepteurs purinergiques neuronaux, soit indirectement, par dégradation en adénosine induisant une activation des récepteurs à l'adénosine (Ochi et al., 2004).

Les mécanismes de relâchement du glutamate glial ou de l'ATP glial et neuronal sont toujours sources de débat. Comme le montrent de nombreuses études *in vitro* sur des synaptosomes de cortex, d'hippocampe ou de la moëlle épinière, certaines libérations de glutamate ou d'ATP peuvent avoir lieu suivant un mécanisme vésiculaire dépendant du calcium (Araque et al., 2000; Pankratov et al., 2006). Il existe également des études réalisées sur des cultures cellulaires d'astrocytes de cortex cérébral de souris, montrant une libération de glutamate par des lysosomes (Li et al., 2008). Cependant, il est clair que la libération de glutamate par les astrocytes est régulée par la fréquence des oscillations calciques : chaque pic d'augmentation de concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  déclenche une libération pulsatile de glutamate par les astrocytes, *in vitro* et *in vivo* (Santello and Volterra, 2008). Le glutamate

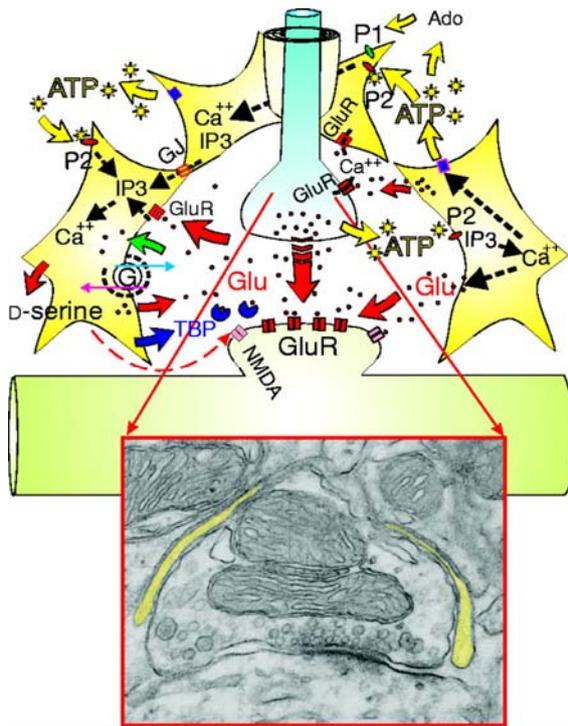
n'est pas libéré uniquement au niveau de la fente synaptique mais bien plus largement et peut, de ce fait, induire une activation des récepteurs extrasynaptiques, qui à leur tour peuvent affecter la propagation de l'information neuronale (Vesce et al., 2001; Fields and Stevens-Graham, 2002). Enfin, les signaux calciques se propagent à travers le réseau d'astrocytes, pouvant influencer la libération de gliotransmetteurs à distance par rapport au contact initial entre un neurone et une cellule gliale. Un simple astrocyte peut connecter des centaines de synapses simultanément et la libération de gliotransmetteurs peut permettre de synchroniser le patron de décharge des neurones (Haydon, 2001)



Current Opinion in Neurobiology

**Figure 23 : Répertoire des interactions fonctionnelles dans le réseau de signalisation entre neurones et cellules gliales.** Les neurones (en clair) utilisent une communication rapide par transmission chimique (1) tandis que les astrocytes (en rose) utilisent principalement les jonctions communicantes de type gap (2). Des observations montrent qu'il existe des synapses entre neurones et cellule gliales (3) ainsi que la formation de jonctions gap (4). La neurotransmission synaptique permet l'activation des cellules gliales (5) qui peuvent à leur tour agir sur les neurones (6) : c'est la synapse tripartite. Les cellules gliales interagissent également par libération de transmetteurs (7) (Bezzi and Volterra, 2001).

En complément de l'ATP et du glutamate (Fig. 24), les astrocytes peuvent également libérer des neuromodulateurs tels que la D-sérine (Panatier et al., 2006), de l'aspartate, de la taurine ou encore des neuropeptides (Fields and Stevens-Graham, 2002). La D-sérine semble jouer un rôle particulièrement important dans la communication neurone-glie. Elle est essentiellement libérée par les astrocytes, notamment suite à la stimulation de récepteurs glutamatergiques (Scolari and Acosta, 2007). Sa libération met en jeu des mécanismes d'exocytose dépendants du calcium et des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor), (Panatier et al., 2006). La D-sérine va ensuite agir comme co-agoniste au niveau du site glycine des récepteurs NMDA (Scolari and Acosta, 2007; Wolosker et al., 2008) et moduler la transmission glutamatergique.



**Figure 24 :** Régulation de la transmission synaptique par les astrocytes en réponse à l'ATP et au glutamate relâchés par le neurone pré-synaptique. Le signal calcique astrocytaire va induire un relâchement de glutamate, d'ATP, et/ou de D-sérine. La régulation de l'activité synaptique peut également se faire via des transporteurs du glutamate (en vert) qui sont impliqués dans la recapture du glutamate ou son extrusion par transport reverse induit par une augmentation de  $\text{Na}^+$  intracellulaire (Fields and Stevens-Graham, 2002).

Malgré l'ensemble de ces données, le rôle physiologique et l'importance de ces mécanismes de transmission astrocytaire n'ont toujours pas été totalement élucidés. L'amplitude et la complexité du rôle des astrocytes dépendent de la multiplicité des gliotransmetteurs libérés par une même cellule (Volterra and Meldolesi, 2005). Cependant, il a été montré que la perturbation de la physiologie astrocytaire peut être à l'origine de certaines pathologies du système nerveux. Au-delà de l'activation microgliale dans les phénomènes d'ischémie, les cellules gliales ont récemment été impliquées dans des pathologies telles que l'épilepsie, la sclérose amyotrophique latérale ou l'encéphalopathie hépatique (Seifert et al., 2006). Certains auteurs les considèrent même comme des cibles thérapeutiques potentielles (Haydon et al., 2008).

Bien que la signalisation astrocytaire soit six fois moins rapide que la propagation d'un potentiel d'action, son implication dans l'activité neuronale ne fait aujourd'hui plus aucun doute (Fig. 24).

### III. Signalisation calcique

#### 1. Généralités

##### 1.1 Le calcium

C'est dans le début des années 1880 que l'importance de l'ion calcium libre ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans les tissus biologiques fut mise en évidence par Sydney Ringer, notamment par son implication au niveau de la contraction cardiaque (Bregestovski and Spitzer, 2005). L'ion calcium est le messager intracellulaire le plus versatile et universel découvert à ce jour : il est impliqué dans la régulation de très nombreux processus cellulaires et est responsable d'évènements majeurs pendant toute la vie de la cellule. Dès les premiers instants qui suivent la fécondation puis tout au long du développement embryonnaire et adulte, il intervient dans des processus comme la transcription, l'activation de canaux ioniques, la contraction musculaire, la prolifération cellulaire mais également la plasticité synaptique et la mort cellulaire (Petersen et al., 2005). A l'état de repos, la concentration cytoplasmique de  $\text{Ca}^{2+}$  libre est de l'ordre de 100 nM. A partir de concentrations intracytoplasmiques de l'ordre du  $\mu\text{M}$ , le calcium est capable d'activer des mécanismes cellulaires (Clapham, 1995), d'où la question de comprendre comment une simple élévation de calcium peut réguler autant de fonctions cellulaires différentes tout en étant capable de cibler un processus particulier. La régulation de ces fonctions multiples et spécifiques est due à une distribution du calcium, à l'intérieur de la cellule, hautement contrôlée dans les dimensions à la fois spatiale, temporelle et au niveau de sa concentration (Bregestovski and Spitzer, 2005). A l'inverse des autres messagers secondaires, le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas métabolisé : les cellules doivent donc réguler finement sa concentration en maîtrisant sa localisation et sa concentration par complexation à des protéines de liaison, son stockage dans des compartiments cellulaires particuliers ou son extrusion hors de la cellule (Clapham, 1995).

Pour façonner les signaux calciques, chaque cellule exprime un set de composants que l'on peut comparer à une boîte à outils considérable (canaux, pompes, échangeurs, protéine de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$ ,...), permettant de créer des systèmes de signalisation calcique avec des propriétés spatiales et temporelles différentes. La signalisation calcique peut être divisée en quatre grandes étapes (Fig. 25) :

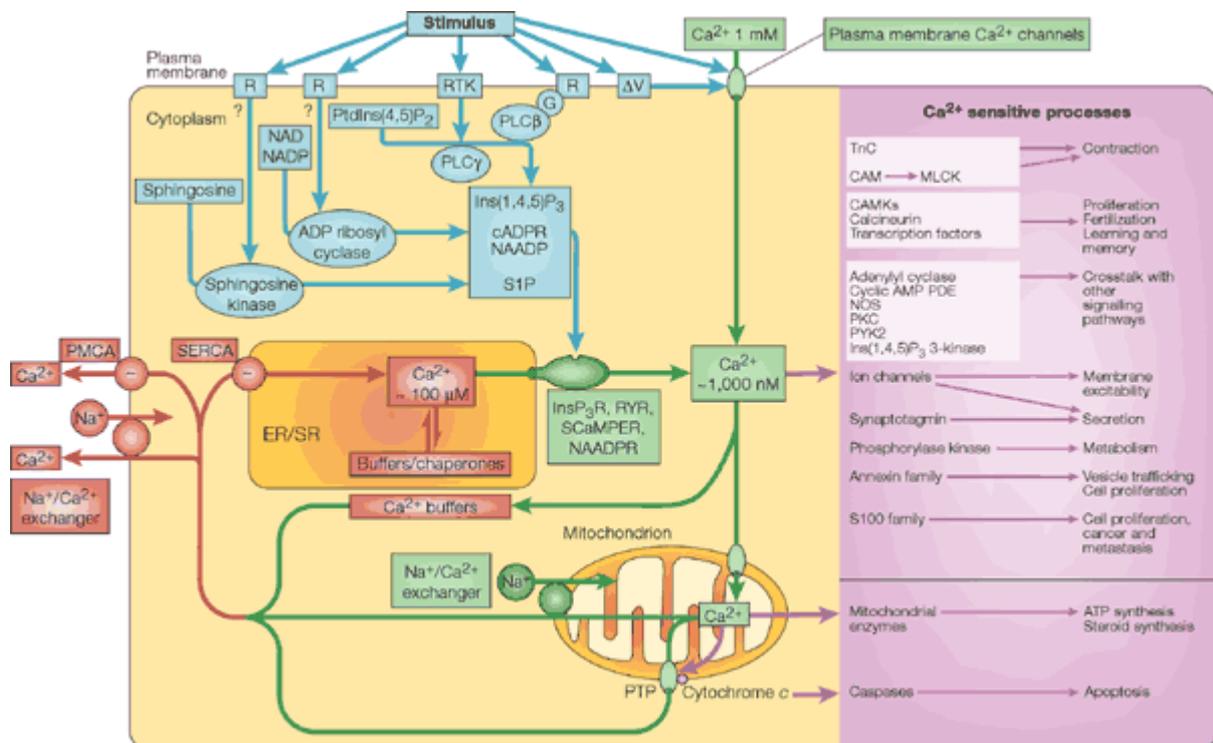
1) Mobilisation (Fig. 25, en bleu) : l'application de stimuli extracellulaires va générer des signaux de mobilisation du calcium à travers une grande variété de récepteurs membranaires couplés à des protéines G, des tyrosines kinases ou autres. Ces signaux

conduisent à la production d'InsP<sub>3</sub>, la production de ribose ADP cyclique ou de NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate).

2) Augmentation de calcium à l'intérieur de la cellule (Fig. 25, en vert, mécanismes « ON ») : elle peut se faire par des canaux calciques répondant à des transmetteurs ou des dépolarisations membranaires (entrée de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire) et par des canaux calciques intracellulaires (libération de Ca<sup>2+</sup> des stocks internes).

3) Action sur sa cible (Fig. 25, en mauve) : le Ca<sup>2+</sup> libéré dans le cytoplasme va activer différents senseurs calciques couplés à un éventail considérable de processus sensibles au calcium.

4) Arrêt du signal (Fig. 25, en rouge, mécanismes "OFF") : afin de restaurer la concentration de base du calcium dans le cytoplasme, la cellule possède des pompes Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup>/ATPase sur la membrane plasmique permettant une libération à l'extérieur de la cellule. Elle possède également des pompes Ca<sup>2+</sup>/ATPase sur la membrane du reticulum endoplasmique, favorisant une recapture dans les stocks calciques. Ces mécanismes doivent être très efficaces pour garantir un retour à la normale rapide et ne pas induire des processus de morts cellulaires inhérents à toute perduration du signal calcique.



**Figure 25 : Les éléments de la boîte à outils de la signalisation calcique.** Les cellules possèdent de nombreux signaux mobilisateurs qui peuvent être mixés pour créer des signaux calciques spécifiques, et ainsi déclencher de nombreux processus physiologiques différents (Berridge et al., 2000).

La mise en jeu de ces outils permet de générer des signaux calciques avec un codage spatio-temporel bien défini orientant la voie vers une cible déterminée (Berridge et al., 2000). Grâce à ce codage mais également à la compartimentalisation des événements, l'universalité et la versatilité de ce système de signalisation deviennent ainsi individuelles et permettent de réguler aussi bien la croissance axonale que la fécondation (Berridge et al., 2003).

### *1.2. Les stocks calciques : le reticulum endoplasmique et la mitochondrie*

Basiquement, la cellule a accès à deux sources principales de calcium : une source quasiment infinie puisée dans le milieu extracellulaire et une source interne plus restreinte, localisée principalement dans le reticulum endoplasmique (RE) (Berridge, 1997). Le reticulum endoplasmique, représenté par un système complexe de membranes invaginées, est considéré comme une organelle de signalisation capable de répondre rapidement par des réponses adaptatives et à long terme, devenant une source de régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Il joue un rôle actif de réservoir de  $\text{Ca}^{2+}$ , capable d'accumuler les ions calcium et de les libérer en réponse à une stimulation physiologique (Berridge, 1998). Le reticulum endoplasmique contient de nombreuses protéines liant le  $\text{Ca}^{2+}$ , localisées sur sa membrane et dans son espace interne. Les pompes calciques (pompes ATP-ases de type SERCA (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase)) situées dans la membrane du RE utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour pomper le calcium du cytoplasme vers la lumière du reticulum où il sera séquestré par des protéines telles que la calséquestrine ou la calbindine 28K, qui ont une faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  mais une forte capacité à le lier de manière dynamique (Verkhratsky, 2002). Le RE contient principalement des canaux calciques de la famille des récepteurs de la ryanodine (RyR), de la famille des récepteurs de l'InsP<sub>3</sub>, mais également quelques récepteurs de la famille des récepteurs sensibles au NAADP ou encore des récepteurs découverts plus récemment, des canaux polycystine-2 (faisant partie de la famille des protéines TRP : Transient Receptor Potential) (pour revue Verkhratsky et Butt, 2007). Les récepteurs RyRs sont généralement activés par les ions calcium cytosoliques (en général provenant d'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  externe) et agissent comme des amplificateurs des signaux calciques. Les récepteurs de l'InsP<sub>3</sub> sont, quant à eux, des canaux calciques activés par un messager secondaire, l'InsP<sub>3</sub>, qui va agir sur ces récepteurs et induire une libération de calcium du RE. Cependant, l'activation des InsP<sub>3</sub>Rs est également régulée, en partie, par le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique libre (Berridge et al., 2000).

Un autre organite intracellulaire capable de séquestrer le calcium est la mitochondrie. Elle est capable de tamponner le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique rapidement, malgré des systèmes de transporteurs de faible affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Clapham, 1995). Les mitochondries participent activement à la signalisation calcique de par leur capacité à accumuler rapidement puis à relâcher des quantités importantes de  $\text{Ca}^{2+}$ , ce qui permet de moduler les concentrations de  $\text{Ca}^{2+}$  libre cytoplasmique. Ces élévations rapides de calcium à l'intérieur des mitochondries semblent importantes dans la régulation de leur dynamique cellulaire mais également dans la participation des mitochondries à des processus de mort cellulaire (Rimessi et al., 2008). Des contacts étroits entre le reticulum endoplasmique et les mitochondries ont été mis en évidence, ce qui laisse supposer l'importance de cet organite dans la régulation de la signalisation calcique (Szabadkai et al., 2006).

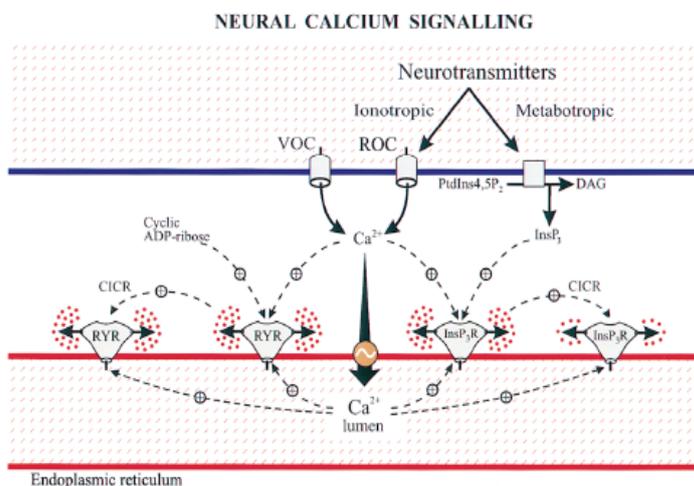
Dans la suite de ce paragraphe sur le calcium, je vais décrire plus particulièrement l'implication du calcium dans l'activité neuronale et gliale.

## *2. Activités calciques dans les cellules neuronales*

Chez l'adulte, les cellules nerveuses sont capables de transmettre rapidement des informations sous la forme de signaux électriques. A l'état basal, le potentiel de repos des neurones est négatif (entre -40 et -90 mV) et l'ouverture de certains canaux membranaires va induire un flux d'ions à travers la membrane plasmique, rendant localement et transitoirement le potentiel transmembranaire positif (pour revue voir Purves et al., 2003). Le calcium est impliqué dans la régulation de quasiment toutes les fonctions et réactions cellulaires. L'exception la plus connue est probablement la propagation des potentiels d'action le long de la membrane axonale en direction des synapses, qui dépend de canaux sodiques et potassiques, non régulés par le calcium. Cependant l'arrivée des potentiels d'action au niveau de la synapse terminale va induire l'ouverture de canaux calciques dépendants du voltage et une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire nécessaire à la fusion des vésicules synaptiques à la membrane et à la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique (pour revue voir, Purves et al., 2003 chapitre 5, p99-103). L'exocytose responsable de la transmission synaptique est déclenchée par la libération de calcium à partir de deux sources : le mécanisme classique est médié par l'entrée de calcium à travers les canaux dépendants du voltage (VOCs; Voltage Operated Channels) mais il y a également une libération de calcium à partir du reticulum endoplasmique qui contribue à la régulation de la libération des transmetteurs

(Fig. 26). Les neurotransmetteurs libérés peuvent conduire à des entrées de calcium au niveau post-synaptique par leur action sur des récepteurs, comme par exemple les récepteurs NMDA (Berridge, 1998).

Le reticulum endoplasmique contient une concentration de calcium de l'ordre de 300 à 800  $\mu\text{M}$  (Verkhratsky, 2002). Dans les neurones, il apparaît comme un réseau membranaire continu à travers toute la cellule, avec cependant l'émergence de régions spécialisées, notamment au niveau dendritique. Il est considéré par certains auteurs comme un neurone dans le neurone (Berridge, 1998, 2002). Au niveau dendritique, la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le RE se fait par l'intermédiaire des deux familles de canaux calciques intracellulaires : les RyR (essentiellement de type 2 dans le cerveau) et les récepteurs de l' $\text{InsP}_3$ . Le processus de régénération du signal calcique, suite à la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire par l'activation de ces récepteurs, est responsable de l'amplification des signaux calciques venant de l'extérieur. L'idée de base est que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers les récepteurs ou les canaux dépendants du voltage au niveau de la membrane plasmique va produire une élévation de calcium intracellulaire par stimulation de la libération des stocks internes. La libération de  $\text{Ca}^{2+}$  par le RE va moduler l'excitabilité neuronale en altérant le potentiel de membrane et participe à l'apparition des courants d'hyperpolarisation ou de dépolarisation suivant un potentiel d'action unique ou de "bursts" de potentiel d'action. Elle module également la libération de neurotransmetteurs, la plasticité synaptique ou encore la transcription génique (Berridge, 1998).



**Figure 26: Représentation de la signalisation calcique dans les neurones.** L'entrée de calcium extracellulaire est régulée par des canaux dépendants du voltage ou des récepteurs ionotropiques. L'activation des récepteurs métabotropiques stimule la production d' $\text{InsP}_3$  qui va agir sur ses récepteurs au niveau du reticulum endoplasmique. Le calcium lui-même peut induire l'activation des RyRs et des  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  permettant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$  du lumen du reticulum (Berridge, 1998).

### 3. Activités calciques dans les cellules gliales

Les cellules gliales possèdent l'ensemble des composants de la machinerie de signalisation et d'homéostasie calcique. Une des différences importantes entre les cellules gliales et neuronales est une très faible quantité de canaux calciques dépendants du voltage exprimés par les cellules gliales (MacVicar, 1984). Ces canaux calciques dépendants du voltage ont été décrits sur les précurseurs gliaux et les cellules gliales immatures mais leur expression sur les cellules gliales matures reste encore inexplorée. L'entrée du calcium dans les cellules gliales matures se fait donc essentiellement par des canaux perméables au calcium, activés par des ligands. Ce sont principalement des récepteurs glutamatergiques ionotropiques de type AMPA et des récepteurs purinergiques P2X qui jouent ce rôle (Verkhatsky et al., 1998).

La source majeure de calcium dans les cellules gliales est le reticulum endoplasmique. La concentration calcique contenue dans le RE des cellules gliales varie entre 100 et 300  $\mu\text{M}$ . Elle est donc plus faible que celle des neurones (pour revue, Verkhatsky and Butt, 2007). Les différents types de cellules gliales contiennent tous de nombreux récepteurs métabotropiques membranaires dont l'activation va induire une augmentation d' $\text{InsP}_3$  dans le milieu cytosolique. L' $\text{InsP}_3$  va agir sur les  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  et il semble que les cellules gliales ne possèdent pas de récepteurs RyRs fonctionnels (Beck et al., 2004). Bien que certaines études stipulent que les astrocytes et les cellules microgliales expriment ces récepteurs RyRs, ils jouent un rôle relativement mineur, voire nul, dans la signalisation calcique des cellules gliales. Les RyRs semblent cependant avoir un rôle important dans la maturation des cellules gliales car ils sont présents et fonctionnels sur les progéniteurs et les oligodendrocytes immatures (pour revue, Verkhatsky, 2007, chapitre 5.5.2).

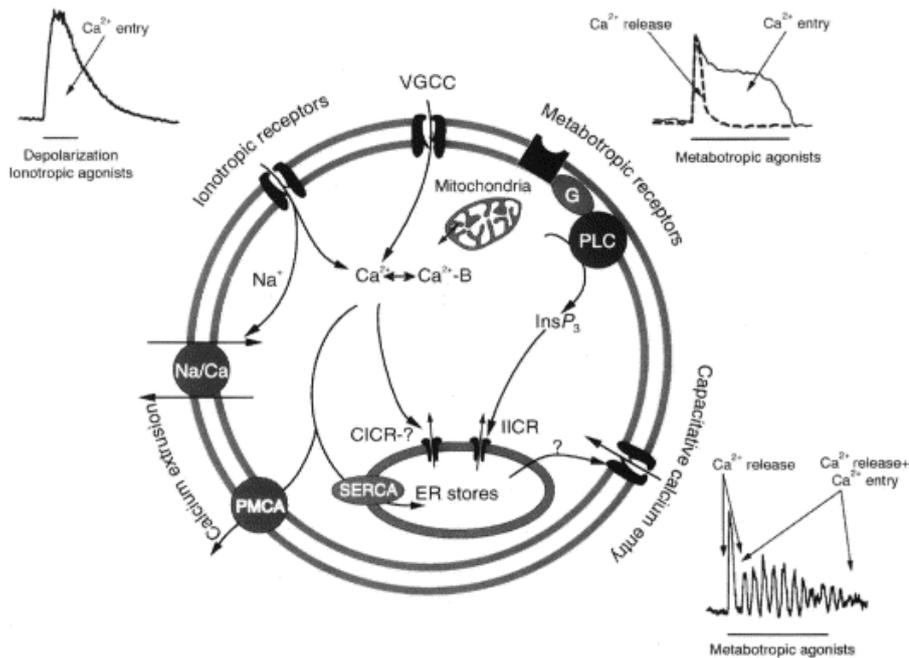
L'action de l' $\text{InsP}_3$  sur les  $\text{InsP}_3\text{Rs}$  va conduire à une libération rapide de calcium; ce mécanisme semble être le principal mécanisme de signalisation dans les cellules gliales (Verkhatsky et al., 1998).

La libération de calcium du RE va entraîner l'ouverture de canaux membranaires de type SOCs (Store Operated Channel), présents en abondance sur tous les types de cellules gliales. Si ces canaux sont ubiquitaires dans toutes les cellules, leur identification au niveau moléculaire est récente (Potier et al., 2008). Cependant, ils ont un rôle fonctionnel très important : leur activation va permettre de prolonger les signaux calciques et d'augmenter la durée de stimulation. L'équilibre entre la libération de calcium, la recapture dans le RE et l'entrée par les SOCs détermine la forme du signal calcique résultant, qui peut varier

fortement en passant d'une réponse très transitoire à une élévation de calcium pouvant durer plusieurs centaines de secondes (Verkhatsky et al., 1998).

En condition physiologique, les cellules gliales sont activées par une stimulation brève et locale de neurotransmetteurs. Cette stimulation va produire des événements calciques localisés qui vont pouvoir se propager à l'intérieur de la cellule mais également dans les cellules voisines par des vagues de calcium. Ces vagues circulent sur des distances relativement longues à travers un syncytium astrocytaire, mais elles se propagent également en dehors de ce syncytium par libération de messagers extracellulaires qui vont pouvoir agir sur les neurones, les oligodendrocytes et la microglie situés aux alentours (Araque et al., 2001). La propagation des signaux calciques est une fonction principalement astrocytaire et conduit à de nombreux mécanismes incluant : 1) la diffusion intercellulaire directe d'InsP<sub>3</sub> *via* les jonctions communicantes de type gap (Venance et al., 1997), 2) la libération de messagers extracellulaires diffusibles, comme par exemple l'ATP, capables d'entraîner la libération de calcium *via* l'activation des récepteurs métabotropiques sur les cellules voisines, 3) la libération d'un messenger extracellulaire au niveau d'une seule cellule qui va pouvoir diffuser sur une longue distance et 4) de nombreuses autres conséquences (pour revue, voir Verkhatsky and Butt, 2007), (Fig. 27).

Ce panel d'acteurs implique un rôle important de la signalisation calcique dans la physiologie des cellules gliales et leur confère une forme d'excitabilité cellulaire même si l'activité électrique reste le langage des neurones. Cette activité calcique peut être spontanée, c'est-à-dire survenir en dehors de toute activité neuronale et ainsi fournir une source autonome de glutamate pouvant générer et moduler l'activité neuronale en dehors de toute stimulation extérieure (Perea and Araque, 2005)



**Figure 27 : Représentation de l'hétérogénéité de la signalisation calcique dans les cellules gliales.** La présence de récepteurs metabotropiques et de récepteurs à l'InsP<sub>3</sub> (IICR sur le schéma pour InsP<sub>3</sub> Induced Calcium Release) est commune à l'ensemble des cellules gliales : c'est la voie principale de signalisation calcique de ces cellules : c'est la voie principale de signalisation calcique de ces cellules. L'expression ou l'activation des différents composants de la machinerie de signalisation calcique entraîne des réponses très hétérogènes pouvant varier d'un simple pic de calcium à des réponses biphasiques ou oscillatoires (Verkhratsky and Kettenmann, 1996).

Bien que les neurones et les cellules gliales possèdent la même machinerie de signalisation calcique, il existe cependant de grandes différences concernant sa mise en jeu et ses caractéristiques : 1) l'initiation du signal calcique neuronal résulte à la fois d'une entrée de calcium extracellulaire, principalement par des canaux dépendants du voltage, et d'une libération des stocks internes, tandis que 2) le signal calcique des cellules gliales dépend essentiellement de la libération de Ca<sup>2+</sup> des stocks internes et 3) le signal calcique glial peut se propager à travers les cellules gliales pour agir à distance sur des cellules gliales ou neuronales. De même, le ciblage et les conséquences fonctionnelles du signal seront très diverses en fonction des senseurs présents, de la compartimentalisation du signal, de son information spatio-temporelle et des acteurs mis en jeu au sein du réseau neuro-glial. Dans tous les cas, l'initiation de ces mouvements calciques implique de nombreux systèmes régulateurs qui vont déterminer l'amplitude et la durée du signal, incluant la participation de protéines chélatrices, des pompes et des échangeurs calciques transportant le calcium à l'extérieur de la cellule ou à l'intérieur du RE et de la mitochondrie.

## Objectifs

Malgré les avancées des recherches en cours, les mécanismes qui sous-tendent l'efficacité de la SHF du NST sont encore loin d'être élucidés. Notamment, cette thérapie neurochirurgicale soulève de nombreuses questions fondamentales d'ordre physiopathologique, qui concernent les interactions entre les réseaux appartenant aux différentes voies des ganglions de la base. Dans ce cadre, mon projet avait pour but de décrypter certains des mécanismes cellulaires se mettant en place au sein de la SNr sous l'effet de la SHF du NST, en me focalisant sur l'implication des cellules gliales dans la réponse de cette structure de sortie des ganglions de la base. En effet, les études récentes concernant ces cellules gliales ont permis d'aboutir au double constat : qu'elles sont fortement impliquées 1) dans l'activité neuronale et la modulation de cette activité et 2) dans certaines pathologies du système nerveux (pour revue, voir Fields et coll., 2002). Sachant que l'excitabilité gliale repose sur la mise en jeu d'un signal calcique, nous avons utilisé l'imagerie calcique comme moyen de visualisation de l'activité gliale. Nous avons appliqué cette technique à des tranches de cerveau de rat contenant à la fois le NST et la SNr afin de préserver les connexions entre ces deux structures et le réseau cellulaire nigral. Cette approche était extrêmement complémentaire des techniques physiologiques, neurochimiques et neuroanatomiques déjà utilisées dans le laboratoire.

Nous savions que la stimulation du NST conduit à une activation des neurones de la SNr (Maurice et al., 2003) accompagnée d'une augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate et de GABA (Windels et coll., 2000). Nous nous sommes donc intéressés à l'implication possible des cellules gliales dans ces mécanismes à travers les objectifs suivants:

1. Dans un premier temps, nous allons caractériser les différents types de populations cellulaires, neuronales et gliales, composant la SNr afin de voir l'importance et la diversité des populations gliales.

2. Dans un deuxième temps, nous allons déterminer les caractéristiques fonctionnelles des cellules gliales nigrales de la SNr, en nous focalisant notamment sur la présence de certains récepteurs activés par des neurotransmetteurs pouvant être libérés au sein de la SNr.

3. Dans un troisième temps, nous allons déterminer si les cellules gliales répondent à la stimulation électrique du NST en essayant d'identifier quels sont les récepteurs impliqués dans cette réponse.

4. Enfin, nous allons caractériser certains des neuro et gliotransmetteurs libérés au sein de la SNr et impliqués dans la réponse calcique observée lors de la stimulation électrique du NST.

L'ensemble de ces résultats va peut-être permettre d'envisager une éventuelle implication des cellules gliales dans les effets de la stimulation électrique du NST.

## I. Animaux

Les expériences présentées dans ce travail sont réalisées sur des rats mâles Sprague-Dawley (Elevage Janvier, France), âgés de 17 à 21 jours. Les animaux sont maintenus dans l'animalerie à une température constante de 24°C, sous un cycle de lumière/obscurité de 12 heures. A ce stade, les animaux n'étant pas encore sevrés, ils sont laissés en présence de la mère recevant nourriture et boisson à volonté. L'ensemble des expériences conduites sur ces animaux est réalisé en accord avec la Directive Européenne de 1986 (86/609/EEC) et le ministère de l'agriculture (autorisation numéro 38-R 1001).

## II. Préparation des tissus

### 1. Principe du modèle utilisé : la tranche aigue de cerveau

Afin de maintenir au mieux l'intégrité physiologique des structures et des cellules, des coupes épaisses sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Leica VT1000S) qui permet un contrôle de la coupe avec une épaisseur régulière et un maintien de l'environnement cellulaire qui compose la tranche ainsi obtenue. Nous avons utilisé une vitesse de coupe très lente et un mouvement de vibration rapide de la lame, ce qui assure un minimum de lésion cellulaire. Les tranches de cerveau sont réalisées dans du liquide cérébro-rachidien artificiel prérefroidi à -20°C pendant quelques minutes et maintenu froid avec un mélange de glace plus éthanol (température contrôlée entre 0°C et +4°C maximum), afin de limiter les activités cellulaires, notamment celles des canaux et des pompes impliqués dans les processus de mort cellulaire.

### 2. Protocole expérimental

Les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de kétamine (100 mg/kg, Imalgène® 1000, Merial, France) puis sacrifiés par décapitation. Une fois sorti de la boîte crânienne, le cerveau est rapidement placé dans du liquide cérébro-rachidien artificiel froid (ACSF : Artificial Cerebro-Spinal Fluid), pauvre en calcium et riche en magnésium (NaCl : 126 mM, KCl : 2,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> : 0,5 mM, MgSO<sub>4</sub> : 7 mM, NaHCO<sub>3</sub> : 25 mM, glucose : 11 mM), carboxygéné par 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>. La faible concentration de calcium extracellulaire permet de limiter les entrées de calcium dans la cellule et une forte concentration en magnésium sert à inhiber l'activation des récepteurs NMDA : ces deux

précautions combinées à la température proche de 0°C conduisent à diminuer les phénomènes d'excitotoxicité. Le cerveau est ensuite collé sur sa partie dorsale et à plat, sur la platine d'un vibratome de façon à réaliser des coupes horizontales de 300 µm d'épaisseur. Les tranches contenant à la fois la SNr et le NST sont récupérées et placées dans de l'ACSF (NaCl : 126 mM, KCl : 2,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,2 mM, CaCl<sub>2</sub> : 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> : 1,2 mM, NaHCO<sub>3</sub> : 25 mM, glucose : 11 mM) carboxygné, complété par 1 mM de sodium pyruvate et 250 µM d'acide kynurénique (antagoniste large des récepteurs glutamatergiques de type NMDA et AMPA/kainate) afin de limiter l'effet excitotoxique du glutamate et du kainate pouvant être libérés pendant la coupe tissulaire (Beurrier et al., 2006). Les tranches de cerveau sont laissées 1 heure à température ambiante dans ce milieu afin de permettre un retour progressif des activités cellulaires et notamment la remise en action des processus de signalisation impliquant les canaux, les pompes ioniques, les enzymes, etc...

### III. Validation du modèle de tranche de cerveau

#### 1. *Mesure de la viabilité cellulaire*

Afin de vérifier la viabilité des cellules de la SNr sur nos tranches de cerveau ainsi obtenues, nous avons appliqué de l'iodure de propidium, un marqueur fluorescent qui se fixe spécifiquement au niveau des acides nucléiques mais qui ne traverse pas les membranes lipidiques des cellules intactes. Pour visualiser toutes les cellules, les tranches de cerveau sont préalablement incubées pendant 30 minutes avec du Hoechst 33342 (marqueur vital des noyaux des cellules; Molecular Probes) à 5 µM dans de l'ACSF, à l'obscurité et sous carboxygnation. L'iodure de propidium à 0,75 µM (Molecular Probes) est ensuite ajouté dans le milieu pendant 1 minute. Les tranches sont rincées 3 fois dans de l'ACSF, puis placées dans la chambre du microscope pour observation. Ces expériences sont effectuées sur des tranches de cerveau chargées ou non avec la sonde calcique. Ces mesures de viabilité sont réalisées toutes les heures, durant le protocole utilisé pour l'imagerie, c'est-à-dire immédiatement après la coupe et sur une durée allant jusqu'à 5h30 après la coupe.

Le microscope utilisé n'étant pas équipé d'un laser UV, l'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un appareil photo numérique (Nikon Coolpix E990, Japon) mis à la place d'un des oculaires du microscope par l'intermédiaire d'un adaptateur (Coolpix MDC lens, Japon).

## 2. *Traçage de voies*

Afin de s'assurer de l'intégrité des connexions entre le NST et la SNr, un traçage de voies est réalisé par application d'un traceur fluorescent rétrograde et antérograde, le DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, Molecular Probes). Ce traceur est un marqueur lipophile qui s'intègre dans les membranes et diffuse dans celles-ci pour finalement marquer la cellule entière. Il est notamment utilisé pour visualiser les prolongements axonaux des cellules neuronales. Après obtention des tranches de cerveau, celles-ci sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% pendant une nuit à température ambiante. Les tranches contenant à la fois le NST et la SNr sont ensuite rincées en PB 0,1M ( $K_3PO_4$  : 0,1 M,  $Na_3PO_4$  : 0,019 M, pH 7,2) et un cristal de DiI est placé soit au niveau de la SNr soit au niveau du NST. Après pénétration du cristal dans le tissu, les tranches sont rincées 2 fois 10 minutes en tampon PB 0,1 M, conservées à l'obscurité et à température ambiante pendant 4 semaines pour être ensuite observées en microscopie confocale.

## IV. Identification des populations cellulaires présentes dans la substance noire réticulée

Afin d'identifier la nature des différents types cellulaires présents au sein de la SNr, nous avons réalisé plusieurs expériences d'immunomarquages

### 1. *Marquages immunohistochimiques*

La technique d'immunohistochimie est basée sur l'interaction anticorps-antigène, ce complexe étant ensuite révélé par un deuxième anticorps conjugué à un marqueur fluorescent. Le modèle de tranche utilisé est le même que pour l'imagerie, des tranches de 300  $\mu m$  d'épaisseur afin de pouvoir comparer les résultats.

