



HAL
open science

Les neurones pyramidaux corticaux dans le couplage neurovasculaire et neurométabolique : mécanismes cellulaires et moléculaires

Alexandre Lacroix

► **To cite this version:**

Alexandre Lacroix. Les neurones pyramidaux corticaux dans le couplage neurovasculaire et neurométabolique : mécanismes cellulaires et moléculaires. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066200 . tel-01551401v1

HAL Id: tel-01551401

<https://theses.hal.science/tel-01551401v1>

Submitted on 30 Jun 2017 (v1), last revised 21 Sep 2017 (v2)

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité: Neurosciences

Ecole doctorale Cerveau Cognition Comportement ED n° 158 (ED3C)

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie – Paris VI

Les neurones pyramidaux corticaux dans le couplage neurovasculaire et neurométabolique : mécanismes cellulaires et moléculaires

Présenté par

Alexandre LACROIX

Soutenue publiquement le 24 septembre 2014

Devant un jury composé de :

Mme CHARRIAUT-MARLANGUE Christiane	Directeur de Recherche	Rapporteur
M GURDEN Hirc	Directeur de Recherche	Rapporteur
Mme ANGULO Maria Cecilia	Directeur de Recherche	Examineur
M PONCER Jean-Christophe	Directeur de Recherche	Représentant UPMC
M CAULI Bruno	Directeur de Recherche	Directeur de Thèse

À ma Mère, mon Père, ma Soeur

À Aude

À mes Grands-Parents

Je vous dédie ce travail

Avant-propos

Je remercie le Directeur de Recherche Mme Christiane CHARRIAUT-MARLANGUE ainsi que le Directeur de Recherche M Hirc GURDEN d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de doctorat. Je tenais à vous exprimer ma reconnaissance pour cette lourde tâche.

Le Directeur de Recherche M Jean-Christophe PONCER, je vous remercie respectueusement de me faire l'honneur d'être président de jury de ma thèse.

Je remercie également le Directeur de Recherche Mme Maria Cécilia ANGULO d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse pour en examiner le travail.

Je voudrais exprimer ma gratitude au Pr Jean MARIANI puis au Directeur de Recherche M Hervé CHNEIWEISS pour m'avoir donné la possibilité de poursuivre mes études au sein du laboratoire de « Neurobiologie des Processus Adaptatifs » puis au sein du laboratoire « Neuroscience Paris Seine » et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Bruno CAULI qui a dirigé et supervisé mon travail depuis mon stage de Master 2 et durant ces 3 années de thèse. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour la disponibilité qu'il m'a accordée. Sans son aide et ses connaissances scientifiques, je n'aurais pas pu obtenir tous ces résultats. Je tiens à le remercier de m'avoir donné la possibilité de participer à des congrès scientifiques au cours desquels j'ai beaucoup appris. Enfin, je tiens à le remercier de m'avoir donné l'opportunité de réaliser des collaborations autant nationales qu'internationales.

Je tiens à remercier chaleureusement Bertrand LAMBOLEZ, autant pour la qualité de ces conseils avisés que pour sa bonne humeur quotidienne.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Pr Edith HAMEL et au Pr Tim MURPHY de m'avoir permis de collaborer avec leur équipe respective. Merci à Clotilde LECRUX et à Eitan ANENBERG pour leur implication et leur travail.

Je souhaite remercier également les membres que j'ai pu côtoyer au sein de l'équipe Réseau Cortical et Couplage Neurovasculaire. Merci à Annatassios KARAGIANNIS pour toute son aide et ses conseils durant mon apprentissage de la technique du patch-clamp ainsi que pour l'important travail auquel j'ai eu l'honneur d'avoir eu accès et pour lequel j'ai pris beaucoup de plaisir à faire évoluer (dans le bon sens je l'espère !). Je remercie aussi Fabrice PLAISIER pour nos discussions et ses conseils sur la méthode de RT-PCR sur cellule unique ainsi que pour les nombreuses données sur les astrocytes et de RT-PCR qu'il a réalisées et dont j'ai pu profiter ! Je remercie également Juliette PIQUET, qui a dû subir le partage de son bureau avec moi !! J'espère que je ne t'aurai pas trop traumatisé ! Je remercie aussi Agnès BONNOT pour nos discussions et l'aide qu'elle a pu m'apporter. Un grand merci également à Najate BENAMER et nos discussions fleuves et à Antoine BERGEL pour son soutien à mon humour pendant nos pauses. Je remercie également Audrey HAY, Shinobu NOMURA, Lim-Ana SIEU Régine HEPP, Ivan COHEN, Ludovic TRICOIRE pour toutes les discussions riches en informations !

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à l'ensemble des membres du 5^{ème} étage. Je remercie Nathalie LERESCHE, Régis LAMBERT, Pierre VINCENT, Philippe FAURE et Laure RONDI-REIG, ainsi que tous les membres des équipes du 5^{ème}. Je tenais à exprimer ma reconnaissance particulièrement à Philippe FAURE pour toute l'aide et le soutien qu'il a pu m'apporter et à Frédéric JARLIER pour son implication et sa bonne humeur.

Je tenais aussi à remercier les membres du laboratoire qui veillent (ou qui ont veillé !) à son bon fonctionnement, à savoir Caroline, Marie-Jo, Sylvie, Bernadette et Emmanuel.

Je voulais exprimer ma grande reconnaissance à Xavier TOUSSAY, avec qui j'ai pu construire et entretenir (et j'espère que cela durera !) une amitié sincère. Je te remercie pour nos discussions fortes, ton implication dans le travail, ton implication dans le suivi du mercato...!! Merci pour ton soutien et l'aide que tu as pu m'apporter ! Et comme dirai Tiziano...

Je voulais également remercier : Patrick CHAUSSON, pour sa bonne humeur et son humour quotidien (allez...Viens ! Regarde comme on est bien !!!), Michael QUICAMPOIX pour son calme olympien et ses avis toujours objectifs, Romain PIGEAT pour nos interactions diverses et variées autant pendant les Doctoriales® que durant ces 4 années passées ensemble. Merci autant pour l'humour décalé que pour les discussions plus sérieuses (et souvent houleuses !). Merci à la mère de Maud pour les gâteaux qui ont pu transiter par Romain et que j'ai pu goûter !

Je remercie aussi Marina BRITO pour sa gentillesse et sa générosité, ces discussions musicales toujours au top et sa bonne humeur quotidienne ! Je n'oublie pas Mariana RAMOS pour sa bonne humeur et sa gentillesse également !

Je voulais également exprimer ma reconnaissance et mon amitié à Marina POLITO avec qui j'ai pu partager beaucoup de bons moments ! Merci d'avoir été là pendant ces 2 premières années de thèse, merci pour ton implication, ta générosité et ta sincérité ! Merci pour ton écoute sans jugement, merci pour tes conseils ! J'espère qu'on retournera voir quelques concerts ensemble !

Je remercie Sébastien pour sa fidélité inconditionnelle et son optimisme, Charles et son jeu atypique et Pierre pour son côté Morrisonien ! François pour son jeu « Frusciante », Gautier et son Blues mais aussi Matthieu et son touché funk et David pour ses vocalises !

Un gros merci pour Adrien, Steven, Baptiste « le manouche » et John. Merci pour le son, merci Adrien et Steven pour ces Jams Funky, merci Baptiste pour nos (trop court) Jam et nos discussions. Un grand merci à John à qui j'exprime ma sincère et profonde amitié, et t'inquiètes « ktk Aj ». À Risin'Son et au Magic Band, merci tout simplement pour vous !

Maud et Fabien, Je tenais à vous remercier pour votre présence, elle a été d'une grande aide pour moi ! Merci pour tous les bons moments passés ensemble durant cette thèse. Merci pour le coul' caf' et par contre je ne sais pas comment parler de ce liquide rose... ! Voilà mon manuscrit, j'ai décidé de le mettre sur papier mais si vous voulez, je vous la mets sur clé USB avec un motif galaxies qui bouge !!

Axel, Briva, Erwan, Martin, Max, Tony, Vic, je tenais à vous remercier pour votre soutien inconditionnel et nos délires à n'en plus finir ! Merci pour votre ouverture d'esprit, les découvertes littéraires et musicales, nos discussions passionnantes et riches d'espoir ! Merci !

A Laurent, merci pour ton dévouement et ton aide. J'espère qu'on arrivera à aller pêcher le bar un jour ! Je suis très reconnaissant envers tout ce que tu as pu faire autant pour moi que pour Delphine que pour Maman. Merci encore !

A Brigitte, merci de m'avoir poussé à renvoyer une lettre de candidature au Master BIP ! Je n'en serai pas là sans ça ! Merci pour 20** WF 59, j'aurais eu plus de mal à circuler sans elle !

Je voulais également remercier la famille BUREL pour leur soutien et pour tous les moments passés. Merci encore à ma deuxième famille !

Je remercie toute ma famille qui m'a soutenu de près ou de loin sur le chemin de ce travail.

A Delphine, merci pour tout mais il va falloir que tu fasses quelque chose pour ce picotement des yeux !

Je voulais porter une attention particulière à mes grands-parents, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans toutes mes entreprises. Merci d'avoir toujours cru en moi !

A mes parents, à qui je dois énormément, je vous remercie pour votre éducation exemplaire, votre soutien indéfectible, votre amour. Merci de m'avoir permis de faire toutes ces études. Sans votre implication et votre aide, je n'aurais certainement pas pu arriver jusque-là. Merci pour tout ! Papa, merci pour ton soutien et tes conseils, merci d'être toujours à mon écoute. Merci aussi pour ces parties de pêche, c'est toujours un moment particulier pour moi (spécialement quand je gagne par un mini brochet !). Maman, je voulais te remercier particulièrement pour ton dévouement pour que je puisse faire les études que je voulais. Merci d'être là à mon écoute. Merci de croire en moi dans tout ce que je fais ! Merci de m'avoir trimballé au début de mes péripéties musicales, je n'aurais pas fait tout ça sans toi ! Je pourrai encore écrire mais je garde ça pour plus tard !

Enfin, à ma petite femme chérie, je voulais te montrer tout mon amour. Je te remercie d'avoir accepté tous les sacrifices pour que je puisse faire mon chemin, je te suis énormément reconnaissant. Merci pour tout le soutien, merci d'avoir été là pendant les moments de doute sans quoi je n'aurais certainement pas été jusque-là. Ça n'a pas été facile mais on a réussi à faire face tous les deux ! Ce travail, tu le connais par cœur ! Merci pour ta patience et ton dévouement durant toutes ces années, je ne pourrai te remercier assez ici, je garde ça pour la sphère privée. L'important, c'est le chemin et non le but, le but n'est qu'une illusion repoussée indéfiniment, mais le chemin est le présent. Ce chemin partagé à deux depuis longtemps est essentiel et vital pour construire l'arborescence d'une vie. Je te suis tellement reconnaissant pour tout cela ! $A+A=A$

Les travaux réalisés au cours de ma thèse feront l'objet de trois publications :

Article 1 (Soumis dans le journal « Neuron ») :

Sources and targets of vasodilatory prostanoids in the rodent neocortex

Lacroix A, Toussay X, Anenberg E, Lecrux C, Karagiannis A, Plaisier F, Chausson P, Jarlier F, Burgess S.A, Hillman E.M.C, Murphy T.H, Hamel E and Cauli B

Article 2 (En préparation pour soumission dans le journal « Journal of Neuroscience ») :

Tissue plasminogen activator-ergic neurons are a subpopulation of pyramidal cells in the rodent neocortex

Louessard M, Lacroix A, Hazalin N, Montagne A, Lesept F, Martineau M, Lambolez B, Cauli B, Mothet J-P, Vivien D and Maubert E

Article 3 (En préparation) :

Multifaceted roles of lactate in the cerebral cortex

Karagiannis A, Lacroix A, Plaisier F, Belliveau L, Hepp R, Gallopin T, Geoffroy H, David C, Jarlier F, L'Heureux B, Burgess S.A, Lambolez B, Staiger J.F, Seino S, Hillman E.M.C, Roeper J and Cauli B

Les résultats de ces publications ont été présentés dans différents congrès :

Poster :

Cortical Pyramidal cells are a major source of vasodilatory prostanoids

Lacroix A, Plaisier F, Karagiannis A, Toussay X, Chausson P, Jarlier F, Burgess S.A, McCaslin A.F.H, Hamel E, Hillman E.M.C and Cauli B

-Society for Neuroscience, November 9-13, San Diego, California, USA (2013)

-11^{ème} colloque Société des Neurosciences, 21-24 Mai 2013, Lyon, France (2013)

-8th Forum of Neuroscience, July 14-18, Barcelone, Spain (2012)

-Réunion annuelle Société d'Etude des Interfaces Sang-Cerveau, 26 Octobre, Paris, France (2011)

Oral :

Cortical Pyramidal cells are a major source of vasodilatory prostanoids

Lacroix A, Plaisier F, Karagiannis A, Toussay X, Chausson P, Jarlier F, Burgess S.A, McCaslin A.F.H, Hamel E, Hillman E.M.C and Cauli B

-Colloque Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires, 20 Janvier, Paris, France (2012)

Résumé

Le couplage étroit entre l'activité neuronale et l'augmentation du flux sanguin, appelé couplage neurovasculaire, est essentiel aux fonctions cérébrales. Ce processus est par ailleurs à la base de l'imagerie médicale cérébrale non invasive largement utilisée pour déterminer l'activité neuronale chez l'individu sain ou malade. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires de ce couplage restent encore débattus. La compréhension de ce processus permettra non seulement une interprétation plus fine des signaux d'imagerie cérébrale mais également un meilleur diagnostic des maladies neurologiques.

De nombreux messagers vasoactifs sont impliqués dans le couplage neurovasculaire du cortex cérébral. Les prostanoïdes, notamment libérés lors de l'activation des récepteurs NMDA, sont responsables de près de la moitié de l'augmentation de flux sanguin cérébral induite par des stimulations sensorielles. Cependant, l'origine cellulaire, moléculaire, la nature ainsi que les cibles de ces messagers lipidiques restent incertaines.

La prostaglandine E₂ (PGE₂) et la prostacycline (PGI₂) sont les deux principaux prostanoïdes vasodilatateurs du cortex cérébral. Ils sont produits à partir d'enzymes limitantes, les cyclo-oxygénases de type 1 ou 2 (COX-1 ou COX-2) et d'enzymes terminales spécifiques. J'ai montré, sur tranches de cortex cérébral de rats, que les vasodilatations induites par le NMDA dépendaient de la COX-2 mais pas de la COX-1. Ces réponses nécessitent également l'activation des récepteurs EP2 et EP4 de la PGE₂ et IP de la PGI₂. De plus, *in vivo*, l'augmentation de flux évoquée par la stimulation des vibrisses est également atténuée par les antagonistes des récepteurs EP2 et EP4. Ces données *in vitro* et *in vivo* montrent donc l'implication de la PGE₂ et de ses récepteurs dans ces réponses vasodilatatrices.

La caractérisation des cellules productrices de prostanoïdes vasodilatateurs montre que les neurones pyramidaux sont les principales cellules du cortex cérébral équipées pour la biosynthèse de la PGE₂ et, dans une moindre mesure, de la PGI₂. Un tiers d'entre elles co-expriment notamment la COX-2 et une enzyme terminale de synthèse de la PGE₂. De plus, nos données *in vivo* ont montré que la stimulation optogénétique des neurones pyramidaux corticaux induit une réponse neurovasculaire dépendante de l'activité de la COX-2.

L'ensemble de ces travaux démontre que les neurones pyramidaux sont capables, via l'activité de la COX-2 et la libération de la PGE₂, d'agir sur les récepteurs vasodilatateurs EP2 et EP4. Ces neurones pyramidaux jouent donc un rôle clé dans le couplage neurovasculaire cortical.

Sommaire

Avant-propos	i
Résumé	viii
Sommaire	1
Liste des abréviations	6
Liste des figures	8
Introduction	11
A. Le néocortex : structure aux multiples facettes	13
I. Les premières observations du néocortex font apparaître une structure organisée	14
1. L'observation microscopique révèle une organisation en couche... ..	15
2. ...et une organisation en colonne	18
II. Le néocortex est constitué de cellules gliales, de neurones et d'un système vasculaire étroitement liés	19
1. Il existe trois types de cellules gliales : les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les astrocytes.....	19
2. Dans le cortex, le réseau neuronal est composé de neurones excitateurs et de neurones inhibiteurs.....	22
3. Le système vasculaire repose sur un réseau d'artères, de capillaires et de veines	30
4. L'étroite relation neuro-glio-vasculaire	35
5. L'acteur final des réponses vasculaires : la cellule musculaire lisse.....	36
B. Couplage neurovasculaire : relation étroite entre l'activité neuronale et le flux sanguin	39
I. Le couplage neurovasculaire comme source de détection de l'activité neuronale	39
1. Un principe fondamental découvert à la fin du XIXème siècle : l'hyperémie fonctionnelle.....	39
2. Le tissu cérébral doit réguler son apport énergétique	40
3. Comment mesurer les variations de débit sanguin cérébral et l'activité neuronale chez l'être humain?.....	44

4. L'activité neuronale et les variations de débit sanguin cérébral peuvent être disséquées par des méthodes sur des modèles animaux.....	50
II. La régulation du couplage neurovasculaire cortical a une origine extrinsèque et intrinsèque	53
1. La régulation extrinsèque périphérique agit de façon majoritaire sur les vaisseaux piaux.....	53
2. La régulation intrinsèque d'origine sous-corticale régule le flux sanguin du cortex ...	56
3. De nombreux messagers vasoactifs régulent le flux sanguin cortical local.....	56
III. Le couplage neurométabolique fournit l'énergie nécessaire aux fonctions neuronales	78
1. Il existe une étroite relation métabolique entre les astrocytes et les neurones.....	79
2. Les astrocytes assurent la capture du glutamate issu de l'activité synaptique.....	80
3. Recapture du glutamate et libération du lactate par les astrocytes : l'hypothèse de la « navette lactate ».....	80
Problématique	85
Matériels et Méthodes.....	89
I. RT-PCR sur cellule unique après patch-clamp.....	91
II. Analyse des propriétés de décharge des neurones.....	93
1. Propriétés électriques passives de membrane	93
2. Propriétés de décharge de PA au seuil	93
3. Propriétés de décharge de PA.....	94
4. Propriétés des potentiels d'action.....	94
III. Réactivité vasculaire <i>ex vivo</i>	95
III. Imageries cellulaires.....	96
1. Animaux et préparation des tranches	96
2. Autofluorescence du couple $NAD^+/NADH+H^+$	97
3. Expression en tranches du biosenseur FRET	98
4. Imagerie intracellulaire de l'ATP par biosenseur FRET.....	98
5. Analyse des données d'imagerie	99
Résultats	101
A. Article I : Origines et cibles des prostanoides vasodilatateurs dans le néocortex de rongeurs	104

I. Le couplage neurovasculaire cortical est régi par de nombreux messagers vasoactifs	104
II. Les neurones pyramidaux et la COX-2 dans les réponses vasculaires	105
1. Le NMDA induit des vasodilatations dépendantes de la COX-2.....	105
2. Les neurones pyramidaux sont équipés pour la synthèse de la PGE ₂ via l'activité COX-2	108
3. Les neurones pyramidaux à COX-2 induisent des vasodilatations <i>in vivo</i>	110
III. La libération de la PGE₂ par les neurones pyramidaux déclenche une vasodilatation dans le néocortex de rongeurs	111
IV. Article	111
B. Article II : Influence du lactate et des canaux K_{ATP} sur l'activité neuronale	143
I. L'apport énergétique est essentiel pour les neurones	143
II. Le lactate comme substrat énergétique neuronal.....	144
1. Les canaux K _{ATP} régulent l'activité neuronale.....	144
2. Les neurones sont capables de métaboliser le glucose et le lactate	145
3. Les neurones ont une sensibilité plus élevée pour le lactate que pour le glucose.....	146
4. Les neurones ont une capacité de phosphorylation oxydative accrue.....	148
III. Les neurones tirent leur énergie principalement du lactate qui est transformé en ATP modulant leur activité par les canaux K_{ATP}	151
C. Article III : Preuve de l'existence d'une sous-population de neurones pyramidaux exprimant le <i>tissue plasminogen activator</i> dans le néocortex de rongeurs	152
I. Le tPA est une molécule multifonction mais sa localisation cellulaire reste peu connue.....	152
II. Le tPA est exprimé dans un type de neurone particulier... ..	153
1. L'expression du tPA dans le système nerveux central se localise dans certains types cellulaires	153
2. Le tPA est stocké dans des vésicules permettant sa libération dans le milieu extracellulaire	158
III. ...formant une sous-population de neurones glutamatergiques excitateurs tPAergiques.....	159
IV. Article	159

Discussions	193
A. Origines et cibles des prostanoides vasodilatateurs dans le néocortex de rongeurs	196
I. Origine cellulaire de la PGE ₂ et de la PGI ₂	196
II. Contribution relative des récepteurs aux prostanoides dans les réponses vasculaires.....	198
III. Implication des prostanoides dans les processus physiopathologiques	199
B. Influence du lactate et des canaux K_{ATP} sur l'activité neuronale	200
I. Les canaux K _{ATP} dans la régulation de l'activité neuronale.....	200
II. Le substrat énergétique et les neurones.....	201
C. Preuve de l'existence d'une sous-population de neurones pyramidaux exprimant le <i>tissue plasminogen activator</i> dans le néocortex de rongeurs	206
I. Le tPA est exprimé dans les neurones pyramidaux.....	206
II. Le tPA dans la régulation du flux sanguin cérébral.....	208
Conclusion.....	211

Liste des abréviations

20-HETE : *20-Hydroxy-EicosaTetraEonic acid* (Acide 20-hydroxy-écosatétraeonique)

4-CIN : *α -cyano-4-hydroxyCINnamic acid*

7-NI : 7-NitroIndazole (inhibiteur de la nNOS)

A_{2A} : Récepteur de type 2A de l'adénosine

A_{2B} : Récepteur de type 2B de l'adénosine

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

ANP : *Adapting Nonpyramidal Neuron* (Décharge adaptante de cellule non pyramidale)

ARN : Acide RiboNucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

Ba²⁺ : Barium (bloquant des K_{ir})

BK : *Big Potassium channels* (Canaux potassiques à grande conductance)

BOLD : *Blood Oxygen Level Dependent*

CaM : CalModuline

CaMKII : *Calcium/calModulin-dependent protein Kinase II* (Protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante)

CB : CalBindine D-28k

CCD : Charge-Coupled Device (dispositif à transfert de charge)

CCK : CholeCystoKinine

CGRP : *Calcitonin Gene Related Peptide*

COX : Cyclo-OXygénase

cPGES : Forme cytosolique de la PGES

CR : CalRetinine

CYP : CYtochrome P450

DAG : DiAcylGlycérol

DIC : *Differential Interference Contrast*

DOI : *Diffuse Optical Imaging*

EEG : ElectroEncéphaloGraphie

EET : *EpoxyEicosaTrienoic Acid* (Acide époxyeicosatrienoïque)

eNOS : *endothelial Nitric Oxide Synthase*

EP : Récepteur de la prostaglandine E₂

FDG : FluoroDésoxyGlucose

fNIRS : *functional Near-InfraRed Spectroscopy*

FRET : *Fluorescence Resonance Energy Transfer*

FS : *Fast Spiking* (Décharge rapide)

fUS : *functional UltraSound imaging*

GABA : *γ -AminoButyric Acid* (Acide γ -aminobutyrique)

GAD : *Glutamic Acid Decarboxylase* (enzyme de synthèse du GABA)

GC : Guanylase Cyclase

GFAP : *Glial Fibrillary Acidic Protein* (Protéine acide fibrillaire gliale)

GLAST : *GLutamate ASpartate Transporter*

GLT-1 : *GLial glutamate Transporter 1*

GluT3 : *Glucose Transporter 3*

GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution*

IB : *Intrinsically Bursting* (Décharge en bouffée)

iNOS : *inducible Nitric Oxide Synthase*

IOS : *Intrinsic Optical Signal*

IP : Récepteur de la prostacycline

IP3 : Inositol 1,4,5-triPhosphate

IR : InfraRouge

IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

IS : *Irregular Spiking* (Decharge irrégulière)

K_{ATP} : Canaux potassiques sensibles à l'ATP intracellulaire

K_{Ca} : Canaux potassiques sensibles au calcium

K_{ir} : *Inwardly Rectifying Potassium channels* (Canaux potassiques à rectification entrante)

KO : *Knock Out*

LCRa : Liquide CéphaloRachidien artificiel

LDH : Lactate DésHydrogénase

L-NA : Nitro-L-Arginine (Inhibiteur des NOS)

LS : *Late Spiking* (Décharge retardée)

MCT : *MonoCarboxylate Transporter* (Transporteur des monocarboxylates)

MEG : MagnetoEncéphaloGraphie

MEM : *Minimum Essential Medium*

MLCK : *Myosin Light-Chain Kinase* (Kinase de la myosine LC20)

mPGES-1 : Forme microsomale de type 1 de la PGES

mPGES-2 : Forme microsomale de type 2 de la PGES

NAD+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NMDA : *N-Méthyl-D-Aspartate*

nNOS : *neuronal Nitric Oxide Synthase*

NO : *Nitric Oxide* (Monoxyde d'azote)

NOS : *Nitric Oxide Synthase*

NPY : Neuropeptide Y

P2Y : Récepteur Purinergique 2 de type Y

PA : Potentiel d'Action

PACAP : *Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide*

PGE2 : ProstaGlandine E₂

PGES : ProstaGlandine E₂ Synthase

PGH2 : ProstaGlandine H₂

PGI2 : Prostacycline

PGIS : Prostacycline Synthase

PKA : Protéine Kinase A

PKC : Protéine Kinase C

PLA₂ : PhosphoLipase A₂

PLC : PhosphoLipase C

PSD-95 : *PostSynaptic Density-95*

PV : ParaValbumine

RS : *Regular Spiking* (Décharge habituelle)

RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (Transcription inverse-Reaction de polymérisation en chaîne)

SOM : SOMatostatine

SUR : *SulfonylUrea Receptor* (Récepteur aux sulfonilurées)

t-ACPD : *trans-1-AminoCyclopentane-1,3 Dicarboxylic acid* (agoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate de type II)

TEP : Tomographie par Emission de Positrons

tPA : *tissue Plasminogen Activator*

TRP : *Transient Receptor Potential*

TRPV4 : Isoforme 4 de la sous famille V des *Transient Receptor Potential*

TTX : TétrodoToXine (Bloquant des canaux sodiques voltages dépendants)

UV : Ultra Violet

VDCC : *Voltage-Dependent Calcium Channels* (Canaux calciques voltages dépendants)

VGluT1 : *Vesicular Glutamate Transporter 1* (Transporteur vésiculaire du glutamate de type 1)

VIP : *Vasoactive Intestinal Peptide* (Peptide vasoactif intestinal)

VPAC1 : Récepteur au VIP

VSD : *Voltage Sensitive Dye*

Liste des figures

Figure 1. Lobes du cerveau.....	13
Figure 2. Les aires de Brodmann	14
Figure 3. Premier dessin d'un cortex organisé en couche (T. Meynert)	16
Figure 4. Les différentes techniques de coloration.....	17
Figure 5. Organisation cellulaire du cortex en tonneaux du rongeur	18
Figure 6. Les différentes cellules gliales	19
Figure 7. Représentation schématique de l'activation microgliale.....	20
Figure 8. Oligodendrocyte	21
Figure 9. Différents types d'astrocytes	22
Figure 10. Exemple de représentation de neurones établie par Ramón y Cajal	23
Figure 11. Représentation de cellules pyramidales du néocortex	24
Figure 12. Epines dendritiques de cellules pyramidales.....	25
Figure 13. Différents profils de décharge de neurones pyramidaux	26
Figure 14. Différents types d'interneurones de la couche V du gyrus temporal supérieur d'un enfant âgé d'un mois	27
Figure 15. Reconstruction morphologique des différents types cellulaires	28
Figure 16. Caractérisation morphologique d'interneurones périvasculaires.....	30
Figure 17. La circulation artérielle du cerveau	31
Figure 18. Organisation de la microcirculation cérébrale et relation neuro-glio-vasculaire.....	32
Figure 19. Caractéristiques morphologiques des artères et des veines	34
Figure 20. Représentation du drainage veineux cérébral.....	35
Figure 21. Les astrocytes recouvrent la totalité du lit vasculaire	35
Figure 22. Structure schématique de l'unité neurovasculaire	36
Figure 23. Représentation schématique du fonctionnement des relaxations/contractions des cellules musculaires lisses.....	37
Figure 24. L'autorégulation cérébrovasculaire permet de maintenir la pression sanguine	40
Figure 25. Le tonus myogénique permet de répondre aux variations de pression.....	41
Figure 26. Un grand nombre de messagers vasoactifs d'origine neuronale et astrocytaire sont impliqués dans le couplage neurovasculaire.....	42
Figure 27. Le principe de la TEP utilise une molécule biologique marquée par un radioisotope émetteur de positrons.....	45
Figure 28. Le spectre d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la déoxyhémoglobine est différent dans les longueurs d'onde proche infrarouge	46
Figure 29. Le matériel d'enregistrement du fNIRS reste très mobile	47
Figure 30. Le potentiel électrique est généré par les courants synaptiques au niveau des cellules pyramidales	48
Figure 31. Les différentes techniques d'imagerie sont complémentaires autant au niveau des résolutions temporelles que spatiales	49
Figure 32. Schéma du montage optique permettant de visualiser, par IR-DIC, le tissu biologique	53
Figure 33. Représentation des grands types d'innervations corticales	54
Figure 34. Les neurones pyramidaux périvasculaires ont des appositions dendritiques sur les vaisseaux adjacents	57

Figure 35. La synthèse du NO induit par la NOS	59
Figure 36. Le NO issu des interneurons intervient dans différentes voies de synthèses	60
Figure 37. Le NO intervient de différentes façons dans la régulation du couplage neurovasculaire.....	62
Figure 38. Le rôle hypothétique du NO.....	63
Figure 39. Rôle des différents peptides produits par les interneurons sur le couplage neurovasculaire.....	65
Figure 39. La synthèse des prostanoides	66
Figure 40. La synthèse de la prostaglandine E₂ et de la prostacycline.....	67
Figure 41. Les différents types de récepteurs de la prostaglandine E₂.....	68
Figure 42. La synthèse des EETs et du 20-HETE est faite à partir de l'acide arachidonique	70
Figure 43. L'augmentation de calcium dans les astrocytes, à la suite d'une activité synaptique, induit une synthèse puis une libération d'EETs	71
Figure 44. L'augmentation de calcium dans les astrocytes, à la suite d'une activité synaptique, induit une synthèse puis une libération du 20-HETE	72
Figure 45. Le NO joue un rôle central dans la contribution à la réponse vasculaire des EETs et du 20-HETE	74
Figure 46. Les différents types de canaux potassiques	76
Figure 47. Hypothèse historique de la navette lactate	81
Figure 48. L'importance des MCTs et des LDHs dans la navette lactate	83
Figure 49. Les vasodilatations induites par le NMDA sont dépendantes de la COX-2 et des récepteurs EP2, EP4 et IP	106
Figure 50. L'augmentation du flux sanguin induit par la stimulation de vibrisses est dépendante des récepteurs EP2 et EP4	107
Figure 51. L'expression de la COX-2 est restreinte à une sous-population de neurones pyramidaux.....	108
Figure 52. Profil d'expression des enzymes de biosynthèse de la PGE₂ et de la PGI₂ dans les astrocytes, les neurones pyramidaux et les interneurons	109
Figure 53. La stimulation optogénétique des neurones pyramidaux induit une vasodilatation dépendante de la COX-2.....	111
Figure 54. Le lactate exacerbe l'activité des neurones corticaux.....	146
Figure 55. Le lactate exacerbe l'activité neuronale via la fermeture des canaux K_{ATP}.	148
Figure 56. Le lactate est métabolisé dans les neurones	149
Figure 57. La phosphorylation oxydative est prépondérante dans le métabolisme des neurones	150
Figure 58. Schéma hypothétique du mécanisme de couplage métabo-neuronal par les canaux K_{ATP}.....	151
Figure 59. L'expression du tPA est localisée dans certains types cellulaires.....	154
Figure 60. L'expression du tPA est visible dans certaines fibres et dans certains corps cellulaires de neurones	155
Figure 61. Le blocage <i>in vivo</i> du transport axodendritique par la colchicine révèle des neurones tPAergiques	156
Figure 62. Le blocage <i>in vivo</i> du transport axodendritique par la colchicine révèle des neurones tPAergiques dans 4 cortex.....	157
Figure 63. Caractérisation électrophysiologique, morphologique et moléculaire d'un neurone pyramidal de la couche V du néocortex exprimant le tPA	158
Figure 64. Schéma récapitulatif des différents acteurs cellulaires et moléculaires définis du couplage neurovasculaire	215

Introduction

*« L'éducation est l'arme la plus puissante qu'on puisse utiliser pour changer le monde »
Nelson Mandela*

A. Le néocortex : structure aux multiples facettes

Défini comme l'apogée hiérarchique du système nerveux central, le néocortex est impliqué dans de nombreux procédés complexes. Il joue notamment un rôle dans des processus cognitifs primordiaux comme le langage, la pensée abstraite, l'imagination ou encore la conscience. Sa plasticité en fait également une structure en constante progression, mettant à jour des capacités d'apprentissage quasiment infinies.

Le néocortex est la structure cérébrale acquise la plus récemment au cours de l'évolution. Originnaire du télencéphale, il apparaît avec les mammifères et représente la partie la plus superficielle du cerveau. D'aspect lisse chez les mammifères dits « primitifs » (lissencéphales), le néocortex des mammifères dits « supérieurs » (gyrencéphales) est formé de nombreuses circonvolutions (**Figure 1**).