Après la coupe, les tranches de cerveau sont fixées en solution de paraformaldéhyde 4% dans du TBS-TX (Tris Base : 0,1 M, NaCl : 0,15 M, Triton X-100 : 0,2%) pendant 1h à température ambiante et sous agitation douce. Elles sont ensuite rincées en TBS-TX puis incubées dans une solution de saturation comprenant 3% BSA (Bovine Serum Antigen, Jackson ImmunoResearch Laboratories), 3% NGS (Normal Goat Serum, Interchim) et 0.2% de Triton-X100 dans du TBS, pendant 30 minutes. Cette étape permet de saturer les sites de fixation non spécifiques. Par la suite, les tranches de cerveau sont incubées une nuit à

température ambiante avec les anticorps primaires adéquats dilués dans la solution de saturation. La nature ainsi que la dilution utilisée pour chaque anticorps sont indiquées dans le tableau 2. Après rinçage au TBS-TX, les tranches sont incubées pendant 2h à température ambiante, avec les anticorps anti-espèces appropriés, anti-IgG de lapin ou anti-IgG de souris, couplés à l’Alexa 488 (Molecular Probes) ou à la cyanine 3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Ces anticorps secondaires sont dilués au 1/1000 dans la solution de saturation. Les tranches sont ensuite rincées en tampon TBS puis montées entre lame et lamelle avec le liquide de montage Vectashied (Vector Laboratories Inc.). En fonction des doubles marquages réalisés, les noyaux sont contre-colorés soit au DAPI (inclus dans le milieu de montage, Di Aminido Phenyl Indol, 1.5 µg/ml) soit au TO-PRO-3 iodide (Invitrogen, 1/1000), au Hoechst 33342 vital (Sigma) ou encore au Syto® 83 orange (Molecular Probes). Ces différents agents ont été choisis en fonction de leurs propriétés optiques, du matériel de détection utilisé et des marquages auxquels ils sont couplés : le DAPI et le Hoechst sont des agents excités dans l’UV, le TO-PRO a la particularité d’être excité à une longueur d’onde de 633 nm différente de celle de la cyanine 3 (554 nm), tandis que le Syto® 83 est excité à une longueur d’onde de 543 nm, proche de celle de la cyanine 3. Les images sont acquises sur un microscope confocal TCS-SP2 (Leica, Deerfield, IL), équipé d’un objectif x20. Les images sont stockées, observées puis superposées grâce au logiciel Adobe Photoshop CS.

Symbole	Nom	Spécificité	Type	Dilution utilisée	Fournisseurs
NeuN	Ac anti-Neuronal Nuclei	Neurone	Monoclonal	1/500	Chemicon
S100β	Ac anti- S100β	Astrocyte	Polyclonal de lapin	1/100	Sigma
GFAP	Ac anti-Glial Fibrillary Acid Protein	Astrocyte	Polyclonal de lapin	1/1000	Dako
Ox-42	Ac anti-CD11b	Microglie	Monoclonal	1/100	AbCys
CNPase	Ac anti-Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase	Oligodendrocyte	Monoclonal	1/100	Sigma
NG2	Ac anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan	Cellule progénitrice NG2	Monoclonal	1/100	Millipore (Upstate)
TH	Ac anti-Tyrosine Hydroxylase	Neurone dopaminergique	Monoclonal	1/400	Chemicon
GAD	Ac anti-glutamine decarboxylase	Neurone GABAergique	Polyclonal de lapin	1/200	Sigma

**Tableau 2 : Nature et dilution des anticorps primaires utilisés pour l’identification des différents types cellulaires présents au niveau de la SNr.**

## 2. Fixation du Fluo-4

Le Fluo-4 est une sonde calcique qui devient fluorescente après avoir été désesterifiée par les estérases à l'intérieur des cellules. La perméabilisation des cellules pour les expériences d'immunohistochimie engendre la perte de la fluorescence par diffusion de la sonde dans le milieu extracellulaire. Afin d'établir une corrélation entre les populations cellulaires présentes dans la SNr et les populations chargées en sonde calcique, nous avons appliqué un protocole de fixation du Fluo-4 utilisant de l'EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, Sigma). L'EDC est une carbodiimide qui fixe les chélateurs en préservant la morphologie des cellules et les sites antigéniques permettant ainsi la réalisation de marquages immunohistochimiques (Tymianski et al., 1997).

Après chargement, les tranches sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% et 10 mg/ml EDC dans du PBS ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  : 31,6 mM,  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  : 68,4 mM, NaCl : 150 mM), pendant 1 heure à température ambiante, dans l'obscurité. Elles sont ensuite rincées cinq fois en TBS-TX. Ce n'est qu'une fois cette étape de fixation effectuée, que les différents marquages immunohistochimiques avec les anticorps spécifiques sont réalisés pour l'identification des populations cellulaires nigrales (cf Matériel et Méthodes § IV.1).

## 3. Marquage des astrocytes et des progéniteurs des oligodendrocytes à l'aide d'un dipeptide

Dans certaines expériences, nous avons utilisé un colorant vital, le dipeptide  $\beta$ -Ala-Lys couplé à un fluorophore AMCA ( $\beta$ -Ala-Lys-N $\epsilon$ -AMCA) pour marquer les cellules gliales de type astrocytaire (I et II) et les précurseurs d'oligodendrocytes (O-2A). Ce dipeptide va s'incorporer de façon spécifique dans les cellules gliales exprimant le transporteur PEPT2 (Peptide Transporter 2). Ce transporteur, couplé aux protons et dépendant du sodium, permet le transport de di ou tripeptides à travers la membrane grâce à un gradient électrochimique de protons. Ce dipeptide est donc incorporé uniquement par des cellules vivantes (Dieck et al., 1999).

Les tranches sont incubées en présence de Fluo-4 et de dipeptide  $\beta$ -Ala-Lys (40  $\mu\text{M}$ ) dans de l'ACSF pendant 2h à 35°C. Elles sont ensuite laissées au repos dans de l'ACSF pendant 1h, afin de permettre la désesterification du Fluo-4, puis, si nécessaire, elles sont fixées dans une solution de fixation contenant 4% de paraformaldéhyde et 10 mg/ml d'EDC

dans du PBS, dans les mêmes conditions que décrites précédemment (cf Matériel et Méthodes § VI.2).

#### *4. Détermination des pourcentages de cellules de chaque type cellulaire au sein de la substance noire réticulée*

Les analyses des données immunohistochimiques sont réalisées manuellement. Pour chaque marquage, les comptages sont effectués sur 10 à 15 tranches de cerveau de différents animaux, en prenant 2 zones (390  $\mu\text{m}$  x 390  $\mu\text{m}$ ) de comptage sur chaque tranche.

Pour chaque zone, on détermine le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps spécifique par rapport au nombre total de noyaux (100%). La valeur finale correspond à la moyenne des pourcentages établie dans chaque zone, pour l'ensemble des tranches. Pour valider cette méthode, certains comptages (notamment pour les marquages Ox-42) ont été réalisés par deux expérimentateurs différents sur un échantillon d'environ 5 tranches. Les comptages étant statistiquement similaires, ils ont ensuite été réalisés par un seul expérimentateur.

## **V. Imagerie calcique**

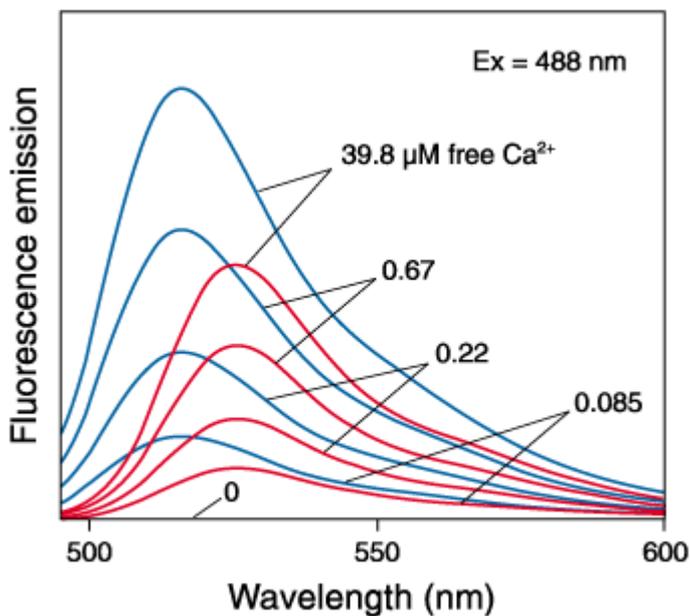
### *1. Principe de l'imagerie calcique*

L'imagerie calcique permet, avec l'aide d'indicateurs fluorescents de synthèse, de suivre la cinétique des variations des concentrations de calcium libre cytoplasmique, dans les cellules vivantes. L'utilisation de molécules fluorescentes pour détecter des constituants moléculaires des cellules par le biais de sondes spécifiques a été une véritable révolution en biologie cellulaire, et reste aujourd'hui une méthode de choix particulièrement résolutive en imagerie.

La sonde calcique utilisée dans ce travail est le Fluo-4 AM, un chélateur du  $\text{Ca}^{2+}$  dérivé du BAPTA (1,2-bis (2-aminophenoxy) éthane-N,N,N',N'-tetraacetic acid) et couplé à un ester. Cet indicateur permet une détection sur un large spectre de concentration et est peu phototoxique. La sonde liée à un ester est inactive et non fluorescente. Elle doit être désesterifiée pour devenir active et fluorescente. Cette liaison ester lui confère sa lipophilie et lui permet de pénétrer de façon passive à l'intérieur des cellules où elle se retrouve en présence des estérases intracellulaires qui vont couper le résidu ester, la rendre hydrosoluble

et la piéger dans le compartiment cytoplasmique. Le Fluo-4 est faiblement fluorescent à l'état libre et voit sa fluorescence augmenter fortement lorsqu'il se lie au calcium, ce qui permet de suivre les variations intracellulaires de calcium libre (Gee et al., 2000), (Fig. 28).

Le Fluo-4 a une constante d'affinité de liaison au calcium de 345 nM. Sa fluorescence peut augmenter de plus de 100 fois lors d'une élévation de calcium intracellulaire, par chélation du calcium libre. Cette sonde calcique apporte un bon compromis entre une détection de faibles mouvements de calcium, de l'ordre d'une centaine de nanomolaire, et un respect de la dynamique de recapture et d'extrusion du calcium en fin de signal.



**Figure 28:** Spectre d'émission de fluorescence du Fluo-4 (courbe bleue) et du Fluo-3 (courbe rouge) à concentration égale, dans des solutions contenant de 0 à 39.8 µM de calcium libre. (excitation à 488 nm, filtre d'émission > 520 nm)(Gee et al., 2000).

## 2. Chargement des tranches de cerveau en Fluo-4

Les tranches de cerveau obtenues précédemment (cf Matériel et Méthodes § II.2) sont incubées en présence de Fluo-4 AM pendant 1h. Elles sont placées dans une solution de 2 ml d'ACSF-Hepes 10 mM contenant 5 µM de Fluo-4 AM (Molecular Probes), 0,0025% de Cremophor EL, 0,005% de Pluronic F127, 0,5% de DMSO. Le Pluronic F127 et le Cremophor EL sont deux détergents non ioniques qui facilitent le passage de la sonde calcique à travers les membranes des cellules en favorisant la formation de micelles (Ikegaya et al., 2005). Ils sont utilisés à de très faibles quantités pour ne pas être toxiques pour les cellules. Avant utilisation, le milieu de chargement est soniqué pendant 15 min à 4°C pour que les micelles formées soient les plus petites possibles et s'incorporent en plus grande

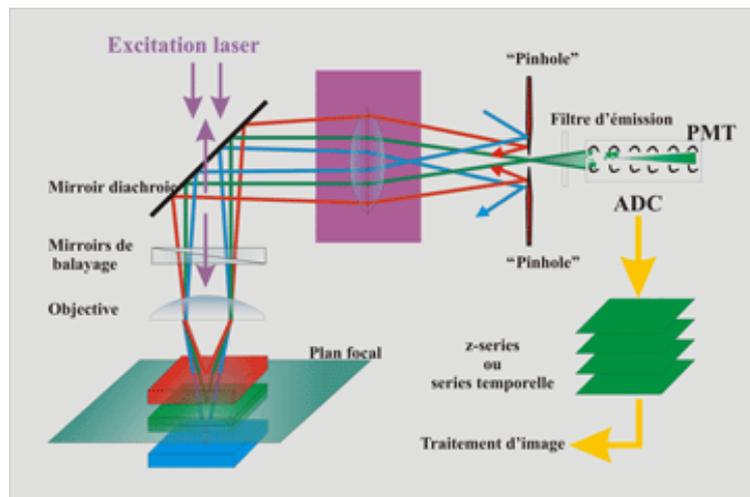
quantité dans les cellules. Le chargement des tranches de cerveau s'effectue à une température de 35°C afin d'optimiser la pénétration et l'activité des estérases permettant la désestérification de la sonde calcique à l'intérieur des cellules. Pendant l'heure de chargement, les tranches sont carboxygénées pendant 30 min seulement par apport du mélange 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> en surface de la chambre d'incubation, puis la carboxygénéation est arrêtée car l'oxygène est un "quencher" chimique pouvant entraîner un effet d'extinction de la fluorescence de la sonde, par diminution du rendement quantique du fluorochrome.

Après le chargement, les tranches de cerveau sont transférées dans de l'ACSF oxygéné complété de 1 mM de sodium pyruvate et 250 µM d'acide kynurénique (pour prévenir tout effet toxique lié à une libération excessive de kaïnate dans le milieu), à température ambiante. Ceci permet 1) de limiter une entrée prolongée de la sonde à l'intérieur des cellules, ce qui pourrait conduire à un effet tampon du calcium (chélation), 2) de limiter l'effet du DMSO et de l'acide pluronique sur une durée trop importante et 3) de permettre la continuation de la désestérification.

### 3. Montage expérimental

Le microscope utilisé (Nikon E600FN) est un microscope droit à épifluorescence, équipé notamment d'un objectif à immersion à eau x20, d'ouverture numérique de 0,5. La source lumineuse utilisée pour l'observation en épifluorescence est une lampe à vapeur de mercure (HBO 100W) dont le rayonnement est filtré en longueur d'onde par un filtre d'excitation qui conserve une bande étroite du spectre lumineux. Pour l'observation du Fluo-4 en épifluorescence, nous utilisons un filtre d'excitation à  $480 \pm 15$  nm et un filtre d'émission à  $535 \pm 20$  nm (Nikon). Le microscope est également équipé d'un module confocal (PCM 2000, Nikon) qui permet l'acquisition d'images en temps réel et l'enregistrement des variations de fluorescence en fonction du temps. Pour l'acquisition des données par l'intermédiaire du module confocal, la source lumineuse est un rayon laser Argon à 488 nm focalisé et le signal de réflexion émis est filtré avec un filtre à  $515 \pm 15$  nm puis détecté par un photomultiplicateur. Ce dernier est placé derrière un diaphragme de très faible dimension, le pinhole, permettant d'éliminer des signaux issus des points situés en dehors du plan focal (Fig. 29). Le pinhole utilisé dans notre étude a un diamètre de 0,5 µm, ce qui permet d'obtenir un plan focal d'environ 2 µm d'épaisseur avec un objectif d'ouverture numérique de 0,5, à 488 nm.

L'acquisition est réalisée par le logiciel EZ2000 (Nikon) dans un format de 12 bits, (*i.e.* la variation de fluorescence est définie entre 0 et 4095 en niveau de gris). Ce logiciel permet de numériser des images sur plusieurs plans focaux, à intervalles de temps réguliers. Dans nos conditions, des images de 512 pixels en abscisse et de 300 à 400 pixels en ordonnée sont acquises sur un seul plan focal, ceci permettant d'enregistrer une image environ toutes les 800 ms. Suite aux travaux de Shen and Johnson (2006), on sait que la durée des courants excitateurs post-synaptiques enregistrés au niveau des neurones de la SNr sous stimulation électrique du NST est d'environ 500 ms. Si ces courants sont couplés à des signaux calciques, notre résolution temporelle de 800 ms devrait permettre de les observer. Les fichiers enregistrés sont ensuite analysés grâce au logiciel *CalSignal* (Platel et al., 2007) et les résultats sont exportés vers un logiciel Excel (Microsoft) ou SigmaStat (Systat).

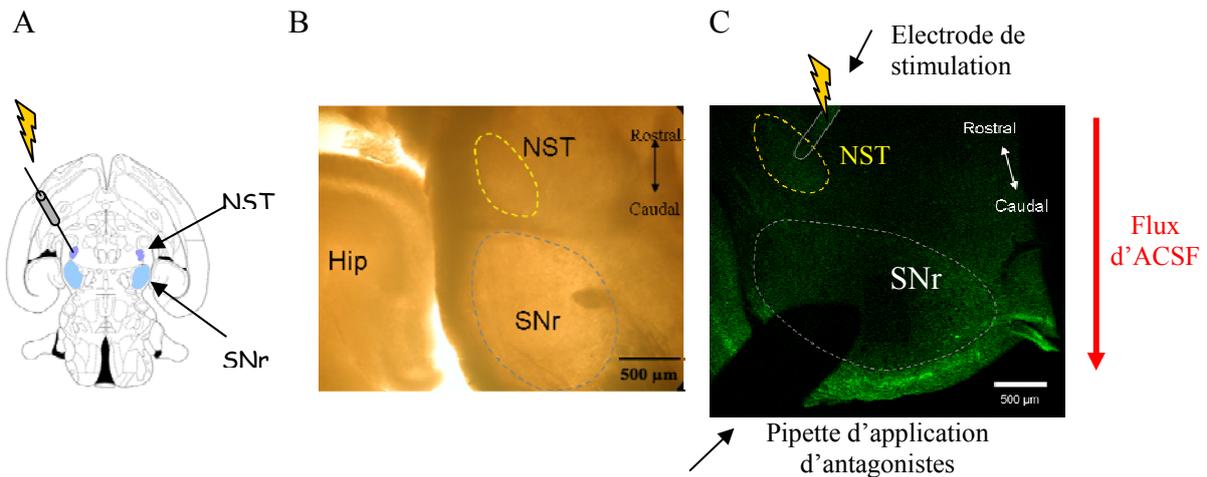


**Figure 29: Représentation schématique du principe du microscope confocal.** Le laser Argon émet un rayon lumineux qui est dévié par un miroir dichroïque vers l'échantillon. Le rayon lumineux émis en retour est dirigé vers un pinhole d'émission qui permet d'obtenir les informations ne concernant qu'un seul plan focal. Le signal est détecté par un photomultiplicateur (PMT) Le logiciel d'acquisition permet d'enregistrer plusieurs plans focaux et d'obtenir une image superposée.

#### 4. Protocole d'enregistrement des activités calciques

Les tranches chargées sont placées dans une chambre perfusée avec de l'ACSF oxygéné, à un débit minimum de 1 ml par minute. Le renouvellement rapide du liquide est indispensable à la survie des cellules. Les tranches de cerveau sont placées de façon à ce que

le NST se situe au niveau de l'entrée du flux dans la chambre et la SNr en sortie (Fig. 30). Les réponses calciques sont enregistrées soit sous stimulation du NST, soit en présence de différents agents pharmacologiques ajoutés dans le bain par perfusion. Nous avons effectué des enregistrements de 150 images, soit pour une vitesse d'acquisition de 800 ms par image, une durée d'enregistrement d'environ 2 minutes.

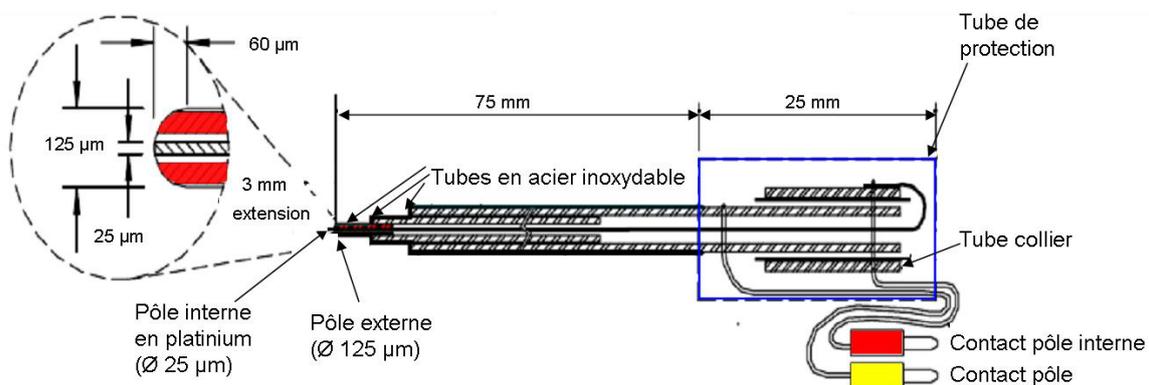


**Figure 30 : Protocole d'enregistrement des réponses calciques dans la SNr lors de la stimulation électrique du NST.** A) Localisation de la SNr et du NST sur une tranche horizontale de cerveau de rat (d'après l'atlas Paxinos-Watson). B) Photo d'une tranche de cerveau en lumière transmise, grossissement  $\times 4$ . La SNr (pointillés gris) est bien visible par sa couleur claire tandis que le NST (pointillés jaunes) est plus foncé. C) Partie d'une tranche de cerveau chargée en Fluo-4 et observée à l'aide d'un objectif  $\times 4$ . L'électrode de stimulation (contour gris) est placée sur le NST (pointillés jaunes) et les antagonistes (ombre noire) sont appliqués localement au niveau de la SNr (pointillés gris) en sens opposé du flux d'ACSF (flèche rouge) afin de ne pas modifier l'activité électrique des neurones du NST.

#### 4.1 Stimulation électrique du noyau sous-thalamique

Le noyau sous-thalamique est repéré sur nos tranches en lumière blanche, grâce à sa forme en « grain de riz » et sa situation en bordure de la capsule interne. Son repérage se fait également par sa localisation par rapport à la SNr : il se situe à environ 2,7 mm latéralement de la ligne médiane du cerveau et 2 mm en rostral du centre de la SNr. La stimulation électrique du NST est réalisée à l'aide d'une électrode bipolaire en platine/iridium (Frederick Haer & Co. Inc., USA). Son extrémité arrondie est formée d'un pôle interne de 25  $\mu\text{m}$  de diamètre et d'un pôle externe de 125  $\mu\text{m}$  de diamètre (Fig. 31). Son impédance, donnée par le fabricant, est de 2-3  $\text{M}\Omega$ . Les paramètres de stimulation appliqués au niveau du NST sur les tranches de cerveau sont les suivants : 100 Hz, 100  $\mu\text{s}$ , 100  $\mu\text{A}$ , 1 trains de 5 stimulations

toutes les dix images soit environ toutes les 8 secondes, et tout au long de la durée d'enregistrement. Ces paramètres ont été choisis par rapport aux données de la littérature (Shen and Johnson, 2006) afin de se placer au maximum d'amplitude des courants excitateurs postsynaptiques enregistrés par cette équipe. De plus, ils sont en adéquation avec ceux utilisés par le laboratoire chez le rat *in vivo* (150 Hz, 60  $\mu$ s, 150-250  $\mu$ A), ces paramètres mimant au mieux les paramètres utilisés en clinique humaine (130-180 Hz, 60  $\mu$ s, 300 à 500  $\mu$ A). La stimulation est délivrée par un stimulateur Master 8 programmable (Dipsi, France) et le signal délivré est contrôlé à l'aide d'un oscilloscope (Hameg).



**Figure 31: Représentation schématique de l'électrode de stimulation.** (D'après <http://www.fh-co.com>)

#### 4.2 Application d'agents pharmacologiques

Différents agents pharmacologiques sont appliqués dans la chambre de perfusion, soit pour induire une réponse calcique par action sur leur récepteur, soit pour inhiber une famille de récepteurs présents sur les cellules de la structure étudiée. Les agents utilisés comme agonistes sont appliqués par perfusion dans la chambre d'enregistrement, dans le sens du flux d'ACSF. Le glutamate et le GABA sont appliqués dès le début de l'enregistrement et pendant environ 40 secondes (50 images). Ceci permet d'éviter un phénomène d'excitotoxicité pour le glutamate et de rester dans les mêmes conditions expérimentales pour l'application du GABA. L'ATP étant rapidement métabolisé en ADP, AMP et adénosine, il sera préparé extemporanément lors de chacune de ses applications et sera ajouté directement dans la chambre de perfusion.

A l'opposé, les antagonistes sont appliqués en flux inverse et de façon très localisée au niveau de la SNr, ceci afin de ne pas modifier les activités cellulaires du NST. Le réglage de

la perfusion d'antagonistes a été préalablement réalisé par application de produits fluorescents et contrôle de leur diffusion dans la chambre. Les antagonistes sont appliqués dans la chambre de perfusion pendant une minute avant l'application de la stimulation, et ce, pour une meilleure pénétration tissulaire. Ils sont ensuite appliqués pendant toute la durée de l'expérience. Ci-après, le tableau 3 récapitule les différents agents pharmacologiques utilisés au cours de notre étude ainsi que les différentes concentrations auxquelles ils ont été appliqués. Ces concentrations ont été déterminées en fonction des données de la littérature.

Récepteurs	Agonistes	Concentrations utilisées	Antagonistes	Concentrations utilisées
P2	ATP	100 nM	Suramine	100 $\mu$ M
NMDA	Glutamate	100 $\mu$ M	D-AP5	50 $\mu$ M
AMPA	Glutamate	100 $\mu$ M	CNQX	10 $\mu$ M
mGlu	Glutamate	100 $\mu$ M	LAP-3	100 $\mu$ M
GABA <sub>A</sub>	GABA	20 $\mu$ M	Bicuculline	20 $\mu$ M

**Tableau 3:** *Liste des différents agonistes et antagonistes utilisés, avec leurs concentrations et leurs cibles pharmacologiques respectives*

#### 4.2.1 Actions sur les récepteurs glutamatergiques

Pour tous les récepteurs glutamatergiques ionotropiques et métabotropiques, l'agoniste physiologique est le glutamate. Il a une affinité de l'ordre de 100 nM. Nous avons utilisé une concentration de 100  $\mu$ M qui est la concentration classiquement utilisée sur tranche afin d'activer l'ensemble des récepteurs glutamatergiques.

Chaque type de récepteur est ensuite inhibé par un antagoniste pharmacologique spécifique :

- Pour les récepteurs NMDA, nous avons utilisé le (R)-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) qui est un antagoniste compétitif à haute affinité pour les récepteurs NDMA (Kew and Kemp, 2005). Ce composé montre une sélectivité préférentielle pour les récepteurs composés des sous-unités NR2A et NR2B.

- Pour les récepteurs AMPA/kainate, les antagonistes compétitifs les plus utilisés dans la littérature, sont le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) et le 6,7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione (DNQX), (Kew and Kemp, 2005). Ils montrent une sélectivité 20 à 150 fois plus importante pour les récepteurs AMPA que kainate, de par leur liaison préférentielle aux sous-unités GluRs. Nous avons utilisé le CNQX dans notre étude.
- Pour les récepteurs métabotropiques, nous avons utilisé le L-2-amino-3-phosphonopropionate (L-AP3). C'est un analogue du glutamate et, sur des tranches de cerveau de rat, il s'avère être un inhibiteur non compétitif à large spectre qui va inhiber l'ensemble des récepteurs glutamatergiques métabotropiques. Son affinité pour les récepteurs métabotropiques est supérieure à 1  $\mu\text{M}$  et son activité dépend de la concentration en calcium extracellulaire. Bien qu'utilisé couramment, son mode d'action est peu connu (The Metabotropic Glutamate Receptors, De P. Jeffrey Conn, Jitendra Patel - Humana Press, 1994) et semble passer par une désensibilisation des récepteurs au glutamate, difficilement réversible dans certains cas.

#### 4.2.2 Actions sur les récepteurs GABAergiques

L'application de GABA, agoniste physiologique, permet d'activer l'ensemble des récepteurs ionotropiques et métabotropiques GABAergiques. Le récepteur  $\text{GABA}_A$  possède un site de haute affinité au GABA ( $K_d = 10\text{-}20 \text{ nM}$ ) et plusieurs sites de faible affinité ( $K_d = 100 \text{ nM- } 1\mu\text{M}$ ). Cependant, le rôle de ces différents sites reste encore peu connu. Nous avons donc choisi d'utiliser une concentration de 20  $\mu\text{M}$  de GABA afin d'activer l'ensemble des sites. En dehors des sites récepteurs au GABA, le récepteur  $\text{GABA}_A$  présente une variété d'autres sites récepteurs topographiquement distincts, capables de reconnaître des substances pharmacologiquement actives, comme les benzodiazépines (BZDs), les barbituriques, les neurostéroïdes, les anti-convulsivants ou encore l'alcool. Ces agents modulateurs changent l'efficacité d'action du GABA en induisant une modification de l'architecture protéique du complexe  $\text{GABA}_A$ . Ce changement transforme la taille du canal ce qui modifie la perméabilité au chlore (Henschel et al., 2008).

Afin de bloquer spécifiquement le rôle du GABA, nous avons choisi d'appliquer de la bicuculline méthiodide (BMI), qui est un antagoniste compétitif des récepteurs  $\text{GABA}_A$ . Son action au niveau du site de liaison du GABA va entraîner une diminution de l'action du GABA, médiée par les ions  $\text{Cl}^-$  (MacDonald and Olsen, 1994). La picrotoxine est un autre antagoniste de type non compétitif qui va également induire une diminution de l'effet

inhibiteur du GABA en agissant au niveau du canal chlore, mais il n'agit pas au niveau du site de liaison du GABA.

L'activation des récepteurs GABA<sub>B</sub> n'entraîne pas d'augmentation calcique au sein des cellules, ils n'interviennent donc pas dans les réponses calciques pouvant être enregistrées en imagerie calcique. De plus, ils sont très peu présents au niveau des cellules gliales, (si ce n'est au niveau de l'hippocampe, pour revue Verkhatsky and Butt, 2007), principale population cellulaire étudiée dans ce travail, nous n'avons donc pas étudié spécifiquement l'inhibition de ces récepteurs.

#### *4.2.3 Actions sur les récepteurs purinergiques*

Les récepteurs purinergiques sont tous activés par l'application d'ATP. Il existe des antagonistes particuliers à certains sous-types de récepteurs. Il existe également des antagonistes peu spécifiques qui peuvent inhiber l'ensemble des récepteurs P2, mais il n'existe pas, à ce jour, d'antagonistes permettant de faire la distinction entre les P2Y et les P2X.

La suramine, utilisée dans ce travail, est un inhibiteur global des récepteurs purinergiques P2, qui ne permet pas de faire une réelle distinction entre les P2X et les P2Y. En effet, même si elle semble inhiber plus spécifiquement les récepteurs P2Y, elle peut également toucher les récepteurs P2X (Ralevic and Burnstock, 1998). Le PPDAS (pyridoxalphosphate-6-azophenyl-29,49-disulfonic acid) est également donné comme étant un antagoniste spécifique des récepteurs P2Y, mais il agit aussi sur les P2X (Ralevic and Burnstock, 1998). Le fait que les cellules gliales de la SNr expriment essentiellement des récepteurs de type P2Y, on a estimé que l'effet observé était relié essentiellement à l'inhibition de ces récepteurs.

### *5. Traitement des résultats et analyses statistiques des données expérimentales*

#### *5.1 Analyse des fichiers bruts par l'utilisation du logiciel d'analyse Calsignal*

Les fichiers bruts sont obtenus à partir du logiciel EZ2000 (Nikon) et sont ensuite analysés par le logiciel d'analyse CalSignal (Platel et al., 2007), développé et incrémenté pour l'analyse de nos résultats par Jean-Claude Platel (Yale University, USA). Ce logiciel permet une détection automatique des cellules chargées en sonde calcique (ROIs : Regions Of Interest) et une analyse complète des variations de fluorescence se produisant au sein de chaque ROI en fonction du temps. Plusieurs paramètres sont quantifiés : le nombre de

réponses par région d'intérêt, la durée des réponses, l'amplitude des événements, leur fréquence, les phénomènes de synchronie entre ROIs ou entre différentes zones choisies, etc... Une adaptation de ce logiciel nous a permis de réaliser un calque de l'ensemble des ROIs déterminées sur une tranche et d'appliquer ce même calque (en le recadrant éventuellement si la tranche a légèrement bougé en xy) sur les différents fichiers d'enregistrements réalisés sur la même zone, en fonction des expériences conduites (stimulation électrique, agents pharmacologiques). Ceci permet notamment de suivre les réponses individuelles de chaque cellule en fonction de différentes conditions et d'établir des corrélations entre les réponses à ces différentes conditions lors de séquences d'acquisition successives.

### 5.2 Analyse statistique des données d'imagerie calcique

L'analyse statistique des résultats d'imagerie calcique a été effectuée grâce au logiciel SigmaStat. Les tests statistiques effectués sont des tests de Mann-Whitney permettant de comparer les effets de la stimulation électrique du NST sur les réponses calciques des cellules gliales de la SNr, en absence et en présence d'inhibiteur. Pour comparer ces réponses, nous avons effectué deux périodes de stimulation du NST espacées de 5 minutes (Fig. 32). Un groupe témoin (sham) a été réalisé en absence d'inhibiteurs. Dans le groupe expérimental, le nombre total de cellules répondant à la stimulation en présence d'inhibiteur est rapporté au nombre de cellules répondant lors de la première période de stimulation. Ce rapport est comparé à celui réalisé dans le groupe sham en absence d'inhibiteur, dans les mêmes conditions et permet ainsi d'évaluer le pourcentage d'inhibition de chaque antagoniste testé. L'ensemble des données est exprimé en moyenne  $\pm$  SEM. Les différences significatives sont illustrées comme suit : \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , et \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figure 32: Schéma du protocole de stimulation du NST en présence d'inhibiteurs.** Les réponses calciques de la stimulation en présence d'antagonistes sont rapportées aux réponses calciques obtenues lors de la première stimulation et comparées aux réponses obtenues sur les animaux sham (témoin).

## VI. Patch-clamp

Au cours de ce travail doctoral, je me suis intéressée à l'étude de l'activité électrique des neurones de la SNr par utilisation de la technique de patch-clamp. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Corinne Beurrier et le Dr Paolo Gubellini de l'équipe « Interactions Cellulaires, Neurodégénérescence et Neuroplasticité » dirigée par le Dr Lydia Kerkerian, (CNRS UMR6216, IBDM, Marseille).

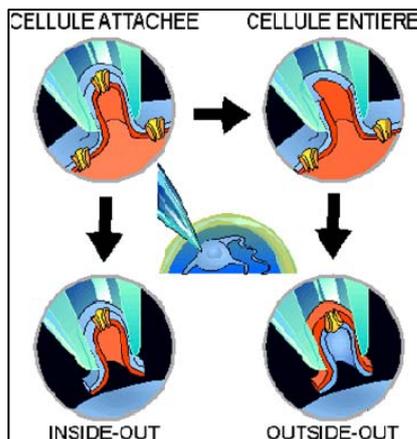
### 1. Généralités

Toute fonction cellulaire (transmission de l'information, sécrétion, contraction,...) s'accompagne de mouvements ioniques à travers la membrane plasmique des cellules (Neher, 1992). L'électrophysiologie consiste à mesurer ces flux ioniques de part et d'autre d'une membrane biologique. Les techniques d'électrophysiologie ont permis, en étudiant la propagation des signaux électriques entre les cellules nerveuses (potentiel d'action, courants ioniques...), de montrer de quelle manière le système nerveux gère l'information pour produire des comportements adaptés au milieu externe et interne. Depuis une vingtaine d'années, des techniques nouvelles, comme le patch-clamp, ont révolutionné la vision du fonctionnement du SNC en donnant accès aux propriétés fonctionnelles des protéines-canaux qui sont à l'origine de l'activité électrique du système nerveux. Ces techniques ont considérablement élargi notre compréhension de la transmission des signaux cellulaires (pour revue voir Hammond and Tritsch, 1990).

### 2. Technique du patch-clamp

La technique du patch-clamp, mise au point par le groupe de Neher et Sakmann dans les années 1975-1980, permet de mesurer les courants électriques au niveau d'une cellule ou même d'un morceau de membrane, jusqu'à une résolution permettant de mesurer l'activité d'un seul canal. Cette technique permet d'étudier les mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques d'une cellule en permettant le suivi en direct des phénomènes d'ouverture des canaux. Le patch-clamp consiste donc à enregistrer l'activité électrique d'un fragment microscopique de membrane cellulaire, isolé électriquement du reste de la surface cellulaire et ne contenant que quelques canaux. On utilise une électrode de verre, remplie d'une solution conductrice, dont la pointe a un diamètre de l'ordre du micromètre.

Il existe quatre configurations possibles (Fig. 33) : 1) en cellule attachée ("cell-attached"), une configuration qui permet d'enregistrer un petit nombre de canaux en conservant l'intégrité du milieu intracellulaire et la valeur du potentiel de membrane de la cellule, 2) en cellule entière ("whole-cell"), une configuration qui permet de mesurer les fluctuations du courant global ou du potentiel membranaire tout en contrôlant la composition ionique du milieu intracellulaire, 3) en configuration dite "inside-out" qui permet d'enregistrer un petit nombre de canaux sur un morceau de membrane isolé. Dans ce cas, la face interne de la membrane est exposée au milieu extracellulaire qui peut être aisément manipulé et enfin 4) en configuration dite "outside-out" qui permet d'enregistrer un petit nombre de canaux sur un morceau de membrane isolé, la face externe de la membrane étant orientée vers l'extérieur de la pipette. Cette configuration permet de manipuler l'environnement extérieur et notamment la concentration en neurotransmetteurs pour les récepteurs impliqués dans la neurotransmission.