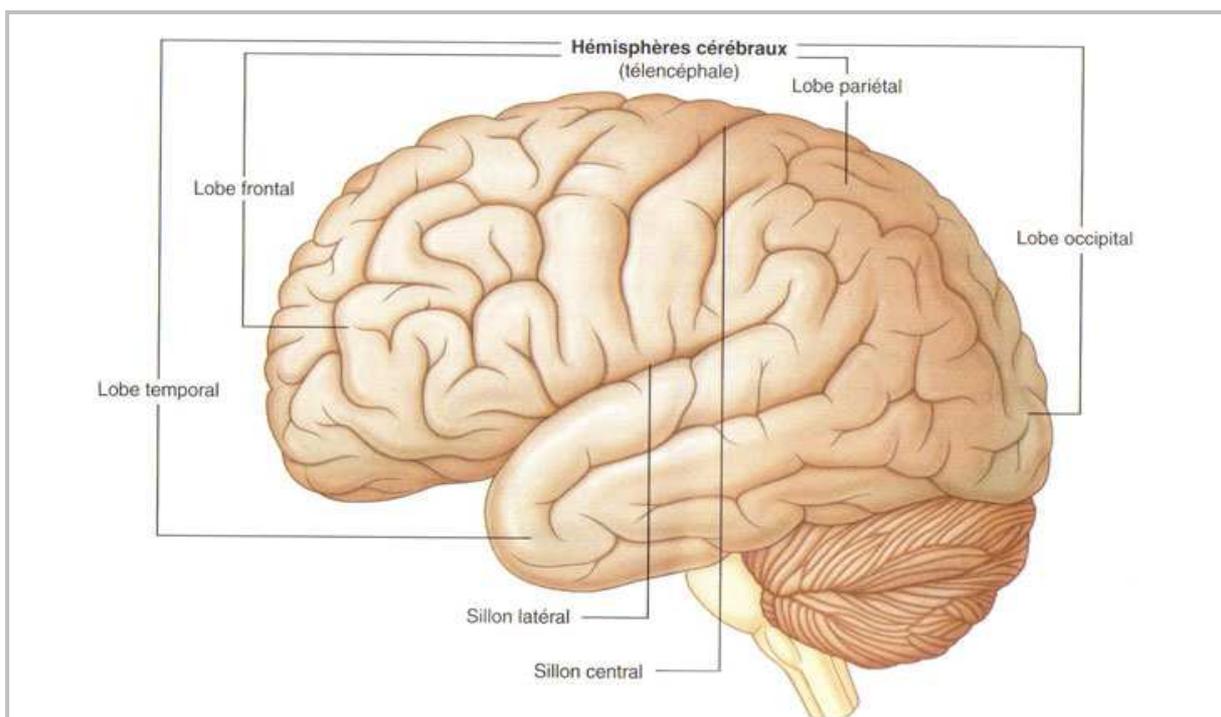


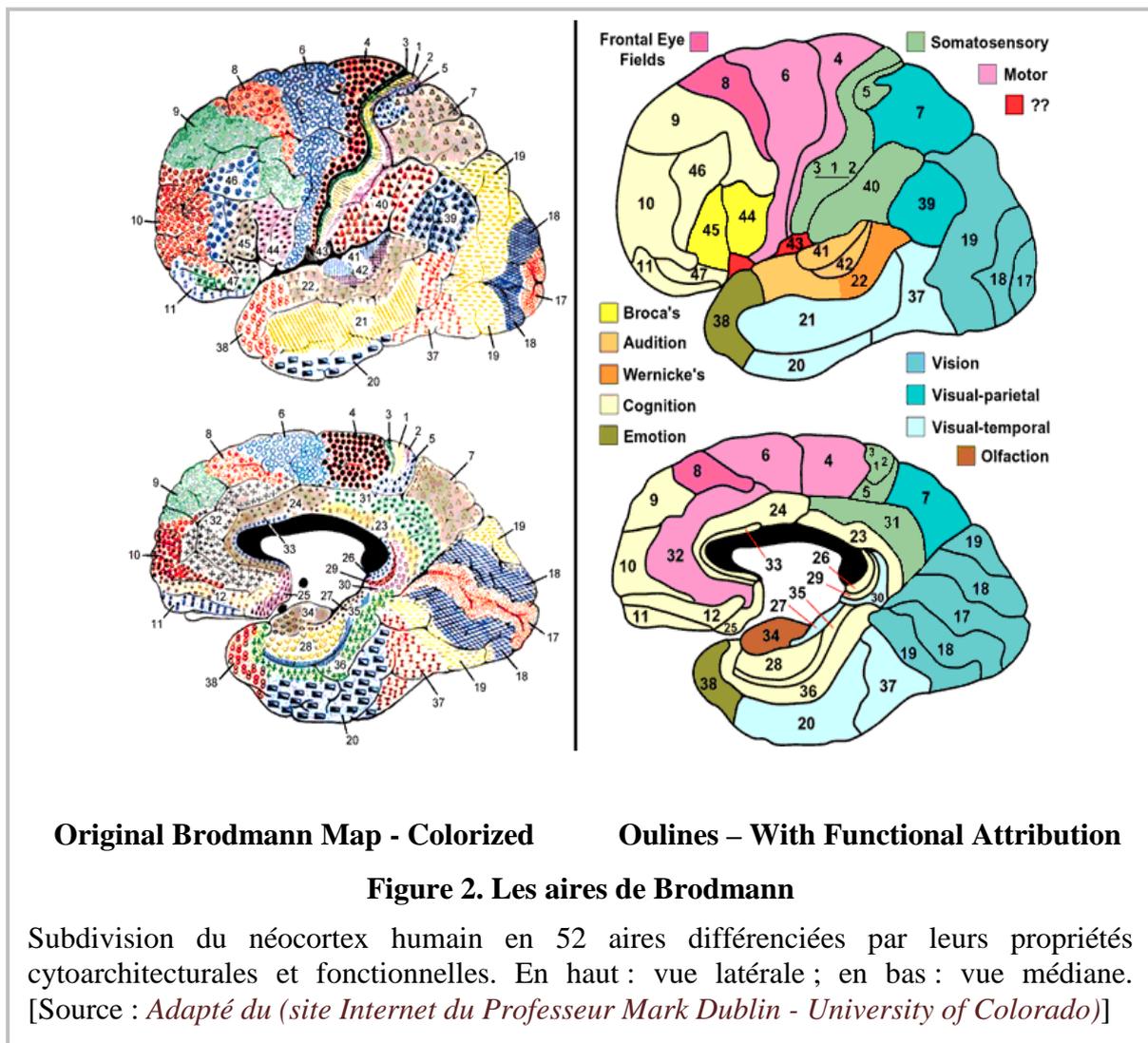
Figure 1. Lobes du cerveau

Le sillon latéral (ou scissure de Sylvius) sépare le lobe frontal du lobe temporal ; le sillon central sépare quant à lui le lobe frontal du lobe pariétal. Le lobe occipital représente la partie la plus postérieure du cerveau. [Source : (*Joel-caserus.info*)]

I. Les premières observations du néocortex font apparaître une structure organisée

Au cours du XIX^{ème} siècle, le neurologue français Paul Broca a mis en évidence la localisation de fonctions cérébrales. La description *post mortem* du cerveau d'un de ses patients lui a permis de faire la relation entre une lésion du lobe frontal gauche et l'incapacité de son patient à parler. En multipliant ces observations sur d'autres cas, Paul Broca fit le lien entre le lobe frontal gauche et le langage.

En 1909, le neuroanatomiste allemand Korbinian Brodmann a divisé le néocortex en 52 aires corticales. Il se basa sur la taille des neurones, leur densité, le nombre de couches présentes dans chaque région étudiée et l'abondance des axones myélinisés. Il les regroupa en aires motrices, sensorielles et associatives (**Figure 2**). Il élargit alors l'hypothèse de Paul Broca en



postulant qu'à chaque aire corticale correspond une fonction spécifique. À la fin du XX^{ème} siècle, la mise au point d'imageries cérébrales non invasives comme l'IRMf¹ ou encore la TEP² ont permis de valider cette théorie (ces techniques sont développées dans la partie B.I.).

Le néocortex est classiquement délimité par des sillons et des fissures. Ces différentes caractéristiques anatomiques permettent de cartographier quatre lobes distincts (**Figure 1**) : le lobe frontal, qui comprend l'aire motrice principale responsable de la genèse des mouvements volontaires ; le lobe pariétal (séparé du lobe frontal par le sillon central), faisant apparaître les aires somesthésiques ; le lobe occipital, situé à l'arrière du cerveau, mettant à jour le cortex visuel et le lobe temporal. Borné par le sillon latéral et replié vers l'avant, ce lobe temporal est composé des aires impliquées dans l'audition ou la mémoire (^aBear, 2001).

Certaines de ces aires corticales ont leur équivalent chez les mammifères plus « primitifs ». On va pouvoir trouver, par exemple chez le rat, l'aire sensorimotrice qui est l'équivalent humain des aires somesthésiques et motrices.

1. L'observation microscopique révèle une organisation en couches...

Un des principaux traits caractéristiques partagé par le néocortex de mammifères est son organisation laminaire. C'est l'Allemand Theodor Meynert, au milieu du XIX^{ème} siècle, qui réalisa le premier dessin d'un cortex formé par différentes couches (**Figure 3**). De son point de vue, la stratification corticale la plus représentée dans le cortex correspondait en une succession de cinq couches distinctes.

La première couche contenait un petit nombre de cellules. La seconde était caractérisée par de petites cellules pyramidales tandis que la troisième présentait de grosses cellules pyramidales. La quatrième couche faisait apparaître des cellules aux formes multiples. La cinquième mettait en évidence de petites cellules pyramidales larges et des cellules fusiformes (pour revue, voir Jones, 1984). L'avancée des techniques de coloration, notamment l'imprégnation à l'argent de Golgi, la coloration de Nissl et la coloration de fibres myélinisées ont permis de décrire plus précisément la cytoarchitecture du néocortex (**Figure 4**).

¹ IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle

² TEP : Tomographie par Emission de Positrons

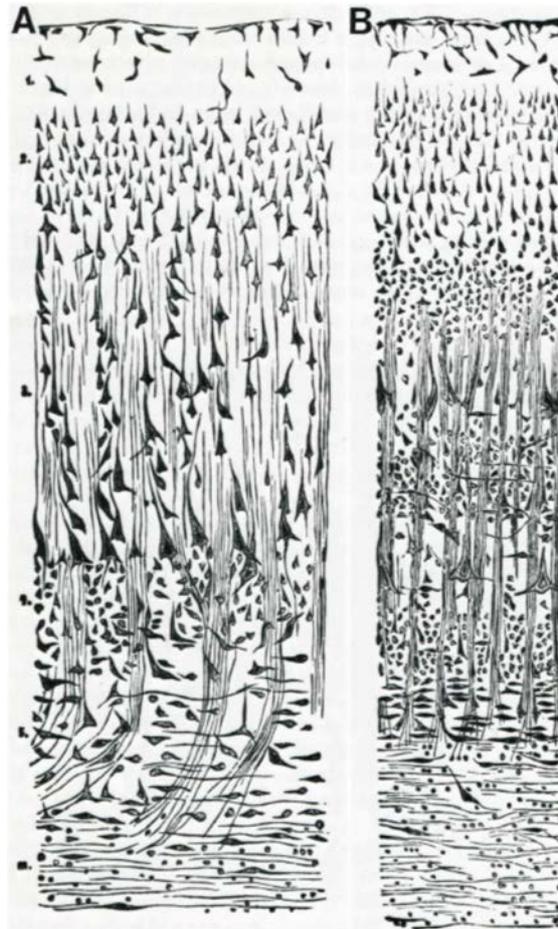


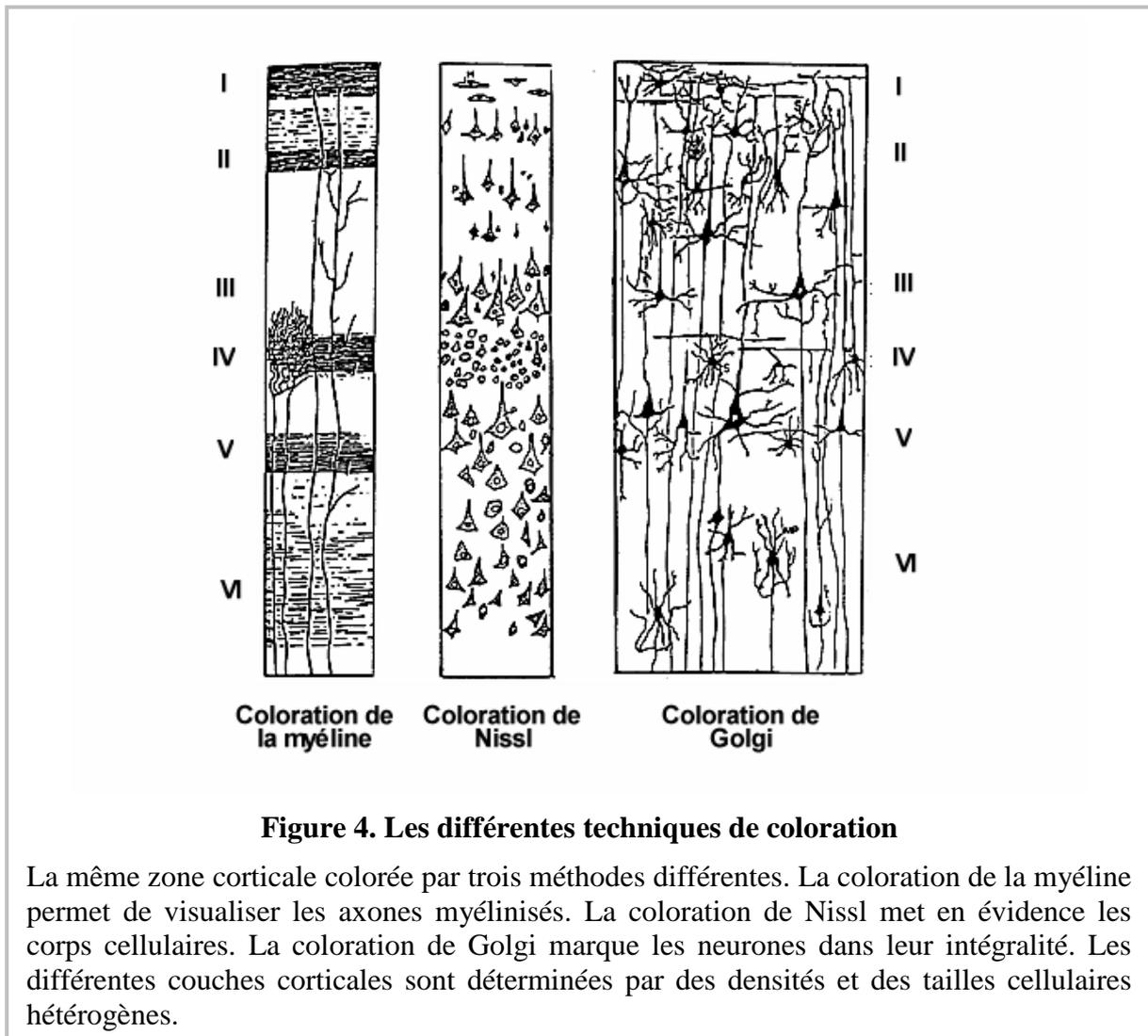
Figure 3. Premier dessin d'un cortex organisé en couche (T. Meynert)

(A) T. Meynert a représenté un cortex à cinq couches provenant du lobe frontal. (B) Il a également établi un cortex à huit couches. [Source : *Adapté de (Jones, 1984)*]

Le néocortex est divisé en deux parties superposées. À la surface du cerveau, on retrouve la substance grise caractérisée par la présence d'un grand nombre de corps cellulaires. La substance blanche, délimitée par la substance grise, les ventricules et le striatum, est essentiellement composée de fibres nerveuses myélinisées.

Du point de vue histologique, la substance grise est composée de six couches distinctes parallèles à la surface du néocortex. Cependant, l'épaisseur de chaque couche peut varier en fonction des aires corticales. Par exemple, au niveau du cortex moteur, la couche IV va jusqu'à disparaître au détriment d'une couche V très développée.

La couche I, la plus superficielle, se situe juste sous la pie-mère. Aussi appelée couche moléculaire ou couche plexiforme, elle est en grande partie composée de fibres nerveuses. On y trouve toutefois quelques corps cellulaires de neurones. Les couches II et III, appelées

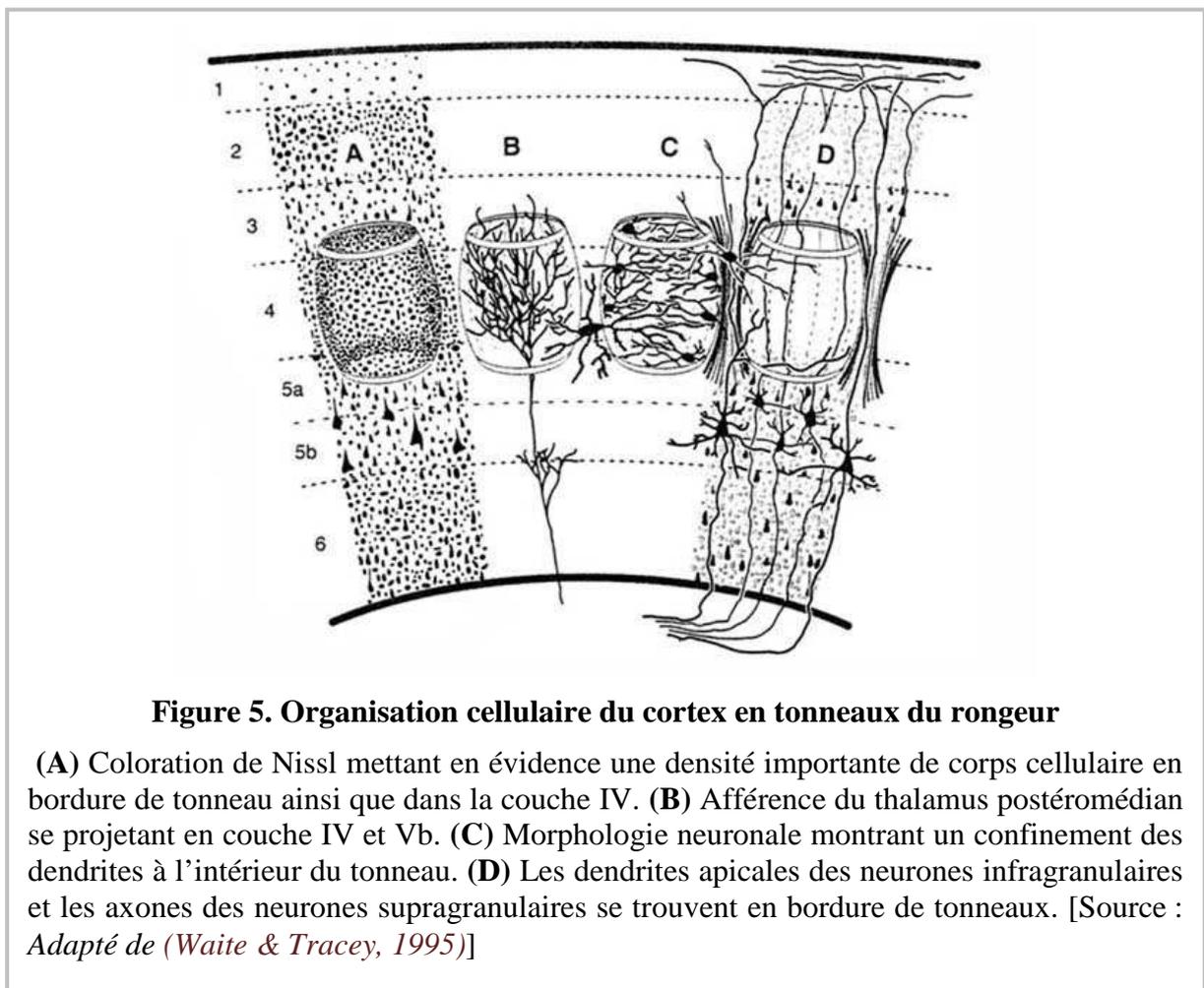


respectivement couche granulaire externe et couche pyramidale externe, contiennent de nombreux corps cellulaires de neurones. On peut remarquer que les cellules de la couche II sont plus petites que celles de la couche III. La couche granulaire interne, ou couche IV, est densément peuplée de cellules à l'aspect étoilé et épineux (cellules en grains) mais pauvre en cellules pyramidales. La couche V, nommée couche ganglionnaire ou pyramidale interne, regroupe les grandes cellules pyramidales du néocortex. Enfin, la couche VI autrement appelée couche polymorphe, tire son nom de ses cellules aux formes irrégulières.

D'un point de vue fonctionnel, le néocortex est regroupé en trois couches distinctes. La couche supragranulaire formée des couches I à III envoie des projections vers d'autres aires corticales. La couche granulaire (couche IV), reçoit la grande majorité des afférences sensorielles du thalamus. Les couches V et VI sont regroupées pour former la couche infragranulaire et projettent vers les zones extracorticales.

2. ...et une organisation en colonne

Outre cette structure laminaire, le néocortex présente également une organisation en colonnes (Mountcastle, 1997). L'unité de base de ces dernières est appelée mini-colonne. Elles sont perpendiculaires à la surface piaie et contiennent plusieurs milliers de neurones. Ces colonnes, de 300 à 600 μm de diamètre, s'étendent verticalement de la couche II jusqu'à la couche VI. En 1957, Vernon B. Mountcastle a réalisé des enregistrements dans le néocortex de chat *in vivo*. Ceux-ci lui ont permis de montrer que les cellules répondant à la stimulation d'une même classe de récepteurs sensoriels ou d'une même région de la peau sont organisées en colonnes fonctionnelles (Mountcastle, 1957). Chez le rongeur, cette organisation columnaire est particulièrement développée dans le cortex somatosensoriel (Figure 5). Bien que la forme et la taille de ces colonnes corticales puissent varier suivant les espèces, ces structures sont caractéristiques du néocortex.

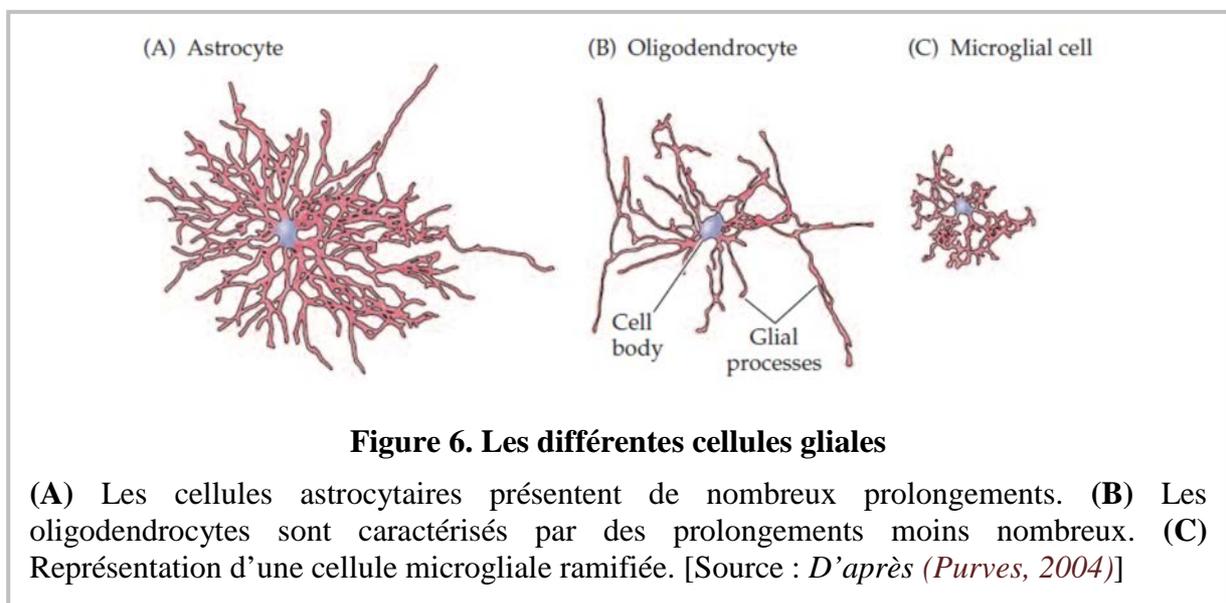


II. Le néocortex est constitué de cellules gliales, de neurones et d'un système vasculaire étroitement liés

Le néocortex se caractérise par la présence de deux grands types cellulaires : les cellules gliales (ou glies) et les cellules nerveuses (ou neurones).

1. Il existe trois types de cellules gliales : les cellules microgliales, les oligodendrocytes et les astrocytes

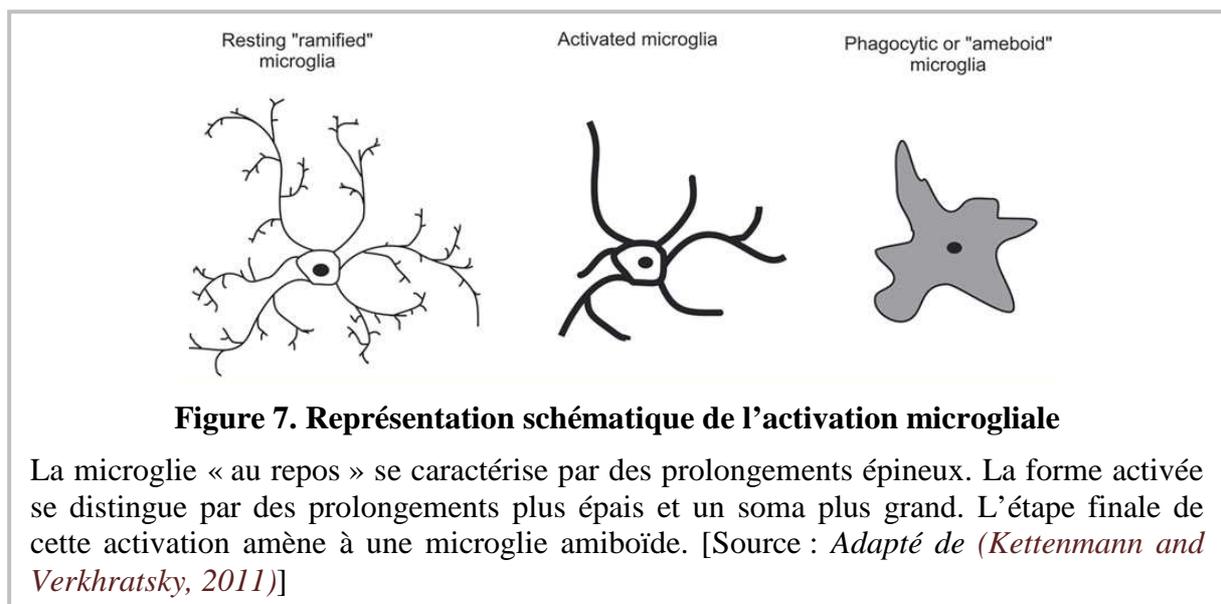
Dès le début du XX^{ème} siècle, trois groupes de cellules gliales avaient été identifiés dans le système nerveux central (**Figure 6**). Les astrocytes et les oligodendrocytes proviendraient du neuroectoderme, comme les neurones. La microglie serait d'origine vitelline (Ginhoux et al., 2010). Ces cellules sont les représentantes majoritaires du système nerveux. On estime qu'il y a, suivant les aires cérébrales, jusqu'à dix fois plus de glies que de neurones (Lent et al., 2012).



L'origine étymologique grecque de glie (*glia*) signifie « colle ». Les cellules gliales ont un rôle de soutien mais ont aussi d'autres caractéristiques essentielles. En effet, parmi les fonctions qu'elles occupent dans la physiologie du système nerveux, on peut citer un rôle dans : l'installation et le maintien de la barrière hémato-encéphalique, la myélinisation, le métabolisme, le maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire ou le couplage neurovasculaire.

La microglie

Les cellules microgliales sont mobiles et très polymorphes. Leur phénotype dépend de leur microenvironnement et du stade de développement. Plusieurs types de microglie existent. La microglie amiboïde, la forme « activée », se distingue de la microglie ramifiée (« au repos »), par leur capacité de phagocytose et de migration ou encore de l'expression de marqueurs spécifiques des macrophages ou de facteurs trophiques (**Figure 7**). Cette microglie est essentiellement présente au cours du développement mais peut réapparaître dans le parenchyme adulte lors de pathologies, de lésions ou d'infections cérébrales. La microglie ramifiée est le stade mature de la microglie au repos. Ces cellules présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques qui s'alignent le long des faisceaux nerveux. Il existe aussi une microglie périvasculaire, qui se trouve enfouie dans la lame basale produite par les cellules endothéliales (Pham-Dinh, 1998).

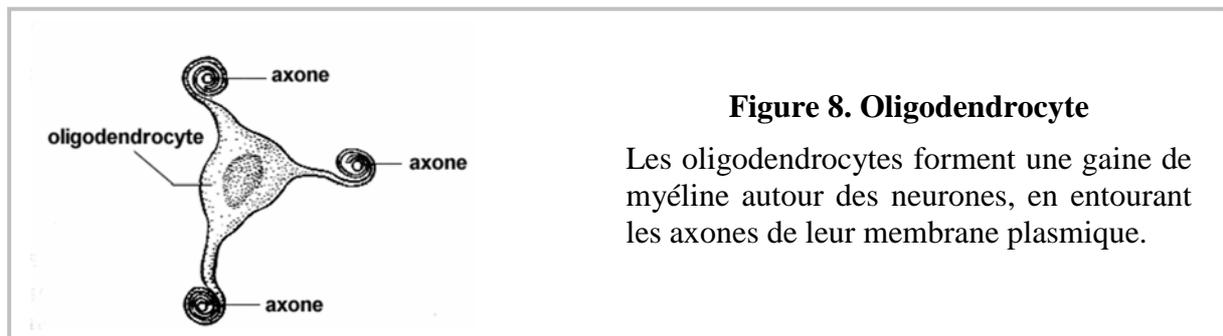


La localisation de la microglie périvasculaire facilite son renouvellement par l'apport de cellules venant des organes hématopoïétiques [moelle osseuse, rate ou foie](Ritter et al., 2006). La microglie résidente (forme activée et ramifiée) présente un taux de renouvellement plus faible.

Dans le système nerveux central adulte, les cellules de la microglie permettent d'éliminer les substances étrangères. En effet, celles-ci pourraient pénétrer dans le cerveau par le liquide céphalorachidien ou à partir de la circulation sanguine. En réponse à une agression, c'est l'activation de la microglie qui constitue la première réponse cellulaire.

Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont des cellules avec relativement peu de prolongement (**Figure 8**). Ces cellules se différencient après la mise en place des faisceaux axonaux et la fin de la synaptogenèse. Leur fonction principale est de synthétiser des gaines de myéline autour de l'axone de nombreux neurones du système nerveux central. Celle-ci isole électriquement les axones et permet une conduction très rapide de l'influx nerveux. Les cellules de Schwann jouent ce rôle dans le système nerveux périphérique.



Les astrocytes

Les astrocytes – *astro*, étoile et *cyte*, cellule – sont des cellules avec une forme souvent étoilée (**Figure 6**). Cependant, leur morphologie est aussi hétérogène que celle des neurones (**Figure 9**). On va retrouver des astrocytes avec de longs prolongements localisés dans la substance blanche du néocortex, dont certains atteignent la couche III. Ils sont également présents dans la couche I et forment une structure sur laquelle les artères piales reposent : la *glia limitans*. Les astrocytes aux prolongements courts sont présents en abondance dans la substance grise. Ils peuvent également avoir de multiples contacts entre les différents types cellulaires mais aussi sur les vaisseaux sanguins (Kacem et al., 1998).

Les astrocytes projettent leurs pieds astrocytaires sur les vaisseaux sanguins et les neurones. Ce sont des constituants de la barrière hémato-encéphalique (Zlokovic, 2008). Ils jouent un rôle dans la régulation du métabolisme neuronal et dans l'apport énergétique (Magistretti, 1990;Pellerin and Magistretti, 1994;McEwen and Reagan, 2004;Pellerin et al., 2005;Rouach et al., 2008;Magistretti, 1990;McEwen and Reagan, 2004;Pellerin and Magistretti, 1994). Les astrocytes qui entourent les zones synaptiques sont impliqués dans la recapture de certains neurotransmetteurs comme le glutamate (Voutsinos-Porche et al., 2003) ou dans l'homéostasie du potassium (Walz, 2000;Wang et al., 2012). Ils ont aussi la capacité de libérer des

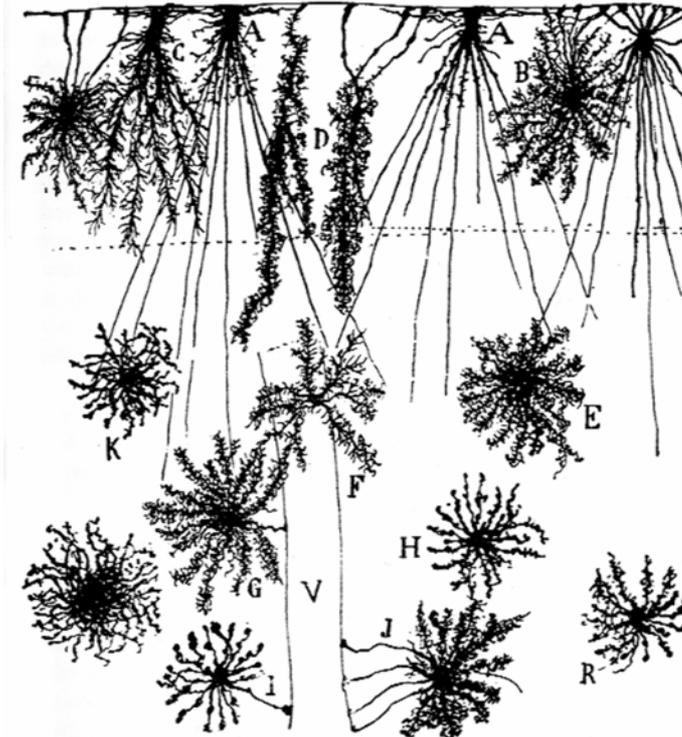


Figure 9. Différents types d'astrocytes

Les astrocytes **A, B, C** et **D** sont présents dans la couche moléculaire. Les astrocytes **E, F, G** et **H** font partis de la couche II et III. Les astrocytes **I** et **J** envoient leurs pieds astrocytaires au niveau du vaisseau (**V**). [Source : *Adapté de (Ramon y Cajal, 1899)*]

molécules comme le glutamate, la D-sérine, l'ATP³ ou encore le GABA⁴. Cette fonction est appelée gliotransmission (Perea et al., 2009).