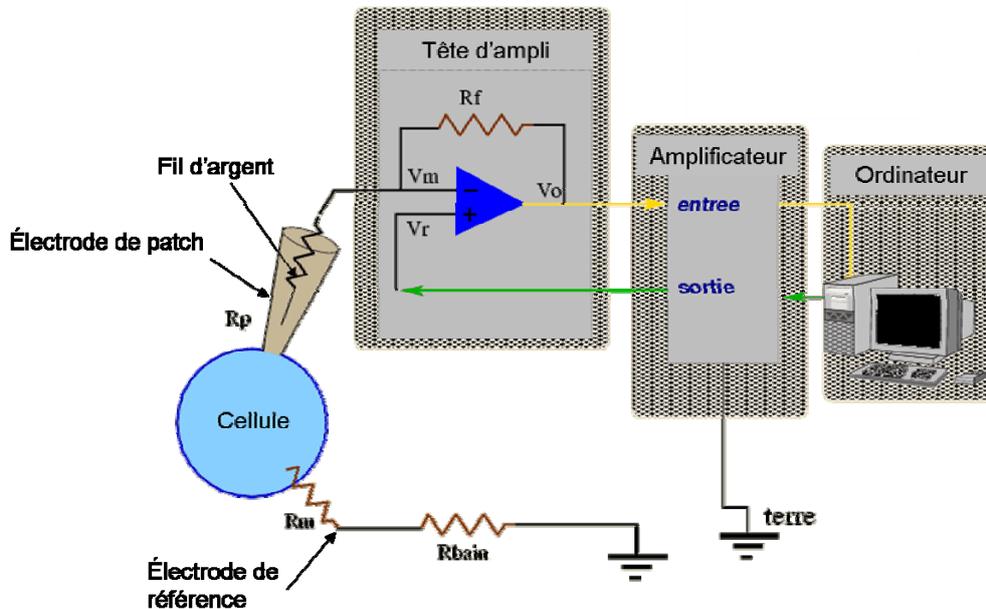
**Figure 33: Représentation schématique des quatre configurations de patch-clamp.** Au centre, représentation schématique d'une pipette de patch sur un neurone, et autour les différentes configurations : en cellule attachée, cellule entière, inside-out et outside-out (modifié d'après Neher et Sakmann, 1992)

Les deux principales méthodes d'enregistrement du patch-clamp sont 1) le « voltage-clamp » où l'on mesure un courant en imposant un voltage donné et 2) le « current-clamp », où, dans ce cas, un voltage est mesuré en imposant un courant donné. Le principe de la mesure repose sur l'utilisation de la loi d'Ohm  $U = R.I$ , où  $U$  est le voltage,  $R$  la résistance et  $I$  le courant.

### 3. Montage expérimental

Pour réaliser des expériences de patch-clamp, on utilise un montage avec les connexions suivantes : la cellule est reliée *via* une pipette de patch à une tête d'amplificateur, elle-même connectée à un amplificateur, lui-même en lien avec un ordinateur permettant l'acquisition des données (Fig. 34).

La tête de l'amplificateur est la partie la plus importante car elle remplit les deux fonctions principales : 1) elle transfère le signal de stimulation de l'amplificateur jusqu'à la membrane et 2) elle mesure le courant électrique  $I$  qui traverse la membrane de la cellule (ou un morceau de membrane). Elle est composée de trois éléments principaux : le connecteur du porte-électrode comprenant le fil conducteur central, un amplificateur opérationnel et un ensemble de résistances électriques ( $R_f$ ) (Fig. 34).



**Figure 34: Schéma du montage expérimental d'enregistrement électrophysiologique.** Représentation du circuit d'enregistrement d'une mesure en patch-clamp, en configuration « cellule entière ».  $R_p$  = résistance de pipette,  $R_f$  = résistance de la tête d'ampli (feedback resistors),  $R_{bain}$  = résistance du bain,  $R_m$  = résistance de membrane,  $V_m$  = potentiel de membrane,  $V_o$  = valeur du potentiel proportionnel à la valeur du courant  $I$  traversant la membrane (<http://www.compneuro.org/hammond/techniques>).

L'amplificateur est un ensemble de blocs de composants électroniques qui permettent d'étalonner et de corriger le signal qui sort de la tête d'ampli (flèche jaune, fig. 34) ainsi que le signal de stimulation qui entre dans la tête d'ampli (flèche verte, fig. 34). Pour connecter l'amplificateur à l'ordinateur, il est nécessaire d'intercaler un convertisseur permettant de transcrire les signaux électriques venant de la préparation (signaux analogiques) en valeurs numériques et un convertisseur pour générer des signaux électriques (analogiques) à partir de valeurs numériques définies par l'expérimentateur : c'est une carte d'acquisition, dans notre cas, il s'agit d'une Digidata 1440 (Axon Instruments, Inc. USA).

### *3.1 Le matériel*

Les pipettes de patch sont des capillaires en verre de 1,5 mm de diamètre externe. Les pipettes sont fabriquées par le biais d'une étireuse horizontale (Model P-97, Sutter Instrument Co.). Le tube en verre est étiré en deux temps permettant de réduire le diamètre du tube progressivement et ainsi d'obtenir une pointe fine sur une longue partie. Cette forme permet de ne pas léser le tissu lors de l'enregistrement. La résistance de l'électrode ainsi obtenue est proportionnelle au diamètre de la pointe : plus le diamètre est grand, plus la résistance est faible. La mesure de la différence de potentiel transmembranaire nécessite l'utilisation d'une électrode d'enregistrement intracellulaire composée d'un fil d'argent chloruré (Ag/AgCl), qui se trouve dans la pipette de patch et d'une électrode de référence qui se situe dans la chambre de perfusion. Les pipettes de patch sont placées sur un micromanipulateur (Sutter Instrument Company) qui permet de les faire descendre lentement et progressivement dans la partie supérieure de la tranche. L'opération se déroule sous contrôle visuel par l'intermédiaire d'un microscope équipé d'une caméra vidéo infrarouge (TVCCD2006 Hamamatsu, Japon). L'électrode d'enregistrement est reliée à une tête d'amplificateur qui mesure le courant électrique traversant la membrane de la cellule et assure le transfert du signal de stimulation jusqu'à la membrane. Elle permet ainsi l'enregistrement et l'envoi d'influx électriques.

Les courants sont ensuite enregistrés à l'aide d'un amplificateur (Axopatch 200B, Axon Instruments, Inc. USA) et les signaux sont transmis à un ordinateur après traitement du signal électrique en signal numérique par l'intermédiaire de la carte d'acquisition (Digidata 1440A, Axon Instruments, Inc. USA). Les enregistrements sont réalisés à l'aide du logiciel Clampex version 10.2 et l'analyse se fait par le logiciel Clampfit version 10.2 (Axon Instruments, Inc. USA).

### *3.2 Protocole expérimental*

Les tranches de cerveau sont obtenues de la même façon que pour les expériences d'imagerie calcique. De la picrotoxine à 50  $\mu$ M est ajoutée dans le milieu de repos après la coupe pour inhiber les courants GABAergiques afin de mieux visualiser les courants glutamatergiques. Nous cherchons dans un premier temps à obtenir les mêmes résultats que dans la littérature (Shen and Johnson, 2006). Nous nous plaçons donc dans les mêmes conditions. Les pipettes sont remplies avec une solution dont la teneur en ions est proche de celle du milieu intracellulaire (K-gluconate : 125 mM, NaCl : 10 mM, MgCl<sub>2</sub> : 2 mM, CaCl<sub>2</sub> : 1 mM, BAPTA : 0,5 mM, HEPES : 19 mM, Mg-ATP : 1 mM, GTP : 0,3 mM, pH : 7.3), puis

elles sont fixées sur le support du micromanipulateur de telle manière que l'électrode d'enregistrement plonge dans la solution intracellulaire. Dans un premier temps, une pression positive est appliquée au niveau de l'électrode en soufflant de l'air dans un tube en plastique souple. Cette pression crée un flux de liquide à son extrémité. Ce flux prévient une éventuelle obstruction de la pointe de l'électrode par des particules lors de la pénétration de l'électrode dans la tranche et pendant sa progression à travers celle-ci (une variation de résistance de l'électrode traduit l'obstruction de celle-ci). L'électrode est descendue assez rapidement à la surface du tissu, puis, une fois que la pipette de patch est en contact avec la tranche, la vitesse du micromanipulateur est diminuée au maximum. Une pénétration lente permet une préservation optimale de l'intégrité du tissu. Lorsque la pointe de l'électrode arrive au contact de la membrane du neurone d'intérêt, le flux de liquide crée une petite invagination dans cette membrane. Le fait de voir cette invagination sur l'écran nous indique que l'extrémité de l'électrode se trouve contre la membrane de la cellule. Juste avant le scellement, le potentiel de jonction du circuit (incluant les différences de potentiel entre la solution contenue dans la pipette et la solution extracellulaire contenue dans la chambre de perfusion) est annulé par la mise à zéro du courant passant à travers la pipette. Le scellement est contrôlé par le suivi de la résistance de la pipette, celle-ci passant de 5 M $\Omega$  à 1 G $\Omega$ , c'est ce qu'on appelle le « gigaseal ». Un bon « seal » est une garantie d'enregistrement de qualité, sans fuites de courant au niveau du scellement de la pipette à la membrane. Le passage de la configuration cellule attachée à cellule entière se fait par l'application d'une brève succion afin de casser la membrane plasmique au niveau de l'embouchure de la pipette et de mettre en communication les milieux intracellulaire et intra-pipette.

### *3.3 Mesure des caractéristiques électrophysiologiques des neurones*

Dans la configuration cellule entière, l'activité électrique de la cellule peut être enregistrée sans imposer ni courant ni voltage. Ceci nous apporte une information sur l'activité spontanée de la cellule. Ainsi l'activité spontanée électrique des neurones est enregistrée en  $I = 0$ , et l'activité spontanée synaptique est enregistrée en mode  $V = 0$ .

Cette configuration permet également d'obtenir des informations sur les propriétés membranaires de la cellule (présence de courant  $I_h$ , production de potentiel d'action...). Un protocole d'application de 10 sauts de potentiels hyperpolarisant puis dépolarisant d'une amplitude de 10 mV, chaque saut durant 500 ms, nous a permis de contrôler ces propriétés membranaires.

### *3.4 Mesure en voltage imposé*

L'application d'un voltage imposé permet d'enregistrer les activités électriques neuronales en fonction de la composition des milieux intra et extracellulaires. Dans notre étude, le fait d'imposer un voltage à -53 mV permet d'être proche du potentiel de repos des cellules neuronales mais également de se placer exactement au potentiel d'équilibre du GABA par rapport à la composition du milieu intrapipette. Ainsi, dans ces conditions, nous pouvons enregistrer uniquement les courants glutamatergiques. Le protocole de stimulation du NST appliqué utilise les mêmes paramètres que celui utilisé lors du protocole d'imagerie calcique. Nous avons appliqué soit une stimulation unique à 100  $\mu$ s, 100  $\mu$ A, soit un train de 5 stimulations à 100 Hz, 100  $\mu$ s, 100  $\mu$ A.

## **VII. Mesure de libération de glutamate par ampérométrie**

Lors de ce travail, nous nous sommes intéressés à la mesure de la libération de glutamate en temps réel au sein de la SNr sous l'effet de la stimulation du NST ou lors de l'application d'ATP. L'objectif était 1) de pouvoir détecter une libération de glutamate au sein de la SNr sur le modèle de la tranche épaisse et 2) de déterminer le décours temporel et l'amplitude de cette libération afin de déterminer, à long terme, la part gliale et la part neuronale de l'origine de ce glutamate. Cette étude a été réalisée en collaboration avec Stéphane Marinesco du laboratoire Inserm U628 dirigé par le Dr Jian-Sheng Lin à Lyon, et qui a mis au point différents biocapteurs permettant de détecter le glutamate, la D-sérine et l'ATP. Dans le cadre de ce travail, seuls les biocapteurs au glutamate ont été utilisés.

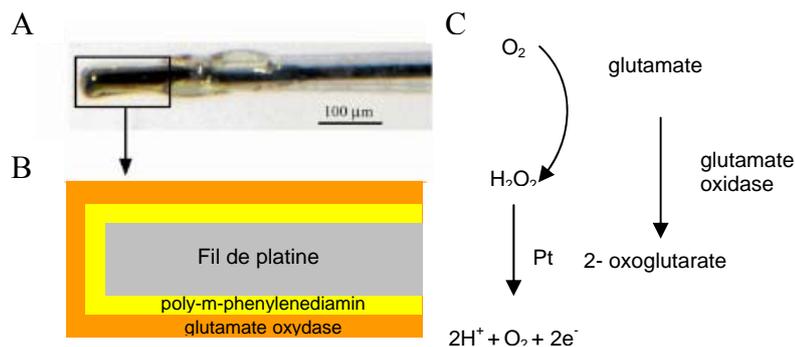
### *1. Principe de fonctionnement*

Un biocapteur est un dispositif intégré capable de fournir des informations analytiques quantitatives ou semi-quantitatives utilisant un élément de reconnaissance biologique (récepteur biologique) qui est en contact direct avec un transducteur. Il est composé d'un élément de reconnaissance moléculaire qui réagit spécifiquement avec la molécule d'intérêt et d'un transducteur qui agit en tant que détecteur, convertissant l'évènement de reconnaissance moléculaire en un signal physique mesurable. Dans notre étude, la technique ampérométrique consiste à mesurer la production de peroxyde d'hydrogène suite à l'oxydation du glutamate

par une enzyme, la glutamate oxydase (élément de reconnaissance), qui est immobilisée sur une membrane sélective liée à l'électrode d'enregistrement (transducteur), (Fig. 35).

Par un mécanisme de réaction d'oxydoréduction, l'événement d'oxydation est traduit en signal électrique mesurable. Nous pouvons ainsi mesurer la quantité de glutamate libéré en temps réel (résolution temporelle de l'ordre de la seconde) par la mesure d'un courant. Cette technique permet de mesurer des variations des contenus extracellulaires en glutamate avec une résolution temporelle de l'ordre de la ms, ce que ne permet pas la technique de microdialyse dont la résolution temporelle est de l'ordre de quelques minutes. La sensibilité est de 100 nM, ce qui est suffisamment précis pour les expériences réalisées, mais ce qui est plus faible que les méthodes d'analyse des échantillons de microdialyse par HPLC, qui peuvent aller jusqu'à une sensibilité d'environ 100 pM pour le glutamate.

Ces biocapteurs sont fabriqués manuellement par Stéphane Marinesco. La figure 36 montre le montage et la composition du biocapteur au glutamate.



**Figure 35 : Représentation schématique du biocapteur à glutamate.** A) Photographie de la pointe de l'électrode (la zone encadrée correspondant à la couche enzymatique). B) Représentation de la composition de la pointe de l'électrode, comprenant un fil en platine, une membrane sélective en polyphénylène-diamine, et une couche enzymatique avec la glutamate oxydase immobilisée. C) Réaction enzymatique se produisant à la pointe de l'électrode en présence de glutamate. La réduction du peroxyde d'hydrogène est détectée par le fil en platine (Pernot et al., 2008).

## 2. Protocole expérimental

Les tranches sont obtenues de la même façon que précédemment (cf Matériel et Méthodes § II.2). Après la coupe, elles sont laissées 1h en ACSF oxygéné contenant 250 µM d'acide kynurénique et 1 mM de sodium pyruvate puis elles sont placées dans la chambre de perfusion. Le biocapteur est positionné au niveau de la SNr et l'électrode de stimulation dans le NST. Afin d'équilibrer la sonde, celle-ci est placée dans le milieu de la chambre de

perfusion, l'équilibre étant contrôlé par la stabilisation du courant mesuré. Une fois cet équilibre obtenu, il faut calibrer cette sonde : 2  $\mu\text{M}$  de glutamate sont appliqués dans le bain. La limite de détection de la sonde au glutamate est de 1  $\mu\text{M}$ . Les résultats étant des résultats très préliminaires, nous avons fait une calibration simple de la sonde et non une gamme linéaire.

Le courant enregistré étant proportionnel à la concentration appliquée, il est ainsi possible de calibrer la sonde. Cette calibration sera répétée en fin de journée pour s'assurer que la sonde n'a pas dévié (perte d'activité enzymatique). Après lavage en ACSF, on positionne la sonde au sein de la SNr, on la laisse de nouveau se stabiliser et la quantité de glutamate libérée lors de la stimulation du NST génère un courant électrique qui est mesuré directement.



*Remarque préliminaire :*

*Les résultats obtenus au fur et à mesure de nos investigations nous ont amené à réorienter certaines approches expérimentales. Aussi, dans la présentation de mes résultats, nous nous sommes permis de commenter quelque peu ces résultats afin que le lecteur suive parfaitement la démarche expérimentale. Les quelques commentaires de ce chapitre seront bien évidemment repris dans la discussion générale.*

## **I. Validation du modèle expérimental**

La plupart de nos connaissances concernant le fonctionnement physiologique des ganglions de la base est issue d'études *in vivo* réalisées sur des modèles animaux, chez le rongeur ou chez le primate non humain (Parent et al., 2000, Obeso et al., 2002; Israel and Bergman, 2008). L'intégrité des réseaux neuronaux formés par les ganglions de la base est indispensable au bon fonctionnement de l'ensemble des circuits impliqués, entre autre, dans le contrôle du mouvement. Les études *in vitro* restent toutefois indispensables et complémentaires des approches *in vivo*. En effet, elles apportent des informations plus focalisées sur l'activité des neurones impliqués dans ces structures en permettant de révéler notamment les interactions cellulaires et moléculaires ainsi que les acteurs principaux impliqués dans ces activités neuronales (Beurrier et al., 2001).

La technique d'imagerie calcique, utilisable à ce jour seulement *in vitro* pour étudier l'activité de ces structures profondes, reste un outil de choix pour mieux appréhender les interactions cellulaires et notamment pour tenter de décrypter les mécanismes complexes mis en jeu dans la SHF du NST.

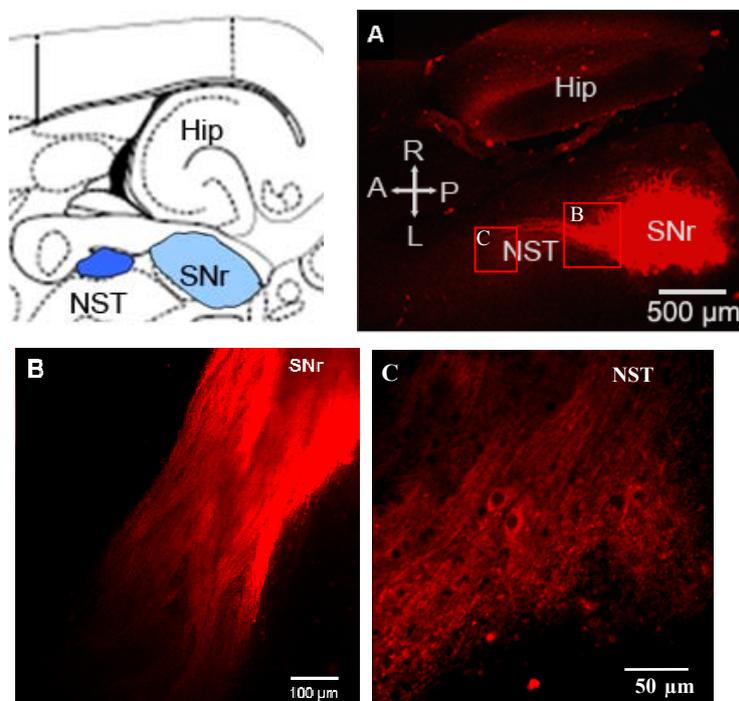
### *1. Traçage des voies subthalamo-nigrales*

Une étude réalisée chez la souris montre qu'une inclinaison de 10° de l'angle de coupe permet de préserver un maximum de fibres entre la SNr, le NST, le GPe et le striatum (Beurrier et al., 2006). Cependant, d'après leur localisation dans le cerveau de rat, la majorité des projections entre le NST et la SNr se situe dans un plan horizontal (Mailly et al., 2001). Afin de vérifier la conservation des projections subthalamo-nigrales sur notre modèle de tranche de cerveau, nous avons effectué des marquages rétrogrades (SNr vers NST,  $n = 9$ ) ou antérogrades (NST vers SNr,  $n = 8$ ) avec un traceur de voie, le DiI.

Après 4 semaines à l'obscurité, les tranches sont observées au microscope. On remarque de nombreuses fibres marquées par le DiI, et ce, quel que soit l'emplacement initial du cristal de DiI, dans la SNr ou dans le NST (Fig. 36). Ces fibres subthalamo-nigrales sont regroupées en paquets et forment de gros faisceaux partant tous dans la même direction. Il est d'ailleurs possible de les suivre d'une extrémité à l'autre, c'est-à-dire de leur origine jusqu'à leurs sites de projection (Fig. 36B). Les projections subthalamo-nigrales semblent donc être globalement bien préservées sur nos tranches de cerveau, même si nous ne connaissons pas la proportion de fibres coupées *versus* préservées (Fig. 36A). Lorsque le cristal de DiI est placé dans la SNr, des corps cellulaires marqués sont parfois visibles au niveau du NST (Fig. 36C), montrant bien la diffusion du DiI dans les synapses subthalamo-nigrales, le long de l'axone, et ce, jusqu'aux corps cellulaires des neurones glutamatergiques du NST.

Ainsi, la réalisation de tranches dans un plan horizontal permet de préserver une part des connexions entre la SNr et le NST.

La figure 36 illustre la visualisation des projections subthalamo-nigrales sur nos tranches de cerveau, révélées par la fluorescence rouge émise par le DiI incorporé dans les membranes. Nous pouvons voir la présence des deux structures d'intérêt, la SNr et le NST, ainsi que le faisceau de fibres qui les relie, jusqu'au corps cellulaires du NST. Dans cet exemple, le DiI a été déposé dans la SNr.



**Figure 36 : Des connexions subthalamo-nigrales sont conservées sur des tranches horizontales de cerveau de rat (P18). Traçage des voies entre la SNr et le NST révélées par l'utilisation d'un marqueur fluorescent lipophile, le DiI. A) Marquage rétrograde des voies par dépôt d'un cristal de DiI dans la SNr et propagation du marqueur vers le NST. A plus fort grossissement on voit des paquets de fibres marquées (B) et des corps cellulaires au niveau du NST (C). SNr : Substance noire réticulée, STN : noyau sous-thalamique, Hip : Hippocampe.**

## *2. Mise au point de la technique d'imagerie calcique*

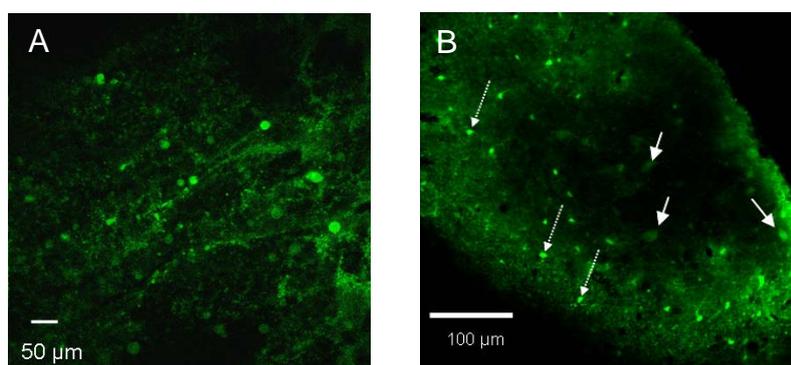
Nous avons choisi d'utiliser la technique d'imagerie calcique sur tranches pour étudier les réponses calciques des cellules de la SNr, lors de la stimulation électrique du NST. Cette technique est surtout connue pour son utilisation sur des tissus embryonnaires pour étudier par exemple l'impact du calcium sur le développement ou sur la migration cellulaire (Haydar et al., 1999; Platel et al., 2007). Chez l'adulte, elle est essentiellement utilisée sur des structures telles que le cortex ou l'hippocampe pour étudier, par exemple les interactions cellulaires lors de processus de mémorisation (Cossart et al., 2005). En revanche, aucune étude sur des structures telles que les ganglions de la base chez le rat adulte n'a été rapportée à ce jour. C'est pourquoi, pour répondre aux objectifs de ce travail doctoral, j'ai dû mettre au point cette technique d'imagerie calcique sur notre modèle de tranches de cerveau, en optimisant les conditions de viabilité des cellules sur les tranches et les procédures de chargement de ces cellules par la sonde calcique.

Les difficultés à surmonter ont été de deux ordres : 1) la faible perméabilité de la membrane plasmique des neurones matures et 2) la survie des cellules. En effet, la substance noire est connue pour être une structure très sensible au stress oxydatif (Hald and Lotharius, 2005). De plus, les neurones matures sont beaucoup plus sensibles aux changements de leur environnement cellulaire comparativement aux neurones immatures. Les conditions de coupe sont délicates et nécessitent beaucoup de minutie. De mauvaises conditions entraînent rapidement un fort taux de mort cellulaire.

L'application de la technique d'imagerie calcique sur le tissu cérébral adulte a nécessité plusieurs mois de mise au point avant de pouvoir obtenir les premiers tissus vivants avec des cellules chargées. Ce chargement certifie une bonne viabilité des cellules ainsi qu'une bonne pénétration de la sonde calcique, celle-ci devenant fluorescente après désestérification au sein des cellules. L'amélioration et l'ensemble des adaptations du protocole m'ont permis d'obtenir des tranches avec des cellules de la SNr bien chargées en indicateur calcique et avec un maximum de cellules en bon état (Fig. 37).

Les différents tests réalisés par la suite ont visé à préserver les neurones de cette structure en prévenant les processus de mort cellulaire, qu'ils soient liés ou non à des phénomènes d'excitotoxicité du glutamate, du kaïnate ou du calcium. Ceci nous a conduit à utiliser un milieu de coupe (ACSF) à 4°C, contenant une faible concentration de calcium et une forte concentration de magnésium afin de limiter ces phénomènes. De plus, une température de coupe très basse, proche de 0°C est respectée afin de stopper tous les

processus cellulaires. A une telle température, les cellules se mettent en « hibernation », elles ont une activité cellulaire ralentie, les pompes ioniques et les divers canaux sont principalement bloqués. Enfin lors du chargement de la sonde, l'ajout d'acide kynurénique dans le milieu de repos permet de diminuer au maximum les phénomènes d'apoptose et de nécrose cellulaire dues à la libération massive de glutamate et de kaïnate (Beurrier et al., 2006). Par ailleurs, l'association de deux détergents différents, en très faible quantité, le Pluronic F127 et le Cremophor EL, s'est révélée utile pour augmenter le nombre de cellules chargées sans induire d'effet délétère sur celles-ci.

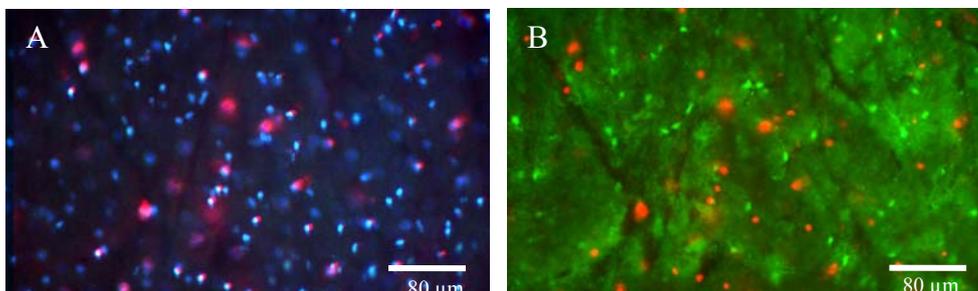


**Figure 37 :** *Exemple de cellules nigrales chargées en Fluo-4 sur tranches horizontales de cerveau de rat (P18), avant (A) et après (B) adaptation de la technique d'imagerie calcique. A) La forme arrondie des cellules traduit leur mauvais état bien que celles-ci ne soient pas totalement mortes puisque leur fluorescence indique que la sonde a été désesterifiée par les estérases cellulaires. B) Des cellules de petite taille (flèches en pointillées) et des cellules plus grosses (flèches pleines) sont bien différenciables. Les cellules sont moins arrondies que sur l'image A et des prolongements sont également visibles.*

### 3. Mesure de la viabilité des cellules

Comme décrit dans le paragraphe précédent, les cellules de la SNr sont très sensibles au stress oxydatif. Afin d'avoir une estimation de ce phénomène de mort cellulaire sur notre modèle de tranches, nous avons mesuré le taux de survie des cellules par marquage à l'iodure de propidium. Dans un premier temps, les marquages sont réalisés à différentes étapes du protocole expérimental, en absence de sonde calcique. Une heure après la coupe, le taux de cellules marquées à l'iodure de propidium est de l'ordre de  $20 \pm 5\%$  ( $n = 16$  tranches, 5 animaux) de la population totale (estimée par contre-marquage des noyaux par le colorant vital, le Hoechst 33342, Fig. 38A). Le pourcentage de cellules marquées à l'iodure de propidium ne varie pas au cours du temps (5h), permettant ainsi de confirmer que les cellules

restent bien vivantes tout au long du protocole. Ce pourcentage de mortalité cellulaire, observé dès le début de notre expérience, est donc induit principalement par la coupe tissulaire qui est, de fait, une étape assez délétère pour le tissu cérébral. Dans un second temps, les marquages sont réalisés dans les mêmes conditions que précédemment, sur des tranches chargées en Fluo-4 (Fig. 38B). Les résultats montrent un pourcentage de cellules mortes équivalent à celui observé sur des tranches non chargées (résultats non montrés;  $n = 10$  tranches). Ces observations indiquent que la pénétration de la sonde calcique dans les cellules n'affecte pas la survie des cellules dans nos conditions expérimentales, malgré la présence de DMSO, de détergents et la perturbation du milieu intracellulaire générée par la présence de la sonde.

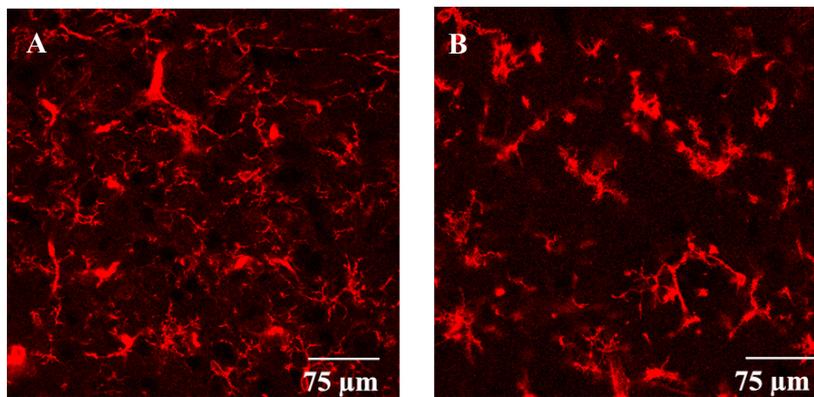


**Figure 38 : Le pourcentage de cellules mortes reste constant au cours de l'expérimentation.** Ces images montrent la viabilité cellulaire sur les tranches de cerveau, 4h après la coupe par un marquage à l'iodure de propidium. A) Superposition des marquages à l'iodure de propidium (rouge) et au Hoechst 33342 vital (bleu) permettant d'estimer le pourcentage de cellules mortes au sein de la SNr. B) Superposition des cellules chargées en Fluo-4 (vert) et des cellules ayant incorporé l'iodure de propidium (rouge). Il n'y a pas de co-localisation entre les deux marquages.

#### 4. Evaluation de l'activation des cellules microgliales

Lors d'une inflammation ou d'un dommage cellulaire, il peut exister une réaction gliale ou gliose, qui témoigne d'une activation des cellules de la microglie (cf Contexte Scientifique § II.1.3). Certaines de ces cellules peuvent se différencier en cellules phagocytaires et cytotoxiques, capables de sécréter des protéases ou des agents inflammatoires, en réaction à une attaque (Hanisch and Kettenmann, 2007). Cette réaction gliale peut induire une augmentation de l'activité calcique cellulaire par l'activation des nombreux récepteurs présents au niveau de la membrane plasmique des cellules microgliales. La coupe du cerveau est un phénomène agressif entraînant de nombreux dommages,

notamment par la section de projections entre diverses structures. Il est donc probable qu'une mise en jeu des cellules microgliales puisse avoir lieu. Notre étude portant sur l'effet de la stimulation électrique du NST sur les cellules de la SNr *via* l'analyse des réponses calciques, il était nécessaire de nous assurer que cette réaction microgliale ne se produise pas au sein de notre modèle, afin d'éviter tout biais dans l'analyse des réponses obtenues. Nous avons donc utilisé un anticorps spécifique de la microglie, Ox-42, pour contrôler la stabilité du nombre de cellules microgliales présentes dans la SNr, et le maintien de leur morphologie au cours des différentes étapes préparatoires et expérimentales : coupe, chargement, désesterification, mesure des réponses calciques. La figure 39 montre que le nombre de cellules microgliales n'augmente pas au cours du temps et que leur morphologie reste stable tout au long de l'expérience ( $n = 10$  tranches, sur 3 expériences indépendantes).



**Figure 39 : Etude de la stabilité du nombre de cellules microgliales et de leur morphologie au cours du temps par immunomarquage des cellules microgliales de la SNr.** Les tranches de cerveaux de rats sont marquées avec un anticorps monoclonal de souris, Ox-42, spécifique des cellules microgliales (anti-CD11) et révélé par un anticorps anti-IgG de souris couplé à la cyanine3. Les marquages sont effectués immédiatement après la coupe (A) ou 3 heures après (B). Les pourcentages ont été déterminés par rapport à un contre-marquage des noyaux au TO-PRO (non montré ici) et par deux expérimentateurs différents.

Ces marquages nous ont permis de nous assurer, d'une part, que le nombre de cellules microgliales n'augmente pas au cours de l'expérimentation, mais surtout que leur morphologie caractéristique, avec un petit soma et de longs prolongements, reste inchangée. Aucune cellule phagocytaire, de type amiboïde avec peu de prolongement n'est observée.

Ces observations, combinées aux mesures de viabilité, ont confirmé l'optimisation de nos conditions expérimentales : celles-ci n'induisent pas d'effets lésionnels dramatiques et nos tranches de cerveau semblent être dans un environnement physiologique peu délétère.

## II. Description des différents types cellulaires présents dans la substance noire réticulée

Selon les données de la littérature, et sur la base d'enregistrements électrophysiologiques de l'activités caractéristiques des différents types neuronaux (Richards et al., 1997; Shen and Johnson, 2006), la substance noire réticulée contient essentiellement des neurones GABAergiques et une faible proportion de neurones dopaminergiques. Toutefois, aucune description immunohistochimique exhaustive de la nature des cellules présentes au sein de cette structure n'avait été réalisée. Ainsi, afin de corrélérer les différentes populations cellulaires présentes au sein de la SNr à nos observations en imagerie calcique, nous avons commencé par identifier ces populations cellulaires en utilisant principalement des techniques d'immunohistochimie.

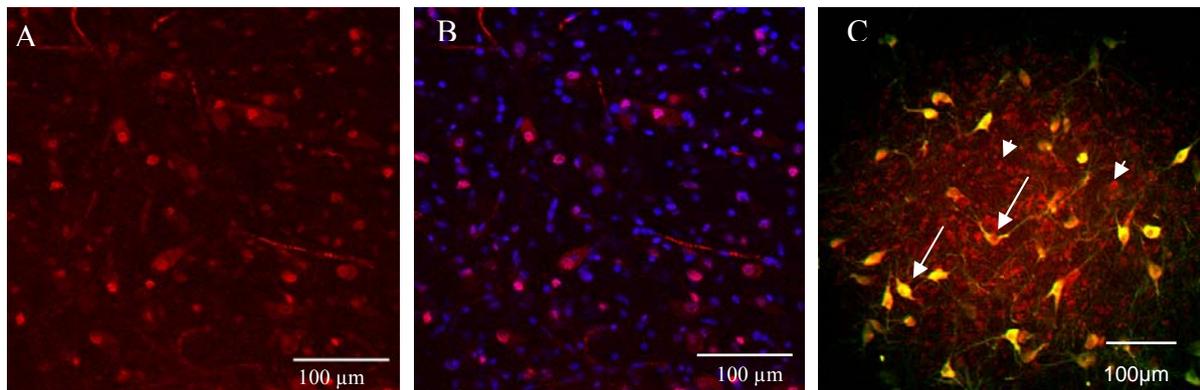
Sachant que les cellules gliales sont de plus en plus impliquées dans le fonctionnement du système nerveux central (Araque et al., 2001), nous nous sommes intéressés à déterminer leur identité et leur proportion au sein de la SNr.

### *1. Caractérisation immunohistochimique des cellules présentes au niveau de la substance noire réticulée*

#### *1.1 Les cellules neuronales*

Afin de déterminer la proportion de neurones présents au sein de la SNr, nous avons réalisé un marquage spécifique des neurones par utilisation de l'anticorps anti-NeuN. Une quantification par un contre-marquage des noyaux au Dapi a révélé la présence de  $32 \pm 11\%$  ( $n = 12$ ) de cellules marquées par NeuN au sein de la SNr (Fig. 40A, B). Pour caractériser la nature de ces neurones, dopaminergiques ou GABAergiques, des marquages avec les anticorps anti-TH et anti-GAD respectivement, ont été réalisés. L'anticorps anti-TH a permis de montrer la présence de neurones dopaminergiques (Fig. 40C), mais nous n'avons pu réaliser de quantification. Nous avons utilisé plusieurs anticorps dirigés contre l'une ou les deux formes connues de la GAD (anti-GAD 65 poly (Chemicon), anti-GAD 67 mono (Chemicon), anti-GAD65/67 poly (Sigma)), car, si la GAD 65 est exprimée plus précocement que la GAD 67 (Jenkins and Simmons, 2006), les deux formes de GAD sont présentes aux stades étudiés dans ce travail (Szabo et al., 1994). Avec les différents anticorps testés, aucun marquage des corps cellulaires n'a pu être observé, seuls les prolongements neuronaux sont marqués, ce qui ne permet pas de faire un comptage précis. Cependant, d'après des données

électrophysiologiques de la littérature, 85% (73 neurones /86) des neurones de la SNr sont des neurones GABAergiques (Shen and Johnson, 1997).



**Figure 40 : Caractérisation des cellules neuronales de la SNr.** A) Immunomarquage de l'ensemble des neurones par l'anticorps monoclonal de souris anti-NeuN (Neuronal Nuclei). B) Superposition des marquages par l'anticorps anti-NeuN et le marqueur de noyaux, le DAPI. C) Superposition du marquage des neurones dopaminergiques par un anticorps monoclonal anti-TH (Tyrosine Hydroxylase, vert) et du marquage au Syto orange révélant tous les noyaux (rouge), (flèches pleines). Les têtes de flèches indiquent des cellules marquées au Syto orangemais pas avec l'anticorps anti-TH.