2. Dans le cortex, le réseau neuronal est composé de neurones excitateurs et de neurones inhibiteurs

Avec les travaux de Camillo Golgi et ceux de Santiago Ramón y Cajal à la fin du XIX^{ème} siècle, de grandes avancées dans l'étude des populations de neurones du cortex ont été faites. En améliorant la technique histologique d'imprégnation à l'argent de Golgi, Ramón y Cajal a dressé un vaste catalogue de neurones corticaux (**Figure 10**). Ces travaux ont mis à jour l'extraordinaire diversité neuronale. À la fin du XX^{ème} siècle, de nouvelles techniques d'immunocytochimie, d'hybridation *in situ*, d'électrophysiologie par patch-clamp (Edwards et

³ ATP : Adénosine TriPhosphate

⁴ GABA : *γ-AminoButyric Acid*

al., 1989;Stuart et al., 1993) ou encore de RT-PCR⁵ sur cellule unique (Lambolez et al., 1992) ont été mises au point. Les descriptions morphologiques des neurones ont été enrichies de

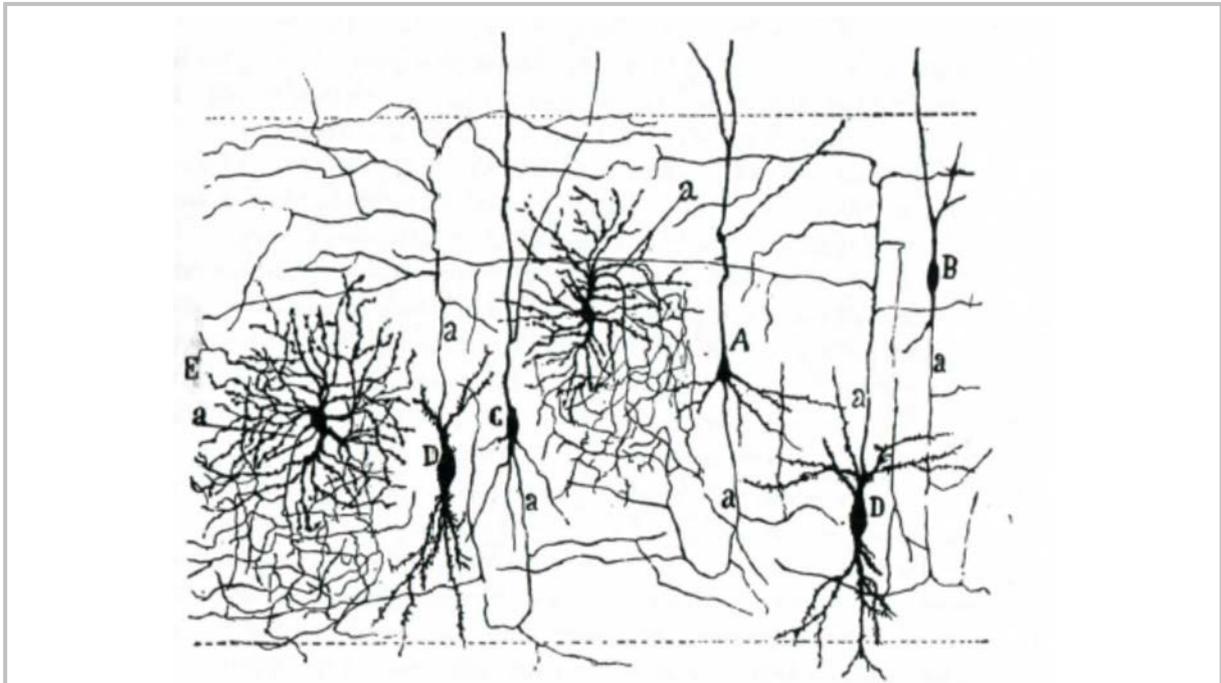


Figure 10. Exemple de représentation de neurones établie par Ramón y Cajal

Marquage par la méthode de Golgi de différents types cellulaires du cortex visuel chez le chat âgé de 28 jours. (A, B et C) Neurones pyramidaux et fusiformes présentant un axone descendant. (D) Cellule fusiforme à large soma avec un axone ascendant. (E) Cellule neurogliaforme. (a) Axone. [Source : *Adapté de (Ramon y Cajal, 1899)*]

connaissances électrophysiologiques et moléculaires.

Parmi les propriétés singulières des neurones, on retrouve une excitabilité cellulaire, une polarité (par rapport à l'organisation et la fonction différente de leurs extrémités) ou encore un métabolisme particulier (Pellerin and Magistretti, 1994). Ces neurones sont aussi des cellules postmitotiques. En effet, après la naissance, les neurones ne peuvent plus entrer dans la phase G1 du cycle mitotique et arrêtent de se diviser [à l'exception des cellules de la muqueuse olfactive ou les grains de l'hippocampe (Cameron and McKay, 1999)].

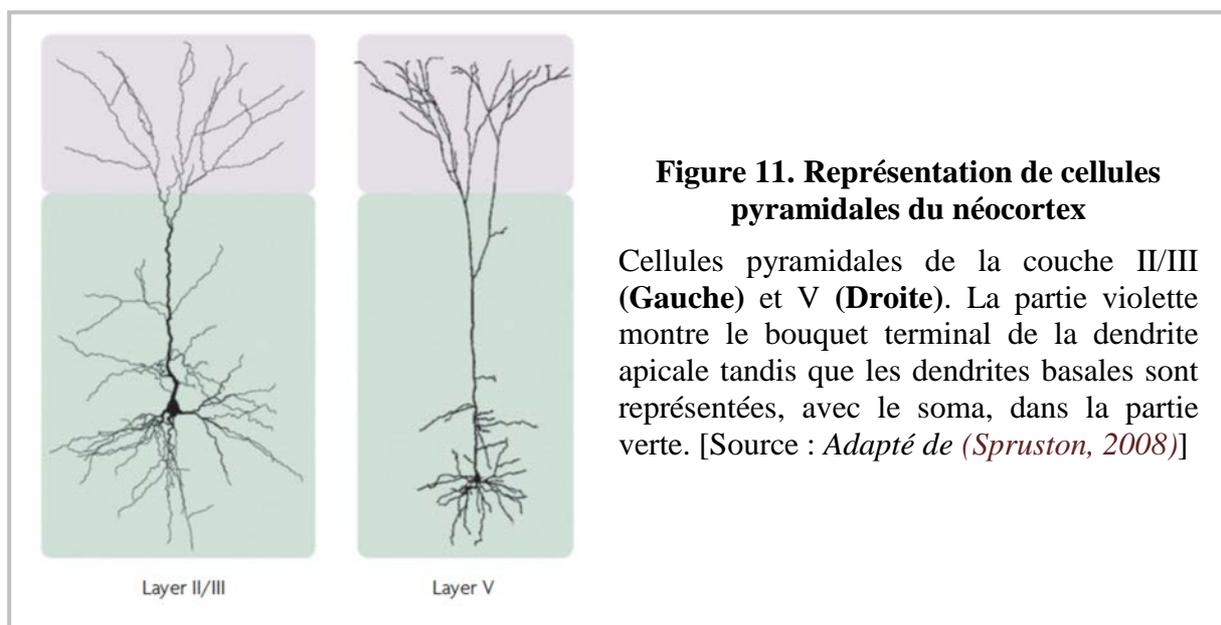
Classiquement, on distingue deux types de cellules : les neurones excitateurs (cellules pyramidales et cellules étoilées) et les neurones inhibiteurs, autrement appelés interneurons inhibiteurs.

⁵ RT-PCR : *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

Les cellules pyramidales

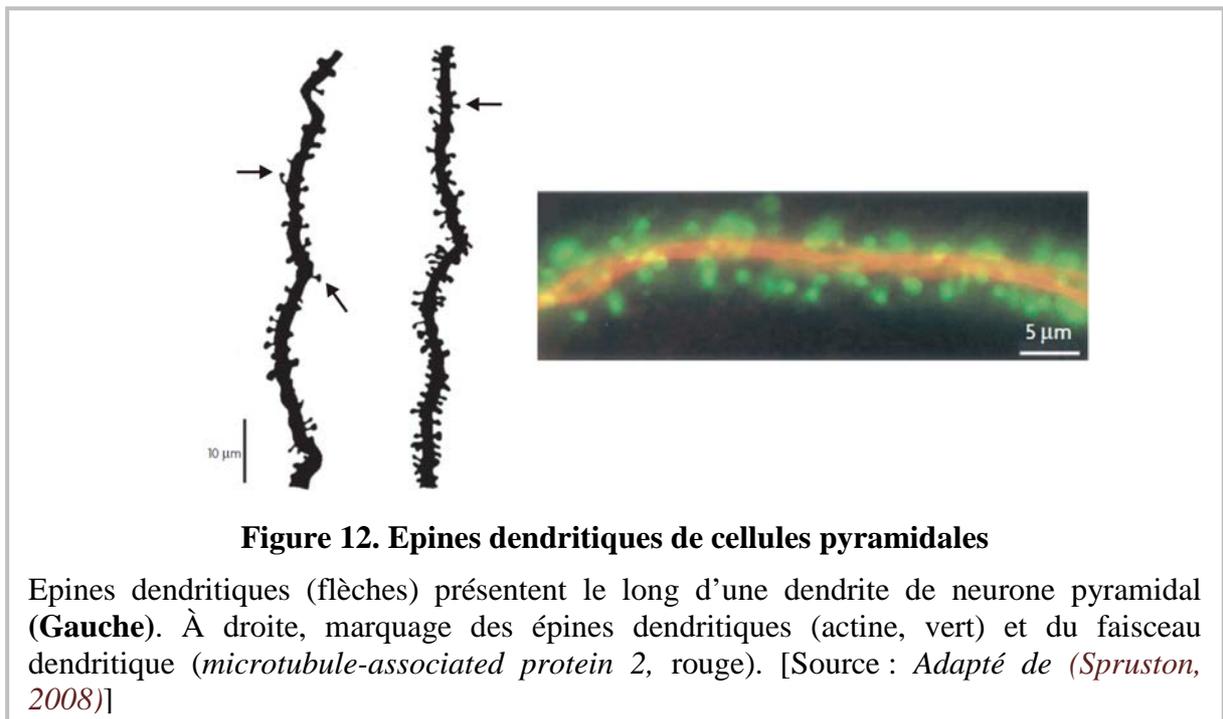
Les neurones pyramidaux tirent leur nom de leur morphologie particulière (**Figure 11**). On les distingue facilement des autres types cellulaires puisqu'ils présentent : un soma triangulaire, une dendrite apicale verticale orientée vers la surface néocorticale et plusieurs dendrites basales qui émergent latéralement du corps cellulaire. Ils représentent entre 70 et 85% des neurones du néocortex (Sloper et al., 1979). De plus, ces cellules excitatrices utilisent le glutamate comme neurotransmetteur (Baughman and Gilbert, 1981).

L'arborisation dendritique des neurones pyramidaux est plus ou moins développée selon les couches corticales. Les dendrites de ces neurones sont couvertes d'épines (**Figure 12**). La dendrite apicale s'étend jusqu'à la couche moléculaire. Elle s'y ramifie et forme le bouquet



terminal. Les dendrites basales qui émergent du soma se ramifient rapidement (DeFelipe and Farinas, 1992).

L'axone se développe à la base du corps cellulaire ou à la base d'une dendrite basale. Il plonge ensuite dans le cortex puis pénètre dans la substance blanche avant de rejoindre d'autres aires corticales ou sous-corticales. L'axone, pendant son trajet descendant, donne naissance à des collatérales. Celles-ci peuvent être soit distribuées proche du corps cellulaire soit former des prolongements verticaux (en dessous ou au-dessus de la couche à laquelle appartient le soma père) ou horizontaux (à distance du soma père). Ainsi, les cellules



pyramidales sont les neurones efférents du cortex cérébral, elles sont de ce fait parfois nommées cellules principales.

Cependant, en fonction des couches corticales considérées, une certaine variabilité morphologique est observée au niveau de la taille. Relativement petites dans les couches superficielles, les cellules peuvent atteindre des tailles considérables dans les couches profondes. À titre d'exemple, il existe dans la couche V du cortex moteur des cellules pyramidales géantes appelées cellules de Betz.

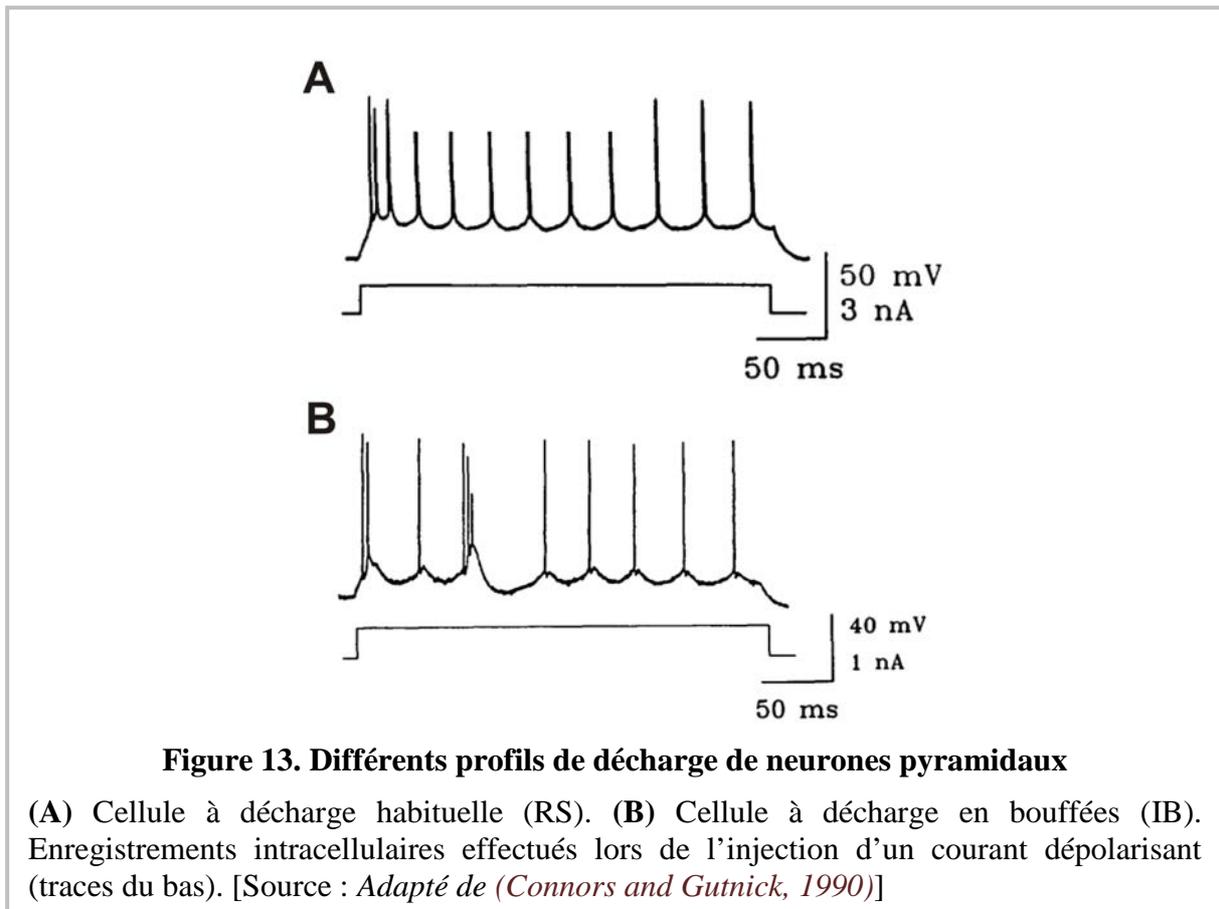
Bien qu'on puisse caractériser les cellules pyramidales par leurs morphologies, on peut également les identifier par leurs propriétés électrophysiologiques (*Connors and Gutnick, 1990*). En effet, ces cellules émettent en général des PA⁶ de longue durée [à mi-hauteur, supérieure à la milliseconde, (*McCormick et al., 1985*)]. On distingue, parmi ces neurones (**Figure 13**) :

- des cellules à décharge habituelle (RS⁷),
- des cellules à décharge en bouffées (IB⁸)

⁶ PA : Potentiel d'Action

⁷ RS : *Regular Spiking*

⁸ IB : *Intrinsically Bursting*



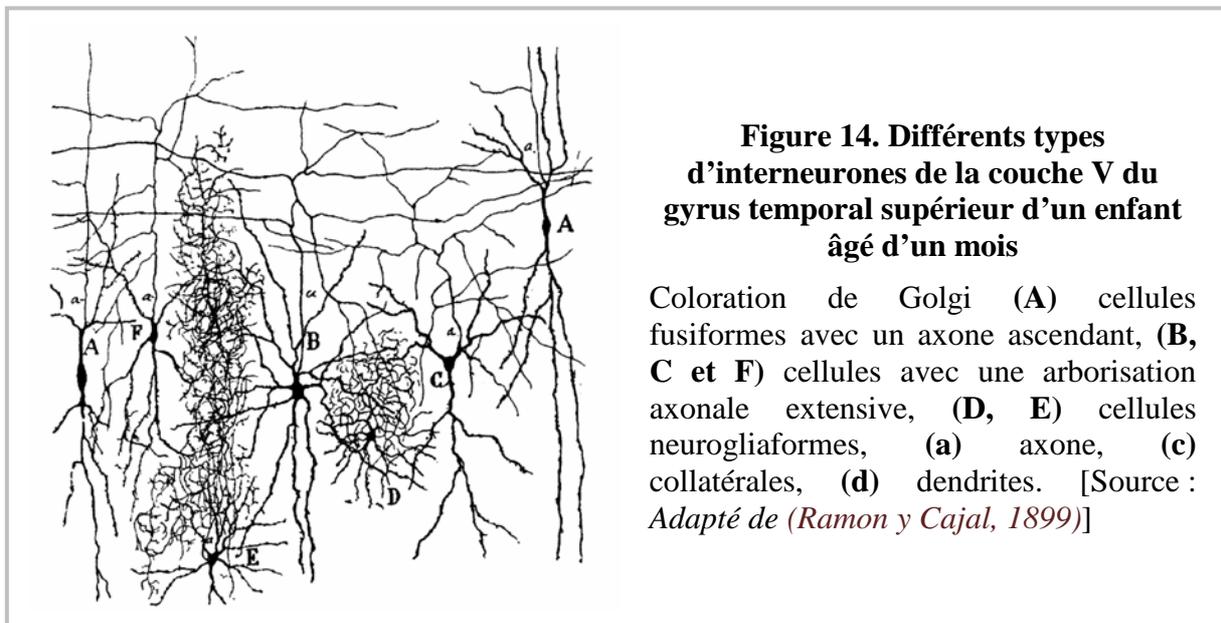
Le profil de décharge le plus couramment trouvé, comme son nom l'indique, correspond aux cellules à décharge habituelle. Ce type de décharge est caractérisé par une réduction rapide et marquée de la fréquence instantanée des PA (adaptation de fréquence). Les cellules pyramidales à décharge en bouffées sont quant à elles plus rares. Elles se situent généralement dans les couches IV et V du cortex cérébral.

Les cellules étoilées

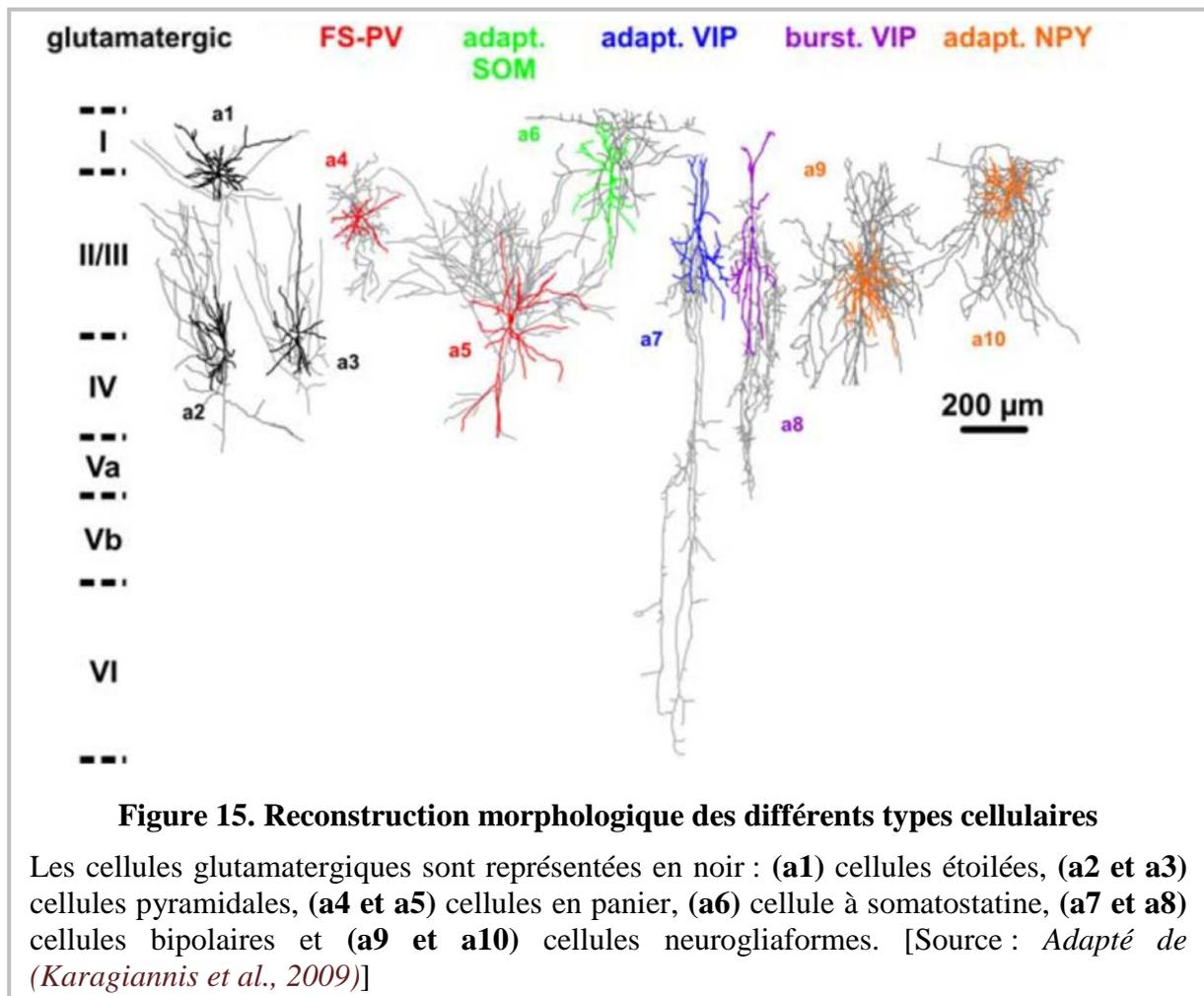
À la différence des cellules pyramidales, les cellules étoilées présentent plusieurs dendrites émergentes du soma, ne permettant pas de déterminer de dendrite apicale. Elles possèdent un axone court et restreint au circuit cortical local. On les rencontre essentiellement dans la couche IV des aires sensorielles. Du fait de leur localisation, elles reçoivent les afférences directes du thalamus. Au niveau électrophysiologique, ces cellules sont caractérisées par un profil de décharge similaire aux neurones pyramidaux (Connors and Gutnick, 1990; McCormick et al., 1985).

Les interneurons inhibiteurs

Les interneurons inhibiteurs sont des cellules à projection généralement locale qui libèrent le GABA comme neurotransmetteur (Houser et al., 1983). Ils sont retrouvés dans toutes les couches du cortex et font partis des rares neurones qu'on retrouve dans la couche moléculaire. Ces neurones GABAergiques constituent environ 20% des neurones corticaux (Gabbott and Somogyi, 1986). Contrairement aux cellules excitatrices du cortex, ces cellules présentent très peu d'épines dendritiques. Cependant, elles ont une diversité autant morphologique, neurochimique qu'électrophysiologique (DeFelipe and Farinas, 1992;Ascoli et al., 2008). Cette variabilité laisse entrevoir l'existence de différents types d'interneurons (**Figure 14**) occupant des fonctions distinctes. Malheureusement, une telle diversité complexifie la classification de ces cellules.



De nombreuses études de classification basées sur des critères anatomiques, biochimiques ou électrophysiologiques ont été menées. Cependant, il sera fait état, dans ce manuscrit, uniquement de la classification multiparamétrique réalisée au laboratoire (Cauli et al., 2000;Gallopín et al., 2005). Cette classification regroupe la majorité des interneurons en grandes classes [**Figure 15**,(Kawaguchi and Kubota, 1997;Karagiannis et al., 2009)]. Parmi celles-ci :



-Les interneurons exprimant le VIP⁹. Ces cellules constituent 15 à 20% des interneurons et ont une morphologie caractéristique. Elles ont une forme généralement bipolaire avec une organisation radiale de leur arborisation dendritique et axonale. Leur axone naît parfois d'une dendrite primaire et plonge dans les couches V et VI où il forme des contacts somatiques ou dendritiques (Peters and Harriman, 1988;Cauli et al., 1997;Kawaguchi and Kubota, 1997;Porter et al., 1998). Deux types de neurones sont déterminés par leur profil de décharge de PA : les neurones non pyramidaux à décharge adaptante (ANP¹⁰) et les cellules caractérisées par des bouffées de PA émises à intervalles de temps irréguliers (IS¹¹).

-les interneurons qui expriment la SOM¹² ont également un profil de décharge RS. Ils constituent entre 30 et 40% des interneurons. Au niveau morphologique, ces cellules

⁹ VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

¹⁰ ANP : Adapting Nonpyramidal Neuron

¹¹ IS : Irregular Spiking

¹² SOM : SOMatostatine

présentent une arborisation dendritique multipolaire ou à double bouquet verticalement orienté. Leurs axones forment une arborisation ascendante avec des contacts sur les dendrites distales (Cauli et al., 1997;Kawaguchi and Kubota, 1997;Wang et al., 2004).

-Les interneurones exprimant la PV¹³ présentent une décharge de PA de type FS¹⁴ caractérisée par une décharge rapide de PA sans adaptation de fréquence. Ces neurones représentent 30 à 50 % des interneurones. Leur arborisation dendritique est soit multipolaire, soit à double bouquet verticalement orienté. Leurs axones forment des contacts axo-axoniques (contact de type cellule en chandelier) ou bien axo-somatiques (contact de type cellule à panier) (Kawaguchi and Kubota, 1997).

-Les interneurones qui expriment la CCK¹⁵ présentent une décharge de PA soit de type RS (Kawaguchi and Kubota, 1997) soit de type IS (Galarreta et al., 2004). Ils constituent 10% des interneurones. Leur arborisation dendritique est du type multipolaire et leur axone crée des contacts somatiques de type cellule à panier.

-Les interneurones qui expriment le NPY¹⁶ ont une décharge de type RS ou retardée [LS¹⁷, (Kawaguchi, 1995;Karagiannis et al., 2009)]. La morphologie neurogliaforme est la plus fréquemment rencontrée pour ces neurones (Kawaguchi and Kubota, 1997;Tamas et al., 2003;Karagiannis et al., 2009). Ils sont présents dans toutes les couches corticales dans une proportion de 5 à 10%. On peut noter qu'on retrouve également du NPY dans les interneurones exprimant la SOM.

Cependant, pour que cette classification soit pertinente, il est nécessaire d'établir un lien entre d'une part, les propriétés intrinsèques caractéristiques des types d'interneurones et d'autre part les propriétés intrinsèques caractéristiques des types d'interneurones et d'autre part les propriétés fonctionnelles spécifiques. Il ne sera pas fait état ici de tous les rôles potentiels de ces neurones [pour revue, (Kawaguchi and Kubota, 1997;Somogyi et al., 1998;Thomson and Bannister, 2003;Markram et al., 2004)], mais uniquement le rôle de ces interneurones dans le couplage neurovasculaire (partie II.3.). A titre d'exemple, les interneurones GABAergiques

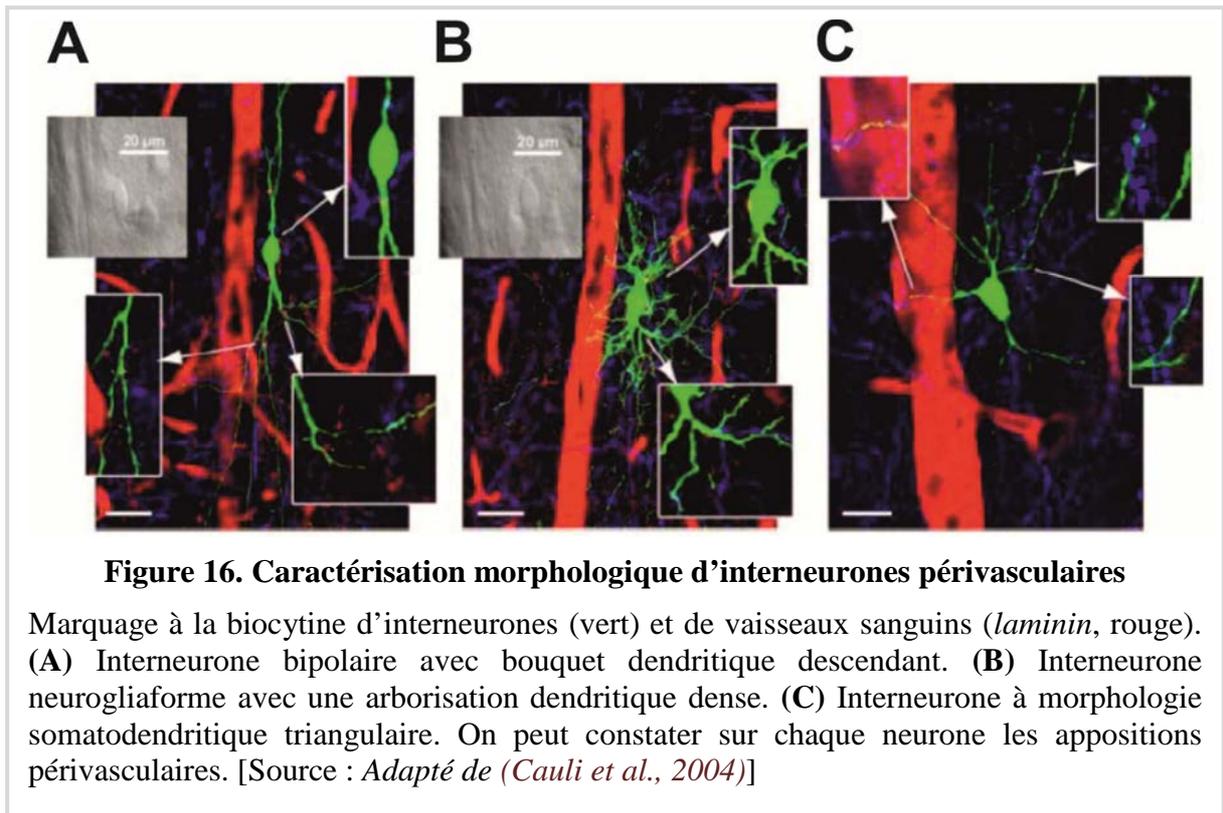
¹³ PV : ParaValbumine

¹⁴ FS : *Fast Spiking*

¹⁵ CCK : CholeCystoKinine

¹⁶ NPY : NeuroPeptide Y

¹⁷ LS : *Late Spiking*



peuvent être en contact avec les artérioles pénétrantes, suggérant un lien avec le système vasculaire [Figure 16, (Cauli et al., 2004)].

3. Le système vasculaire repose sur un réseau d'artères, de capillaires et de veines

Le cerveau est fortement dépendant des apports extérieurs car il est dépourvu de réserves de dioxygène et de substrats énergétiques. Cet apport est d'autant plus important quand on constate que le cerveau représente 2% de la masse totale du corps pour une consommation de 20% du glucose et du dioxygène disponible (Keller, 2013). L'irrigation constante et soutenue de l'encéphale [en moyenne de 50 ml/min/100g de tissu cérébral chez l'adulte (Tatu et al., 1998;Phillips and Whisnant, 1992)] est essentielle au bon fonctionnement cérébral. Le système vasculaire du cerveau, qui draine 15% de la circulation générale, permet d'assurer cette fonction d'apport. Il débarrasse, par le retour veineux, les métabolites produits par l'activité du tissu cérébral.

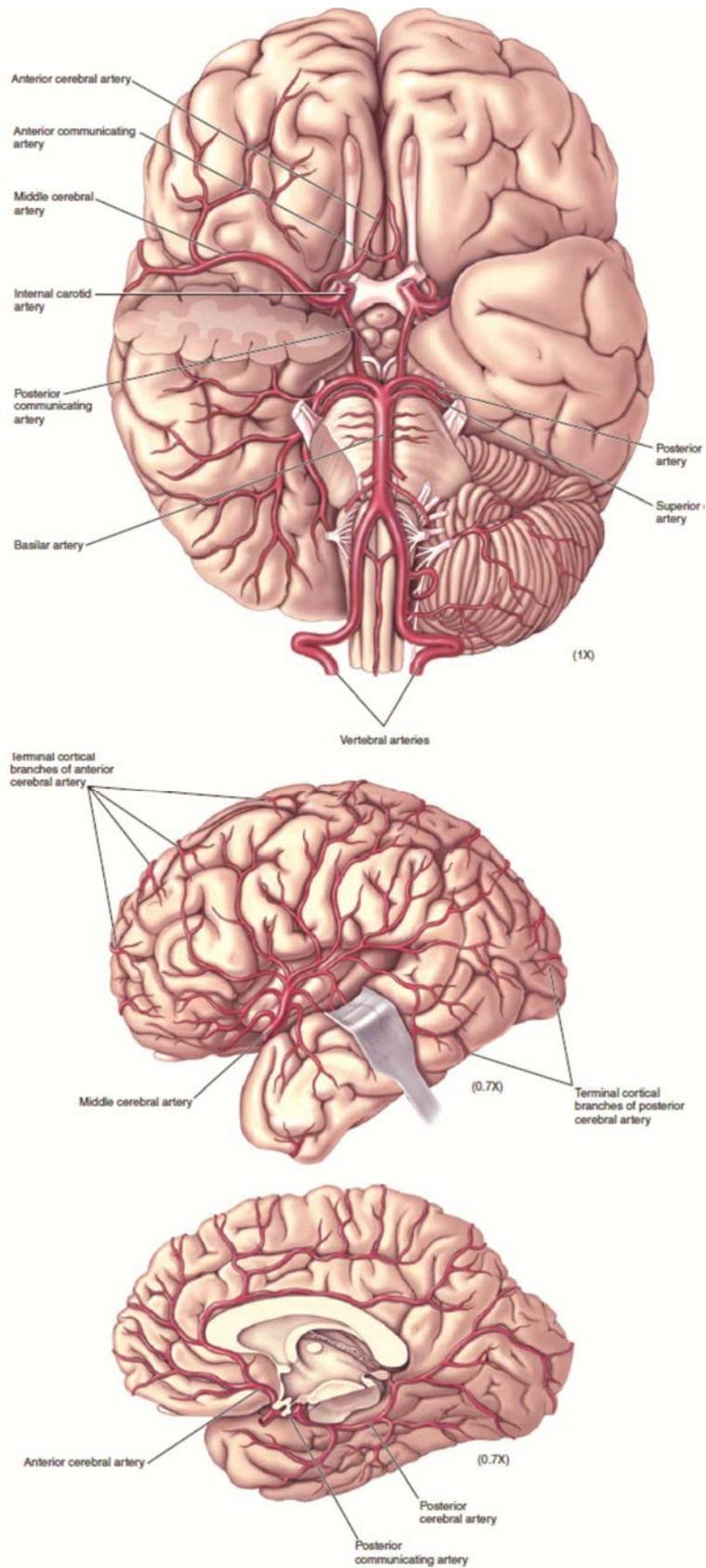


Figure 17. La circulation artérielle du cerveau

Les principales artères qui apportent le sang au cerveau. **(Haut)** Vue ventrale. **(Milieu)** Vue latérale **(Bas)** Vue médiane sans le tronc cérébral. [Source : *Adapté de (b)Bear, 2001*]