### 1.2 Les cellules gliales

Comme présenté en introduction, les cellules gliales se composent de trois grands types : les astrocytes, les oligodendrocytes et la microglie (cf Contexte Scientifique § II.1). Parmi ces cellules matures co-existent également des cellules immatures telles que des progéniteurs d'oligodendrocytes comme les O2A ou encore les cellules NG2 caractérisées par l'expression d'un proteoglycane NG2. Les cellules NG2 sont difficiles à classer dans la population des cellules gliales car elles peuvent donner soit des astrocytes, soit des oligodendrocytes, et elles ne peuvent pas être, de ce fait, incluses dans l'une ou l'autre de ces populations car elles ne possèdent pas l'ensemble de leurs caractéristiques (Wigley et al., 2007).

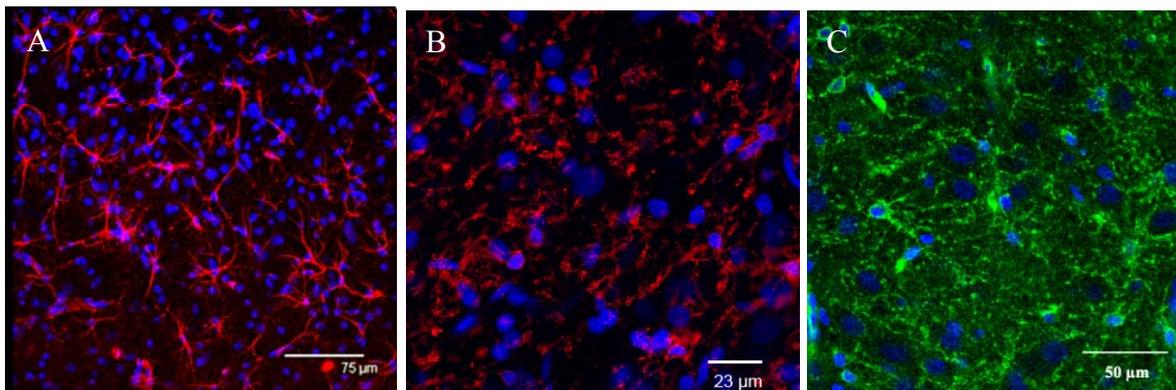
D'après nos résultats précédents, les neurones représentent environ 32% de la population totale de la SNr, ce qui signifie que les 68% des cellules restantes sont des cellules gliales. Afin de caractériser et de quantifier chaque type glial au niveau de la SNr, nous avons réalisé des marquages spécifiques de chaque population gliale (Fig. 41) combinés à un contre-marquage des noyaux au DAPI ou au TO-PRO-3.

Deux anticorps, anti-S100 $\beta$  et anti-GFAP, ont été utilisés pour marquer les astrocytes (Fig. 41A) car si tous les astrocytes possèdent la protéine S100 $\beta$ , bien que ceci soit

controversé (Wang and Bordey, 2008), tous ne sont pas marqués par l'anticorps GFAP (cf Contexte Scientifique § II.1.3). Notre but était de caractériser la population astrocytaire au sein de la SNr. Les résultats obtenus montrent que  $23 \pm 13\%$  ( $n = 11$ ) des cellules sont positives au marquage S100 $\beta$ . Un pourcentage comparable a été obtenu avec l'anticorps anti-GFAP ( $28 \pm 7,5\%$ ,  $n = 14$ ) (Fig. 41A).

Un immunomarquage avec l'anticorps Ox-42 spécifique des cellules microgliales a permis de déterminer que cette sous-population gliale représente  $7 \pm 4\%$  ( $n = 10$  tranches) de la population cellulaire totale de la SNr (Fig. 41B). De manière intéressante, ce pourcentage de cellules microgliales est comparable au pourcentage global estimé au niveau du système nerveux central (pour revue, voir Verkhratsky and Butt, 2007).

L'utilisation de l'anticorps NG2 a permis de déterminer une proportion de  $10,5 \pm 4,1\%$  ( $n = 7$  tranches) de ces cellules au sein de la SNr (Fig. 41C). Etant donné leur importance dans la genèse de certaines populations neuronales et gliales, la présence de ces cellules au sein de la SNr est un point important à prendre en compte dans la physiopathologie de cette structure.



**Figure 41 : Identification des différentes populations gliales présentes au sein de la SNr.** A) L'anticorps polyclonal de lapin anti-GFAP (en rouge) révèle la présence de  $28 \pm 7,5\%$  d'astrocytes au sein de la SNr. B) Marquage des cellules microgliales avec l'anticorps Ox-42. C) Les cellules NG2 sont marquées avec l'anticorps monoclonal anti-NG2 (en vert). Les noyaux sont marqués au DAPI ou au TO-PRO-3 (en bleu).

Le marquage avec l'anticorps CNPase spécifique des oligodendrocytes n'a pas donné de résultats exploitables, aucun marquage n'a pu être détecté : ni au niveau des corps cellulaires, ni au niveau des prolongements. D'autres anticorps ont été testés tels que le MBP, (Myelin Basic Protein) spécifique des oligodendrocytes matures, ou encore le RIP, un marqueur des oligodendrocytes précoces, matures et des gaines de myéline mais ces anticorps n'ont pas montré de marquages spécifiques. Dès lors le pourcentage d'oligodendrocytes et de leurs progéniteurs peut être déduit des chiffres obtenus précédemment pour les autres sous-

types de cellules gliales. Nous pouvons ainsi estimer approximativement que les 25% des cellules de la SNr pourraient être des oligodendrocytes ou/et des progéniteurs O2-A (Fig. 43A).

## 2. Caractérisation des populations cellulaires chargées avec la sonde calcique

Nous savons maintenant que la SNr contient environ 32% de neurones pour 68% de cellules gliales. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à identifier plus précisément les cellules ayant incorporé la sonde calcique. Lors de l'observation des tranches chargées avec la sonde, nous avons pu distinguer deux types cellulaires morphologiquement différents : des cellules de petite taille, représentant la majorité des cellules chargées (voir Fig. 37B, flèches pointillées) et des cellules de plus grande taille, présentes en très faible proportion (voir Fig. 37B, flèches pleines). Afin d'identifier ces deux populations, nous avons réalisé plusieurs types d'immunomarquages sur les tranches préalablement chargées en indicateur calcique, avec les mêmes anticorps que précédemment.

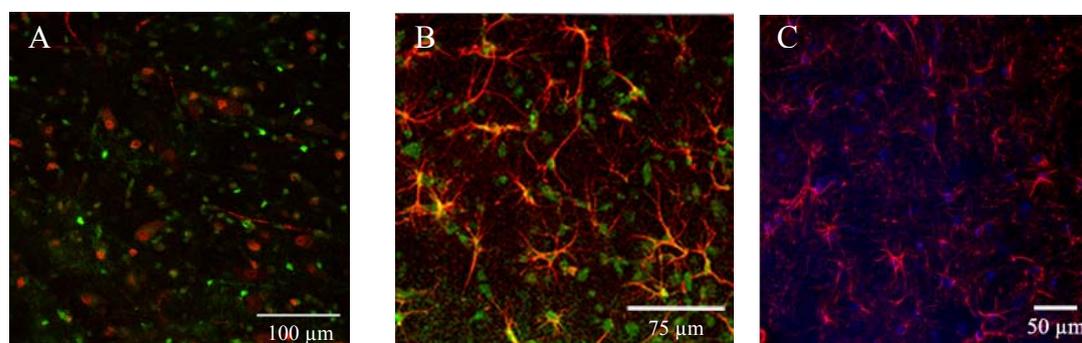
### 2.1 Les cellules neuronales chargées

Après fixation du Fluo-4 avec l'EDC, une carbodiimide qui fixe les chélateurs (Tymianski et al., 1997), nous avons marqué les neurones avec l'anticorps anti-NeuN. Ce marquage montre très peu de co-localisation avec les cellules chargées en Fluo-4 (Fig. 42A). Les quelques cellules chargées marquées avec l'anticorps anti-NeuN sont toutes de grosse taille ce qui suggère que ces cellules sont des cellules neuronales, comme ceci a déjà été décrit dans la littérature au niveau du cortex de souris (Ikegaya *et al.*, 2005). Les cellules de petite taille chargées en Fluo-4 peuvent donc être considérées comme étant des cellules gliales. Après comptage, il s'est avéré que moins de  $1 \pm 1,9\%$  ( $n = 7$  tranches) des cellules ayant incorporé la sonde calcique sont des neurones. Ces résultats mettent en avant la difficulté de pénétration de la sonde calcique à l'intérieur des neurones matures (Smetters et al., 1999; Kettunen et al., 2002).

### 2.2 Les cellules gliales chargées

Initialement, nous pensions charger plus de neurones au sein de la SNr et pour visualiser spécifiquement les événements calciques se produisant dans les cellules gliales au cours de l'acquisition, nous avons utilisé un colorant vital, le dipeptide  $\beta$ -Ala-Lys-N $\epsilon$ -AMCA (Dieck et al., 1999). Celui-ci est spécifiquement capté par les astrocytes et les progéniteurs

des oligodendrocytes (O-2A) et marque ainsi la population des cellules gliales qui est la plus importante de la SNr ( $26 \pm 11\%$  d'astrocytes et environ 25% d'oligodendrocytes et progéniteurs, Fig. 42C).

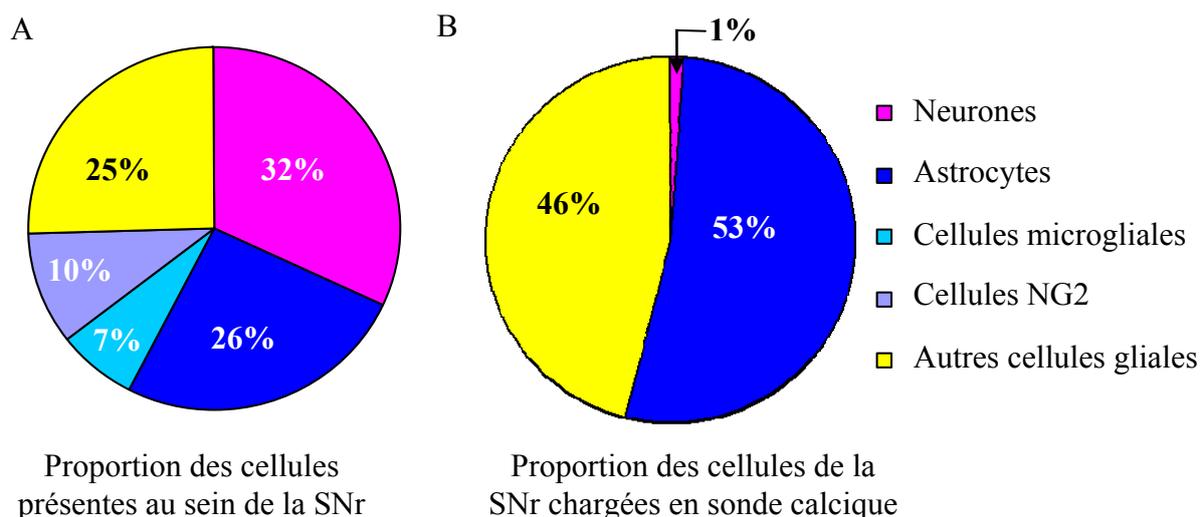


**Figure 42 : Immunomarquages des différentes populations cellulaires de la SNr, sur des tranches chargées en Fluo-4.** A) Superposition du marquage par l'anticorps monoclonal de souris anti-NeuN (rouge) et les cellules chargées par la sonde calcique (vert). B) Superposition du marquage avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-GFAP (rouge) et les cellules chargées par la sonde calcique (vert). C) Vérification de la spécificité de capture du dipeptide par certaines populations de cellules gliales de la SNr, par superposition des marquages des astrocytes avec l'anticorps anti-GFAP (rouge) et le marquage au dipeptide (bleu).

L'utilisation concomitante de ce dipeptide avec le Fluo-4 montre que  $68 \pm 12\%$  des cellules de la SNr ayant incorporé la sonde sont marquées par le dipeptide ( $n = 8$  tranches). Des co-marquages avec les anticorps anti-GFAP ou S100 $\beta$  ont permis de déterminer que la majorité des cellules gliales chargées sont des astrocytes ( $53 \pm 6\%$  des cellules chargées;  $n = 22$ ) (Fig. 43B). Nous avons pu déduire de ces différents comptages que 78% ( $53\%$  de cellules Fluo-4-GFAP/ $68\%$  de cellules Fluo-4-dipeptide\*100) des cellules ayant incorporé le dipeptide  $\beta$ -Ala-Lys-Ne sont des astrocytes. Dans les faits, nous n'avons pas eu besoin d'utiliser ce dipeptide pour distinguer les cellules gliales des cellules neuronales lors de nos acquisitions en imagerie calcique puisque seul 1% des cellules chargées représente des neurones et que ceux-ci sont facilement repérables par leur taille.

Pour compléter ces données et caractériser plus précisément les cellules chargées, nous avons également réalisé des immunomarquages avec les anticorps spécifiques des oligodendrocytes et des cellules microgliales. Les expériences réalisées avec les anticorps CNPase et Ox-42 ne nous ont pas permis de déterminer le pourcentage d'oligodendrocytes et de cellules microgliales ayant incorporé le Fluo-4. Il semble en effet que l'utilisation de l'EDC ne soit pas compatible avec l'immunomarquage Ox-42. De même, l'utilisation de

l'anticorps anti-CNPase sur tissu fixé, chargé ou non, n'a pas permis d'observer de marquage spécifique. En conclusion, les astrocytes représentent 53% des cellules chargées, les neurones 1% et les 46% restant sont un mélange d'oligodendrocytes, de cellules microgliales et de cellules NG2 dans des proportions inconnues. Dans la suite de ce travail nous parlerons de cellules gliales de manière globale et considérerons que les réponses calciques sont observées uniquement dans les cellules gliales (Fig. 43B).



**Figure 43 :** Représentation en diagramme des proportions de populations cellulaires présentes dans la substance noire réticulée. Le diagramme A représente le pourcentage global de chaque type cellulaire mis en évidence par immunomarquage au sein de la SNr. Le diagramme B représente les pourcentages de cellules ayant incorporé la sonde calcique. Les neurones sont identifiés par l'anticorps anti-NeuN, les astrocytes par les anticorps anti-GFAP et anti-S100 $\beta$ , les cellules microgliales par l'anticorps Ox-42 et les cellules NG2 par l'anticorps anti-NG2.

L'ensemble de ces résultats fait le jour sur l'importance quantitative des cellules gliales au sein de la SNr, puisqu'elles représentent 68% de la population cellulaire totale de la SNr. Ceci permet de supposer que ces cellules peuvent participer à la modulation de l'activité neuronale de la SNr, à l'instar de ce qui a été décrit dans d'autres structures. Ainsi, notre travail s'est focalisé sur l'étude de la participation des cellules gliales dans les effets cellulaires de la stimulation électrique du NST au sein de la SNr.

### III. Mesure des activités calciques des cellules de la substance noire réticulée

Les activités neuronales et gliales se manifestent le plus souvent par des variations de concentrations de calcium intracellulaire. Ces réponses calciques peuvent être considérées comme un indice d'activation cellulaire lors de l'application d'un stimulus sur un réseau neuronal ou sur un ensemble de cellules.

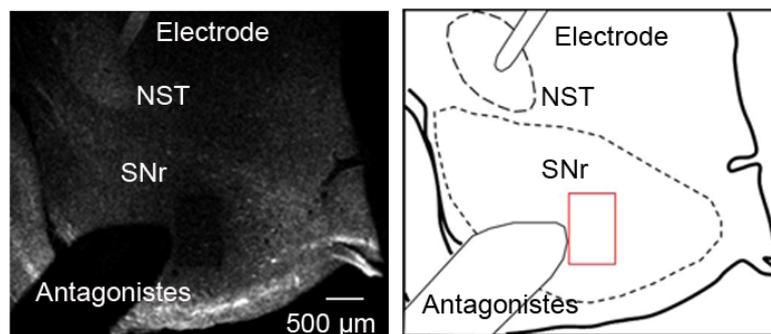
Nous nous sommes intéressés à l'effet de la stimulation électrique du NST sur l'activité calcique des cellules de la SNr. Il est important de préciser ici qu'aucune activité calcique spontanée n'a été observée dans les cellules chargées de la SNr, bien que les cellules neuronales nigrales soient douées d'une activité électrique autonome (Smetters et al., 1999; Atherton and Bevan, 2005) de type pace-maker enregistrée par patch-clamp dans les mêmes conditions expérimentales (cf Résultats § V.2.1). Nous n'avons jamais observé d'équivalent de cette activité électrique autonome en imagerie calcique, que ce soit dans les quelques neurones chargés ni même dans les cellules gliales.

#### *1. La stimulation du noyau sous-thalamique entraîne une activité calcique dans les cellules de la substance noire réticulée*

Les résultats obtenus au laboratoire à l'aide des techniques de microdialyse intracérébrale ont montré que du glutamate et du GABA sont libérés au niveau de la SNr lors de la stimulation du NST (Windels et al., 2000, 2003, 2005; Boulet et al., 2006). Nous avons montré que les connexions subthalamo-nigrales glutamatergiques étaient conservées sur nos tranches de cerveau (cf Résultats § I.1). Nous sommes donc partis de l'hypothèse que la stimulation pouvait induire, *via* une libération de glutamate, une augmentation de calcium, médiée par l'activation des récepteurs métabotropiques et ionotropiques présents sur les cellules neuronales et les cellules gliales. Du GABA peut également être libéré au sein de la SNr par les collatérales des neurones GABAergiques de cette structure. Ce GABA pourrait induire des réponses calciques uniquement dans les cellules gliales.

Dans ces expériences, l'électrode de stimulation est placée dans le NST localisé rostralement à 2 mm du centre de la SNr. La stimulation est réalisée en appliquant un train de 5 stimulations toutes les 10 secondes environ, à une fréquence de 100 Hz, avec une largeur d'impulsion de 100  $\mu$ s et une amplitude variant entre 100 et 150  $\mu$ A. L'intensité a été choisie en fonction des paramètres de la littérature et afin d'obtenir le maximum d'effet en restant

dans une gamme physiologique. Les activités calciques sont enregistrées au niveau de la SNr (Fig. 44).

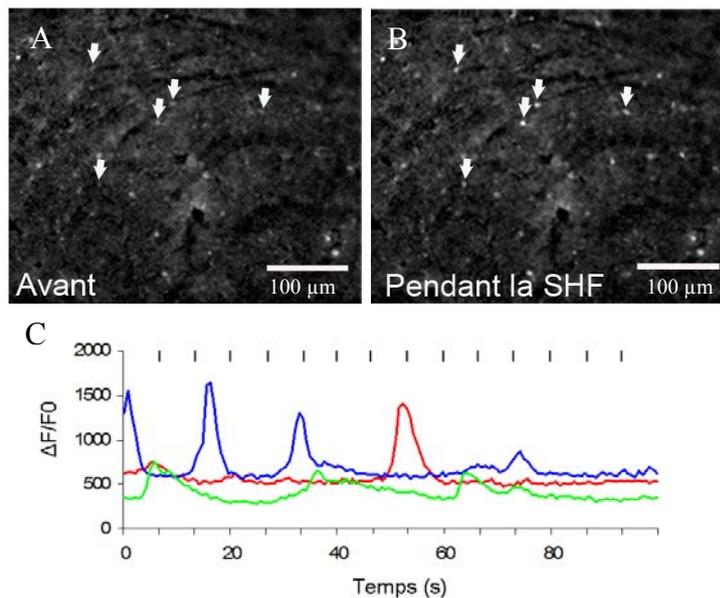


**Figure 44:** *Descriptif de la localisation de l'électrode de stimulation et de la pipette de perfusion des antagonistes lors du protocole d'enregistrement des réponses calciques dans la SNr. Le panel de gauche est une image de chargement d'une tranche en Fluo-4, observée en objectif x4. Ce grossissement permet de visualiser l'électrode de stimulation placée dans le NST et la zone d'enregistrement dans la SNr. Le panel de droite est une représentation schématique de l'image de droite afin de mieux déterminer le contour des structures.*

Dans ces conditions, la stimulation électrique du NST, entraîne des réponses calciques (se traduisant par des augmentations de fluorescence) dans certaines cellules de la SNr (Fig. 45A, B). Ainsi, nous avons montré que sur l'ensemble des cellules de la SNr ayant incorporé la sonde calcique, la stimulation électrique du NST induit une réponse dans  $12,5 \pm 5,2\%$  de cellules chargées ( $n = 49$  tranches, Fig. 46). Seules les cellules de petite taille répondent à cette stimulation, c'est-à-dire les cellules gliales.

Certaines cellules peuvent répondre plusieurs fois lors d'un enregistrement mais chaque train de stimulation n'engendre pas systématiquement une réponse dans la population de cellules répondantes (Fig. 45C). L'absence de réponse à chaque stimulation peut être due, en partie, à la fréquence d'échantillonnage (une image toutes les 800 ms) qui ne permet pas d'enregistrer toutes les réponses de manière exhaustive, mais également à une désensibilisation des fibres stimulées entraînant une diminution de libération de glutamate ou encore à une inactivation des récepteurs cibles.

Lorsque l'électrode de stimulation est placée à la même distance de la SNr, mais en dehors du NST (dans la capsule interne ou en position plus médiane), aucune activité n'est enregistrée dans les cellules de la SNr, ce qui montre que les réponses calciques observées sont bien médiées par les connexions subthalamo-nigrales dont l'intégrité fonctionnelle est conservée sur nos tranches.



**Figure 45 : Réponses calciques enregistrées dans la SNr, sous stimulation du NST. Exemple de cellules chargées en sonde calcique (A) et répondant à la stimulation du NST par une augmentation de fluorescence (B) : les flèches indiquent quelques-unes des cellules répondant. C) Mesures des variations de fluorescence en fonction du temps (en secondes) dans 3 cellules représentatives répondant à la stimulation. Les traits au dessus des courbes correspondent à chaque train de 5 pulses.**

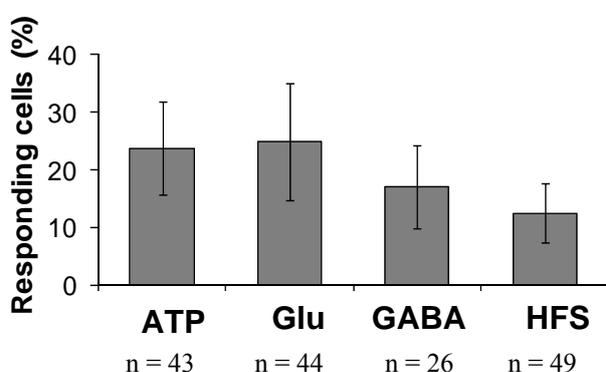
Afin de déterminer les acteurs moléculaires et cellulaires à l'origine des réponses calciques observées, nous avons décidé de déterminer l'éventuelle corrélation entre les réponses calciques observées sous stimulation électrique du NST avec celles induites directement par l'application de neurotransmetteurs comme le glutamate, le GABA ou encore l'ATP qui peuvent être libérés par exocytose au niveau des terminaisons.

## *2. Mise en évidence de l'implication de certains récepteurs et canaux exprimés par les cellules gliales de la substance noire réticulée*

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les cellules gliales possèdent à leur surface un panel important de récepteurs identiques, pour la plupart, à ceux portés par les neurones (cf Contexte Scientifique § II.2.2). Nous avons choisi d'identifier des récepteurs exprimés par les cellules gliales de la SNr, en utilisant plusieurs transmetteurs connus pour induire une entrée de calcium intracellulaire au niveau des cellules gliales et potentiellement présents au sein de la SNr. Les trois agents choisis sont le glutamate et le GABA, qui sont libérés dans la SNr lors de stimulation électrique du NST (Windels et al., 2000; Windels et al., 2005), et l'ATP, qui est le messenger principal et ubiquitaire des cellules gliales (Cotrina et al., 2000). Rappelons ici que le glutamate peut induire une entrée de calcium par l'activation des récepteurs NMDA ou AMPA/kaïnate et une libération de calcium interne par l'activation des récepteurs métabotropiques. L'ATP peut agir sur les récepteurs purinergiques métabotropiques P2Y entraînant une libération de calcium des stocks internes et sur les

récepteurs ionotropiques P2X perméables au calcium. Le GABA, quant à lui, peut induire spécifiquement une dépolarisation des cellules gliales par activation des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Kettenmann and Schachner, 1985; Meier et al., 2008) conduisant à une entrée de calcium secondaire. Ces trois agonistes sont appliqués sur les tranches et les réponses calciques sont enregistrées au niveau de la SNr.

L'application de 100  $\mu$ M de glutamate induit une réponse calcique dans  $24,9 \pm 10,1\%$  ( $n = 44$  tranches) des cellules gliales de la SNr. L'application de 100 nM d'ATP, dans les mêmes conditions, entraîne une réponse calcique dans  $23,7 \pm 8,0\%$  ( $n = 43$  tranches) et enfin l'application de 20  $\mu$ M de GABA induit une réponse dans  $17,1 \pm 7,2\%$  ( $n = 26$  tranches) des cellules gliales chargées de la SNr (Fig. 46).



**Figure 46 : Pourcentages de cellules de la SNr répondant à l'application d'agonistes au sein de la SNr ou à la stimulation du NST.** Histogramme montrant le pourcentage de cellules gliales chargées de la SNr répondant respectivement à l'application de 100 nM d'ATP, 100  $\mu$ M de glutamate, 20  $\mu$ M de GABA ou à la stimulation électrique du NST.

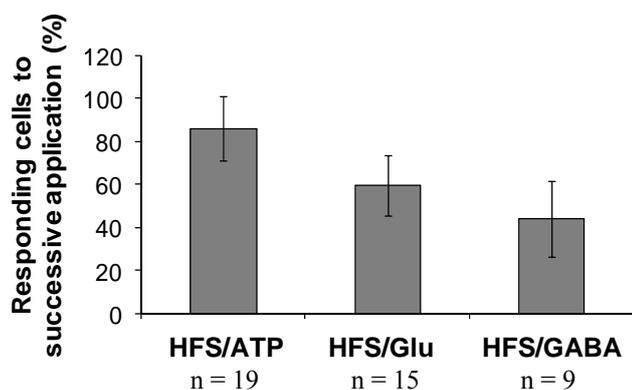
Lors de l'application successive de glutamate puis d'ATP sur une même tranche, le pourcentage de cellules répondant aux deux agonistes est de  $13,7 \pm 5,6\%$  ( $n = 40$  tranches), ce qui représente environ deux fois moins de cellules répondantes que l'effet individuel de chacun des agonistes utilisés. De la même façon,  $9,0 \pm 4,8\%$  ( $n = 9$  tranches) des cellules répondent à l'application successive de glutamate et de GABA.

Ces résultats révèlent donc une sensibilité hétérogène des cellules gliales de la SNr aux transmetteurs. Il est connu que la répartition des récepteurs à la surface des cellules, au niveau des synapses, peut dépendre de la nature des neurotransmetteurs libérés. Par exemple, une cellule gliale proche d'une synapse glutamatergique en provenance du NST, pourra répondre préférentiellement au glutamate car elle exprime essentiellement des récepteurs glutamatergiques. Une cellule gliale située au niveau des collatérales GABAergiques des neurones de la SNr, sera peut-être plus sensible au GABA. Le fait que toutes les cellules gliales ne répondent pas de la même façon pourrait s'expliquer par leur emplacement par

rapport aux types de synapses, mais également par leur localisation plus ou moins proche des synapses et à la répartition, en nombre, de récepteurs spécifiques de chaque agoniste à leur surface.

### 3. Implication des acteurs de signalisation calcique présents sur les cellules gliales dans la réponse à la stimulation électrique du noyau sous-thalamique.

Les cellules gliales de la SNr étant activées à la fois par la stimulation électrique du NST et l'application d'agonistes, nous avons cherché à déterminer une éventuelle corrélation entre ces différentes réponses, dans le but de mieux caractériser et identifier les cellules répondant à la stimulation d'un point de vue pharmacologique. Pour cela, nous avons appliqué successivement le protocole de stimulation électrique et l'ajout de chacun des agonistes sur la même tranche. Le logiciel CalSignal nous permettant de faire une superposition très précise des ROIs entre chaque film, nous avons pu déterminer exactement qu'elles étaient les cellules qui répondaient à plusieurs stimuli (un maximum de 2 applications successives est réalisé sur les tranches pour s'assurer de la spécificité des effets observés). Parmi les cellules répondant à la stimulation électrique du NST,  $86,4 \pm 15,0\%$  ( $n = 19$  tranches) réagissent également à l'application d'ATP,  $60,1 \pm 14,0\%$  ( $n = 15$  tranches) répondent au glutamate et  $44,3 \pm 17,5\%$  répondent à une application de GABA ( $n = 11$  tranches) (Fig. 47).



**Figure 47** : Caractérisation pharmacologique des cellules activées par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique. Pourcentage de cellules répondant simultanément à la stimulation électrique du NST et à l'application d'ATP (100 nM), de glutamate (100  $\mu$ M) ou de GABA (20  $\mu$ M), sur la même tranche.

Ces résultats montrent une certaine corrélation entre les réponses obtenues avec la stimulation électrique et l'application des agonistes. Si les cellules activées par la stimulation électrique semblent être particulièrement sensibles à l'application d'ATP, cette corrélation n'est pas exclusive.

#### IV. Implication de l'ATP, du glutamate et du GABA dans la réponse calcique induite par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique

Le glutamate et le GABA pourraient être impliqués dans les réponses calciques observées au niveau des cellules gliales, en tant que neurotransmetteurs libérés lors de la stimulation électrique du NST. De plus, les cellules activées par la stimulation du NST semblent exprimer à leur surface des récepteurs sensibles au glutamate, à l'ATP et au GABA puisqu'elles répondent à l'application des agonistes de ces différents récepteurs. Nous avons donc essayé de déterminer, par application d'antagonistes spécifiques, dans quelle mesure ces différents récepteurs sont impliqués dans la réponse calcique induite par la stimulation électrique du NST.

##### 1. Vérification de la spécificité des antagonistes

Avant utilisation, la spécificité de chacun des antagonistes a été vérifiée. Nous avons opté pour l'utilisation de la suramine, un inhibiteur des récepteurs purinergiques P2Y et dans une moindre mesure P2X, un cocktail d'inhibiteurs des récepteurs glutamatergiques contenant du CNQX pour bloquer les récepteurs AMPA, du D-AP5 pour les récepteurs NMDA et du LAP-3 pour les récepteurs métabotropiques, et enfin la bicuculline méthiodide (BMI), comme inhibiteur des récepteurs GABA<sub>A</sub>.

L'application de chacun de ces antagonistes a bien montré un effet inhibiteur spécifique entraînant une diminution du nombre de cellules répondant à l'application de chaque agoniste:

- l'application de suramine (100  $\mu$ M) entraîne une diminution de  $85,9 \pm 12,4\%$  ( $n = 5$  tranches) des réponses calciques observées lors de l'application d'ATP

- l'application du cocktail d'inhibiteurs des récepteurs glutamatergiques (CNQX : 10  $\mu$ M, D-AP5 : 50  $\mu$ M, LAP-3 : 100  $\mu$ M) inhibe  $83,0 \pm 7,7\%$  ( $n = 4$  tranches) des réponses au glutamate.

- l'application de bicuculline méthiodide (20  $\mu$ M) entraîne une diminution de  $61,0 \pm 4,3\%$  ( $n = 15$  tranches) des effets de l'application du GABA sur les réponses calciques des cellules gliales.

Ces résultats permettent de s'assurer de la spécificité de chaque antagoniste et nous confortent pour leur utilisation dans la suite de notre étude. Cependant, les résultats mettent

aussi en avant l'absence d'inhibition totale. Il faudra prendre en compte ce paramètre dans l'interprétation de leurs effets lors de l'application de la stimulation électrique du NST.

## 2. Effet de l'inhibition des récepteurs purinergiques, glutamatergiques et GABAergiques sur les réponses calciques induites par la stimulation électrique du noyau sous-thalamique

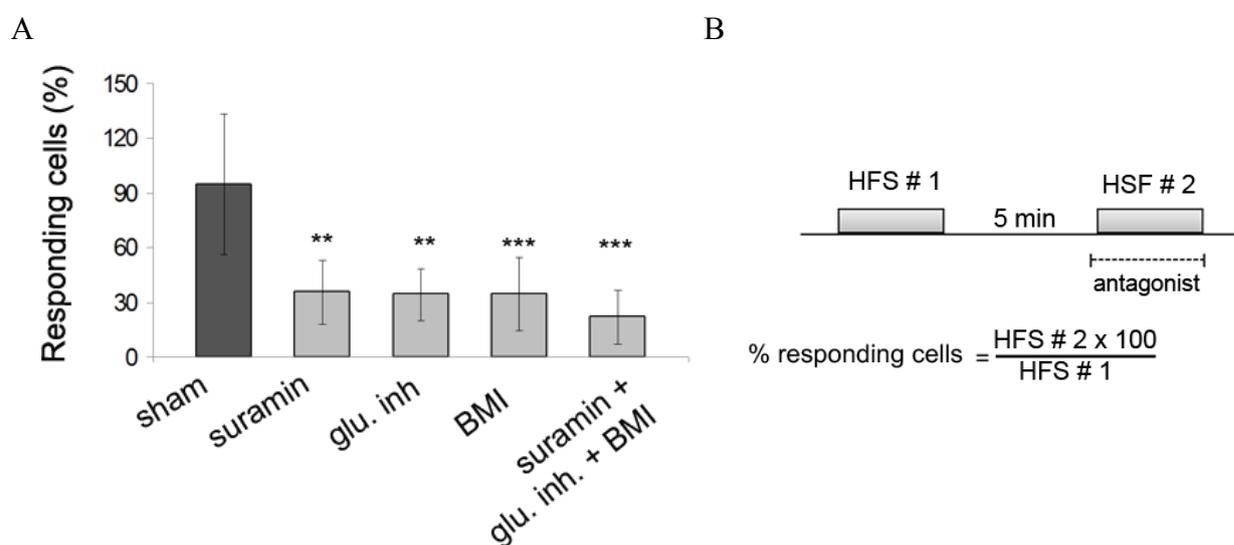
Nous avons ensuite déterminé la contribution possible des différents neuro- et gliotransmetteurs libérés au sein de la SNr, dans les réponses calciques observées lors de la stimulation électrique du NST *via* une approche pharmacologique. Pour cela, les tranches sont stimulées une première fois en absence de tout antagoniste puis une deuxième fois en présence d'antagoniste. Les différents antagonistes sont appliqués 1 minute avant et pendant toute la durée de cette stimulation. Dans certains enregistrements, nous avons remarqué que le nombre de cellules répondant à la stimulation électrique du NST diminue après des stimulations successives (perte de  $5,2 \pm 27,5\%$  de cellules répondantes lors de la deuxième stimulation;  $n = 9$ ), nous avons donc une grande variabilité des réponses, entre chaque expérience, que nous devons prendre en compte pour obtenir et interpréter l'effet réel de nos inhibiteurs. Pour pallier à ce phénomène, le nombre de cellules activées en présence des différents inhibiteurs est rapporté au nombre de cellules activées lors de la première période de stimulation. Ce rapport est ensuite comparé à celui réalisé sur des tranches contrôles (sham), en absence d'inhibiteur (Fig. 48B).

La signalisation calcique dans les cellules gliales est principalement médiée par l'ATP et implique principalement les récepteurs purinergiques de type P2Y (Cotrina et al., 2000). L'application locale au sein de la SNr de 100  $\mu$ M de suramine entraîne une diminution significative de 59,1% de cellules répondant à la stimulation électrique du NST ( $35,7 \pm 17,8\%$  de cellules répondant *versus*  $94,8 \pm 27,5\%$ ,  $p < 0,01$ ;  $n = 12$ ). Ce résultat montre que la stimulation du NST induit une libération d'ATP dans la SNr et que cet ATP active certaines cellules gliales de cette structure (Fig. 48A).

L'application locale du cocktail d'inhibiteurs glutamatergiques (10  $\mu$ M CNQX, 100  $\mu$ M LAP-3, 50  $\mu$ M D-AP5) lors de la stimulation électrique du NST, conduit à une diminution significative de 60,6% du nombre de cellules répondant à la SHF ( $34,2 \pm 14,0\%$  de cellules répondant *versus*  $94,8 \pm 27,5\%$ ;  $p < 0,01$ ;  $n = 11$ ). Ceci confirme, sur le modèle de tranche, une libération de glutamate au sein de la SNr lors de la stimulation électrique du NST et son implication potentielle dans la réponse calcique gliale observée sous stimulation électrique (Fig. 48A).

L'application de 20  $\mu$ M de bicuculline provoque une diminution significative de 64,9 % ( $29,9 \pm 16,5\%$  de cellules répondant *versus*  $94,8 \pm 27,5\%$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 25$ ) de la réponse observée en condition contrôle, confirmant là encore qu'une libération du GABA au sein de la SNr est impliquée dans les réponses calciques des cellules gliales (Fig. 48A).

L'application combinée des trois inhibiteurs induit une diminution significative de 72,9% ( $21,9 \pm 14,7\%$  de cellules répondant *versus*  $94,8 \pm 27,5\%$  %;  $p < 0,001$ ;  $n = 12$ ). Cependant cet effet inhibiteur n'est pas significativement plus important que l'application individuelle de chaque antagoniste.



**Figure 48: Implication de l'ATP, du glutamate et du GABA dans les effets de la stimulation électrique du NST sur l'activité calcique gliale.** A) Pourcentage de cellules répondant à la stimulation du NST en présence de 100  $\mu$ M de suramine, d'un cocktail d'inhibiteurs des récepteurs glutamatergiques (glu. inh.) et/ou de 20  $\mu$ M de bicuculline (BMI). B) Procédure utilisée pour comparer les réponses obtenues pendant deux stimulations successives sur la même tranche, avec ou sans application d'antagonistes. Les tests statistiques effectués sont des tests de Mann-Whitney avec \*\* pour  $p < 0,01$ , \*\*\* pour  $p < 0,001$ .

L'ensemble de ces résultats suggère que ces trois neuro et gliotransmetteurs : l'ATP, le glutamate et le GABA, sont impliqués dans les réponses calciques observées au sein des cellules gliales de la SNr lors de la stimulation électrique du NST. Leurs effets se superposent partiellement, et sont clairement interdépendants.

## V. Etude de l'impact de l'activité des cellules gliales sur l'activité des neurones

L'ensemble des résultats obtenus ci-dessus met en évidence l'activation des cellules gliales de la SNr en réponse à la stimulation électrique du NST. L'ATP, le glutamate et le GABA sont libérés sous l'effet de cette stimulation et activent de manière directe ou indirecte, les cellules gliales. Ces transmetteurs peuvent avoir une origine neuronale mais également gliale. Afin de discriminer l'origine gliale et/ou neuronale de la libération de ces différents neuro ou gliotransmetteurs et leur implication dans les effets de la SHF du NST, nous avons utilisé des techniques complémentaires de l'imagerie calcique. Cette dernière ne nous permettant pas d'étudier l'activité des neurones, nous avons choisi deux approches 1) la mesure de la libération de glutamate sur les tranches de cerveau par une détection ampérométrique et 2) l'enregistrement de l'activité électrique des neurones par une technique d'électrophysiologie. Les résultats obtenus sont pour l'instant préliminaires mais ils montrent la faisabilité et la mise en œuvre possible de ces approches pour la suite de notre projet.

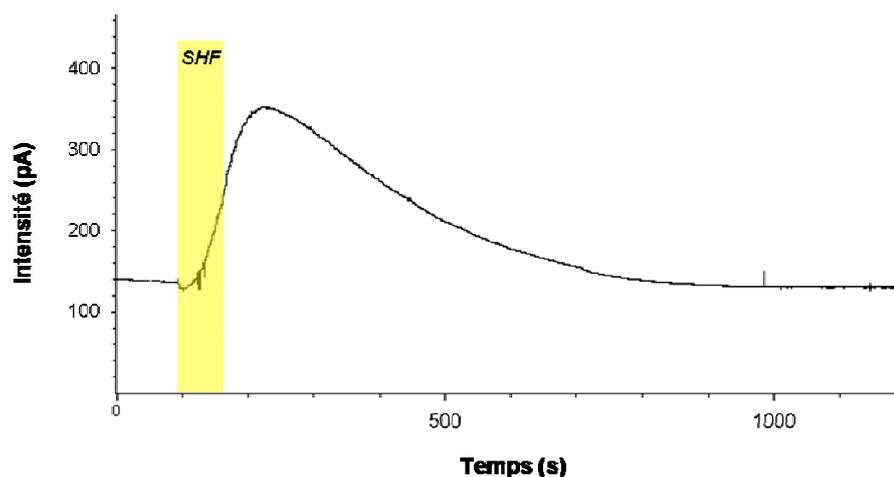
### *1. Etude de la libération de glutamate dans la substance noire réticulée lors de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique.*

Les enregistrements obtenus en imagerie calcique confirment l'implication du glutamate dans la réponse à la stimulation électrique, mais mettent également en évidence son implication dans l'activation des cellules gliales de la SNr. Dans le but de différencier l'impact du glutamate glial et neuronal, nous avons mesuré sa libération à l'aide de biocapteurs à détection ampérométrique (collaboration avec Stéphane Marinesco, Inserm U628, Lyon). La sonde d'enregistrement est placée au sein de la SNr et la libération de glutamate est détectée en temps réel (résolution temporelle de l'ordre de la seconde).

Les expériences préliminaires ont permis de mesurer une augmentation de glutamate dans la SNr pendant la stimulation électrique du NST et après l'arrêt de celle-ci. Le protocole de stimulation utilisé dans ces expériences a consisté en une stimulation continue de 200 à 400  $\mu\text{A}$ , 100 Hz, 100  $\mu\text{s}$  pendant 50 secondes. Les expériences préliminaires ont été réalisés en utilisant les mêmes paramètres que ceux utilisés en imagerie calcique (c'est-à-dire 100 à 150  $\mu\text{A}$ , 100 Hz, 100  $\mu\text{s}$ ), et nous ont permis d'enregistrer une légère augmentation de glutamate uniquement en présence de TBOA, un inhibiteur à large spectre des transporteurs au glutamate (Shimamoto et al., 1998). En absence de TBOA et avec une intensité de stimulation entre 200 et 400  $\mu\text{A}$ , une libération de glutamate est enregistrée durant la stimulation, avec une concentration qui augmente au fur et à mesure de l'augmentation de l'intensité de

stimulation (Fig. 49). L'augmentation de l'intensité de stimulation peut entraîner un recrutement plus important des fibres subthalamo-nigrales, expliquant une libération plus abondante de glutamate durant cette période, d'environ 20  $\mu\text{M}$  au maximum du pic. Cependant, ceci n'exclut pas une libération gliale de glutamate pendant la stimulation électrique du NST.

Après l'arrêt de la stimulation, la libération perdure jusqu'à revenir à un taux de base au bout de 10 à 15 minutes. L'effet observé est donc transitoire et spécifiquement dû à la stimulation. Cette persistance de la libération de glutamate après l'arrêt de la stimulation électrique laisse supposer que cette libération est en partie gliale. En effet, lors de l'arrêt de la stimulation, la libération vésiculaire de glutamate par les projections subthalamo-nigrales est stoppée, seule une libération secondaire peut encore être mise en jeu. Ainsi, les cellules gliales peuvent avoir un rôle de modulation du signal glutamatergique en maintenant la libération de ce transmetteur dans le milieu après l'arrêt de la stimulation électrique.

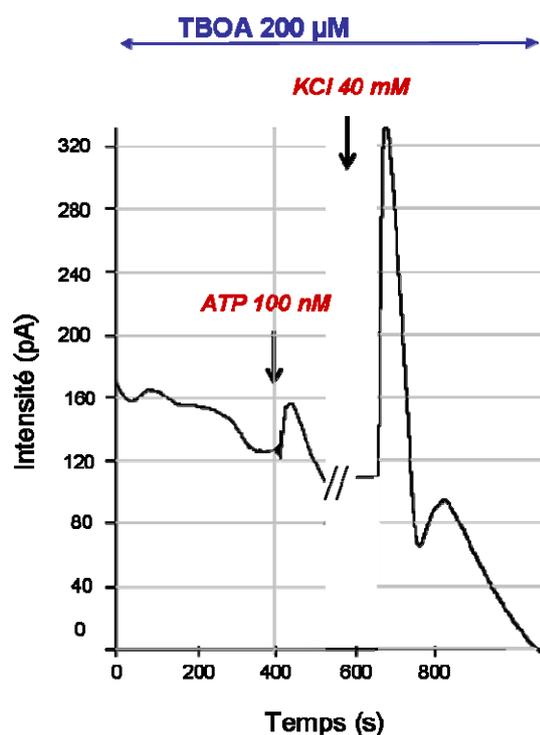


**Figure 49 :** *Mesure ampérométrique de la libération de glutamate dans la SNr, sous stimulation électrique du NST. La zone jaune correspond à la période durant laquelle le NST est stimulé à une intensité croissante de 200  $\mu\text{A}$  à 400  $\mu\text{A}$ . La calibration préalable de l'électrode permet de quantifier la quantité de glutamate libéré (dans ce tracé, une augmentation de courant de 200 pA équivaut à 10  $\mu\text{M}$  de glutamate libéré).*

Afin de déterminer l'implication des neurones et des cellules gliales dans la libération de glutamate mesurée, nous avons choisi d'appliquer du KCl et de l'ATP. Le KCl va agir sur les neurones en entraînant une dépolarisation, tandis que l'ATP va agir sur les récepteurs purinergiques essentiellement exprimés par les cellules gliales. Les résultats montrent que l'application d'ATP ou de KCl induit une libération de glutamate au sein de la SNr, en présence de TBOA (Fig. 50). L'ATP induit une légère augmentation de glutamate au sein de

la SNr. On peut supposer que cette libération est principalement gliale car, comme nous l'avons vu, les récepteurs purinergiques sont particulièrement abondants au niveau des cellules gliales. L'application de KCl 40 mM dans le bain induit une libération importante et rapide de glutamate. Compte tenu de la durée de cette libération, celle-ci doit être principalement neuronale, probablement par dépolarisation des neurones glutamatergiques du NST.

Bien que préliminaire, cette étude met en avant la possibilité de distinguer différents mécanismes de libération de glutamate au niveau des cellules de la SNr.



**Figure 50 :** *Mesure ampérométrique de la libération de glutamate dans la SNr, lors de l'application d'ATP et de KCl en présence de TBOA. La calibration de l'électrode permet de quantifier la quantité de glutamate libéré (dans ce tracé, une augmentation de courant de 20 pA équivaut à 10 µM de glutamate libéré). L'application d'ATP (100 nM) induit une libération de glutamate correspondant à 15 µM au pic. L'application de KCl (40 mM) induit une augmentation de 300 µM de glutamate (changement de gain, /2). Le TBOA inhibe les transporteurs glutamatergiques empêchant la recapture du glutamate.*

## 2. Enregistrement de l'activité électrique des neurones GABAergiques de la substance noire réticulée.

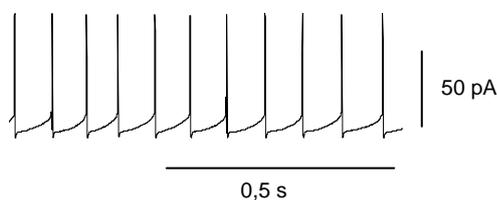
La technique d'imagerie calcique sur tranches de cerveau de rat adulte ne permet pas l'étude de l'activité neuronale au sein de la SNr dans nos conditions expérimentales. La sonde calcique pénètre très peu dans les neurones, et dans les quelques cellules neuronales chargées aucune activité calcique n'a été enregistrée. Afin de pallier à cela, et dans l'objectif d'étudier la communication entre les cellules gliales et les cellules neuronales au sein de la SNr lors de la stimulation électrique du NST, nous avons choisi d'enregistrer l'activité électrique des neurones par la technique du patch-clamp. L'application de cette technique est déjà bien connue sur le modèle de tranches (Richards et al., 1997; Shen and Johnson, 2006). Nous nous

sommes basés sur les expériences effectuées par Shen et Johnson (2006) qui ont développé cette technique sur un modèle de tranches identique au nôtre. Comme décrit dans la partie « matériel et méthodes » (cf § VI, 3.3.2), les tranches sont placées dans la chambre de perfusion en milieu ACSF carboxygéné, contenant 50  $\mu\text{M}$  de picrotoxine afin d'inhiber toute activité GABAergique.

### 2.1 Caractéristiques électrophysiologiques des populations neuronales

La SNr est considérée comme une structure GABAergique mais possède également une faible densité de neurones dopaminergiques (cf Résultats § II.1).

Avant d'appliquer le protocole de stimulation électrique sur les neurones enregistrés, nous avons étudié leurs caractéristiques électrophysiologiques sachant que chacun des deux types neuronaux possède « une signature électrophysiologique » propre (Richards et al., 1997) (Fig. 51). En effet, les neurones GABAergiques ont une activité spontanée rapide (0 à 19,7 Hz), pas ou peu de courant  $I_h$  (cf Contexte Scientifique § I.1.1.4), tandis que les neurones dopaminergiques ont une activité spontanée beaucoup plus lente (0-12,4 Hz) et un fort courant  $I_h$  (Richards et al., 1997).



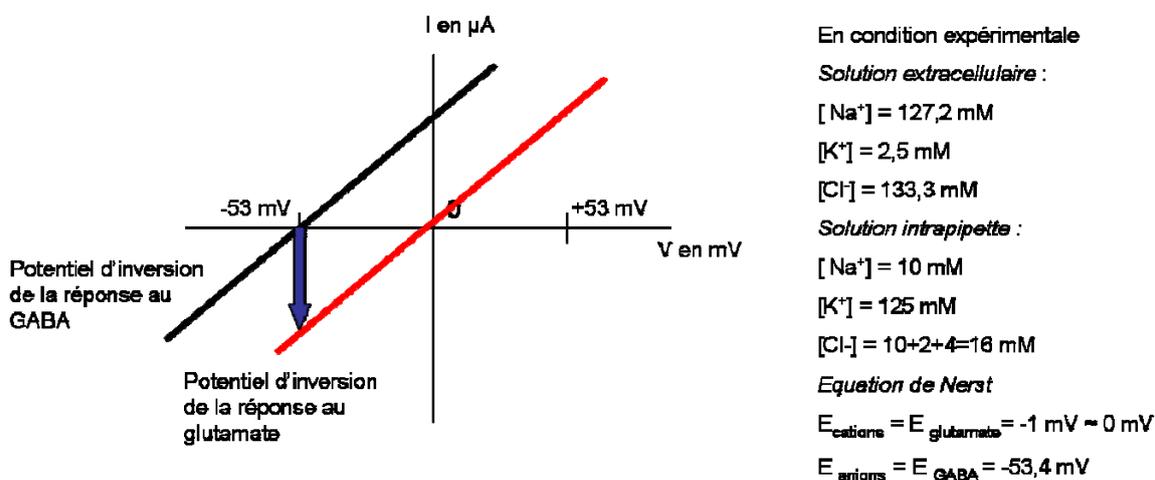
**Figure 51 : Signature électrophysiologique d'un neurone GABAergique de la SNr.** Enregistrement de l'activité spontanée d'un neurone GABAergique de la SNr. Le signal est enregistré en « current-clamp » avec  $I = 0$ . On note une activité régulière d'environ 14 Hz.

Pour cela, l'activité cellulaire spontanée est enregistrée en cellule entière en courant imposé « current-clamp » mais sans imposer de courant ( $I = 0$ ). Cette étape permettra de vérifier que les neurones enregistrés correspondent bien à des neurones GABAergiques : ils ont une activité spontanée rapide et régulière d'environ 14 Hz.

### 2.2 Enregistrement de l'activité neuronale sous stimulation électrique du noyau sous-thalamique

L'activité électrique neuronale sous stimulation du NST est enregistrée en voltage imposé (« voltage-clamp ») à un voltage de -53 mV, afin de respecter au maximum le potentiel de membrane des neurones GABAergiques en conditions physiologiques (Shen and Johnson, 1997). D'autre part, cette valeur de -53 mV permet de se placer exactement au

potentiel d'inversion de la réponse au GABA, en fonction de la composition du milieu intracellulaire et la solution intrapipette (Fig. 52).



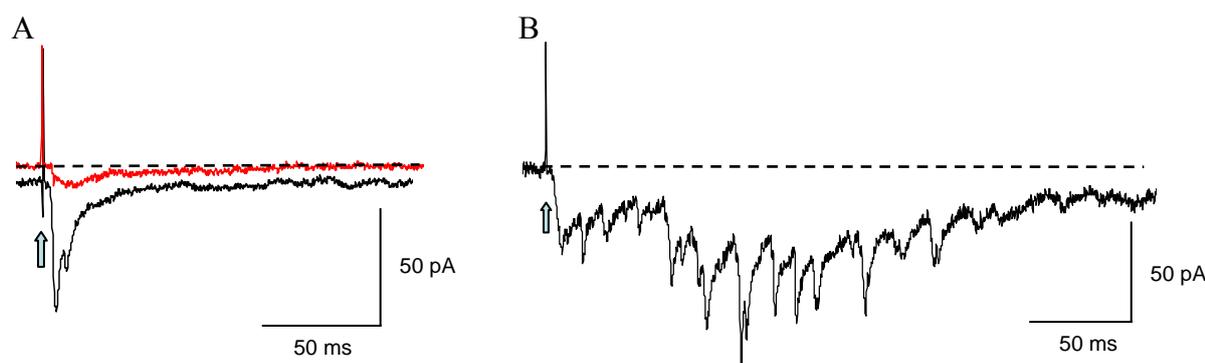
**Figure 52 :** Représentation du potentiel d'inversion de la réponse au GABA et au glutamate. D'après la composition des solutions extracellulaire et intrapipette, l'équation de Nernst permet de déterminer le potentiel d'équilibre des anions et des cations. Le potentiel d'inversion de la réponse au glutamate est lié aux potentiels d'équilibre du sodium et du potassium, tandis que le potentiel d'inversion de la réponse au GABA est lié au potentiel d'équilibre du chlore. En se plaçant au potentiel d'inversion de la réponse au GABA, les courants glutamatergiques enregistrés sont des courants entrants.

Le protocole de stimulation utilisé est identique à celui utilisé dans nos expériences antérieures : soit une stimulation unique à 100  $\mu$ s, 100  $\mu$ A, soit un train de 5 stimulations à 100 Hz, 100  $\mu$ s, 100  $\mu$ A.

Dans la majorité des neurones enregistrés, une stimulation électrique unique au niveau du NST induit un courant postsynaptique entrant d'environ 50 pA, formé d'une seule composante ( $n = 8$  neurones; 5 tranches). Ce courant dure quelques millisecondes (environ 25 ms) puis s'inactive rapidement. Afin de déterminer l'origine de ce courant, une solution d'ACSF contenant 10  $\mu$ M de CNQX, un inhibiteur des récepteurs AMPA, est appliquée pendant 5 minutes sur la tranche. Dans ces conditions, le courant entrant observé précédemment est inhibé, ce qui l'identifie comme un courant excitateur glutamatergique dépendant des récepteurs de type AMPA (Fig. 53A).

Dans certains cas, une stimulation unique peut engendrer un courant entrant formé de plusieurs inflexions successives et qui se maintient sur 200 ms environ, avant de revenir à l'état de base (Fig. 53B;  $n = 2$  neurones). Cependant, le premier pic observé après la stimulation (Fig. 53, flèche bleue) reste constant à chaque stimulation dans les réponses poly-

synaptiques (résultats non montrés). Cette phase précoce (premier pic) est décrite dans la littérature comme un courant mono-synaptique dépendant essentiellement des récepteurs AMPA alors que la phase tardive est décrite comme une réponse poly-synaptique dépendante essentiellement des récepteurs NMDA (Shen and Johnson, 2006). Contrairement à ce qui est décrit dans cette étude, cette composante poly-synaptique n'est retrouvée que rarement dans nos expériences (2/10 neurones enregistrés).

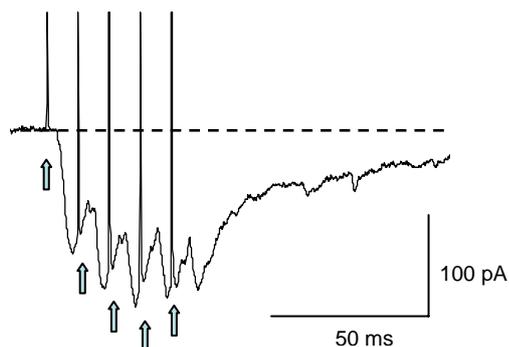


**Figure 53 :** *Enregistrements de courants post-synaptiques excitateurs dans les neurones GABAergiques de la SNr lors de la stimulation électrique du NST. A) Une stimulation unique à 50 V du NST engendre un courant entrant (courbe noire). En présence de 10 µM de CNQX, ce courant est totalement inhibé (courbe rouge). Les courbes représentent la moyenne de 10 enregistrements consécutifs avec une stimulation toutes les 10 s. B) Exemple d'un enregistrement formé de plusieurs pics et inflexions induit également par stimulation unique du NST (n = 2/10 cellules).*

*Les enregistrements sont réalisés en « voltage-clamp » à -53 mV, les flèches indiquent les artefacts de stimulation, la ligne pointillée correspond à la ligne de base.*

Ces résultats montrent donc que la stimulation électrique du NST induit des courants post-synaptiques excitateurs, d'origine glutamatergique, au niveau des neurones GABAergiques de la SNr.

Lorsqu'on applique un train de 5 stimulations, le courant enregistré indique qu'il y a une sommation des courants puisqu'à chaque stimulation le courant augmente (n = 6 neurones) (Fig. 54).



**Figure 54 :** *Enregistrements de courants postsynaptiques excitateurs lors de l'application d'un train de stimulation. L'application d'un train de 5 pulses de stimulation à 50V entraîne une sommation du courant entrant enregistré. Les enregistrements sont réalisés en « voltage clamp » à -53 mV, les flèches indiquent les artefacts de stimulation, la ligne pointillée correspond à la ligne de base.*

L'augmentation de l'amplitude des EPSCs enregistrée au niveau des neurones de la SNr suite à l'augmentation du nombre de stimulations, suggèrent une augmentation de la libération de glutamate au sein de la SNr.

En résumé, les résultats préliminaires obtenus, par ampérométrie ou par électrophysiologie, mettent en évidence la possibilité d'étudier la part neuronale et la part gliale de glutamate libéré au sein de la SNr lors de la stimulation électrique du NST, d'étudier la communication pouvant exister entre les cellules gliales et les cellules neuronales mais, peut-être également, d'aborder la question de la modulation de la transmission synaptique par les cellules gliales.



L'ensemble des résultats présentés dans cette étude a montré que 1) la SNr est une structure riche en cellules gliales puisqu'elle contient 68% de cellules gliales pour 32% de neurones, avec une population gliale majoritairement astrocytaires (26%), 2) les cellules gliales de la SNr répondent à la stimulation électrique du NST par des signaux calciques, 3) ces réponses dépendent à la fois du glutamate, du GABA et de l'ATP libérés dans la SNr, lors de la stimulation. Au final, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence une réponse calcique dans les cellules gliales de la SNr suite à la stimulation électrique du NST. Il apporte un aspect novateur concernant l'implication potentielle des cellules gliales dans la modulation des interactions cellulaires induites par la stimulation électrique du NST, au niveau de la substance noire réticulée. L'identification des acteurs impliqués dans les réponses calciques gliales induites par la SHF du NST et le rôle joué par les cellules gliales dans les effets de cette stimulation, revêt ici une importance particulière pour le décryptage de ses mécanismes d'action mais également plus générale dans le contexte de la communication neurone-glie au sein du SNC. Cette étude visant à décrypter les mécanismes cellulaires de la SHF du NST au niveau de la SNr est la première à utiliser la technique d'imagerie calcique. La mise en jeu des cellules gliales lors de la stimulation électrique du NST que nous avons montré dans ce travail, contribue à clarifier les interactions cellulaires qui interviennent à distance de la structure stimulée, et notamment ici, au niveau de la SNr. Toutefois, le rôle fonctionnel des cellules gliales dans la modulation des effets de la stimulation électrique au niveau synaptique reste encore à élucider. Les approches pharmacologiques utilisées au cours de ce travail, qui visent à identifier chaque acteur impliqué dans les réponses calciques observées, ne représentent que le début de ces investigations. Ce n'est qu'à la suite de cette clarification qu'il sera possible de comprendre la contribution de ces cellules gliales dans l'efficacité thérapeutique de ce traitement neurochirurgical chez les patients parkinsoniens.

## **I. Pertinence du modèle d'étude et intérêt de la technique d'imagerie calcique**

### *1. Choix et validité du modèle d'étude*

Le modèle *in vitro* utilisé dans ce travail est un modèle de tranche de cerveau contenant à la fois le NST et la SNr, et préservant les connexions entre ces deux structures. Ce modèle présente l'avantage de pouvoir maintenir des cellules vivantes dans leur environnement physiologique. Il permet également d'appliquer facilement de nombreux agents pharmacologiques pouvant agir rapidement sur la cible choisie. Malgré tout, ce modèle

reste, sur certains points, réducteur. En effet, il ne nous permet pas d'avoir l'ensemble des structures sur une même tranche, ni même l'intégrité de l'ensemble de leurs connexions. C'est pourquoi, comme dans tout modèle *in vitro*, l'interprétation de nos données doit être modulée car elle est loin de tenir compte et de représenter la totalité des interactions pouvant intervenir *in vivo*. Cependant, ce modèle focalisé sur la voie subthalamo-nigrale reste pertinent pour l'étude des mécanismes cellulaires induits par la stimulation du NST, principale cible chirurgicale thérapeutique de la maladie de Parkinson. Comme nous l'avons vu précédemment, si les effets bénéfiques en clinique humaine de la stimulation cérébrale profonde sont spectaculaires, les mécanismes d'action de cette thérapie ne sont pas encore totalement élucidés. Un certain nombre d'études *in vivo* s'intéressant aux mécanismes de la SHF du NST se sont appuyées sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson, que ce soit chez le rat ou le primate. Ces études ont permis d'apporter plusieurs arguments vis-à-vis de ces mécanismes sur les plans électrophysiologique (Benazzouz et al., 1995; Hashimoto et al., 2003; Maurice et al., 2003; Kita et al., 2005), biochimique (Bacci et al., 2004; Oueslati et al., 2007) ou encore neurochimique (Windels et al., 2000; 2003; 2005; Boulet et al., 2006 ; Bruet et al., 2001; Bruet et al., 2003; Lacombe et al., 2007).

Peu de travaux ont abordé l'étude de ces mécanismes par des approches *in vitro*. Seuls les travaux réalisés par le groupe du Dr Constance Hammond sur des tranches coronales de cerveau de rat ont pu mettre en évidence l'implication de canaux calciques dépendants du voltage dans les courants enregistrés sous stimulation électrique au niveau du noyau sous-thalamique (Beurrier et al., 2001; Garcia et al., 2003). Comme nous l'avons dit plus haut, l'approche par imagerie calcique est tout à fait novatrice dans ce domaine et la mise en place des outils techniques utilisés sur nos tranches de cerveau de rat a dû nécessiter quelques vérifications préalables.

Tout d'abord, je me suis assurée de la pertinence du modèle, en vérifiant que :

- Les cellules restent vivantes tout au long de l'expérience, sans perte cellulaire importante. Des marquages à l'iodure de propidium, réalisés à différents temps de l'expérience, nous ont permis d'évaluer la perte cellulaire à environ 20% en surface. Ces résultats nous assurent que, même si les neurones et toutes les cellules gliales ne sont pas chargés par la sonde calcique, la population cellulaire survivante (environ 80%) devrait participer à l'effet global observé lors de la SHF du NST ou de la mise en jeu d'agents pharmacologiques. Ceci est confirmé par nos expériences d'électrophysiologie qui ont permis d'enregistrer des courants post-synaptiques au niveau des neurones GABAergiques de la SNr signifiant leur réponse à la stimulation électrique du NST. Les réponses calciques observées

sont donc le fruit d'interactions entre les cellules chargées et celles qui ne le sont pas, et représentent la résultante des réponses et des communications cellulaires se produisant au sein de la SNr médiées par la voie glutamatergique subthalamo-nigale.

- Le pourcentage de cellules microgliales n'augmente pas au cours du temps, éliminant ainsi l'incidence possible de phénomènes inflammatoires. Ce point, complémentaire du précédent, permet de s'affranchir de tout phénomène d'activation microgliale qui conduirait inévitablement à des signaux calciques artéfactuels. Ceci a conforté la valeur de nos données en éliminant d'éventuels effets délétères de préparation et atteste que les meilleures conditions physiologiques de survie ont pu être approchées.

- Les connexions entre le NST et la SNr sont bien préservées au niveau anatomique et fonctionnel. Cependant le pourcentage de fibres subthalamo-nigrales résiduelles est difficilement évaluable sur notre préparation tissulaire et dépend bien évidemment du plan de coupe choisi. Dès lors, on ne peut prétendre qu'elles soient toutes conservées et il nous est difficile d'estimer la part des fibres participant aux phénomènes observés.

Un des avantages de ce modèle de tranche de cerveau est l'accessibilité aux cellules qu'il procure pour réaliser des études cellulaires et moléculaires variées. Ainsi, l'application d'agents pharmacologiques est facilitée par une action directe sur les cellules en évitant, notamment, les problèmes de passage de la barrière hémato-encéphalique. Cette application peut également être très localisée sans impliquer l'ensemble des structures du cerveau. Ce modèle de la tranche de cerveau donne aussi la possibilité d'étudier des circuits restreints et localisés. A la différence des cellules en culture, l'environnement cellulaire des structures et des cellules étudiées n'est pas modifié et le réseau cellulaire est maintenu dans des conditions proches des conditions physiologiques. C'est donc un modèle adapté à notre étude qui porte sur l'implication des cellules gliales dans les effets de la stimulation électrique du NST. Il permet la conservation d'un réseau entre le NST et la SNr, le maintien des cellules gliales dans leur environnement cellulaire au niveau de la SNr, et l'utilisation de techniques d'imagerie telle que l'imagerie calcique.

## *2. Limites et avantages de l'imagerie calcique rencontrés lors de notre étude expérimentale.*

La technique d'imagerie calcique nous a permis de mettre en évidence un nouvel acteur mis en jeu sous l'effet de la stimulation du NST au sein de la SNr : les cellules gliales. A notre connaissance, c'est la première étude d'imagerie calcique réalisée sur les structures des ganglions de la base chez le rat l'adulte. Nous avons vu que, dans nos conditions expérimentales, cette technique a des limites, notamment elle ne nous a pas permis d'étudier les réponses calciques pouvant avoir lieu dans les neurones. Il se peut que la réponse neuronale ne fasse pas ou très peu appel à la signalisation calcique, tout au moins dans sa partie somatique, mais on sait que la stimulation du NST module l'excitabilité neuronale (Maurice et al., 2003). Comme le montrent nos résultats d'électrophysiologie, la stimulation du NST induit, au sein des neurones GABAergiques de la SNr, un courant glutamatergique dépendant des récepteurs AMPA (Fig. 45). En plus de ce courant AMPA, Shen et Johnson (2006) avaient mis en évidence une composante NMDA dans le signal polysynaptique enregistré sur les neurones GABAergiques de la SNr, qui serait due à la mise en jeu de collatérales au sein du NST. Le canal NMDA étant perméable au calcium, il y aurait donc bien une entrée de calcium dans les neurones lors de la stimulation du NST, mais celle-ci est peut-être trop faible ou trop localisée pour être détectée. D'autre part, dans les expériences d'électrophysiologie que j'ai réalisées, la composante NMDA n'a pas été détectée systématiquement (2 neurones/10) et la présence de collatérales au niveau du NST est très controversée (Deniau JM, communication personnelle). L'entrée de calcium par cette voie pourrait donc être minime. La composante AMPA, qui elle semble majoritaire, est essentiellement perméable au sodium, ce qui pourrait expliquer l'absence de signaux calciques mesurables dans les neurones.

Malgré les différentes adaptations réalisées, la sonde calcique ne pénètre pas, ou très peu, dans les cellules neuronales de la SNr. Cette difficulté de chargement des neurones est un problème connu dans la littérature (Kettunen et al., 2002). Il existe certaines alternatives comme notamment celle de faire pénétrer la sonde en l'injectant directement à l'intérieur de la tranche par un « puff », à l'aide d'une micropipette placée dans la tranche (Stosiek et al., 2003). Les limites de cette méthode est que la diffusion de la sonde se restreint à une sphère d'un diamètre de 300  $\mu\text{m}$ . Or, nous avons montré que la SNr contient une faible densité de neurones (32%) par rapport aux cellules gliales et qui sont, de plus, assez éloignés les uns des autres. Cette méthode de chargement ne nous permettrait donc pas d'enregistrer l'activité calcique d'un large ensemble de cellules. Toutefois, il est possible que plusieurs injections

soient réalisables afin de pallier à cette limitation technique. Ceci sera prochainement testé sur nos préparations. D'autres possibilités de chargement, telles que l'utilisation d'une forte concentration de DMSO pour mieux perméabiliser les cellules, ou l'utilisation d'autres sondes calciques comme l'Oregon green ont été testées lors de notre étude (résultats non montrés), mais aucune n'a permis d'obtenir de meilleurs résultats que l'utilisation du Fluo-4 dans les conditions décrites dans la partie Matériel et Méthodes.

Quoi qu'il en soit, une minorité de cellules neuronales capte la sonde calcique, et de ce fait, il nous a été difficile d'appréhender les communications neurone-glie. Le couplage avec d'autres techniques permettant d'enregistrer l'activité neuronale, telle que l'électrophysiologie, a donc été envisagée. Nous avons pu ainsi enregistrer des activités électriques de neurones GABAergiques de la SNr par électrophysiologie dans nos conditions, permettant d'envisager un couplage avec l'imagerie calcique. Si, de manière générale, l'activité électrique est le langage des neurones, l'activité calcique telle qu'observée sur nos préparations tissulaire et dans nos conditions expérimentales se révèle être un indicateur d'activité des cellules gliales, de ce fait, l'intérêt de coupler les deux est pertinent. Il serait donc possible d'enregistrer des réponses complémentaires en appliquant les deux techniques en même temps. Ce type d'approche combinée n'a pu être développé au cours de ma thèse. Elle se fera par Elodie Barat (étudiante en 1<sup>ère</sup> année de thèse) qui reprend la suite de ce projet de recherche.

Une autre limite de la technique, liée à la fois au maintien de la viabilité cellulaire et à la pénétration de la sonde dans les cellules, est l'utilisation d'animaux âgés de 17 à 20 jours. Ce paramètre est à prendre en compte, dans le sens où certains systèmes cellulaires et moléculaires (réseaux neuronaux) sont encore en développement à ces stades. En effet, il semble que la maturation des récepteurs se poursuive jusque vers P20 chez le rat. On sait notamment que l'expression des récepteurs métabotropiques glutamatergiques du groupe I (essentiellement mGluR1 et 5) varie en fonction de l'âge pour des animaux allant du stade P14 à P18. Ces variations concernent aussi bien les récepteurs présents au niveau des axones que sur les prolongements des cellules gliales (Hubert and Smith, 2004). Des différences d'expression de récepteurs GABA<sub>A</sub> ont également été rapportées dans la SNr au stade P15 et semblent également dépendre du sexe des animaux (Ravizza et al., 2003). Afin de s'assurer que l'âge des rats n'interférait pas avec les résultats de nos expériences, les analyses des réponses calciques obtenues par différents stimuli (électrique ou chimique) ont été réalisées, et elles ne font pas ressortir de différences significatives dépendantes de l'âge des animaux

(analysées entre P17 et P21;  $n = 18$  tranches pour chaque stade; résultats non montrés), ce qui nous a permis de faire une analyse globale regroupant tous les stades.

Un des avantages de la technique d'imagerie calcique est qu'elle permet d'enregistrer l'activité calcique d'un ensemble de cellules au sein d'une structure ou d'un réseau de cellules. Elle nous a permis de montrer pour la première fois, que les cellules gliales, et principalement les astrocytes (54% des cellules chargées), sont activées par la stimulation électrique du NST. Cette réponse gliale dépend de l'ATP, du glutamate et du GABA. Cette activation laisse ainsi supposer une implication de ces cellules dans la réponse à la stimulation, en interaction potentielle avec les neurones. La technique d'imagerie calcique, nous a permis d'étudier certains aspects nouveaux impliquant les cellules gliales de la SNr, et ouvre ainsi la possibilité d'apporter de nouvelles informations sur le fonctionnement et la communication des cellules au sein de la SNr.

## **II. Caractérisation des populations cellulaires présentes au sein de la substance noire réticulée**

### *1. Présence d'une population importante et diversifiée de cellules gliales dans la substance noire réticulée*

D'une manière générale, les cellules gliales sont les plus représentées au sein du système nerveux central. Nos résultats montrent que, dans la SNr, les cellules gliales représentent 68% de la population totale contre 32% de neurones. Les trois populations principales de cellules gliales sont présentes au niveau de la SNr. On a dénombré environ 26% de cellules astrocytaires parmi la population cellulaire totale de la SNr, par marquage spécifique avec les anticorps anti-GFAP ou S100 $\beta$ . Comme précisé dans l'introduction, ces deux marqueurs sont spécifiques des astrocytes mais ils ne rendent pas compte du même état physiologique de ceux-ci. La protéine S100 $\beta$  est exprimée dans tous les astrocytes quel que soit leur état tandis que la protéine GFAP est exprimée à des niveaux détectables uniquement dans les astrocytes dits « activés ». D'après nos résultats, l'ensemble des astrocytes de la SNr sont des astrocytes « activés » car on retrouve les mêmes pourcentages de cellules marquées avec les anticorps anti-GFAP et anti-S100 $\beta$ . Ceci laisse supposer que les astrocytes de la SNr sont réactifs, et il est possible qu'ils jouent un rôle non négligeable au sein de cette structure. Nos résultats révèlent également la présence de 7% de cellules microgliales dans la SNr par marquage avec l'anticorps Ox-42. A la vue de leur morphologie, celles-ci ne semblent pas

actives chez le rat sain. Le pourcentage d'oligodendrocytes n'a pu être déterminé précisément, par absence de marquage anti-CNPase sur nos tranches. Il semble que l'anticorps ne se fixe pas dans nos conditions expérimentales. Par déduction, le pourcentage d'oligodendrocytes et de leurs progéniteurs est estimé à environ 25%. Des cellules gliales NG2 ont également été détectées au niveau de la SNr par un marquage avec l'anticorps anti-NG2, elles représentent 10% de la population cellulaire nigrale, et peuvent jouer un rôle important dans le renouvellement cellulaire lors d'une lésion cérébrale (Wigley et al., 2007). Les résultats montrent ainsi que les populations gliales principales de la SNr sont des astrocytes et probablement des oligodendrocytes.

A côté du rôle actif des astrocytes dans la physiologie du système nerveux, il est maintenant admis qu'un dysfonctionnement de la communication neurone-glie puisse avoir des implications dans la physiopathologie du cerveau (Araque, 2006). Des analyses post-mortem sur des cerveaux de patients parkinsoniens montrent que la perte des neurones dopaminergiques de la SNc est accompagnée d'une réaction gliale importante dans cette structure, phénomène qui n'est pas retrouvée dans le striatum (Teismann et al., 2003). On retrouve une légère augmentation du nombre d'astrocyte et d'expression de la protéine GFAP au niveau de la SNc. La réaction microgliale est, quand à elle, très importante dans les régions les plus touchées par le processus de neurodégénérescence. Les astrocytes voient également leur nombre augmenter même s'ils semblent moins impliqués que la microglie dans les processus d'inflammation (Teismann and Schulz, 2004).

Etant donné l'importance de la proportion de cellules gliales au sein de la SNr, et plus particulièrement de la population astrocytaire, le rôle des cellules gliales au sein de cette structure n'est sans doute pas à négliger.

## *2. Caractérisation fonctionnelle de certains acteurs présents au niveau des cellules gliales de la substance noire réticulée*

La SNr contient donc une importante proportion de cellules gliales qui peuvent être impliquées dans la communication cellulaire et l'activité de cette structure. Les résultats concernant la caractérisation des populations cellulaires chargées montrent que la majorité des cellules ayant incorporé la sonde calcique sont des astrocytes. Ils représentent 54% de la population de cellules chargées. Dans le but d'appréhender l'implication fonctionnelle des cellules gliales dans la SNr nous avons recherché, sur les cellules chargées, la présence d'acteurs moléculaires pouvant être impliqués dans la neuro et/ou la gliotransmission. Pour cela, nous avons ciblé notre étude sur les récepteurs glutamatergiques, les récepteurs

GABAergiques et les récepteurs purinergiques qui sont tous importants dans la communication des cellules gliales et potentiellement exprimés au sein de la SNr.