Artères et artérioles pénétrantes

Le sang arrive au cerveau par deux paires de vaisseaux, les artères carotides internes (droite et gauche) et les artères vertébrales (droite et gauche). Ces vaisseaux s'unissent pour former l'artère basilaire. Ces artères émergent du cou, pénètrent dans la boîte crânienne et se rejoignent en établissant des connexions. Celles-ci forment le polygone ou cercle de Willis. Les différentes artères qui irriguent et qui reposent sur le cerveau sont présentées dans la **Figure 17**. À la sortie du polygone de Willis, trois paires d'artères majeures drainent le sang : l'artère cérébrale antérieure, l'artère cérébrale moyenne et l'artère cérébrale postérieure. Ces différentes artères desservent des régions spécifiques et définissent donc de nombreux

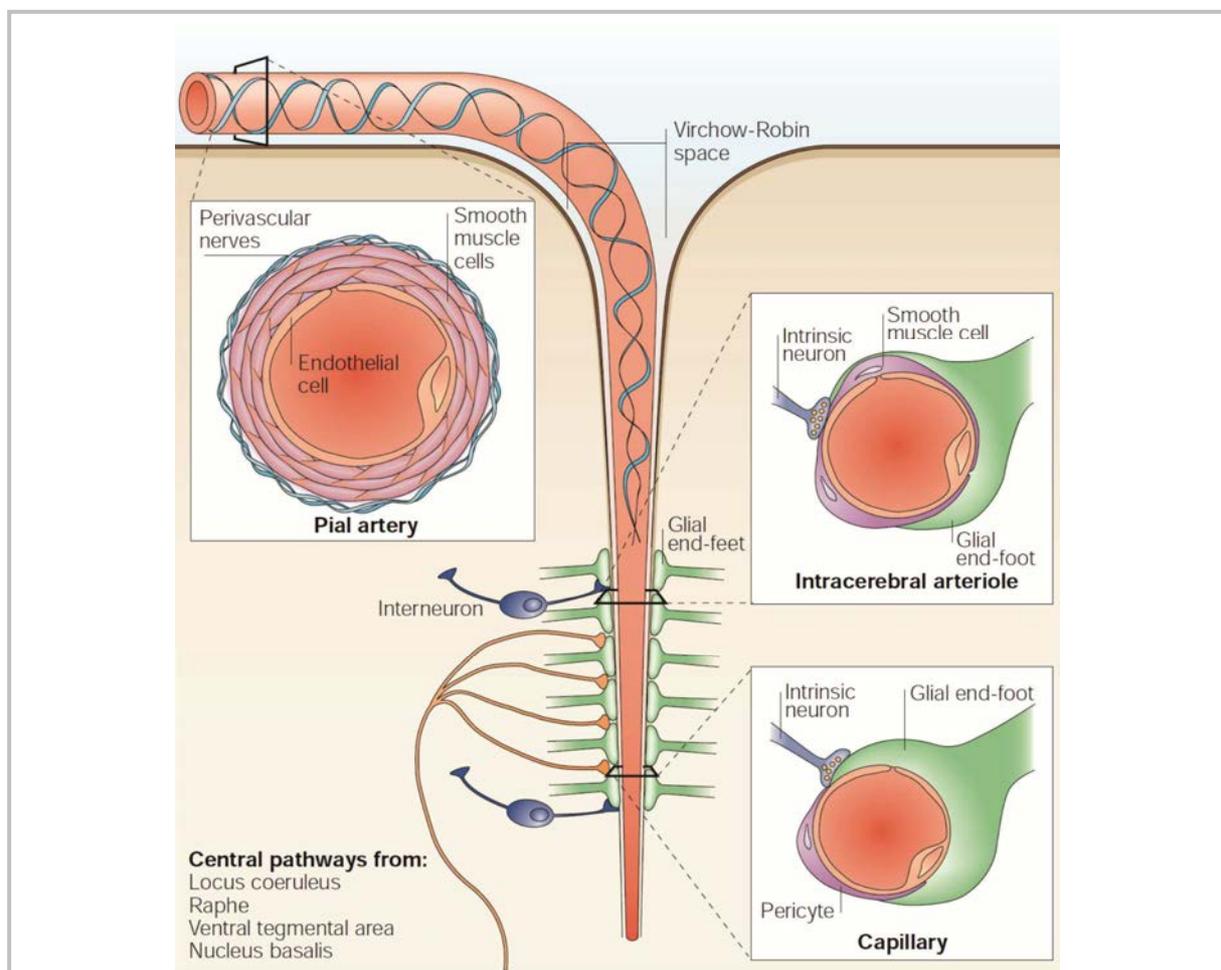


Figure 18. Organisation de la microcirculation cérébrale et relation neuro-glio-vasculaire

Les artères piales plongent dans le parenchyme cortical au niveau de l'espace de Virchow-Robin. L'artère se ramifie ensuite et forme les artérioles. **(Insert gauche)** Caractéristique morphologique d'une artère piale. **(Inserts droits)** Relation neuro-glio-vasculaire au niveau d'une artériole (**haut**) et d'un capillaire (**bas**). [Source : D'après (*Iadecola, 2004*)]

territoires artériels cérébraux.

Au niveau de la surface du cerveau, les artères sont en contact avec la pie-mère et sont appelées artères piales. Celles-ci progressent dans le parenchyme cérébral pour former de petites artères et des artérioles pénétrantes [100 à 10 μm de diamètre (Jones, 1970)]. Elles sont également appelées artères de résistance car elles offrent une résistance à l'écoulement sanguin due à leurs faibles diamètres. Ces artères piales présentent, sur une courte distance, un espace périvasculaire (espace de Virchow-Robin, **Figure 18**) invagination de la pie-mère dans le parenchyme cortical.

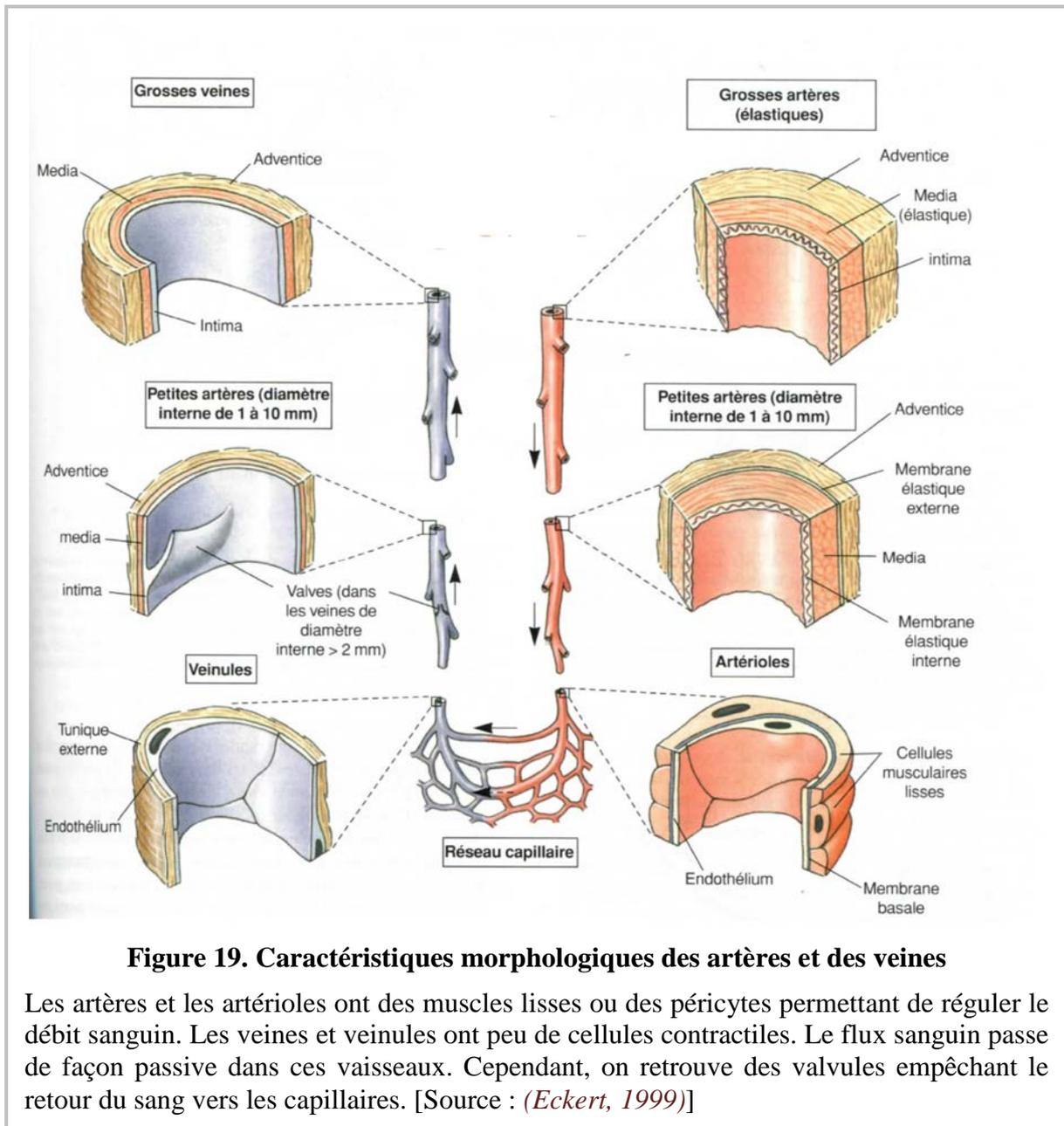
Elles sont dotées de trois tuniques, avec une tunique moyenne composée principalement de cellules musculaires lisses et de quelques fibres élastiques clairsemées. Les plus petites ne sont constituées que d'une seule couche de cellules musculaires lisses enroulées autour de l'endothélium (**Figure 19**). Les péricytes sont des cellules apparentées aux cellules musculaires lisses possédant aussi des propriétés contractiles. Ils s'intègrent à la paroi vasculaire des petites artérioles et des capillaires en quantité croissante et ont un rôle au niveau de la réactivité vasculaire de ces capillaires (Peppiatt et al., 2006; Hall et al., 2014).

Capillaires cérébraux

La ramification extrême des artérioles pénétrantes forme un réseau très dense de capillaires sanguins (400 capillaires au mm^2). Ce sont les plus petits vaisseaux sanguins avec un calibre de l'ordre de 8 à 10 μm . Leurs parois très minces sont formées de cellules endothéliales fixées sur la membrane basale dans laquelle sont disposés les péricytes. Dans certains cas, une seule cellule endothéliale constitue l'entière circonférence de la paroi. Ils sont ainsi bien adaptés à leur rôle d'assurer les échanges de substances (gaz, nutriments, hormones) et de déchets entre le sang et les cellules du parenchyme.

Veinules et veines

Les capillaires s'unissent ensuite pour former les veinules, veines de petit diamètre constituées d'endothélium et de tissu conjonctif. La tunique interne et moyenne sont beaucoup plus minces que celles des artères alors que la tunique externe est plus épaisse. Ces différences impliquent donc que les veines soient suffisamment extensibles pour s'adapter aux variations de volume et de pression du sang circulant. Par opposition à l'écoulement artériel rapide et discontinu, le sang s'écoule lentement et de façon continue dans les veines.



Cependant, afin d'empêcher le sang de refluer et, de cette manière, d'aider le sang à se diriger vers le cœur, les veines sont constituées de valvules (**Figure 19**).

Le retour veineux s'effectue par de nombreuses veines qui forment au fur et à mesure des systèmes veineux plus importants. Il existe un réseau superficiel et un réseau profond, se rejoignant au niveau des sinus présents dans le dédoublement de la dure-mère. Au niveau du cortex et de la substance blanche, les veines cérébrales superficielles et inférieures se déversent progressivement dans les sinus et assurent le drainage du sang (**Figure 20**).

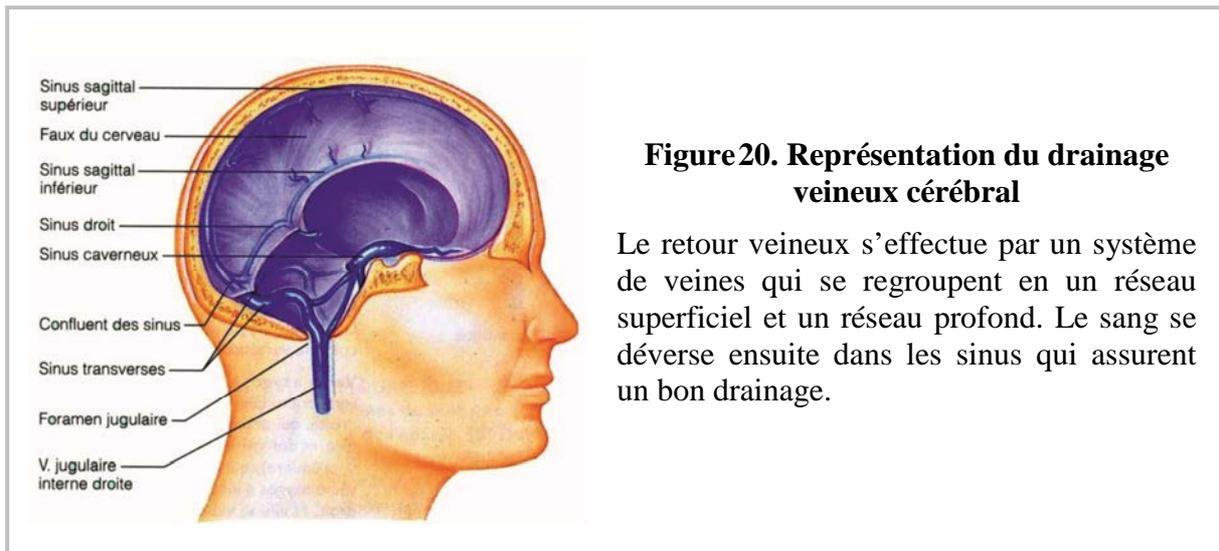


Figure 20. Représentation du drainage veineux cérébral

Le retour veineux s'effectue par un système de veines qui se regroupent en un réseau superficiel et un réseau profond. Le sang se déverse ensuite dans les sinus qui assurent un bon drainage.

4. L'étroite relation neuro-glio-vasculaire

Au fur et à mesure de leur incursion dans le tissu cérébral, le diamètre des artérioles diminue progressivement. Les myocytes interagissent avec les neurones et les astrocytes qui, par l'intermédiaire de leurs prolongements (pieds astrocytaires), viennent jusqu'à entourer la quasi-totalité de la paroi vasculaire [Figure 21, (Kacem et al., 1998; Mathiisen et al., 2010)]. En condition physiologique, ces différents types cellulaires forment une unité fonctionnelle, neuro-glio-vasculaire qui joue un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Figure 22). Ceci permet d'allier le fonctionnement des neurones avec un apport énergétique sanguin adapté qui sera détaillé par la suite. Cet apport sanguin adapté est possible grâce aux cellules musculaires lisses vasculaires qui permettent, selon les conditions, d'aboutir à des vasoconstrictions ou des vasodilatations.