L'application indépendante de chacun des agonistes respectifs de ces récepteurs a permis de montrer que le glutamate (100  $\mu$ M) induit une augmentation de calcium dans environ 25% de cellules gliales chargées, l'ATP (100 nM) induit une activation de 24% des cellules chargées et le GABA (20  $\mu$ M) induit une élévation de calcium dans 17% des cellules ayant incorporé la sonde calcique. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence que les cellules gliales de la SNr sont sensibles à ces transmetteurs, laissant suggérer qu'elles expriment peut être des récepteurs au glutamate, au GABA et à l'ATP. Cependant, l'action des différents agents ne touche pas l'ensemble des cellules de la SNr, ce qui laisse supposer qu'il pourrait exister une répartition hétérogène des récepteurs à la surface de ces cellules gliales décrites. Afin de pousser un peu plus loin cette étude de la sensibilité des cellules gliales de la SNr à ces agents, nous avons effectué des applications successives des différents agents. Les résultats mettent en évidence des populations de cellules répondant à la fois à l'ATP et au glutamate (environ 14%,  $n = 40$  tranches), et des populations répondant à la fois au glutamate et au GABA (environ 9%,  $n = 9$  tranches). D'autres données très préliminaires, montrent également une faible proportion de cellules répondant à l'ATP et au GABA (3% pour  $n = 1$ ), ou encore aux trois applications (3,6% pour  $n = 1$ ). Les résultats montrent donc des différences de sensibilités des cellules gliales, au glutamate, au GABA et à l'ATP. Ainsi, il est possible semble que les différents récepteurs impliqués ne soient pas tous présents ou tout au moins pas tous actifs sur l'ensemble des cellules gliales chargées de la SNr. Ceci peut mettre en avant une répartition particulière de ces récepteurs en fonction de la localisation des cellules par rapport aux terminaisons synaptiques. Des cellules gliales proches des terminaisons GABAergiques, comme par exemple des terminaisons pallido-nigrales ou striato-nigrales de la SNr, pourront exprimer préférentiellement des récepteurs GABAergiques et/ou purinergiques, tandis que des cellules gliales proches des terminaisons glutamatergiques subthalamo-nigrales pourront exprimer des récepteurs plutôt glutamatergiques et/ou purinergiques. Par ailleurs, nos résultats montrent également qu'une faible proportion de cellules (9%) semble exprimer à la fois les récepteurs glutamatergiques et les récepteurs GABAergiques. Dès lors, les différentes réponses calciques observées suite à l'application des agonistes, n'exclut pas la présence de l'ensemble de ces récepteurs sur la totalité des cellules chargées, mais probablement dans des proportions différentes.

Dans la suite de notre étude, nous nous sommes intéressés aux cellules répondant à la stimulation électrique du NST. Afin de caractériser ces cellules nous avons utilisé des antagonistes des récepteurs au glutamate, au GABA et à l'ATP, dont la spécificité a été vérifiée au préalable.

Les résultats montrent que chaque antagoniste est bien spécifique et qu'il inhibe bien l'action de l'agoniste utilisé. Cependant les inhibitions observées ne sont pas totales. La suramine inhibe de 86% environ le nombre de cellules répondantes à l'ATP. Cette inhibition incomplète de l'ATP peut s'expliquer en partie par le fait de l'utilisation d'un antagoniste compétitif. Un tel antagoniste va agir sur le même site que l'agoniste, de façon réversible. Bien que appliqué en plus grande proportion que l'agoniste, la dynamique de liaison laisse la possibilité à l'agoniste d'avoir accès à son site d'action. L'inhibition est donc partielle. D'autre part, la suramine inhibe l'ensemble des récepteurs purinergiques P2Y et P2X mais elle agit plus faiblement sur les P2X. Bien que peu nombreux par rapport aux récepteurs purinergiques métabotropiques P2Y, les P2X sont tout de même présents à la surface des cellules gliales et peuvent être activés par l'ATP (James and Butt, 2002).

L'inhibition de l'effet du glutamate par le cocktail d'inhibiteurs glutamatergiques est de 83%. Les antagonistes CNQX (10  $\mu$ M) et D-AP5 (50  $\mu$ M) sont des antagonistes compétitifs spécifiques des récepteurs AMPA et NMDA, respectivement. Une absence d'inhibition totale peut également s'expliquer par l'aspect sélectif des antagonistes utilisés. Malgré l'incubation des antagonistes avant l'application des agonistes, la pénétration des inhibiteurs dans la tranche n'est peut être pas immédiate ni totale. Ceux-ci étant appliqués à l'inverse du flux d'ACSF dans la chambre de perfusion (afin de ne pas avoir d'effet sur l'activité des cellules NST), leur action est peut-être limitée par une durée de présence trop courte dans la chambre. Quant au LAP-3 (100  $\mu$ M), c'est un puissant antagoniste des récepteurs métabotropiques, difficilement réversible. Les réponses restantes sont donc probablement dues à une activation des récepteurs glutamatergiques ionotropiques et peu à une activation des récepteurs métabotropiques.

Enfin, l'application de bicuculline (20  $\mu$ M) inhibe 61% des cellules chargées répondant au GABA. La bicuculline méthiodide, est également un antagoniste compétitif qui va inhiber spécifiquement les récepteurs GABA<sub>A</sub>.

### III. Réponse des cellules gliales de la substance noire réticulée suite à la stimulation électrique du noyau sous-thalamique

#### 1. Participation du glutamate, de l'ATP et du GABA dans l'activation des cellules gliales de la SNr lors de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique

##### 1.1 Le glutamate

L'implication du glutamate dans la réponse nigrale lors de la SHF du NST a été mise pour la première fois en évidence par des expériences de microdialyse *in vivo* (Windels, et al., 2000; 2003; 2005; Boulet et al., 2006). Des enregistrements extracellulaires *in vivo* (Maurice et al., 2003) ou encore par des enregistrements d'EPSCs *in vitro* (Shen and Johnson, 2006) sont venus conforter ces observations neurochimiques. D'après nos résultats, l'inhibition des différentes familles de récepteurs glutamatergiques diminue de 64% le nombre de cellules gliales de la SNr répondant à la stimulation électrique du NST ( $p < 0,001$ ). Ces résultats confirment donc que du glutamate est bien libéré lors de la stimulation électrique du NST et montrent que celui-ci induit une réponse calcique dans les cellules gliales de la SNr chargées en sonde calcique. Ainsi, le glutamate issu des fibres subthalamo-nigrales (Maurice et al., 2003; Shen and Johnson, 2006) va agir directement sur les cellules gliales de la SNr en entraînant des réponses calciques. Ces signaux calciques vont pouvoir engendrer de multiples réponses au sein du réseau glial de cette structure, dont une libération secondaire de glutamate (Verkhatsky and Kirchoff, 2007a). Il est fort possible que la libération de glutamate induite par la SHF du NST au sein de la SNr ait une double origine, à la fois neuronale et gliale. La contribution des cellules gliales dans la libération du glutamate au sein de la SNr avait déjà été évoquée lors des expériences de microdialyse intracérébrale chez des rats sains, montrant que les taux élevés de glutamate dans la SNr se maintenaient voire augmentaient après l'arrêt de la SHF du NST (Windels et al., 2000). Cependant, ces résultats ont été obtenus dans des conditions de stimulation à des paramètres dyskinésiants chez l'animal (130 Hz, 60  $\mu$ s, 500  $\mu$ A) et ne peuvent donc être comparés directement avec les résultats obtenus dans ce travail.

L'activité des cellules gliales, induite par la libération de glutamate neuronal provenant des terminaisons subthalamo-nigrales, pourrait ainsi aboutir à une libération gliale de glutamate, mais également d'ATP, de D-sérine ou d'autres gliotransmetteurs contribuant probablement aux réponses calciques observées dans notre étude. Ces gliotransmetteurs ainsi libérés à proximité des synapses ou à distance peuvent agir à la fois sur des cellules gliales et sur des neurones, modulant leur activité respective (Jourdain et al., 2007). On ne peut donc pas exclure que certaines des réponses calciques enregistrées dans notre étude ne puissent pas

refléter la conduction et la propagation de vagues calciques à travers ce réseau, en absence d'une action directe du glutamate sur les récepteurs des cellules activées. Afin de déterminer si la propagation de vagues calciques à travers les cellules gliales est impliquée dans les réponses calciques observées, il est envisagé d'utiliser des inhibiteurs des jonctions communicantes, tel que le carbenoxolone.

### 1.2 L'ATP

Nous avons pu confirmer la libération et l'implication de l'ATP dans les réponses gliales induites par la stimulation électrique en bloquant les récepteurs purinergiques par l'application de suramine, un inhibiteur des récepteurs purinergiques P2Y et P2X. L'application de 20  $\mu\text{M}$  de suramine inhibe environ 95% des réponses induites par la stimulation électrique du NST ( $p < 0,01$ ). Nous avons donc ici une confirmation de l'importance du rôle de l'ATP dans l'activité et l'activation des cellules gliales. L'activation des cellules gliales par l'ATP, sous l'effet de la stimulation électrique du NST, peut être soit la conséquence d'une action directe induite par la libération d'ATP au niveau des synapses subthalamo-nigrales (Pankratov et al., 2006), soit être, au contraire, due à une activation indirecte induite par une libération secondaire provenant des astrocytes qui ferait suite à l'activation des récepteurs glutamatergiques des cellules gliales (Domercq et al., 2006). Une sommation des deux effets, directs et indirects est très probable. Il est difficile de dégager de nos résultats une différence temporelle dans la réponse à la stimulation qui permettrait de faire la part entre ces différentes hypothèses. L'ATP est le principal messenger des cellules gliales (Inoue et al., 2007). La majorité des cellules gliales qui répondent à la stimulation du NST répondent également à l'application d'ATP dans le milieu. En effet, nous avons mis en évidence une forte corrélation ( $84.4 \pm 15.0\%$ , coefficient de corrélation :  $r = 0,83$ ) dans les réponses des cellules gliales à l'ATP et à la stimulation électrique du NST. Ceci laisse supposer une libération directe de l'ATP au niveau synaptique lors de la stimulation du NST et montre la possibilité d'action de l'ATP en tant que neurotransmetteur, pouvant être libéré par les neurones (Burnstock, 2006). L'ATP peut également provenir d'une libération à partir des neurones GABAergiques de la SNr, après activation de ceux-ci par le glutamate provenant des fibres subthalamo-nigrale. La libération d'ATP par les cellules gliales dépend de l'activité calcique, notamment pour les mécanismes de libération par exocytose ou par la voie lysosomale (Zhang et al., 2007). Il est à noter que l'ATP peut aussi agir sur les neurones eux-mêmes puisqu'ils expriment des récepteurs purinergiques à leur surface, aux niveaux pré

et postsynaptiques (Inoue et al., 2007). Son action sur les récepteurs P2X présents sur les neurones peut entraîner une entrée de calcium générant un signal neuronal, une dépolarisation ou encore la génération de potentiels d'action (Fields and Stevens, 2000; Pankratov et al., 2006). Il semble cependant que l'ATP libéré par les astrocytes puisse également induire une suppression de l'activité glutamatergique synaptique (Zhang et al., 2003). En effet, l'activation des synapses glutamatergiques entraîne une libération de glutamate qui active les astrocytes à proximité. En retour, les astrocytes libèrent de l'ATP, celui-ci pouvant agir au niveau des récepteurs présynaptiques P2Y présents sur les neurones, et induire ainsi une suppression de l'activité de ces neurones présynaptiques. L'ATP pourrait également induire une inhibition, après sa conversion en AMP puis en adénosine qui est un messager chimique ubiquitaire intervenant dans la modulation de nombreuses activités cellulaires du système nerveux central (Dunwiddie and Masino, 2001). L'adénosine va avoir une action essentiellement inhibitrice par son action sur les récepteurs A<sub>1</sub> majoritaires au niveau des neurones (Benarroch, 2008). Etant donné que l'ATP peut être dégradé en moins de 200 ms dans l'espace extracellulaire (Dunwiddie et al., 1997), il est tout à fait possible que l'adénosine puisse être impliquée dans les mécanismes de régulation des activités dans notre modèle en agissant sur les récepteurs A<sub>1</sub> présents dans la SNr (Shen and Johnson, 1997). Une étude récente montre que la stimulation électrique du thalamus entraîne une libération d'adénosine au sein du thalamus stimulé. De par son action sur les récepteurs A<sub>1</sub>, l'adénosine libérée lors de la SHF du thalamus pourrait inhiber la transmission excitatrice de cette structure, responsable des tremblements. L'adénosine jouerait donc un rôle dans la suppression des tremblements sur des modèles animaux de la maladie de Parkinson et sur les tremblements essentiels (Bekar et al., 2008). Ainsi, la libération d'ATP par les cellules gliales dans le milieu extracellulaire pourrait avoir un rôle de modulation de l'activité neuronale par un effet inhibiteur, *via* sa dégradation en adénosine. Au-delà d'une communication entre neurones et cellules gliales, l'ATP libéré par les cellules gliales peut également agir sur la communication entre les cellules gliales elles-mêmes, en agissant sur le métabolisme glial ou la libération de gliotransmetteurs, ce qui a été montré notamment lors de processus d'activation gliale induit par des lésions du tissu cérébral, (Dare et al., 2007).

### 1.3 Le GABA

Enfin, en plus du glutamate et de l'ATP, nous avons également mis en évidence l'effet du GABA dans les réponses calciques observées dans la SNr lors de la stimulation électrique du NST. En effet, l'application de bicuculline (20  $\mu$ M), un antagoniste des récepteurs

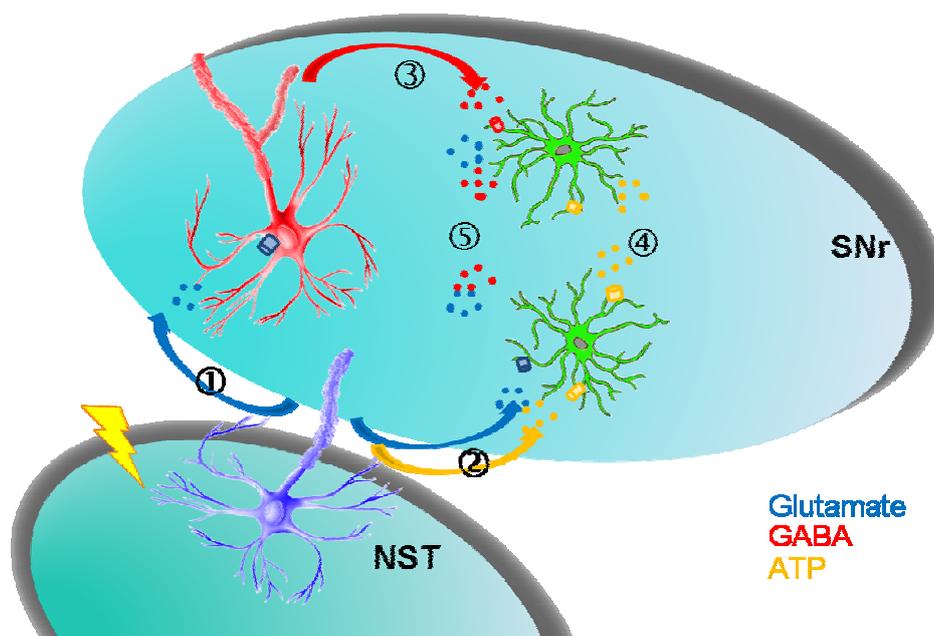
GABA<sub>A</sub>, diminue significativement de 68% le nombre de cellules répondant à la stimulation électrique du NST ( $p < 0,001$ ). Les réponses calciques observées lors de la stimulation électrique du NST peuvent être dues à une action directe du GABA relayée ou non par un effet indirect dû à la libération d'autres gliotransmetteurs. Concernant l'effet direct, il passe par l'activation des récepteurs gliaux GABA<sub>A</sub> qui induit une dépolarisation membranaire conduisant à une entrée de calcium (Fraser et al., 1994). Une action indirecte suite à l'activation des cellules gliales par le GABA impliquerait une libération de différents gliotransmetteurs, tels que le glutamate et l'ATP, dépendant du signal calcique engendré par l'effet direct du GABA.

De plus, il faut prendre en compte que l'effet du GABA libéré est double sur les cellules de la SNr. Il a été décrit qu'il pouvait induire, *in vivo*, une hyperpolarisation des neurones (Maurice et al., 2003) et nos expériences *in vitro* montrent qu'il est capable d'induire une activation calcique dans les cellules gliales, suite à une dépolarisation membranaire (activation de 17% des cellules gliales chargées de la SNr). La résultante fonctionnelle de son action doit prendre en compte ces deux aspects : alors que les neurones sont inhibés, les cellules gliales peuvent de leur côté libérer des gliotransmetteurs pouvant induire une activation neuronale. Nos expériences d'imagerie calcique ne nous permettent pas de distinguer l'action directe de l'éventuelle action indirecte du GABA. La réalité sur le plan fonctionnel de l'activation des cellules gliales médiée par le GABA reste complexe et difficile à élucider. L'impact fonctionnel du GABA au sein du réseau des ganglions de la base, et notamment au sein de la SNr, reste une question importante et plus particulièrement dans la compréhension des mécanismes de la SHF du NST. Sur la base des travaux publiés par le laboratoire, qui avaient montré qu'il existait une libération nigrale de GABA sous l'effet de la SHF du NST, il avait été émise l'hypothèse que le GABA pouvait être le neuromédiateur clé de l'effet clinique observé chez les patients parkinsoniens stimulés, notamment pour son effet inhibiteur sur l'hyperactivité de la SNr. L'origine pallidale du GABA a été évoquée par l'observation de l'absence de libération de GABA au niveau de la SNr, suite à une lésion du GP chez le rat hémiparkinsonien, lors de la SHF du NST (Windels et al., 2005). Elle a, par la suite, été confirmée par des études pharmacologiques et électrophysiologiques chez le singe (Kita et al., 2005). Toutefois, dans notre modèle de tranche de cerveau le GP est absent. Il est donc probable que la libération de GABA provienne principalement des collatérales d'axones GABAergiques de la SNr, mais ceci n'exclut pas la stimulation des fibres en provenance du GPe. Enfin, pour conclure sur cette question de l'origine du GABA nigral, on ne peut

évidemment pas exclure une libération gliale, bien que celle-ci soit très peu décrite à ce jour (Sellstrom and Hamberger, 1977).

A partir des quelques données de la littérature et des données obtenues dans ce travail, nous avons essayé de proposer le modèle suivant (fig. 55) illustrant les relations possibles se mettant en place entre les neurones et les cellules gliales de la SNr sous l'effet de la SHF du NST. La stimulation électrique du NST induit une libération de glutamate dans la SNr, responsable de l'activation des neurones GABAergiques nigraux (1) et des cellules gliales (2). Sachant que les neurones glutamatergiques sont capables de libérer de l'ATP (Pankratov et al., 2006), il est possible qu'une co-libération de glutamate et d'ATP entraîne l'activation conjointe des récepteurs glutamatergiques et purinergiques des cellules gliales (2), sans négliger la possibilité de libération indirecte d'ATP par les cellules gliales elles-mêmes, induite par l'activation des récepteurs gliaux glutamatergiques ou GABAergiques (3, 4). L'activation des neurones GABAergiques de la SNr peut induire une libération de GABA à partir des collatérales de ces neurones dans la SNr (3), qui peut agir sur les neurones mais également sur les cellules gliales, provoquant une activation de ces cellules. De leur côté, une fois activées, les cellules gliales sont capables de libérer de l'ATP (4), du glutamate (5) et/ou du GABA (5). Ces gliotransmetteurs peuvent à leur tour agir sur les neurones et participer à la modulation de l'activité électrique induite par la SHF du NST.

D'une manière générale, le fait que nous ayons mis en évidence une activation des cellules gliales lors de la stimulation électrique du NST impliquant à la fois le glutamate, le GABA et l'ATP soulève de nombreuses questions, notamment: quelle est la résultante fonctionnelle de l'activation des cellules gliales au niveau de la modulation des voies de sortie ? Y a-t-il un partenariat entre le glutamate, le GABA et/ou l'ATP ? Y a-t-il d'autres neuro et/ou gliotransmetteurs impliqués comme par exemple la D-sérine ou la taurine ? Quel rôle jouent ces cellules gliales dans l'inhibition des voies de sorties ? Comment l'activation des cellules gliales par le GABA peut moduler l'activité neuronale nigrale ?



**Figure 55 :** *Modèle schématique illustrant les différents phénomènes pouvant être induits par la stimulation électrique du NST au niveau des cellules de la SNr. Les neurones du NST libèrent du glutamate qui active les neurones GABAergiques et les cellules gliales de la SNr (1,2). L'activation des cellules gliales peut également passer par une libération d'ATP (2). Les neurones GABAergiques de la SNr stimulés peuvent libérer du GABA dans ce noyau (3). Les cellules gliales activées peuvent également libérer de l'ATP (4), du glutamate (5) et/ou du GABA (5).*

## 2. Mesures de l'effet de la stimulation sur la libération de glutamate et sur l'activité neuronale

Comme décrit dans la littérature et dans ce travail, le glutamate est largement impliqué dans les effets de la SHF du NST. La libération de glutamate au niveau de la SNr sous SHF du NST a largement été mise en évidence par de nombreuses techniques telles que la microdialyse intracérébrale, l'électrophysiologie, et dans notre travail, nous avons montré son implication dans les réponses calciques observées par imagerie calcique. On sait également que c'est un médiateur important de la communication neurone-neurone et neurone-glie. Le fait que des augmentations de glutamate soient observées par des techniques de microdialyse après l'arrêt de la SHF du NST (Windels et al., 2000) a souligné une possible contribution gliale que l'on a cherché à confirmer. L'utilisation de biocapteur ampérométrique sur tranche de cerveau, couplés à l'application d'agents pharmacologiques, permettra peut-être de mettre en évidence cette libération gliale. Cette technique permet de mesurer la dynamique de libération du glutamate, avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde et de détecter

des variations extracellulaires avec une sensibilité de l'ordre de 100 nM. Elle présente donc une résolution temporelle beaucoup plus précise que celle de la microdialyse intracérébrale. Ces types de biocapteurs ampérométriques ont été utilisés sur des animaux vivants anesthésiés au niveau du cortex (Pernot et al., 2008) mais ils n'avaient encore jamais été testés sur tranches de cerveau. Nous avons donc testé cette technique sur notre modèle de tranche et l'enregistrement des variations des taux de glutamate s'est révélée possible. Les résultats préliminaires obtenus par cette technique d'ampérométrie, mettent en évidence une libération de glutamate au sein de la SNr pendant la stimulation électrique du NST et qui se poursuit après l'arrêt de la stimulation. D'après ces résultats, la libération de glutamate est immédiate, dès le début de la stimulation supposant une libération directe du glutamate à partir des fibres subthalamo-nigrales stimulées. Dès l'arrêt de la stimulation, la libération vésiculaire de glutamate au niveau des terminaisons synaptiques est stoppée (Garcia et al., 2005). Cependant nos résultats montrent que le taux de glutamate continue à augmenter, ce qui est sans doute lié à un mécanisme métabolique mettant probablement en jeu à une libération de glutamate par les cellules gliales.

D'autres résultats préliminaires ont été obtenus en présence de TBOA, un inhibiteur à large spectre des transporteurs glutamatergiques, et montrent qu'une application de KCl (40 mM) dans le liquide de perfusion de la tranche induit une libération de glutamate (de l'ordre de 300  $\mu$ M) au sein de la SNr, détectée par ampérométrie. Le KCl ajouté dans le milieu va induire une dépolarisation des neurones glutamatergiques du NST et ainsi conduire à une libération de glutamate dans la SNr. A forte concentration (40 mM), le KCl est connu pour dépolariser les neurones mais il n'a pas le même effet sur la concentration intracellulaire de calcium dans les cellules gliales (Dallwig and Deitmer, 2002). Comme présenté en introduction les cellules gliales expriment une forte proportion de canaux potassiques majoritairement de type rectifiant entrant (« inward rectifier») qui maintiennent un potentiel de repos de la cellule proche du potentiel d'équilibre du potassium, c'est-à-dire entre -80 et -90 mV, et qui jouent un rôle important dans la régulation de la concentration de potassium extracellulaire (Butt and Kalsi 2006). Lors d'une augmentation de la concentration extracellulaire de potassium, l'équilibre se déplace et les cellules gliales se dépolarisent mais l'absence de canaux calciques dépendants du voltage fait que cette augmentation n'entraîne pas d'augmentation du calcium cytosolique. De ce fait, l'augmentation de glutamate observée lors de l'application de KCl provient majoritairement d'une libération neuronale.

Le taux de glutamate libéré dans cette expérience sous l'effet de la stimulation électrique du NST est d'environ 15  $\mu$ M (résultat non montré), il est donc beaucoup plus faible

que le taux de glutamate libéré lors de l'application de KCl. Le KCl ajouté dans la chambre de perfusion active probablement l'ensemble des terminaisons glutamatergiques du NST, tandis que l'électrode, en fonction de sa localisation dans le NST, ne va affecter que quelques fibres et corps cellulaires au pourtour de l'électrode. Il se peut également, que les fibres activées ne soient pas celles qui passent à proximité du biocapteur, et que l'effet enregistré soit, de ce fait, atténué. Par ailleurs, il est possible que les fibres activées à distance entraînent une activation du métabolisme glial conduisant à une libération de glutamate qui se propage jusqu'au biocapteur. Cet effet serait donc indirect et sans doute plus faible.

L'application de 100 nM d'ATP induit également une libération de glutamate dans la SNr (15  $\mu$ M). Cependant cette libération est détectable uniquement en présence de TBOA, ce qui signifie que le glutamate libéré par une action de l'ATP est en très faible quantité, va agir très vite sur les récepteurs ou va être rapidement recapté par les transporteurs. En effet, l'ATP ajouté dans le milieu devrait normalement agir sur les récepteurs purinergiques exprimés à la surface des cellules gliales et entraîner des mouvements calciques. Ces variations de calcium vont à leur tour pouvoir induire une libération de glutamate soit par exocytose soit par voie lysosomale. Ceci laisse donc supposer une libération de glutamate par les cellules gliales. On ne peut cependant pas totalement exclure ici, la possibilité d'une action de l'ATP sur les quelques récepteurs purinergiques présents à la surface des neurones. On remarque ici que la libération de glutamate induite par l'application de l'ATP est beaucoup plus faible que celles induites par le KCl. Ceci laisse supposer que les neurones jouent certainement un rôle prépondérant dans la libération de glutamate par rapport à celui des cellules gliales.

Les enregistrements électrophysiologiques réalisés au cours de ce travail ont permis de mesurer un courant glutamatergique entrant au niveau des neurones GABAergiques de la SNr, lors de la stimulation électrique du NST confirmant ainsi l'action du glutamate au niveau des neurones de la SNr lors de la stimulation du NST. Ces résultats étaient déjà connus dans la littérature mais ils nous ont permis de vérifier la faisabilité de ces expériences dans le but d'étudier les interactions entre cellules gliales et neurones de la SNr, lors de la stimulation électrique du NST. En effet, le courant enregistré est dû à une entrée de glutamate provenant de la SNr, qui peut provenir soit d'une libération directe par stimulation des fibres subthalamo-nigrales soit d'une libération gliale, ou bien des deux phénomènes couplés. Ainsi l'étude de l'activité neuronale par électrophysiologie sur nos préparations, couplés à l'application d'inhibiteurs gliaux, pourrait nous permettre de déterminer si les cellules gliales sont impliqués dans l'appartition de ce courant glutamatergique.

L'ensemble des résultats obtenus par ces techniques complémentaires de l'imagerie calcique, nous donne la possibilité d'étudier les effets de la stimulation à la fois sur les cellules gliales et les neurones. L'utilisation d'une telle combinaison d'outils techniques nous aidera à mieux appréhender le rôle des cellules gliales de la SNr dans les effets de la stimulation électrique du NST. La stimulation cérébrale profonde permettant d'abolir les symptômes moteurs chez les patients parkinsoniens, la question est de savoir de quelle manière les cellules gliales contribueraient à cet effet clinique.

#### **IV. Perspectives : rôle des cellules gliales dans les effets de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique dans la maladie de Parkinson : un partenariat entre cellules gliales et neuronales ?**

##### *1. Ouverture possible à d'autres techniques d'imagerie*

La technique d'imagerie calcique utilisée dans ce travail nous a permis d'aborder un nouvel aspect des effets de la stimulation cérébrale profonde, en montrant un impact de celle-ci sur les cellules gliales de la SNr. Les réponses calciques enregistrées au sein des cellules gliales décrivent leur activation lors de la stimulation électrique du NST. L'implication des cellules gliales dans la communication et la modulation des activités neuronales est, à ce jour, de plus en plus décrite. Ainsi, nous avons focalisé notre étude sur cette implication dans les effets de la stimulation électrique du NST.

De par la quasi absence de chargement des neurones avec la sonde calcique, il a été envisagé d'enregistrer les mouvements sodiques et/ou les variations de potentiel membranaire par d'autres techniques d'imagerie, qui pourraient permettre d'étudier les modifications d'excitabilité cellulaire. Nous avons enregistré des courants glutamatergiques entrant au niveau des neurones GABAergiques de la SNr, avec une composante AMPA majoritaire essentiellement perméable au sodium. Cependant, les sondes sodiques actuellement disponibles ont une très mauvaise sensibilité au  $\text{Na}^+$  et sont délicates à utiliser. Pour l'instant, seul le couplage de l'imagerie calcique à des techniques d'électrophysiologie, pourra apporter des informations pertinentes sur le niveau d'interaction neurone-glie au sein de la SNr, notamment sur la compréhension du rôle des neuro et gliotransmetteurs dans la modulation de l'activité électrique neuronale. L'électrophysiologie ne permet d'enregistrer qu'une seule cellule à la fois et, dès lors, les informations régionales et de réseaux, que permettent les techniques d'imagerie, ne sont de ce fait pas exploitables. Dans ce sens, nous avons entrepris

une collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie Physique (Dr Jean-Claude Vial, CNRS, Grenoble) pour mettre au point une technique d'imagerie par « Génération de Second Harmonique » afin d'imager les modifications de potentiel membranaire. La génération de second harmonique est un phénomène non-linéaire de diffusion de la lumière se produisant dans des assemblages moléculaires sans centro-symétrie (monocouche lipidique, collagène...) et qui se traduit par un doublement de la fréquence de la lumière (division par 2 de la longueur d'onde). Pour cela, on utilise des sondes sensibles aux variations de potentiel qui s'insèrent dans la monocouche lipidique externe.

Ces sondes sont actuellement en cours de développement. L'application d'une telle approche sur notre modèle nous permettrait d'enregistrer les variations du potentiel de membrane de l'ensemble des neurones de la SNr. Ainsi, nous aurions accès à l'ensemble du réseau neuronal de la SNr.

D'autres perspectives restent également envisageables avec la technique d'imagerie calcique. En effet, le calcium n'est pas un témoin ordinaire d'une modification d'activité cellulaire, il joue un rôle important dans la signalisation et la communication intercellulaire, et ce, soit par un effet à courte distance sur les cellules avoisinantes, soit par intervention dans une communication à plus longue distance. Il doit donc d'être considéré comme une sorte de chef d'orchestre qui coordonne certaines informations au sein d'un réseau. L'imagerie calcique a révolutionné les approches pour l'analyse fonctionnelle du cerveau sur des modèles animaux expérimentaux, *in vitro* et *in vivo*. Les progrès récents dans le développement de senseurs au calcium, couplés avec de nouvelles approches de marquage de ces molécules ainsi que la mise en œuvre de puissantes techniques d'imagerie, comme la microscopie bi-photonique, permettent aujourd'hui une étude très précise des variations de calcium avec des résolutions temporelles de l'ordre de la milliseconde et des résolutions spatiales de l'ordre du micromètre (Rochefort et al., 2008). Un autre domaine de recherche important en pleine évolution est l'utilisation de l'imagerie calcique sur des modèles animaux *in vivo*, pour l'analyse de pathologies du cerveau telles que l'épilepsie, la maladie d'Alzheimer ou des pathologies du mouvement (Rochefort et al., 2008). A long terme, le couplage de l'imagerie calcique à différentes techniques de microscopie pourra peut être nous permettre d'appliquer cette technique *in vivo* (Stosiek et al., 2003) au niveau du cortex moteur afin d'étudier les effets de la SHF du NST sur l'activité des cellules corticales.

## 2. Etude de la communication entre neurones et cellules gliales.

Pour accéder à la fois au versant neuronal et glial, nous avons développé d'autres techniques telles que l'ampérométrie et l'électrophysiologie qui apportent des informations complémentaires et pourront être couplées à l'imagerie calcique.

Nous avons ainsi mesuré une libération de glutamate au sein de la SNr avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde et enregistré des EPSCs glutamatergiques au sein des neurones GABAergiques de la SNr sous stimulation électrique du NST. La mesure des taux de glutamate par ampérométrie sur tranche a permis d'observer que la libération de glutamate semble complexe avec une libération qui démarre pendant la stimulation électrique du NST et qui perdure après l'arrêt de la stimulation. La libération pendant la stimulation est probablement due à une libération synaptique au niveau des terminaisons subthalamo-nigrales. Par contre, à l'arrêt de la stimulation du NST, l'augmentation observée ne peut plus provenir d'une libération de glutamate par exocytose vésiculaire, il est probable que ce soit principalement une libération gliale.

Afin de déterminer la part gliale *versus* neuronale du glutamate libéré au niveau de la SNr lors de la stimulation électrique du NST, la poursuite du projet vise à appliquer des inhibiteurs de certaines fonctions gliales sur notre modèle de tranche :

1. Dans un premier temps, il est envisagé d'utiliser des inhibiteurs du métabolisme glial tels que le fluorocitrate (inhibiteur de l'aconitase, enzyme spécifique du cycle de Krebs des cellules gliales) ou le L-méthionine sulfoximine (MSO, inhibiteur de la glutamine synthétase) (Dopico et al., 2006). Le fluorocitrate a pour but d'inhiber le métabolisme des cellules gliales, et ainsi de bloquer à la fois la libération et la recapture du glutamate par ces cellules, de même que la production de glutamine (Paulsen et al., 1987; Szerb and Issekutz, 1987). Le MSO va, quant à lui, inhiber la production de glutamine par les astrocytes, indispensable aux neurones pour produire du glutamate au niveau synaptique (Fonnum and Paulsen, 1990).

2. Des transporteurs du glutamate (GLAST et les GLT-1) sont également présents à la surface des cellules gliales. Ils pourront être inhibés par application de dihydrokainate, un inhibiteur spécifique des transporteurs GLT-1, afin de déterminer l'importance de leur rôle dans la régulation des contenus extracellulaires de glutamate au sein de la SNr.

3. Enfin, la communication entre les cellules gliales par l'intermédiaire des jonctions communicantes de types gap sera inhibée par le carbenoxolone, un inhibiteur des jonctions

communicantes. Ainsi, nous analyserons l'importance du passage du calcium ou de molécules de signalisation comme l'ATP ou l'InsP<sub>3</sub> dans les réponses à la stimulation électrique du NST.

Les effets de ces inhibitions pourront être étudiés à la fois sur les réponses calciques enregistrées par imagerie, sur les profils de libération de glutamate détectés par ampérométrie et sur les courants post-synaptiques neuronaux enregistrés par électrophysiologie. Les éventuelles perturbations de ces réponses nous apporteront des informations sur l'implication de l'activité des cellules gliales sur l'activité des neurones induite par la stimulation du NST. Plus largement, nous pourrions ainsi mieux comprendre l'importance fonctionnelle des communications neurone-glie dans la physiopathologie de la SNr et leur rôle dans le cadre de modulation nigrale induite par la stimulation électrique du NST.

Nos résultats ont également mis en évidence l'implication de l'ATP dans l'activation calcique des cellules gliales. Tout comme le glutamate, l'ATP peut être libéré à la fois par les neurones et les cellules gliales (Fields and Stevens, 2000). Vu la proportion de cellules gliales au sein de la SNr, on pourrait penser que l'ATP libéré ait principalement une origine gliale et aboutisse à une activation indirecte des cellules gliales nigrales. Si c'était le cas, l'application de suramine aboutirait à une inhibition partielle de l'effet de la stimulation en n'abolissant pas l'activation glutamatergique directe. Cependant, les résultats montrent que la suramine abolit massivement (de 62%) l'effet de la SHF sur la réponse calcique enregistrée laissant suggérer une libération directe d'ATP au niveau des synapses subthalamo-nigrale lors de la stimulation électrique du NST. Ceci n'est donc pas en faveur d'un effet secondaire dû à une libération d'ATP par les cellules gliales mais plutôt en faveur d'une libération synaptique directement induite par la stimulation électrique du NST. Afin de vérifier ces hypothèses, nous envisageons d'utiliser une sonde ampérométrique à ATP qui permettra de déterminer le profil temporel et les quantités d'ATP libérées au sein de la SNr lors de la stimulation du NST. Ces approches devraient contribuer à déterminer les différentes origines possibles de libération de ce transmetteur (gliale *vs* neuronale) par application des mêmes inhibiteurs de certaines fonctions gliales que précédemment.

Les différentes sondes ampérométriques développées par Stéphane Marinesco nous donnent également la possibilité de mesurer les taux de D-sérine présents dans la SNr. La D-sérine est un agoniste des récepteurs NMDA agissant au niveau du site glycine de ces récepteurs, elle peut également être libérée par les cellules gliales et pourrait ainsi moduler la transmission glutamatergique au sein de la SNr (Panatier et al., 2006; Billard, 2008). Dans le contexte d'une co-libération glutamate-ATP, on peut imaginer que la D-sérine puisse

également intervenir en tant que modulateur de la réponse glutamatergique pour les deux raisons suivantes : 1) le glutamate et la D-sérine pourraient être stockés dans les mêmes vésicules astrocytaires (Martineau et al., 2006) et 2) l'ATP est un co-facteur de l'enzyme de synthèse de la D-sérine, la sérine racémase (Martineau et al., 2006). Si l'enzyme d'oxydation de la D-sérine entraînant sa métabolisation est principalement présente au niveau des neurones, la sérine racémase, permettant la production de la D-Sérine, est essentiellement présente dans les cellules gliales. Ceci est donc en faveur d'une production de D-sérine par les cellules gliales, qui vont ainsi pouvoir moduler l'activité glutamatergique des neurones (Scolari and Acosta, 2007; Verrall et al., 2007). Bien que cette localisation soit aujourd'hui remise en cause (Wolosker et al., 2008), l'étude de ce modulateur reste intéressante pour la suite de ce projet.

La libération d'ATP au sein de la SNr, peut également être impliquée dans les effets d'augmentation du glutamate mis en évidence par le biocapteur à glutamate. L'ATP pourrait avoir un effet sur les cellules gliales libérant ensuite du glutamate dans le milieu. L'utilisation des deux biocapteurs en même temps, permettrait peut-être de déterminer si une augmentation d'ATP peut être à l'origine d'une augmentation de glutamate. Ces informations seraient bien évidemment importantes pour clarifier les mécanismes mis en jeu dans la libération de glutamate dans la SNr sous l'effet de la stimulation électrique du NST.

Enfin, les effets de la libération de GABA au sein de la SNr lors de la stimulation pourront être étudiés par des enregistrements électrophysiologiques car il n'existe pas, à ce jour, de biocapteur ampérométriques au GABA. Les conditions utilisées en électrophysiologie pour l'enregistrement des courants glutamatergiques présentés dans ce travail ne nous ont pas permis d'enregistrer les effets du GABA sur les neurones de la SNr car nous nous sommes placés au potentiel d'inversion du GABA et en présence de picrotoxine, afin d'inhiber les récepteurs GABA<sub>A</sub>. En choisissant des paramètres adéquats, la technique d'électrophysiologie nous permettra d'étudier les effets du GABA sur les activités neuronales et gliales. En effet, l'implication fonctionnelle du GABA au sein de la SNr est double car il est inhibiteur au niveau des neurones GABAergiques de la SNr et activateur au niveau des cellules gliales (Fraser et al., 1994). L'activation des cellules gliales par le GABA pourrait conduire à une libération de gliotransmetteurs comme le glutamate ou l'ATP pouvant induire une augmentation de l'activité électrique neuronale, ou encore une libération de glycine ou de taurine, qui sont des gliotransmetteurs inhibiteurs, pouvant induire une diminution de l'activité neuronale.

Il serait également possible de regarder l'effet du GABA sur les cellules gliales en utilisant les biocapteurs au glutamate et à l'ATP. Les mesures de libération d'ATP et de glutamate, en présence de GABA dans le milieu de perfusion pourrait nous donner accès à l'implication possible du GABA sur les libérations de gliotransmetteurs au sein de la SNr. Comme présenté dans l'introduction (II.3.3), les cellules gliales possèdent des récepteurs et des transporteurs au GABA à leur surface mais elles n'ont pas un rôle prédominant dans la régulation de ce neurotransmetteur. La libération de GABA par les cellules gliales est peu décrite dans la littérature (Sellstrom and Hamberger, 1977) mais les cellules gliales possèdent les composants nécessaires dont les transporteurs du GABA (Magnaghi, 2007) leur donnant la possibilité de libérer du GABA. Il est connu que la glycine puisse être libérée au niveau de la SNr de manière calcium dépendante, suite à une dépolarisation des neurones par une forte concentration de KCl (10 mM) et à l'application de glutamate. Cette libération extracellulaire de glycine se fait notamment par les cellules gliales (mécanisme inhibé par le MSO ou le fluorocitrate), et est capable de moduler les taux de GABA au sein de cette structure (Dopico et al., 2006). Le rôle du GABA dans la régulation de la communication neurone-glie reste encore inconnu et donc à explorer. Par l'étude de son implication dans les effets de la stimulation du NST sur l'activité des cellules de la SNr nous allons nous intéresser plus précisément à ces mécanismes d'actions.

Toujours dans l'optique d'essayer de décrypter la communication neurone-glie au sein de la SNr, il serait possible d'utiliser la technique du double patch dans notre modèle. En effet, bien que les cellules gliales ne soient pas excitables, elles possèdent de nombreux récepteurs dépendants du voltages dont l'activité peut être enregistrée par patch-clamp (Verkhatsky, 2006). La technique de double patch est connue pour l'enregistrement de l'activité de deux neurones (Vandecasteele et al., 2008) ou l'étude du couplage entre les cellules gliales (Venance et al., 1995). D'autre part, les activités des cellules gliales de type hyperpolarisation ou dépolarisation peuvent également être enregistrées, en même temps que celles des cellules neuronales (Venance L, communication personnelle). Dans la suite du projet, il est donc envisagé d'utiliser la technique du double patch pour enregistrer simultanément l'activité de neurones GABAergiques et de cellules gliales de la SNr. Ce projet se fera en collaboration avec le Dr Laurent Venance (Unité Inserm U667, Paris).

### *3. Implication des cellules gliales dans la maladie de Parkinson*

#### *3.1. Rôle des cellules gliales dans la maladie de Parkinson*

Les cellules gliales sont impliquées dans la plupart des pathologies du cerveau comme dans certaines épilepsies, la sclérose latérale amyotrophique, des lésions suite aux ischémies voire dans la maladie de d'Alzheimer (Rogers et al., 2007). D'une manière générale, des lésions du cerveau vont conduire au développement de réactions gliales, généralement regroupées sous le terme de glioses, qui incluent une réaction des astrocytes (astrogliose), de la microglie (réaction microgliale) et des oligodendrocytes. Toutes ces réactions ont une importance majeure dans la progression des lésions neuronales, les cellules gliales pouvant avoir des rôles à la fois protecteurs et délétères (Teismann and Schulz, 2004).

Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'implication de l'ATP dans la réponse des cellules gliales observée suite à la stimulation électrique du NST or une étude de Franke et al. (2003) met en évidence l'activation d'un phénomène d'astrogliose induite par la libération d'ATP dans l'espace intercellulaire suite aux dommages ou à la mort cellulaire dus à une lésion. La libération d'ATP stimulerait l'expression des récepteurs P2X et P2Y à la surface des astrocytes, ceux-ci agissant sur l'expression de la protéine GFAP. L'ATP pourrait ainsi être un régulateur endogène en réponse à une lésion cérébrale, et possiblement un médiateur de la communication neurone-astrocyte. Ainsi, si la stimulation induit bien une augmentation d'ATP en situation pathologique, il serait possible que les astrocytes jouent un rôle par ce biais là, dans les bénéfices de ce traitement.

Actuellement, la réponse gliale observée dans la maladie de Parkinson pourrait avoir des effets bénéfiques et/ou délétères : l'activation des cellules microgliales semble être délétère alors que celle des astrocytes serait bénéfique (McGeer and McGeer, 2008).

Dans notre étude, la stimulation provoque une réponse calcique dans les cellules gliales chez des animaux sains : est-ce que cela conduit à une activité délétère ou bénéfique ? La question reste posée mais il semblerait que les effets résultants de la SHF soient plus bénéfiques que délétères. On peut imaginer que les astrocytes jouent un rôle dans le contrôle des concentrations de glutamate et/ou de GABA dans la SNr, et également de modulation de l'activité électrique des neurones. En effet, nos résultats montrent que les astrocytes répondent à la stimulation électrique du NST en condition physiologique. Or, la stimulation électrique est un traitement thérapeutique bénéfique sur les symptômes parkinsoniens moteurs en conditions pathologiques, il serait donc important de s'intéresser à l'effet de la stimulation

électrique du NST, chez des modèles animaux de la maladie de Parkinson, afin de comparer les réponses calciques obtenues, les implications des différents neuro et gliotransmetteurs impliqués dans cette réponse, et de comprendre le rôle des cellules gliales dans l'impact de la stimulation électrique du NST sur l'activité des neurones de la SNr.

Des expériences de microdialyse réalisées au laboratoire ont montré que du glutamate est libéré au niveau de la SNr lors de la SHF du NST chez des animaux sains mais que cette augmentation des taux de glutamate n'est pas observée chez les animaux 6-OHDA (Windels et al., 2000; 2005) où le niveau de base du glutamate est déjà élevé. Des augmentations des taux de GABA ont, quant à elles, été relevées à la fois chez les animaux sains et chez les animaux 6-OHDA dans la SNr (Savasta et al., 2002; Windels et al., 2005). Comme nous l'avons vu, les cellules gliales sont activées par le glutamate libéré dans la SNr lors de la stimulation électrique du NST. De plus, nous savons que les cellules gliales possèdent à leur surface des transporteurs glutamatergiques et GABAergiques. Les cellules gliales semblent jouer un rôle important dans la recapture du glutamate, alors que leur rôle dans la régulation des taux de GABA reste encore inexploré. Ces astrocytes n'intervenant que très peu dans la régulation du GABA, ceci pourrait expliquer le maintien d'une libération de GABA sous stimulation du NST dans le modèle de rat 6-OHDA.

Plus généralement, il serait intéressant de comprendre l'impact des cellules gliales sur la résultante fonctionnelle de l'activité de cette structure de sortie au sein du réseau de ganglions de la base, vus leurs rôles importants et leur contribution directe dans la régulation des activités neuronales.

### *3.2. Etude des effets de la stimulation électrique du noyau sous-thalamique sur les cellules gliales dans un modèle de la maladie de Parkinson*

Le fait de devoir travailler sur des rats âgés de 17 à 20 jours est un peu limitant dans l'optique d'utiliser des modèles animaux de la maladie de Parkinson puisque le modèle de rat 6-OHDA nécessite un délai de 3 semaines après injection de la toxine, pour observer une destruction des neurones de la SNc. Il semble cependant possible de faire une injection de 6-OHDA en post-natal chez des animaux de 1 à 2 jours et de provoquer la destruction de la SNc en peu de temps (Penit-Soria et al., 1997). Les animaux obtenus présentent une destruction complète des neurones dopaminergiques de la SNc après 15 jours et certains effets moteurs apparaissent dès 15-21 jours. Ils ont donc des caractéristiques communes au modèle de rat 6-OHDA adulte. Cependant, les animaux lésés à des stades précoces de 1-2 jours post-natal

présentent également des déficits d'apprentissage et de mémorisation, et des différences de sensibilité aux agents pharmacologiques (notamment dopaminergique) par rapport au modèle adulte (Breese et al., 2005). Ce modèle nous permettrait malgré tout d'utiliser une approche mimant les mécanismes pathologiques du phénomène induit dans la maladie de Parkinson puisque la perte cellulaire pourrait entraîner des modifications du fonctionnement du réseau des ganglions de la base.

Il est également envisagé d'utiliser un modèle où on ferait une interruption de la transmission dopaminergique en appliquant des inhibiteurs des récepteurs D1 et D2 sur tranches (respectivement SCH-23390 et raclopride). Des études électrophysiologiques réalisées *in vivo* ont montré qu'une telle interruption chimique mimait les effets de la lésion 6-OHDA et que la SHF du NST régularise l'activité électrique des cellules de la SNr (Degos et al., 2005). Cependant, bien que la SNc soit en partie présente sur nos tranches, le striatum est absent, donc l'effet de l'inhibition de la transmission dopaminergique ne peut pas passer par une modification des voies directes et indirectes striato-nigrales. Le NST comme la SNr expriment des récepteurs dopaminergiques et l'interruption de la transmission dopaminergique affecte les patrons de décharge des neurones sous-thalamiques et nigraux (Baufreton et al., 2005; Ibanez-Sandoval et al., 2006). Ce modèle semble donc complémentaire du modèle par lésion 6-OHDA et permettrait d'étudier l'implication fonctionnelle des cellules gliales dans des conditions physiopathologiques proches de la maladie de Parkinson. L'utilisation d'autres modèles animaux intéressants de la maladie de Parkinson pourraient être envisagée par la suite. Ces modèles pourraient s'adresser à la souris, et notamment les souris KO du gène de la parkine ou de l' $\alpha$ -synucléine. L'implication de la parkine et de l' $\alpha$ -synucléine dans la maladie de Parkinson a été largement démontrée chez des familles de patients parkinsoniens. Ils représentent des outils pertinents. Toutefois, les données acquises par le laboratoire sur les mécanismes neurochimiques de la SHF du NST, ainsi que de nombreuses données électrophysiologiques obtenues chez le modèle de rat, nous ont conduit à démarrer logiquement ce projet chez le rat. L'ouverture à d'autres modèles chez la souris n'est donc pas à écarter.

Ce paramètre d'utilisation d'animaux jeunes (P17-P21) peut également représenter une limite dans la transposition des résultats obtenus sur un modèle de rat adulte, dans un contexte physiopathologique. Cependant, les données obtenues lors de notre étude apportent des informations qui pourront être vérifiées *in vivo* notamment par les techniques neurochimiques utilisées au laboratoire. En effet, nous avons soulevé l'hypothèse d'une libération de glutamate, de GABA et d'ATP par les cellules gliales lors de la stimulation.

Comme nous l'avons vu, l'application d'inhibiteurs gliaux au sein de la SNr sera testée sur les mesures des taux de libération de glutamate ou d'ATP sur tranche par ampérométrie. Si ces expériences aboutissent à des données pertinentes sur l'implication des cellules gliales dans la libération de glutamate ou autres transmetteurs au sein de la SNr, lors de la SHF du NST, les inhibiteurs pourront être testés *in vivo* par des injections intracérébrales. Des mesures par microdialyse intracérébrale pourront être effectuées et les données obtenues comparées aux données déjà connues dans la littérature sur la libération de glutamate au niveau de la SNr sous SHF du NST (Windels et al. 2000, Savasta et al., 2002). Ceci apportera de nouvelles données sur l'implication des cellules gliales au sein de la SNr dans un réseau préservé, *in vivo*.



L'intérêt porté aux cellules gliales a connu un essor ces dernières années et il est clair que ces cellules du système nerveux central et périphérique, jouent un rôle crucial, depuis les stades précoces du développement et tout au long de la vie adulte. Au niveau du système nerveux central, elles sont impliquées dans la plasticité neuronale, la conduction axonale ou encore la transmission synaptique, par leur capacité à produire, libérer et recapter de nombreux facteurs essentiels à la physiologie neuronale. Au-delà de leur rôle en condition physiologique, les données récentes mettent également en évidence leur implication dans les phénomènes d'inflammation ou de protection dans les maladies neurologiques (pour revue, voir Verkhratsky A and Butt A, 2007, Chapitre 10).

Ce travail met en exergue un phénomène nouveau en impliquant ces cellules gliales dans les mécanismes qui sous tendent les effets du traitement chirurgical de la maladie de Parkinson, la stimulation cérébrale profonde. La compréhension de leur mise en œuvre, en présence ou en absence de transmission dopaminergique, devrait nous apporter des informations quant à leur implication dans les processus physiologiques et pathologiques affectant le réseau des ganglions de la base. Les données obtenues montrent une réponse des cellules gliales par des réponses calciques, à de multiples transmetteurs libérés au sein de la SNr lors de la stimulation électrique du NST. D'une manière générale, notre étude permettra peut être de faire le jour sur l'importance de ces cellules dans la transmission et l'échange d'informations entre les neurones et les cellules gliales. Elle peut être une clé pour une meilleure compréhension des effets de la stimulation du NST sur les activités neuronales de la SNr.



*A*

- Afsharpour S (1985) Topographical projections of the cerebral cortex to the subthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 236:14-28.
- Aguirre A, Gallo V (2004) Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 24:10530-10541.
- Ahlskog JE, Muenter MD (2001) Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov Disord* 16:448-458.
- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226-230.
- Albin RL, Greenamyre JT (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 42:733-738.
- Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Amadio S, Montilli C, Picconi B, Calabresi P, Volonte C (2007) Mapping P2X and P2Y receptor proteins in striatum and substantia nigra: An immunohistological study. *Purinergic Signal* 3:389-398.
- Andy OJ, Jurko MF, Sias FR, Jr. (1963) Subthalamotomy in Treatment of Parkinsonian Tremor. *J Neurosurg* 20:860-870.
- Araque A (2006) Astrocyte-neuron signaling in the brain--implications for disease. *Curr Opin Investig Drugs* 7:619-624.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol* 63:795-813.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Araque A, Li N, Doyle RT, Haydon PG (2000) SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 20:666-673.
- Arcuino G, Lin JH, Takano T, Liu C, Jiang L, Gao Q, Kang J, Nedergaard M (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9840-9845.
- Arnulf I (2003) [Sleep disorders during synucleopathies and taupathies]. *Rev Neurol (Paris)* 159:6S77-82.
- Atherton JF, Bevan MD (2005) Ionic mechanisms underlying autonomous action potential generation in the somata and dendrites of GABAergic substantia nigra pars reticulata neurons in vitro. *J Neurosci* 25:8272-8281.
- Aziz TZ, Peggs D, Sambrook MA, Crossman AR (1991) Lesion of the subthalamic nucleus for the alleviation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism in the primate. *Mov Disord* 6:288-292.

*B*

- Bacci JJ, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2002) Effects of intralaminar thalamic nuclei lesion on glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) and cytochrome oxidase subunit I mRNA expression in the basal ganglia of the rat. *Eur J Neurosci* 15:1918-1928.
- Bacci JJ, Absi el H, Manrique C, Baunez C, Salin P, Kerkerian-Le Goff L (2004) Differential effects of prolonged high frequency stimulation and of excitotoxic lesion of the subthalamic nucleus on dopamine denervation-induced cellular defects in the rat striatum and globus pallidus. *Eur J Neurosci* 20:3331-3341.

- Baker KB, Kopell BH, Malone D, Horenstein C, Lowe M, Phillips MD, Rezaei AR (2007) Deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder: using functional magnetic resonance imaging and electrophysiological techniques: technical case report. *Neurosurgery* 61:E367-368; discussion E368.
- Baron MS, Vitek JL, Bakay RA, Green J, Kaneoke Y, Hashimoto T, Turner RS, Woodard JL, Cole SA, McDonald WM, DeLong MR (1996) Treatment of advanced Parkinson's disease by posterior GPi pallidotomy: 1-year results of a pilot study. *Ann Neurol* 40:355-366.
- Baufreton J, Zhu ZT, Garret M, Bioulac B, Johnson SW, Taupignon AI (2005) Dopamine receptors set the pattern of activity generated in subthalamic neurons. *Faseb J* 19:1771-1777.
- Baunez C, Christakou A, Chudasama Y, Forni C, Robbins TW (2007) Bilateral high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on attentional performance: transient deleterious effects and enhanced motivation in both intact and parkinsonian rats. *Eur J Neurosci* 25:1187-1194.
- Beck A, Nieden RZ, Schneider HP, Deitmer JW (2004) Calcium release from intracellular stores in rodent astrocytes and neurons in situ. *Cell Calcium* 35:47-58.
- Beckstead RM (1983) A pallidostriatal projection in the cat and monkey. *Brain Res Bull* 11:629-632.
- Beckstead RM, Domesick VB, Nauta WJ (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res* 175:191-217.
- Bekar L, Libionka W, Tian GF, Xu Q, Torres A, Wang X, Lovatt D, Williams E, Takano T, Schnermann J, Bakos R, Nedergaard M (2008) Adenosine is crucial for deep brain stimulation-mediated attenuation of tremor. *Nat Med* 14:75-80.
- Benabid AL, Pollak P, Louveau A, Henry S, de Rougemont J (1987) Combined (thalamotomy and stimulation) stereotactic surgery of the VIM thalamic nucleus for bilateral Parkinson disease. *Appl Neurophysiol* 50:344-346.
- Benabid AL, Pollak P, Gervason C, Hoffmann D, Gao DM, Hommel M, Perret JE, de Rougemont J (1991) Long-term suppression of tremor by chronic stimulation of the ventral intermediate thalamic nucleus. *Lancet* 337:403-406.
- Benabid AL, Pollak P, Gao D, Hoffmann D, Limousin P, Gay E, Payen I, Benazzouz A (1996) Chronic electrical stimulation of the ventralis intermedius nucleus of the thalamus as a treatment of movement disorders. *J Neurosurg* 84:203-214.
- Benabid AL, Pollak P, Gross C, Hoffmann D, Benazzouz A, Gao DM, Laurent A, Gentil M, Perret J (1994) Acute and long-term effects of subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease. *Stereotact Funct Neurosurg* 62:76-84.
- Benarroch EE (2008) Adenosine and its receptors: multiple modulatory functions and potential therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70:231-236.
- Benazzouz A, Piallat B, Pollak P, Benabid AL (1995) Responses of substantia nigra pars reticulata and globus pallidus complex to high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats: electrophysiological data. *Neurosci Lett* 189:77-80.
- Benazzouz A, Gross C, Feger J, Boraud T, Bioulac B (1993) Reversal of rigidity and improvement in motor performance by subthalamic high-frequency stimulation in MPTP-treated monkeys. *Eur J Neurosci* 5:382-389.
- Berendse HW, Groenewegen HJ, Wolters JG, Lohman AH (1990) Organization of the thalamostriatal projections in the rat, with special emphasis on the ventral striatum  
Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat  
The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization. *J Comp Neurol* 299:187-228.

- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249:1436-1438.
- Bergman H, Wichmann T, Karmon B, DeLong MR (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *J Neurophysiol* 72:507-520.
- Berridge MJ (1997) Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol* 499 ( Pt 2):291-306.
- Berridge MJ (1998) Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21:13-26.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Beurrier C, Ben-Ari Y, Hammond C (2006) Preservation of the direct and indirect pathways in an in vitro preparation of the mouse basal ganglia. *Neuroscience* 140:77-86.
- Beurrier C, Bioulac B, Audin J, Hammond C (2001) High-frequency stimulation produces a transient blockade of voltage-gated currents in subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 85:1351-1356.
- Bevan MD, Bolam JP (1995) Cholinergic, GABAergic, and glutamate-enriched inputs from the mesopontine tegmentum to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 15:7105-7120.
- Bevan MD, Wilson CJ (1999) Mechanisms underlying spontaneous oscillation and rhythmic firing in rat subthalamic neurons. *J Neurosci* 19:7617-7628.
- Bevan MD, Bolam JP, Crossman AR (1994) Convergent synaptic input from the neostriatum and the subthalamus onto identified nigrothalamic neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 6:320-334.
- Bevan MD, Atherton JF, Baufreton J (2006) Cellular principles underlying normal and pathological activity in the subthalamic nucleus. *Curr Opin Neurobiol* 16:621-628.
- Bevan MD, Magill PJ, Terman D, Bolam JP, Wilson CJ (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends Neurosci* 25:525-531.
- Bezzi P, Volterra A (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol* 11:387-394.
- Billard JM (2008) D-serine signalling as a prominent determinant of neuronal-glia dialogue in the healthy and diseased brain. *J Cell Mol Med* 20:20.
- Blanchet PJ, Metman LV, Mouradian MM, Chase TN (1996) Acute pharmacologic blockade of dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord* 11:580-581.
- Blandini F, Garcia-Osuna M, Greenamyre JT (1997) Subthalamic ablation reverses changes in basal ganglia oxidative metabolism and motor response to apomorphine induced by nigrostriatal lesion in rats. *Eur J Neurosci* 9:1407-1413.
- Blond S, Siegfried J (1991) Thalamic stimulation for the treatment of tremor and other movement disorders. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 52:109-111.
- Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross CE (2002) From single extracellular unit recording in experimental and human Parkinsonism to the development of a functional concept of the role played by the basal ganglia in motor control. *Prog Neurobiol* 66:265-283.
- Bormann J (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:16-19.
- Boulet S, Lacombe E, Carcenac C, Feuerstein C, Sgambato-Faure V, Poupard A, Savasta M (2006) Subthalamic stimulation-induced forelimb dyskinesias are linked to an increase in glutamate levels in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 26:10768-10776.
- Boussaoud D, Kermadi I, Dominey PF, Wise SP, Johnson PB, Caminiti R (1997) The primate striatum: neuronal activity in relation to spatial attention versus motor preparation
- Bowery NG (1993) GABAB receptor pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33:109-147.

- Breese GR, Knapp DJ, Criswell HE, Moy SS, Papadeas ST, Blake BL (2005) The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: a model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Res Brain Res Rev* 48:57-73.
- Bregestovski P, Spitzer N (2005) Calcium in the function of the nervous system: new implications. *Cell Calcium* 37:371-374.
- Bruet N, Windels F, Bertrand A, Feuerstein C, Poupard A, Savasta M (2001) High frequency stimulation of the subthalamic nucleus increases the extracellular contents of striatal dopamine in normal and partially dopaminergic denervated rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:15-24.
- Bruet N, Windels F, Carcenac C, Feuerstein C, Bertrand A, Poupard A, Savasta M (2003) Neurochemical mechanisms induced by high frequency stimulation of the subthalamic nucleus: increase of extracellular striatal glutamate and GABA in normal and hemiparkinsonian rats  
Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1228-1240.
- Burbaud P, Gross C, Benazzouz A, Coussemaq M, Bioulac B (1995) Reduction of apomorphine-induced rotational behaviour by subthalamic lesion in 6-OHDA lesioned rats is associated with a normalization of firing rate and discharge pattern of pars reticulata neurons. *Exp Brain Res* 105:48-58.
- Burchiel KJ, Anderson VC, Favre J, Hammerstad JP (1999) Comparison of pallidal and subthalamic nucleus deep brain stimulation for advanced Parkinson's disease: results of a randomized, blinded pilot study. *Neurosurgery* 45:1375-1382; discussion 1382-1374.
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485 ( Pt 2):403-418.
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27:166-176.
- Burnstock G (2007) Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 87:659-797.
- Butt AM, Kalsi A (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* 10:33-44.

## C

- Canteras NS, Shammah-Lagnado SJ, Silva BA, Ricardo JA (1990) Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res* 513:43-59.
- Caparros-Lefebvre D, Blond S, Vermersch P, Pecheux N, Guieu JD, Petit H (1993) Chronic thalamic stimulation improves tremor and levodopa induced dyskinesias in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:268-273.
- Carmignoto G (2000) Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones. *Prog Neurobiol* 62:561-581.
- Carter DA, Fibiger HC (1978) The projections of the entopeduncular nucleus and globus pallidus in rat as demonstrated by autoradiography and horseradish peroxidase histochemistry. *J Comp Neurol* 177:113-123.
- Celada P, Paladini CA, Tepper JM (1999) GABAergic control of rat substantia nigra dopaminergic neurons: role of globus pallidus and substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 89:813-825.

- Chabardes S, Minotti L, Chassagnon S, Piallat B, Torres N, Seigneuret E, Vercueil L, Carron R, Hirsch E, Kahane P, Benabid AL (2008) [Basal ganglia deep-brain stimulation for treatment of drug-resistant epilepsy: review and current data]. *Neurochirurgie* 54:436-440.
- Chatfield DA, Zemlan FP, Day DJ, Menon DK (2002) Discordant temporal patterns of S100beta and cleaved tau protein elevation after head injury: a pilot study. *Br J Neurosurg* 16:471-476.
- Charles A (1998) Intercellular calcium waves in glia. *Glia* 24:39-49.
- Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ (1991) Intercellular signaling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 6:983-992.
- Chatha BT, Bernard V, Streit P, Bolam JP (2000) Synaptic localization of ionotropic glutamate receptors in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 101:1037-1051.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH, Storm-Mathisen J (1998) The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18:9733-9750.
- Chevalier G, Deniau JM (1990) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci* 13:277-280.
- Clapham DE (1995) Calcium signaling. *Cell* 80:259-268.
- Clausen RP, Frolund B, Larsson OM, Schousboe A, Krogsgaard-Larsen P, White HS (2006) A novel selective gamma-aminobutyric acid transport inhibitor demonstrates a functional role for GABA transporter subtype GAT2/BGT-1 in the CNS. *Neurochem Int* 48:637-642.
- Cooper IS, Poloukhine N (1956) The globus pallidus as a surgical target. *J Am Geriatr Soc* 4:1182-1207.
- Cornell-Bell AH, Finkbeiner SM, Cooper MS, Smith SJ (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247:470-473.
- Cossart R, Ikegaya Y, Yuste R (2005) Calcium imaging of cortical networks dynamics. *Cell Calcium* 37:451-457.
- Cotrina ML, Lin JH, Lopez-Garcia JC, Naus CC, Nedergaard M (2000) ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci* 20:2835-2844.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280:337-345.
- Crossman AR (1987) Primate models of dyskinesia: the experimental approach to the study of basal ganglia-related involuntary movement disorders. *Neuroscience* 21:1-40.
- Crossman AR, Sambrook MA, Jackson A (1980) Experimental hemiballismus in the baboon produced by injection of a gamma-aminobutyric acid antagonist into the basal ganglia. *Neurosci Lett* 20:369-372.
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11:327-335.

## D

- Dallwig R, Deitmer JW (2002) Cell-type specific calcium responses in acute rat hippocampal slices. *J Neurosci Methods* 116:77-87.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danysz W, Parsons CG (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664.
- Dare E, Schulte G, Karovic O, Hammarberg C, Fredholm BB (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav* 92:15-20.

- Dawson MR, Levine JM, Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61:471-479.
- Dawson TM (2008) Non-autonomous cell death in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 7:474-475.
- De Bie RM, Schuurman PR, Esselink RA, Bosch DA, Speelman JD (2002) Bilateral pallidotomy in Parkinson's disease: a retrospective study. *Mov Disord* 17:533-538.
- Degos B, Deniau JM, Le Cam J, Mailly P, Maurice N (2008) Evidence for a direct subthalamo-cortical loop circuit in the rat. *Eur J Neurosci* 27:2599-2610.
- Degos B, Deniau JM, Thierry AM, Glowinski J, Pezard L, Maurice N (2005) Neuroleptic-induced catalepsy: electrophysiological mechanisms of functional recovery induced by high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:7687-7696.
- Delfs JM, Ciaramitaro VM, Parry TJ, Chesselet MF (1995) Subthalamic nucleus lesions: widespread effects on changes in gene expression induced by nigrostriatal dopamine depletion in rats. *J Neurosci* 15:6562-6575.
- DeLong MR (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* 13:281-285.
- Deniau JM (2003) Le système des ganglions de la base : une revue critique des principes d'organisation fonctionnelle. *Mouvements* 4:2-20
- Deniau JM, Menetrey A, Charpier S (1996) The lamellar organization of the rat substantia nigra pars reticulata: segregated patterns of striatal afferents and relationship to the topography of corticostriatal projections. *Neuroscience* 73:761-781.
- Deniau JM, Hammond C, Risz A, Feger J (1978) Electrophysiological properties of identified output neurons of the rat substantia nigra (pars compacta and pars reticulata): evidences for the existence of branched neurons. *Exp Brain Res* 32:409-422.
- Deniau JM, Mailly P, Maurice N, Charpier S (2007) The pars reticulata of the substantia nigra: a window to basal ganglia output. *Prog Brain Res* 160:151-172.
- Deschenes M, Bourassa J, Parent A (1995) Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain Res* 701:288-292.
- Dieck ST, Heuer H, Ehrchen J, Otto C, Bauer K (1999) The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes. *Glia* 25:10-20.
- Domercq M, Brambilla L, Pilati E, Marchaland J, Volterra A, Bezzi P (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem* 281:30684-30696.
- Dopico JG, Gonzalez-Hernandez T, Perez IM, Garcia IG, Abril AM, Inchausti JO, Rodriguez Diaz M (2006) Glycine release in the substantia nigra: Interaction with glutamate and GABA. *Neuropharmacology* 50:548-557.
- Dostrovsky JO, Lozano AM (2002) Mechanisms of deep brain stimulation. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S63-68.
- Dunwiddie TV, Masino SA (2001) The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24:31-55.
- Dunwiddie TV, Diao L, Proctor WR (1997) Adenine nucleotides undergo rapid, quantitative conversion to adenosine in the extracellular space in rat hippocampus. *J Neurosci* 17:7673-7682.

---

## *E*

- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351:745-748.

Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N, Tobin AJ (1991) Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 7:91-100.

## F

- Fagni L, Chavis P, Ango F, Bockaert J (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci* 23:80-88.
- Feger J, Robledo P (1991) The Effects of Activation or Inhibition of the Subthalamic Nucleus on the Metabolic and Electrophysiological Activities Within the Pallidal Complex and Substantia Nigra in the Rat. *Eur J Neurosci* 3:947-952.
- Feger J, Bevan M, Crossman AR (1994) The projections from the parafascicular thalamic nucleus to the subthalamic nucleus and the striatum arise from separate neuronal populations: a comparison with the corticostriatal and corticosubthalamic efferents in a retrograde fluorescent double-labelling study. *Neuroscience* 60:125-132.
- Fiacco TA, Agulhon C, Taves SR, Petravicz J, Casper KB, Dong X, Chen J, McCarthy KD (2007) Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron* 54:611-626.
- Fields RD, Stevens B (2000) ATP: an extracellular signaling molecule between neurons and glia. *Trends Neurosci* 23:625-633.
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298:556-562.
- Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423-436.
- Filion M, Tremblay L (1991) Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Res* 547:142-151.
- Foffani G, Ardolino G, Egidio M, Caputo E, Bossi B, Priori A (2006) Subthalamic oscillatory activities at beta or higher frequency do not change after high-frequency DBS in Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 69:123-130.
- Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem* 42:1-11.
- Fonnum F, Paulsen RE (1990) Comparison of transmitter amino acid levels in rat globus pallidus and neostriatum during hypoglycemia or after treatment with methionine sulfoximine or gamma-vinyl gamma-aminobutyric acid. *J Neurochem* 54:1253-1257.
- Franke H, Krügel U, Grosche J, Illes P (2003) Immunoreactivity for glial fibrillary acidic protein and P2 receptor expression on astrocytes in vivo. *Drug Dev Res* 59:175-189.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11:83-93.
- Froes MM, de Carvalho AC (1998) Gap junction-mediated loops of neuronal-glia interactions. *Glia* 24:97-107.

## G

- Galati S, Mazzone P, Fedele E, Pisani A, Peppe A, Pierantozzi M, Brusa L, Tropepi D, Moschella V, Raiteri M, Stanzione P, Bernardi G, Stefani A (2006) Biochemical and electrophysiological changes of substantia nigra pars reticulata driven by subthalamic stimulation in patients with Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 23:2923-2928.
- Galvan A, Kuwajima M, Smith Y (2006) Glutamate and GABA receptors and transporters in the basal ganglia: what does their subsynaptic localization reveal about their function? *Neuroscience* 143:351-375.
- Garcia L, Audin J, D'Alessandro G, Bioulac B, Hammond C (2003) Dual effect of high-frequency stimulation on subthalamic neuron activity. *J Neurosci* 23:8743-8751.

- Garcia L, D'Alessandro G, Fernagut PO, Bioulac B, Hammond C (2005) Impact of high-frequency stimulation parameters on the pattern of discharge of subthalamic neurons. *J Neurophysiol* 94:3662-3669.
- Gauthier J, Parent M, Levesque M, Parent A (1999) The axonal arborization of single nigrostriatal neurons in rats. *Brain Res* 834:228-232.
- Gee KR, Brown KA, Chen WN, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* 27:97-106.
- Gerfen CR, Young WS, 3rd (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res* 460:161-167.
- Gerfen CR, Engber TM (1992) Molecular neuroanatomic mechanisms of Parkinson's disease: a proposed therapeutic approach. *Neurol Clin* 10:435-449.
- Gerfen CR, Staines WA, Arbuthnott GW, Fibiger HC (1982) Crossed connections of the substantia nigra in the rat. *J Comp Neurol* 207:283-303.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Giaume C, Venance L (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24:50-64.
- Gill SS, Heywood P (1997) Bilateral dorsolateral subthalamotomy for advanced Parkinson's disease. *Lancet* 350:1224.
- Gimsa U, Schreiber U, Habel B, Flehr J, van Rienen U, Gimsa J (2006) Matching geometry and stimulation parameters of electrodes for deep brain stimulation experiments--numerical considerations. *J Neurosci Methods* 150:212-227.
- Goetz CG, Tanner CM, Glantz RH, Klawans HL (1985) Chronic agonist therapy for Parkinson's disease: a 5-year study of bromocriptine and pergolide. *Neurology* 35:749-751.
- Gomide V, Chadi G (2005) Glial bFGF and S100 immunoreactivities increase in ascending dopamine pathways following striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system: a stereological analysis. *Int J Neurosci* 115:537-555.
- Greenamyre JT, Eller RV, Zhang Z, Ovadia A, Kurlan R, Gash DM (1994) Antiparkinsonian effects of remacemide hydrochloride, a glutamate antagonist, in rodent and primate models of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 35:655-661.
- Greenwood K, Butt AM (2003) Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival. *Mol Cell Neurosci* 23:544-558.
- Groenewegen HJ, Berendse HW (1990) Connections of the subthalamic nucleus with ventral striatopallidal parts of the basal ganglia in the rat. *J Comp Neurol* 294:607-622.
- Gross C, Rougier A, Guehl D, Boraud T, Julien J, Bioulac B (1997) High-frequency stimulation of the globus pallidus internalis in Parkinson's disease: a study of seven cases. *J Neurosurg* 87:491-498.
- Guridi J, Obeso JA (2001) The subthalamic nucleus, hemiballismus and Parkinson's disease: reappraisal of a neurosurgical dogma. *Brain* 124:5-19.

## *H*

- Haber SN, Groenewegen HJ, Grove EA, Nauta WJ (1985) Efferent connections of the ventral pallidum: evidence of a dual striato pallidofugal pathway. *J Comp Neurol* 235:322-335.

- Hald A, Lotharius J (2005) Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol* 193:279-290.
- Hammond C, Yelnik J (1983) Intracellular labelling of rat subthalamic neurones with horseradish peroxidase: computer analysis of dendrites and characterization of axon arborization. *Neuroscience* 8:781-790.
- Hammond C, Feger J, Bioulac B, Souteyrand JP (1979) Experimental hemiballism in the monkey produced by unilateral kainic acid lesion in corpus Luysii. *Brain Res* 171:577-580.
- Hammond C, Tritsch D (1990) *Neurobiologie cellulaire*, Edited by doin
- Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10:1387-1394.
- Hariz MI, Bergenheim AT (2001) A 10-year follow-up review of patients who underwent Leksell's posteroventral pallidotomy for Parkinson disease. *J Neurosurg* 94:552-558.
- Hashimoto T, Elder CM, Okun MS, Patrick SK, Vitek JL (2003) Stimulation of the subthalamic nucleus changes the firing pattern of pallidal neurons. *J Neurosci* 23:1916-1923.
- Hassani OK, Feger J (1999) Effects of intrasubthalamic injection of dopamine receptor agonists on subthalamic neurons in normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats: an electrophysiological and c-Fos study. *Neuroscience* 92:533-543.
- Hassani OK, Mouroux M, Feger J (1996) Increased subthalamic neuronal activity after nigral dopaminergic lesion independent of disinhibition via the globus pallidus. *Neuroscience* 72:105-115.
- Hassler R, Riechert T (1954) [Indications and localization of stereotactic brain operations.]. *Nervenarzt* 25:441-447.
- Hassler R, Usunoff KG, Romansky KV, Christ JF (1982) Electron microscopy of the subthalamic nucleus in the baboon. I. Synaptic organization of the subthalamic nucleus in the baboon. *J Hirnforsch* 23:597-611.
- Haydar TF, Bambrick LL, Krueger BK, Rakic P (1999) Organotypic slice cultures for analysis of proliferation, cell death, and migration in the embryonic neocortex. *Brain Res Brain Res Protoc* 4:425-437.
- Haydon PG (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2:185-193.
- Haydon PG, Blendy J, Moss SJ, Rob Jackson F (2008) Astrocytic control of synaptic transmission and plasticity: a target for drugs of abuse? *Neuropharmacology* 3:3.
- Hedberg TG, Veliskova J, Sperber EF, Nunes ML, Moshe SL (2003) Age-related differences in NMDA/metabotropic glutamate receptor binding in rat substantia nigra. *Int J Dev Neurosci* 21:95-103.
- Henschel O, Gipson KE, Bordey A (2008) GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:211-224.
- Herrero MT, Levy R, Ruberg M, Luquin MR, Villares J, Guillen J, Faucheux B, Javoy-Agid F, Guridi J, Agid Y, Obeso JA, Hirsch EC (1996) Consequence of nigrostriatal denervation and L-dopa therapy on the expression of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in the pallidum. *Neurology* 47:219-224.
- Hevers W, Luddens H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol* 18:35-86.
- Higgins CF (1995) The ABC of channel regulation. *Cell* 82:693-696.
- Hirsch EC, Breidert T, Rousset E, Hunot S, Hartmann A, Michel PP (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:214-228.
- Hirsch EC, Perier C, Orioux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Levy R, Tolosa ES, Marin C, Trinidad Herrero M, Obeso JA, Agid Y (2000) Metabolic effects of nigrostriatal denervation in basal ganglia. *Trends Neurosci* 23:S78-85.

- Hollerman JR, Grace AA (1992) Subthalamic nucleus cell firing in the 6-OHDA-treated rat: basal activity and response to haloperidol. *Brain Res* 590:291-299.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Houeto JL, Bejjani PB, Damier P, Staedler C, Bonnet AM, Pidoux B, Dormont D, Cornu P, Agid Y (2000) Failure of long-term pallidal stimulation corrected by subthalamic stimulation in PD. *Neurology* 55:728-730.
- Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
- Hubert GW, Smith Y (2004) Age-related changes in the expression of axonal and glial group I metabotropic glutamate receptor in the rat substantia nigra pars reticulata. *J Comp Neurol* 475:95-106.
- Hutchison WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Boraud T, Goldberg J, Brown P (2004) Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24:9240-9243.

*I*

- Ibanez-Sandoval O, Hernandez A, Floran B, Galarraga E, Tapia D, Valdiosera R, Erlij D, Aceves J, Vargas J (2006) Control of the subthalamic innervation of substantia nigra pars reticulata by D1 and D2 dopamine receptors. *J Neurophysiol* 95:1800-1811.
- Ikegaya Y, Le Bon-Jego M, Yuste R (2005) Large-scale imaging of cortical network activity with calcium indicators. *Neurosci Res* 52:132-138.
- Inoue K, Koizumi S, Tsuda M (2007) The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem* 102:1447-1458.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov SV, Stewart CL, Fields RD (2006) Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49:823-832.
- Israel Z, Bergman H (2008) Pathophysiology of the basal ganglia and movement disorders: from animal models to human clinical applications. *Neurosci Biobehav Rev* 32:367-377.

*J*

- Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8733-8738.
- James G, Butt AM (2002) P2Y and P2X purinoceptor mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in glial cell pathology in the central nervous system. *Eur J Pharmacol* 447:247-260.
- Jenkins SA, Simmons DD (2006) GABAergic neurons in the lateral superior olive of the hamster are distinguished by differential expression of gad isoforms during development. *Brain Res* 1111:12-25.
- Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* 10:331-339.

*K*

- Kaakkola S, Gordin A, Mannisto PT (1994) General properties and clinical possibilities of new selective inhibitors of catechol O-methyltransferase. *Gen Pharmacol* 25:813-824.
- Kawaguchi Y, Wilson CJ, Augood SJ, Emson PC (1995) Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends Neurosci* 18:527-535.

- Kettenmann H, Schachner M (1985) Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci* 5:3295-3301.
- Kettunen P, Demas J, Lohmann C, Kasthuri N, Gong Y, Wong RO, Gan WB (2002) Imaging calcium dynamics in the nervous system by means of ballistic delivery of indicators. *J Neurosci Methods* 119:37-43.
- Kew JN, Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4-29.
- Kincaid AE, Albin RL, Newman SW, Penney JB, Young AB (1992) 6-Hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal pathway alter the expression of glutamate decarboxylase messenger RNA in rat globus pallidus projection neurons. *Neuroscience* 51:705-718.
- Kita H, Kitai ST (1987) Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 260:435-452.
- Kita H, Kitai ST (1994) The morphology of globus pallidus projection neurons in the rat: an intracellular staining study. *Brain Res* 636:308-319.
- Kita H, Chang HT, Kitai ST (1983) The morphology of intracellularly labeled rat subthalamic neurons: a light microscopic analysis. *J Comp Neurol* 215:245-257.
- Kita H, Tachibana Y, Nambu A, Chiken S (2005) Balance of monosynaptic excitatory and disynaptic inhibitory responses of the globus pallidus induced after stimulation of the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurosci* 25:8611-8619.
- Kitai ST, Deniau JM (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain Res* 214:411-415.
- Koller W, Pahwa R, Busenbark K, Hubble J, Wilkinson S, Lang A, Tuite P, Sime E, Lazano A, Hauser R, Malapira T, Smith D, Tarsy D, Miyawaki E, Norregaard T, Kormos T, Olanow CW (1997) High-frequency unilateral thalamic stimulation in the treatment of essential and parkinsonian tremor. *Ann Neurol* 42:292-299.
- Krack P, Limousin P, Benabid AL, Pollak P (1997) Chronic stimulation of subthalamic nucleus improves levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Lancet* 350:1676.
- Krack P, Batir A, Van Blercom N, Chabardes S, Fraix V, Ardouin C, Koudsie A, Limousin PD, Benazzouz A, LeBas JF, Benabid AL, Pollak P (2003) Five-year follow-up of bilateral stimulation of the subthalamic nucleus in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 349:1925-1934.
- Kreiss DS, Mastropietro CW, Rawji SS, Walters JR (1997) The response of subthalamic nucleus neurons to dopamine receptor stimulation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 17:6807-6819.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

---

## *L*

- Lacombe E, Carcenac C, Boulet S, Feuerstein C, Bertrand A, Poupard A, Savasta M (2007) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus prolongs the increase in striatal dopamine induced by acute l-3,4-dihydroxyphenylalanine in dopaminergic denervated rats. *Eur J Neurosci* 26:1670-1680.
- Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI (1992) Leksell's posteroventral pallidotomy in the treatment of Parkinson's disease. *J Neurosurg* 76:53-61.
- Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 339:1130-1143.

- Lang AE, Lozano AM, Montgomery E, Duff J, Tasker R, Hutchinson W (1997) Posteroventral medial pallidotomy in advanced Parkinson's disease. *N Engl J Med* 337:1036-1042.
- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355:418-426.
- Lee KH, Roberts DW, Kim U (2003) Effect of high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus on subthalamic neurons: an intracellular study. *Stereotact Funct Neurosurg* 80:32-36.
- Lee MS, Marsden CD (1994) Movement disorders following lesions of the thalamus or subthalamic region. *Mov Disord* 9:493-507.
- Levesque JC, Parent A (2005) GABAergic interneurons in human subthalamic nucleus. *Mov Disord* 20:574-584.
- Levy R, Hazrati LN, Herrero MT, Vila M, Hassani OK, Mouroux M, Ruberg M, Asensi H, Agid Y, Feger J, Obeso JA, Parent A, Hirsch EC (1997) Re-evaluation of the functional anatomy of the basal ganglia in normal and Parkinsonian states. *Neuroscience* 76:335-343.
- Li D, Ropert N, Koulakoff A, Giaume C, Oheim M (2008) Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca<sup>2+</sup>-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J Neurosci* 28:7648-7658.
- Limousin P, Pollak P, Hoffmann D, Benazzouz A, Perret JE, Benabid AL (1996) Abnormal involuntary movements induced by subthalamic nucleus stimulation in parkinsonian patients. *Mov Disord* 11:231-235.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995) Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Mov Disord* 10:672-674.
- Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E, Perret JE, Benabid AL (1995b) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345:91-95.
- Lin SC, Bergles DE (2004) Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia* 47:290-298.
- Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE (2005) Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 46:773-785.
- Lozano AM, Dostrovsky J, Chen R, Ashby P (2002) Deep brain stimulation for Parkinson's disease: disrupting the disruption. *Lancet Neurol* 1:225-231.

## *M*

- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- MacVicar BA (1984) Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science* 226:1345-1347.
- Magarinos-Ascone C, Pazo JH, Macadar O, Buno W (2002) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus silences subthalamic neurons: a possible cellular mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience* 115:1109-1117.
- Magill PJ, Bolam JP, Bevan MD (2000) Relationship of activity in the subthalamic nucleus-globus pallidus network to cortical electroencephalogram. *J Neurosci* 20:820-833.
- Magnaghi V (2007) GABA and Neuroactive Steroid Interactions in Glia: New Roles for Old Players? *Curr Neuropharmacol* 5:47-64.

- Mailly P, Charpier S, Menetrey A, Deniau JM (2003) Three-dimensional organization of the recurrent axon collateral network of the substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Neurosci* 23:5247-5257.
- Mailly P, Charpier S, Mahon S, Menetrey A, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2001) Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections. *J Neurosci* 21:6874-6888.
- Malarkey EB, Papura V (2008) Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int* 52:142-154.
- Maltete D, Jodoin N, Karachi C, Houeto JL, Navarro S, Cornu P, Agid Y, Welter ML (2007) Subthalamic stimulation and neuronal activity in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neurophysiol* 97:4017-4022.
- Marino MJ, Wittmann M, Bradley SR, Hubert GW, Smith Y, Conn PJ (2001) Activation of group I metabotropic glutamate receptors produces a direct excitation and disinhibition of GABAergic projection neurons in the substantia nigra pars reticulata. *J Neurosci* 21:7001-7012.
- Martineau M, Baux G, Mothet JP (2006) D-serine signalling in the brain: friend and foe. *Trends Neurosci* 29:481-491.
- Matsumoto K, Shichijo F, Fukami T (1984) Long-term follow-up review of cases of Parkinson's disease after unilateral or bilateral thalamotomy. *J Neurosurg* 60:1033-1044.
- Maurice N, Deniau JM, Glowinski J, Thierry AM (1999) Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat: physiology of the cortico-nigral circuits. *J Neurosci* 19:4674-4681.
- Maurice N, Thierry AM, Glowinski J, Deniau JM (2003) Spontaneous and evoked activity of substantia nigra pars reticulata neurons during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 23:9929-9936.
- McGeer PL, McGeer EG (2008) Glial reactions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23:474-483.
- McGeorge AJ, Faull RL (1989) The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29:503-537.
- McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM (1997) Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389:870-876.
- McIntyre CC, Savasta M, Kerkerian-Le Goff L, Vitek JL (2004a) Uncovering the mechanism(s) of action of deep brain stimulation: activation, inhibition, or both. *Clin Neurophysiol* 115:1239-1248.
- McIntyre CC, Grill WM, Sherman DL, Thakor NV (2004b) Cellular effects of deep brain stimulation: model-based analysis of activation and inhibition. *J Neurophysiol* 91:1457-1469.
- Meier SD, Kafitz KW, Rose CR (2008) Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56:1127-1137.
- Meissner W, Leblois A, Hansel D, Bioulac B, Gross CE, Benazzouz A, Boraud T (2005) Subthalamic high frequency stimulation resets subthalamic firing and reduces abnormal oscillations. *Brain* 128:2372-2382.
- Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stefani A, Bernardi G (1995) Properties of the hyperpolarization-activated cation current  $I_h$  in rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 7:462-469.
- Mika J (2008) Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness. *Pharmacol Rep* 60:297-307.
- Mink JW (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol* 50:381-425.

- Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T (2000) The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience* 95:425-432.
- Moro E, Esselink RJ, Xie J, Hommel M, Benabid AL, Pollak P (2002) The impact on Parkinson's disease of electrical parameter settings in STN stimulation. *Neurology* 59:706-713.
- Mouroux M, Feger J (1993) Evidence that the parafascicular projection to the subthalamic nucleus is glutamatergic. *Neuroreport* 4:613-615.
- Muramatsu Y, Kurosaki R, Watanabe H, Michimata M, Matsubara M, Imai Y, Araki T (2003) Expression of S-100 protein is related to neuronal damage in MPTP-treated mice. *Glia* 42:307-313.
- Murer MG, Riquelme LA, Tseng KY, Pazo JH (1997) Substantia nigra pars reticulata single unit activity in normal and 6OHDA-lesioned rats: effects of intrastriatal apomorphine and subthalamic lesions. *Synapse* 27:278-293.

## N

- Nakanishi H, Kita H, Kitai ST (1987) Intracellular study of rat substantia nigra pars reticulata neurons in an in vitro slice preparation: electrical membrane properties and response characteristics to subthalamic stimulation. *Brain Res* 437:45-55.
- Nambu A, Tokuno H, Hamada I, Kita H, Imanishi M, Akazawa T, Ikeuchi Y, Hasegawa N (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurophysiol* 84:289-300.
- Neher E (1992) Nobel lecture. Ion channels for communication between and within cells. *Neuron* 8:605-612.
- Neher E, Sakmann B (1992) La technique du patch-clamp. *Pour la Science* 175:74-82.
- Nguyen JP, Degos JD (1993) Thalamic stimulation and proximal tremor. A specific target in the nucleus ventrointermedius thalami. *Arch Neurol* 50:498-500.
- Ni Z, Bouali-Benazzouz R, Gao D, Benabid AL, Benazzouz A (2000) Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *Eur J Neurosci* 12:4338-4344.
- Nishiyama A, Yang Z, Butt A (2005) Astrocytes and NG2-glia: what's in a name? *J Anat* 207:687-693.
- Nishiyama A, Watanabe M, Yang Z, Bu J (2002) Identity, distribution, and development of polydendrocytes: NG2-expressing glial cells. *J Neurocytol* 31:437-455.

## O

- Oades RD, Halliday GM (1987) Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res* 434:117-165.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci* 29:547-553.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Arbizu J, Gimenez-Amaya JM (2002) The basal ganglia and disorders of movement: pathophysiological mechanisms. *News Physiol Sci* 17:51-55.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, Olanow CW (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23:S8-19.
- Ochi M, Shiozaki S, Kase H (2004) Adenosine A<sub>2A</sub> receptor-mediated modulation of GABA and glutamate release in the output regions of the basal ganglia in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 127:223-231.

- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS (2004) Lewy-body formation is an aggregates-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3:496-503.
- Orieux G, Francois C, Feger J, Hirsch EC (2002) Consequences of dopaminergic denervation on the metabolic activity of the cortical neurons projecting to the subthalamic nucleus in the rat. *J Neurosci* 22:8762-8770.
- Orieux G, Francois C, Feger J, Yelnik J, Vila M, Ruberg M, Agid Y, Hirsch EC (2000) Metabolic activity of excitatory parafascicular and pedunculopontine inputs to the subthalamic nucleus in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 97:79-88.
- Ostrem JL, Starr PA (2008) Treatment of dystonia with deep brain stimulation. *Neurotherapeutics* 5:320-330.
- Oueslati A, Sgambato-Faure V, Melon C, Kachidian P, Gubellini P, Amri M, Kerkerian-Le Goff L, Salin P (2007) High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus potentiates L-DOPA-induced neurochemical changes in the striatum in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 27:2377-2386.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.

---

*P*

- Padmashri R, Sikdar SK (2008) Glutamate transporter blockade affects Ca(2+) responses in astrocytes. *Neuroscience* 151:56-62.
- Pan HS, Walters JR (1988) Unilateral lesion of the nigrostriatal pathway decreases the firing rate and alters the firing pattern of globus pallidus neurons in the rat. *Synapse* 2:650-656.
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125:775-784.
- Pankratov Y, Lalo U, Verkhratsky A, North RA (2006) Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflugers Arch* 452:589-597.
- Pankratov Y, Lalo U, Krishtal OA, Verkhratsky A (2008) P2X receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 23:23.
- Parent A (1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13:254-258.
- Parent A, Hazrati LN (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain Res Brain Res Rev* 20:128-154.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J Neurosci* 17:7817-7830.
- Patel NK, Heywood P, O'Sullivan K, McCarter R, Love S, Gill SS (2003) Unilateral subthalamotomy in the treatment of Parkinson's disease. *Brain* 126:1136-1145.
- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F (1987) An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. *J Neurochem* 48:1377-1385.
- Penit-Soria J, Durand C, Herve D, Besson MJ (1997) Morphological and biochemical adaptations to unilateral dopamine denervation of the neostriatum in newborn rats. *Neuroscience* 77:753-766.
- Perea G, Araque A (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 38:375-382.
- Perier C, Tremblay L, Feger J, Hirsch EC (2002) Behavioral consequences of bicuculline injection in the subthalamic nucleus and the zona incerta in rat. *J Neurosci* 22:8711-8719.

- Pernot P, Mothet JP, Schuvailo O, Soldatkin A, Pollegioni L, Pilone M, Adeline MT, Cespuglio R, Marinesco S (2008) Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. *Anal Chem* 80:1589-1597.
- Petersen OH, Michalak M, Verkhratsky A (2005) Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium* 38:161-169.
- Platel JC, Dupuis A, Boisseau S, Villaz M, Albrieux M, Brocard J (2007) Synchrony of spontaneous calcium activity in mouse neocortex before synaptogenesis. *Eur J Neurosci* 25:920-928.
- Plenz D, Kital ST (1999) A basal ganglia pacemaker formed by the subthalamic nucleus and external globus pallidus. *Nature* 400:677-682.
- Plenz D, Herrera-Marschitz M, Kitai ST (1998) Morphological organization of the globus pallidus-subthalamic nucleus system studied in organotypic cultures. *J Comp Neurol* 397:437-457.
- Pollak P, Benabid AL, Limousin P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Perret J (1996) Subthalamic nucleus stimulation alleviates akinesia and rigidity in parkinsonian patients. *Adv Neurol* 69:591-594.
- Pollak P, Benabid AL, Gross C, Gao DM, Laurent A, Benazzouz A, Hoffmann D, Gentil M, Perret J (1993) [Effects of the stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson disease]. *Rev Neurol (Paris)* 149:175-176.
- Potier M, Trebak M (2008) New developments in the signaling mechanisms of the store-operated calcium entry pathway. *Pflugers Arch* 457:405-415.
- Porter JT, McCarthy KD (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51:439-455.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO (2003). *Neuroscience*, editeur De Boeck, 2ème édition française.

## R

- Ralevic V, Burnstock G (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50:413-492.
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, De Deyn PP, Clarke CE, Lang AE (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N Engl J Med* 342:1484-1491.
- Ravizza T, Friedman LK, Moshe SL, Veliskova J (2003) Sex differences in GABA(A)ergic system in rat substantia nigra pars reticulata. *Int J Dev Neurosci* 21:245-254.
- Ray CD, Burton CV (1980) Deep brain stimulation for severe, chronic pain. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 30:289-293.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89:1009-1023.
- Reiner A, Medina L, Haber SN (1999) The distribution of dynorphinergic terminals in striatal target regions in comparison to the distribution of substance P-containing and enkephalinergic terminals in monkeys and humans. *Neuroscience* 88:775-793.
- Richards CD, Shiroyama T, Kitai ST (1997) Electrophysiological and immunocytochemical characterization of GABA and dopamine neurons in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 80:545-557.
- Rimessi A, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R (2008) The versatility of mitochondrial calcium signals: from stimulation of cell metabolism to induction of cell death. *Biochim Biophys Acta* 1777:808-816.

- Rizzone M, Lanotte M, Bergamasco B, Tavella A, Torre E, Faccani G, Melcarne A, Lopiano L (2001) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease: effects of variation in stimulation parameters. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:215-219.
- Robledo P, Feger J (1990) Excitatory influence of rat subthalamic nucleus to substantia nigra pars reticulata and the pallidal complex: electrophysiological data. *Brain Res* 518:47-54.
- Rodriguez Diaz M, Alonso TJ, Perdomo Diaz J, Gonzalez Hernandez T, Castro Fuentes R, Sabate M, Garcia Dopico J (2005) Glial regulation of nonsynaptic extracellular glutamate in the substantia nigra. *Glia* 49:134-142.
- Rocheffort NL, Jia H, Konnerth A (2008) Calcium imaging in the living brain: prospects for molecular medicine. *Trends Mol Med* 12:12.
- Rogers J, Mastroeni D, Leonard B, Joyce J, Grover A (2007) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: are microglia pathogenic in either disorder? *Int Rev Neurobiol* 82:235-246.
- Rosales MG, Martinez-Fong D, Morales R, Nunez A, Flores G, Gongora-Alfaro JL, Floran B, Aceves J (1997) Reciprocal interaction between glutamate and dopamine in the pars reticulata of the rat substantia nigra: a microdialysis study. *Neuroscience* 80:803-810.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.

## S

- Santello M, Volterra A (2008) Synaptic modulation by astrocytes via Ca(2+)-dependent glutamate release. *Neuroscience* 22:22.
- Sato F, Lavallee P, Levesque M, Parent A (2000) Single-axon tracing study of neurons of the external segment of the globus pallidus in primate. *J Comp Neurol* 417:17-31.
- Savasta M, Windels F, Bruet N, Bertrand A, Poupard A (2002) Neurochemical modifications induced by high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in rats. *The Basal Ganglia VII*, Edited by Nicholson and Faull, Kluwer Academic/Plenum Publishers pp. 581-90
- Schuurman PR, Bosch DA, Bossuyt PM, Bonsel GJ, van Someren EJ, de Bie RM, Merkus MP, Speelman JD (2000) A comparison of continuous thalamic stimulation and thalamotomy for suppression of severe tremor. *N Engl J Med* 342:461-468.
- Scolari MJ, Acosta GB (2007) D-serine: a new word in the glutamatergic neuro-glia language. *Amino Acids* 33:563-574.
- Seifert G, Schilling K, Steinhauser C (2006) Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci* 7:194-206.
- Sellstrom A, Hamberger A (1977) Potassium-stimulated gamma-aminobutyric acid release from neurons and glia. *Brain Res* 119:189-198.
- Shammah-Lagnado SJ, Alheid GF, Heimer L (1996) Efferent connections of the caudal part of the globus pallidus in the rat. *J Comp Neurol* 376:489-507.
- Shen KZ, Johnson SW (1997) Presynaptic GABAB and adenosine A1 receptors regulate synaptic transmission to rat substantia nigra reticulata neurones. *J Physiol* 505 ( Pt 1):153-163.
- Shen KZ, Johnson SW (2006) Subthalamic stimulation evokes complex EPSCs in the rat substantia nigra pars reticulata in vitro. *J Physiol* 573:697-709.
- Sherwood CC, Stimpson CD, Raghanti MA, Wildman DE, Uddin M, Grossman LI, Goodman M, Redmond JC, Bonar CJ, Erwin JM, Hof PR (2006) Evolution of increased glia-

- neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:13606-13611.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45:250-265.
- Shimamoto K, Lebrun B, Yasuda-Kamatani Y, Sakaitani M, Shigeri Y, Yumoto N, Nakajima T (1998) DL-threo-beta-benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol Pharmacol* 53:195-201.
- Siegfried J, Lippitz B (1994) Bilateral chronic electrostimulation of ventroposterolateral pallidum: a new therapeutic approach for alleviating all parkinsonian symptoms. *Neurosurgery* 35:1126-1129; discussion 1129-1130.
- Slaght SJ, Paz T, Mahon S, Maurice N, Charpier S, Deniau JM (2002) Functional organization of the circuits connecting the cerebral cortex and the basal ganglia: implications for the role of the basal ganglia in epilepsy. *Epileptic Disord* 4 Suppl 3:S9-22.
- Smetters D, Majewska A, Yuste R (1999) Detecting action potentials in neuronal populations with calcium imaging. *Methods* 18:215-221.
- Smith AD, Bolam JP (1990) The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurones. *Trends Neurosci* 13:259-265.
- Smith Y, Villalba R (2008) Striatal and extrastriatal dopamine in the basal ganglia: An overview of its anatomical organization in normal and Parkinsonian brains. *Mov Disord* 23:S534-S547.
- Smith Y, Shink E, Sidibe M (1998) Neuronal circuitry and synaptic connectivity of the basal ganglia. *Neurosurg Clin N Am* 9:203-222.
- Smith Y, Bennett BD, Bolam JP, Parent A, Sadikot AF (1994) Synaptic relationships between dopaminergic afferents and cortical or thalamic input in the sensorimotor territory of the striatum in monkey. *J Comp Neurol* 344:1-19.
- Soghomonian JJ, Chesselet MF (1992) Effects of nigrostriatal lesions on the levels of messenger RNAs encoding two isoforms of glutamate decarboxylase in the globus pallidus and entopeduncular nucleus of the rat. *Synapse* 11:124-133.
- Soghomonian JJ, Doucet G, Descarries L (1987) Serotonin innervation in adult rat neostriatum. I. Quantified regional distribution. *Brain Res* 425:85-100.
- Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A (2003) In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7319-7324.
- Surmeier DJ, Song WJ, Yan Z (1996) Coordinated expression of dopamine receptors in neostriatal medium spiny neurons. *J Neurosci* 16:6579-6591.
- Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K, De Stefani D, Leo S, Wieckowski MR, Rizzuto R (2006) Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochim Biophys Acta* 1763:442-449.
- Szabo G, Katarova Z, Greenspan R (1994) Distinct protein forms are produced from alternatively spliced bicistronic glutamic acid decarboxylase mRNAs during development. *Mol Cell Biol* 14:7535-7545.
- Szerb JC, Issekutz B (1987) Increase in the stimulation-induced overflow of glutamate by fluoroacetate, a selective inhibitor of the glial tricarboxylic cycle. *Brain Res* 410:116-120.

---

## *T*

- Tai CH, Boraud T, Bezard E, Bioulac B, Gross C, Benazzouz A (2003) Electrophysiological and metabolic evidence that high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus bridles neuronal activity in the subthalamic nucleus and the substantia nigra reticulata. *Faseb J* 17:1820-1830.

- Tan SK, Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2006) The subthalamic nucleus: From response selection to execution. *J Chem Neuroanat* 31:155-161.
- Teismann P, Schulz JB (2004) Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res* 318:149-161.
- Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2003) Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 18:121-129.
- Temel Y (2008) Subthalamic nucleus stimulation in Parkinson's disease: the other side of the medallion. *Exp Neurol* 211:321-323.
- Temel Y, Blokland A, Steinbusch HW, Visser-Vandewalle V (2005) The functional role of the subthalamic nucleus in cognitive and limbic circuits. *Prog Neurobiol* 76:393-413.
- Tepper JM, Martin LP, Anderson DR (1995) GABAA receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *J Neurosci* 15:3092-3103.
- Thobois S, Delamarre-Damier F, Derkinderen P (2005) Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. *Clin Neurol Neurosurg* 107:269-281.
- Thobois S, Dominey P, Fraix V, Mertens P, Guenot M, Zimmer L, Pollak P, Benabid AL, Broussolle E (2002) Effects of subthalamic nucleus stimulation on actual and imagined movement in Parkinson's disease : a PET study. *J Neurol* 249:1689-1698.
- Tsacopoulos M, Magistretti PJ (1996) Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16:877-885.
- Tymianski M, Bernstein GM, Abdel-Hamid KM, Sattler R, Velumian A, Carlen PL, Razavi H, Jones OT (1997) A novel use for a carbodiimide compound for the fixation of fluorescent and non-fluorescent calcium indicators in situ following physiological experiments. *Cell Calcium* 21:175-183.

---

 V
 

---

- Vandecasteele M, Glowinski J, Deniau JM, Venance L (2008) Chemical transmission between dopaminergic neuron pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4904-4909.
- Veening JG, Cornelissen FM, Lieven PA (1980) The topical organization of the afferents to the caudatoputamen of the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 5:1253-1268.
- Venance L, Stella N, Glowinski J, Giaume C (1997) Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci* 17:1981-1992.
- Venance L, Cordier J, Monge M, Zalc B, Glowinski J, Giaume C (1995) Homotypic and heterotypic coupling mediated by gap junctions during glial cell differentiation in vitro. *Eur J Neurosci* 7:451-461.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci* 19:6897-6906.
- Verkhratsky A (2002) The endoplasmic reticulum and neuronal calcium signalling. *Cell Calcium* 32:393-404.
- Verkhratsky A (2006) Patching the glia reveals the functional organisation of the brain. *Pflugers Arch* 453:411-420.
- Verkhratsky A, Kettenmann H (1996) Calcium signalling in glial cells. *Trends Neurosci* 19:346-352.
- Verkhratsky A, Steinhauser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380-412.

- Verkhatsky A, Kirchhoff F (2007a) Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat* 210:651-660.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F (2007b) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 13:28-37.
- Verkhatsky A, Orkand RK, Kettenmann H (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev* 78:99-141.
- Verkhatsky A, Butt A (2007) *Glial Neurobiology A textbook*. Edited by Wiley
- Verrall L, Walker M, Rawlings N, Benzel I, Kew JN, Harrison PJ, Burnet PW (2007) d-Amino acid oxidase and serine racemase in human brain: normal distribution and altered expression in schizophrenia. *Eur J Neurosci* 26:1657-1669.
- Vesce S, Bezzi P, Volterra A (2001) Synaptic transmission with the glia. *News Physiol Sci* 16:178-184.
- Vila M, Levy R, Herrero MT, Ruberg M, Faucheux B, Obeso JA, Agid Y, Hirsch EC (1997) Consequences of nigrostriatal denervation on the functioning of the basal ganglia in human and nonhuman primates: an in situ hybridization study of cytochrome oxidase subunit I mRNA. *J Neurosci* 17:765-773.
- Vingerhoets FJ, Villemure JG, Temperli P, Pollo C, Pralong E, Ghika J (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: two-year follow-up. *Neurology* 58:396-401.
- Vitek JL (2002) Mechanisms of deep brain stimulation: excitation or inhibition. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S69-72.
- Volkman J, Allert N, Voges J, Sturm V, Schnitzler A, Freund HJ (2004) Long-term results of bilateral pallidal stimulation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 55:871-875.
- Volkman J, Sturm V, Weiss P, Kappler J, Voges J, Koulousakis A, Lehrke R, Hefter H, Freund HJ (1998) Bilateral high-frequency stimulation of the internal globus pallidus in advanced Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44:953-961.
- Volterra A, Meldolesi J (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6:626-640.

---

## W

- Walter BL, Vitek JL (2004) Surgical treatment for Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 3:719-728.
- Wang DD, Bordey A (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol* 1:1.
- Welter ML, Mallet L, Houeto JL, Karachi C, Czernecki V, Cornu P, Navarro S, Pidoux B, Dormont D, Bardinet E, Yelnik J, Damier P, Agid Y (2008) Internal pallidal and thalamic stimulation in patients with Tourette syndrome. *Arch Neurol* 65:952-957.
- Whittier JR (1947) Ballism and the subthalamic nucleus hypothalamicus; corpus luysi) review of the literature and study of 30 cases. *Arch Neurol Psychiatry* 58:672-692.
- Whittier JR, Mettler FA (1949) Studies on the subthalamus of the rhesus monkey; hyperkinesia and other physiologic effects of subthalamic lesions; with special reference to the subthalamic nucleus of Luys. *J Comp Neurol* 90:319-372.
- Wigley R, Hamilton N, Nishiyama A, Kirchhoff F, Butt AM (2007) Morphological and physiological interactions of NG2-glia with astrocytes and neurons. *J Anat* 210:661-670.
- Windels F, Carcenac C, Poupard A, Savasta M (2005) Pallidal origin of GABA release within the substantia nigra pars reticulata during high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosci* 25:5079-5086.
- Windels F, Bruet N, Poupard A, Feuerstein C, Bertrand A, Savasta M (2003) Influence of the frequency parameter on extracellular glutamate and gamma-aminobutyric acid in substantia nigra and globus pallidus during electrical stimulation of subthalamic nucleus in rats. *J Neurosci Res* 72:259-267.

- 
- Windels F, Bruet N, Poupard A, Urbain N, Chauvet G, Feuerstein C, Savasta M (2000) Effects of high frequency stimulation of subthalamic nucleus on extracellular glutamate and GABA in substantia nigra and globus pallidus in the normal rat. *Eur J Neurosci* 12:4141-4146.
- Wittmann M, Hubert GW, Smith Y, Conn PJ (2001) Activation of metabotropic glutamate receptor 1 inhibits glutamatergic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 105:881-889.
- Wolosker H, Dumin E, Balan L, Foltyn VN (2008) d-Amino acids in the brain: d-serine in neurotransmission and neurodegeneration. *Febs J* 275:3514-3526.
- Wu Y, Richard S, Parent A (2000) The organization of the striatal output system: a single-cell juxtacellular labeling study in the rat. *Neurosci Res* 38:49-62.

## $\gamma$

- 
- Yasoshima Y, Kai N, Yoshida S, Shiosaka S, Koyama Y, Kayama Y, Kobayashi K (2005) Subthalamic neurons coordinate basal ganglia function through differential neural pathways. *J Neurosci* 25:7743-7753.
- Yuan X, Eisen AM, McBain CJ, Gallo V (1998) A role for glutamate and its receptors in the regulation of oligodendrocyte development in cerebellar tissue slices. *Development* 125:2901-2914.

## Z

- 
- Zhang JM, Wang HK, Ye CQ, Ge W, Chen Y, Jiang ZL, Wu CP, Poo MM, Duan S (2003) ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40:971-982.
- Zhang L, Zhang C, Zhu Y, Cai Q, Chan P, Ueda K, Yu S, Yang H (2008) Semi-quantitative analysis of alpha-synuclein in subcellular pools of rat brain neurons: An immunogold electron microscopic study using a C-terminal specific monoclonal antibody. *Brain Res* 4:4.
- Zhang Z, Chen G, Zhou W, Song A, Xu T, Luo Q, Wang W, Gu XS, Duan S (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol* 9:945-953.

La stimulation haute fréquence (SHF) du noyau sous-thalamique (NST) est un traitement efficace dans l'abolition des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent ces effets sont encore loin d'être élucidés. Le laboratoire avait précédemment montré que la SHF du NST entraîne une augmentation des taux extracellulaires de glutamate et de GABA chez les animaux éveillés ou anesthésiés dans une des principales structures cibles du NST, la substance noire réticulée (SNr). Au niveau de la SNr, les données suggèrent que la régulation de l'activité des neurones nigraux est due à la mise en œuvre conjointe d'une excitation des neurones glutamatergiques du NST et une implication des fibres de passages GABAergiques provenant du GPe et passant au voisinage de la zone sous-thalamique stimulée. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier l'implication des cellules gliales dans les réponses cellulaires de la SNr, sous stimulation du NST, et repose sur la mise en place d'une technique d'imagerie sur tranches de cerveau de rat adultes. Les tranches horizontales de cerveau contiennent à la fois le NST et la SNr, avec un maintien des connexions glutamatergiques subthalamonigrales. Dans un premier temps, nous avons montré par immunohistochimie que la SNr contient 32% de neurones pour 68% de cellules gliales. Par la suite, nous avons montré que la SHF du NST induit une réponse calcique dans environ 12% des cellules gliales de la SNr. Ces réponses calciques enregistrées dans les cellules gliales impliquent à la fois du glutamate, du GABA et de l'ATP libérés dans la SNr lors de la SHF du NST. Cette étude a donc permis de montrer que les transmetteurs libérés dans la SNr sous l'effet de la SHF du NST, comme le glutamate et le GABA, peuvent activer les cellules gliales de cette structure. Elle a également permis de mettre en évidence la libération au sein de la SNr, d'un des principaux gliotransmetteurs, l'ATP. Ainsi, les cellules gliales de la SNr répondent à la SHF du NST, et il est probable qu'elles soient impliquées dans la modulation de l'activité neuronale de cette structure.

Mots-clé : ganglions de la base, noyau sous-thalamique, substance noire réticulée, calcium, cellules gliales, ATP, glutamate, GABA

High-frequency stimulation of the subthalamic nucleus (STN-HFS) is an effective treatment for alleviating the motor symptoms of parkinsonian patients. However, the cellular and molecular mechanisms of its effects remain under debate. Marc Savasta's laboratory had previously shown that, in awake or anaesthetized rats, STN-HFS increased extracellular glutamate and GABA contents in one of the main output nuclei of the STN, substantia nigra pars reticulata (SNr). Within the SNr, data suggested that, under NST stimulation, the regulation of neuronal activity is conjointly due to the excitation of NST glutamatergic neurons and the involvement of GABAergic fibers coming from the GPe and passing near the stimulated area. The aim of the present study is to study glial cell implication in the cellular response to STN-HFS within the SNr, by using a calcium imaging technique in adult rat brain slices. Rat brain horizontal slices, containing both STN and SNr, and respecting at best their glutamatergic connections, were used.

We show by immunohistochemistry that the SNr contains 32% of neuron versus 68% of glial cells. Then, we show that STN-HFS induced a calcium response in almost 12% of SNr glial cells population. These calcium responses involved the release of glutamate, GABA and ATP within the SNr. Thus, this study shows that glutamate and GABA, known to be released within SNr under STN-HFS, are able to activate glial cells. Moreover, it provides evidence that ATP, one of the main gliotransmitter, is released within the SNr under STN-HFS. Thus, SNr glial cells respond to the STN-HFS and could potentially be involved in the modulation of neuronal activity in this structure.

Keyword : basal ganglia, subthalamic nucleus, substantia nigra reticulata, calcium, glial cells, ATP, glutamate, GABA