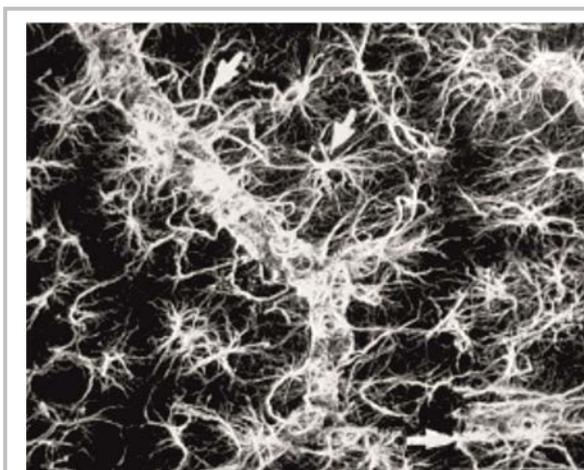


Figure 21. Les astrocytes recouvrent la totalité du lit vasculaire

Marquage immunocytochimique des astrocytes avec un anticorps dirigé contre la protéine spécifique astrocytaire GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*). [Source : Adapté de (Kacem et al., 1998)]

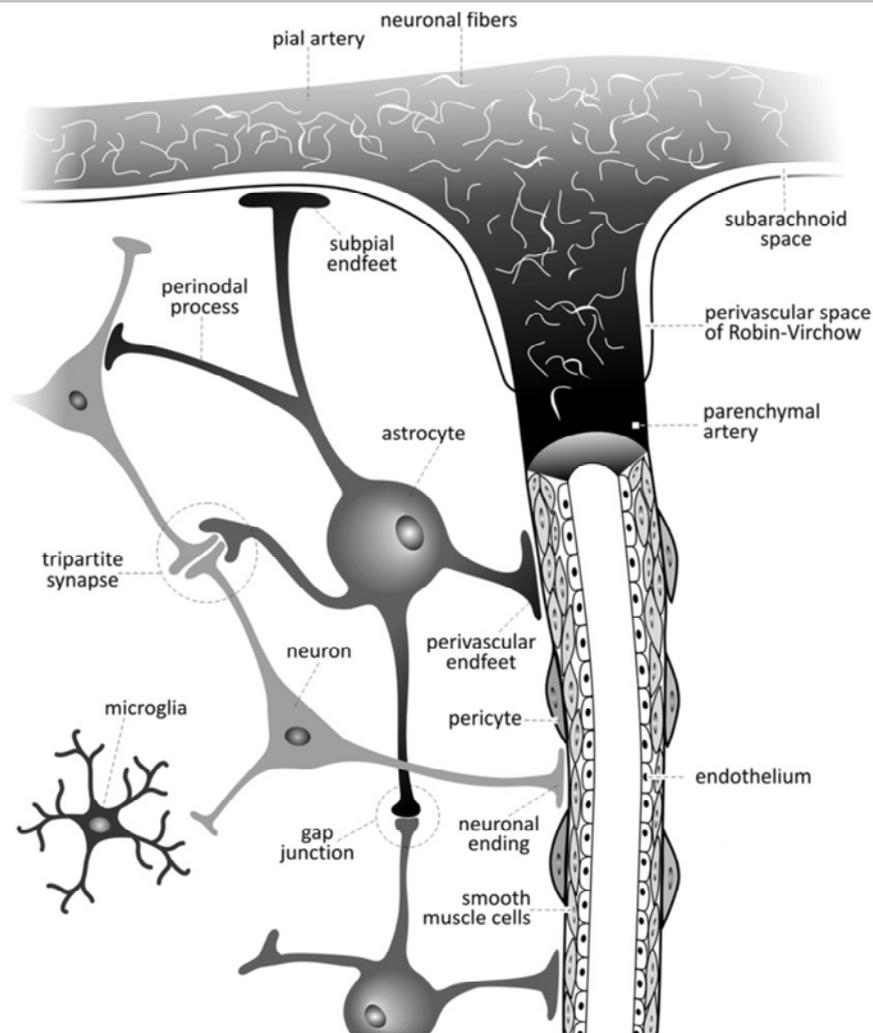


Figure 22. Structure schématique de l'unité neurovasculaire

Le contact direct des astrocytes avec les neurones et avec différentes parties des vaisseaux montre l'importance de cette unité neurovasculaire dans la régulation du flux cérébral cortical. [Source : *Adapté de (Kowianski et al., 2013)*]

5. L'acteur final des réponses vasculaires : la cellule musculaire lisse

Au niveau vasculaire, les myocytes sont les cellules les plus représentées au niveau de la média de la paroi des artères cérébrales jusqu'au stade artériolaire. Leur forme est souvent allongée affichant un diamètre de l'ordre de 2 à 5 μm pour une longueur variable. Les cellules sont organisées en feuillets, parallèles les unes aux autres et représentent de par leur activité synchrone une composante contractile capable de réguler le débit sanguin au sein de la microcirculation cérébrale.

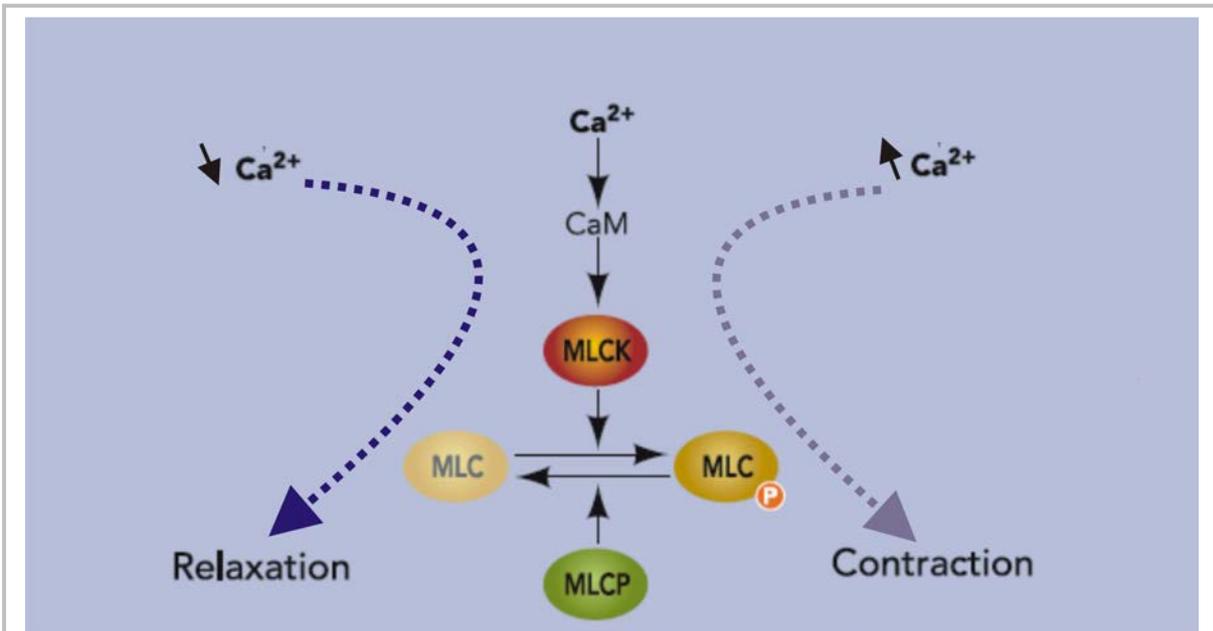


Figure 23. Représentation schématique du fonctionnement des relaxations/contractions des cellules musculaires lisses

L'augmentation du calcium intracellulaire induit une phosphorylation de la *Myosine Light-Chain* (MLC). Cette phosphorylation aboutie à une contraction des cellules musculaires lisses. Inversement, une diminution du calcium intracellulaire engendre une baisse de la phosphorylation de la MLC. Il y a donc une relaxation des cellules musculaires lisses [Source : Adapté de (Puetz *et al.*, 2009)]

Dans la fibre musculaire, un petit nombre de filaments de myosine sont mêlés à de nombreux filaments d'actine qui sont organisés en unités contractiles individualisées. À ce niveau, les filaments d'actine s'organisent à partir de deux corps denses. Ils recouvrent un unique filament de myosine qui sera le lieu de glissement des myofilaments entre eux.

La formation des ponts acto-myosines et donc le développement de la force (contraction) nécessite la phosphorylation préalable des chaînes légères des têtes de la myosine (myosine LC20) par une enzyme spécifique : la MLCK¹⁸. Cette kinase est activée par un complexe $4Ca^{2+}$ -CaM¹⁹ formé lors de l'élévation de la concentration de Ca^{2+} libre cytosolique (**Figure 23**). La phosphorylation des chaînes légères de myosine permet alors l'interaction entre les têtes de la myosine avec les filaments d'actine (pour revue (Akata, 2007)). Le changement conformationnel s'effectue lors de l'hydrolyse de l'ATP de la tête de myosine alors que celle-ci interagit avec l'actine et va provoquer un glissement entre les filaments d'actine et de myosine.

¹⁸ MLCK : *Myosin Light-Chain Kinase* (Kinase de la myosine LC20)

¹⁹ CaM : CalModuline

La régulation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, que ce soit dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution, est dépendante de l'activation de nombreux canaux. Certains de ces canaux impliqués dans les vasodilatations et les vasoconstrictions sont détaillés dans les parties suivantes.

B. Couplage neurovasculaire : relation étroite entre l'activité neuronale et le flux sanguin

Comme nous l'avons vu précédemment, le cerveau est un organe hautement énergivore. Cette consommation importante est cruciale pour maintenir le bon fonctionnement des activités cérébrales. Cette énergie est essentiellement utilisée pour garder une homéostasie cellulaire ou maintenir une activité synaptique. Un défaut, ne serait-ce que minime dans l'apport en glucose et en dioxygène, entraînerait des dégâts considérables voire la mort des neurones et des cellules gliales. C'est d'ailleurs à la suite d'ischémie cérébrale ou d'hémorragie cérébrale qu'apparaissent des dégradations du tissu cérébral de ce type. Le couplage neurovasculaire, mécanisme spatiotemporel étroit entre l'activité neuronale et la variation du flux sanguin est un processus essentiel pour soutenir l'activité du réseau de neurones.

I. Le couplage neurovasculaire comme source de détection de l'activité neuronale

Depuis longtemps, les scientifiques se sont attachés à déceler les mécanismes cérébraux. En combinant les données théoriques et méthodologiques qu'ils possédaient, ces scientifiques ont mis en évidence des théories encore valables aujourd'hui et sur lesquelles repose un grand nombre d'études contemporaines.

1. Un principe fondamental découvert à la fin du XIX^{ème} siècle : l'hyperémie fonctionnelle

L'hyperémie fonctionnelle est un phénomène fondamental des fonctions cérébrales. Angelo Mosso en fit la découverte à la fin des années 1800 (Mosso 1880) et fut confirmé plus tard par Roy et Sherrington (Roy and Sherrington, 1890). Aujourd'hui, elle se définit par la dilatation des artérioles et des capillaires dans une région précise du cerveau concomitante avec la constriction des vaisseaux sanguins d'une autre zone du cerveau éloignée. Cette réponse vasodilatatrice est liée à une activité neuronale intense. Ces événements sont spatialement restreints et se produisent en quelques secondes suite à une activation neuronale intense. Cela correspond bien à l'idée selon laquelle un réseau de neurones ne peut être soumis à une

activité intense que si celui-ci reçoit toute l'énergie et le dioxygène afin de maintenir son fonctionnement.

2. Le tissu cérébral doit réguler son apport énergétique

Le tissu cérébral possède très peu de réserves énergétiques. Il requiert un débit sanguin minimal et contrôlé pour s'adapter à son activité. Environ 80% de l'énergie apportée par le glucose sanguin cérébral est dévolue à l'activité neuronale, à la synthèse et au recyclage des neurotransmetteurs. Comme nous l'avons vu précédemment, l'hyperémie fonctionnelle correspond à l'augmentation du débit sanguin cérébral observée suite à l'augmentation de l'activité cérébrale, intégrant l'idée d'un couplage neurovasculaire. Nous allons voir que des intermédiaires interviennent pour réaliser ce couplage, comme les neurotransmetteurs libérés lors de l'activité synaptique tels que le glutamate ou les ions K^+ . Cependant, il existe un phénomène de régulation en réponse aux variations de pression.

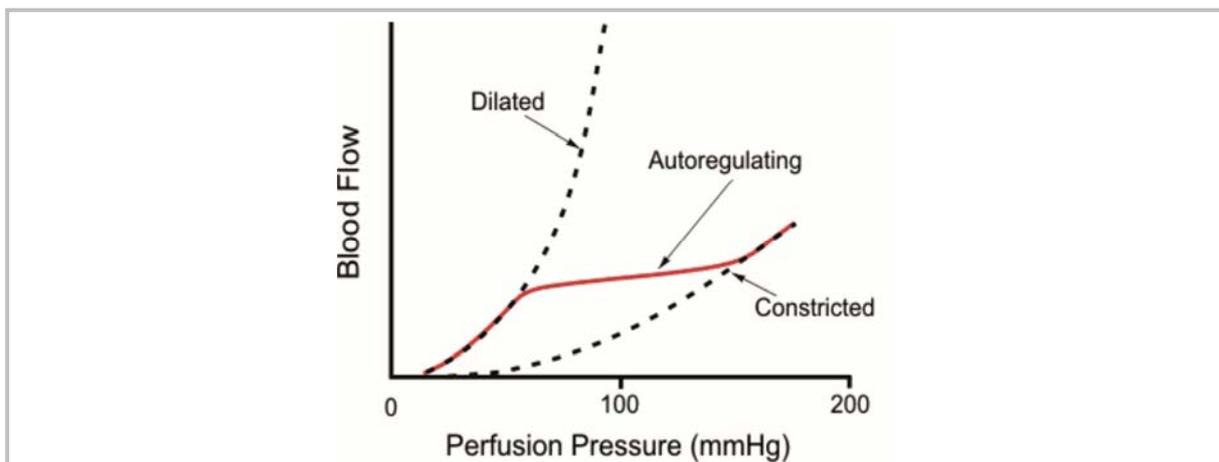


Figure 24. L'autorégulation cérébrovasculaire permet de maintenir la pression sanguine

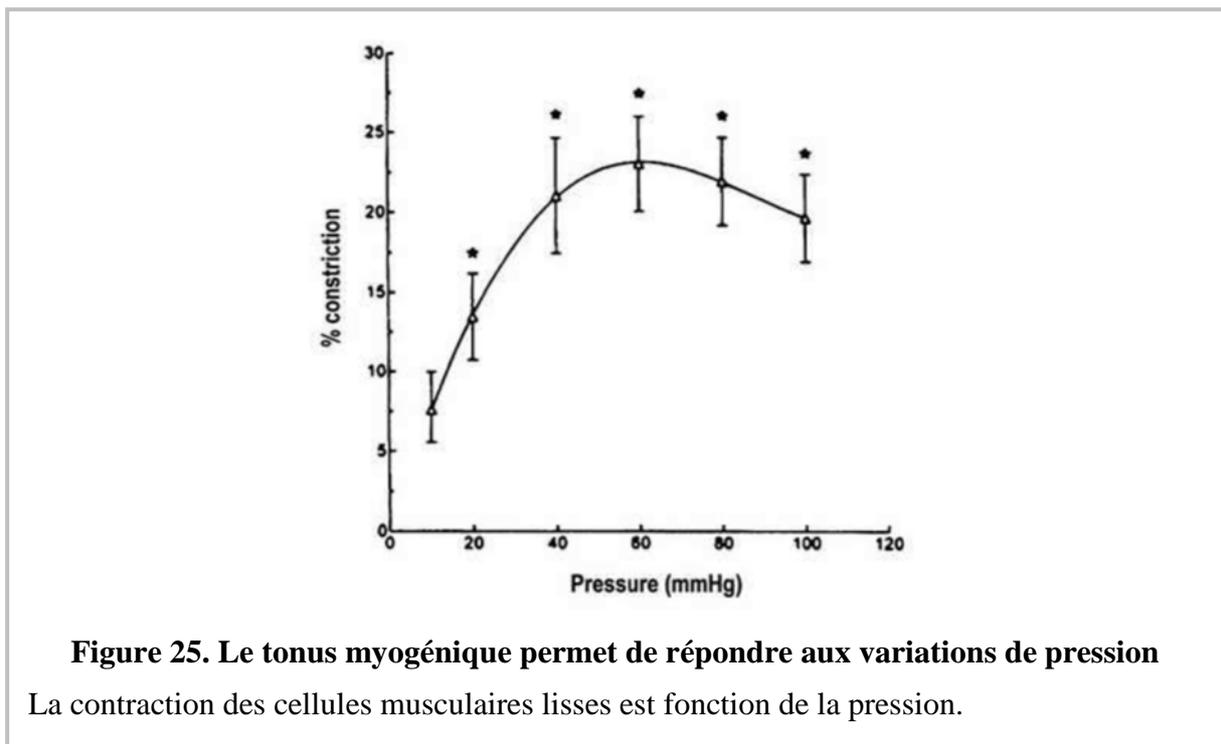
En fonction de la pression artérielle, les vaisseaux piaux s'adaptent vers une vasoconstriction ou une vasodilatation. Au-delà de certaines valeurs de pression, l'autorégulation n'est plus efficace.

[Source : <http://www.cvphysiology.com/Blood%20Flow/BF004.htm>]

L'autorégulation peut se définir comme la propriété qu'ont les vaisseaux du cerveau de modifier activement leur diamètre en réponse à une variation de pression de perfusion. Le résultat de cette modification permet de maintenir un débit sanguin cérébral constant. Il s'agit d'un mécanisme physiologique de protection. Il permet d'éviter l'ischémie en cas de chute de la pression artérielle ou d'empêcher les dommages capillaires et la formation d'œdème en cas

d'augmentation de la pression artérielle. Les seuils inférieurs et supérieurs d'autorégulation se situent chez l'être humain sain aux alentours de 60 à 150 mm Hg de pression artérielle moyenne. Au-delà, le débit sanguin cérébral suit passivement les variations de la pression de perfusion (**Figure 24**).

Ce mécanisme est présent sur les artères du polygone de Willis et sur les artères piales et pénétrantes. Les systèmes de contrôle impliqués sont d'origine extrinsèque (influences nerveuses et hormonales) et intrinsèque (réponse myogénique et facteurs métaboliques) aux muscles lisses. Les canaux ioniques de la famille des TRP²⁰ des myocytes vasculaires sont



impliqués dans la réponse myogénique des petites artères et des artérioles : ils participent au mécanisme d'autorégulation (**Figure 25**).

En effectuant leur rôle de cellules support de la propagation de l'influx nerveux au niveau des synapses chimiques, les neurones et les astrocytes qui entourent les synapses libèrent des transmetteurs vasoactifs tels que l'acétylcholine, le NO²¹, le GABA, les catécholamines et les neuropeptides. D'autres neurotransmetteurs, comme le glutamate, n'ont pas de propriétés vasoactives directes mais stimulent la synthèse et la libération de puissants vasodilatateurs

²⁰ TRP : *Transient Receptor Potential*

²¹ NO: *Nitric Oxide*

comme le NO, les métabolites des époxygénases P450 et des COXs²² tant au niveau neuronal qu'astrocytaire [Figure 26 (Iadecola, 2004)].

Au niveau neuronal, la fixation du glutamate sur les récepteurs NMDA²³ induit une activation de voies intracellulaires dépendante du Ca²⁺ intracellulaire. La nNOS²⁴ est ainsi activée menant à la synthèse de NO agissant directement sur les myocytes vasculaires. La fixation du glutamate sur son récepteur métabotrope au niveau des prolongements périssynaptiques

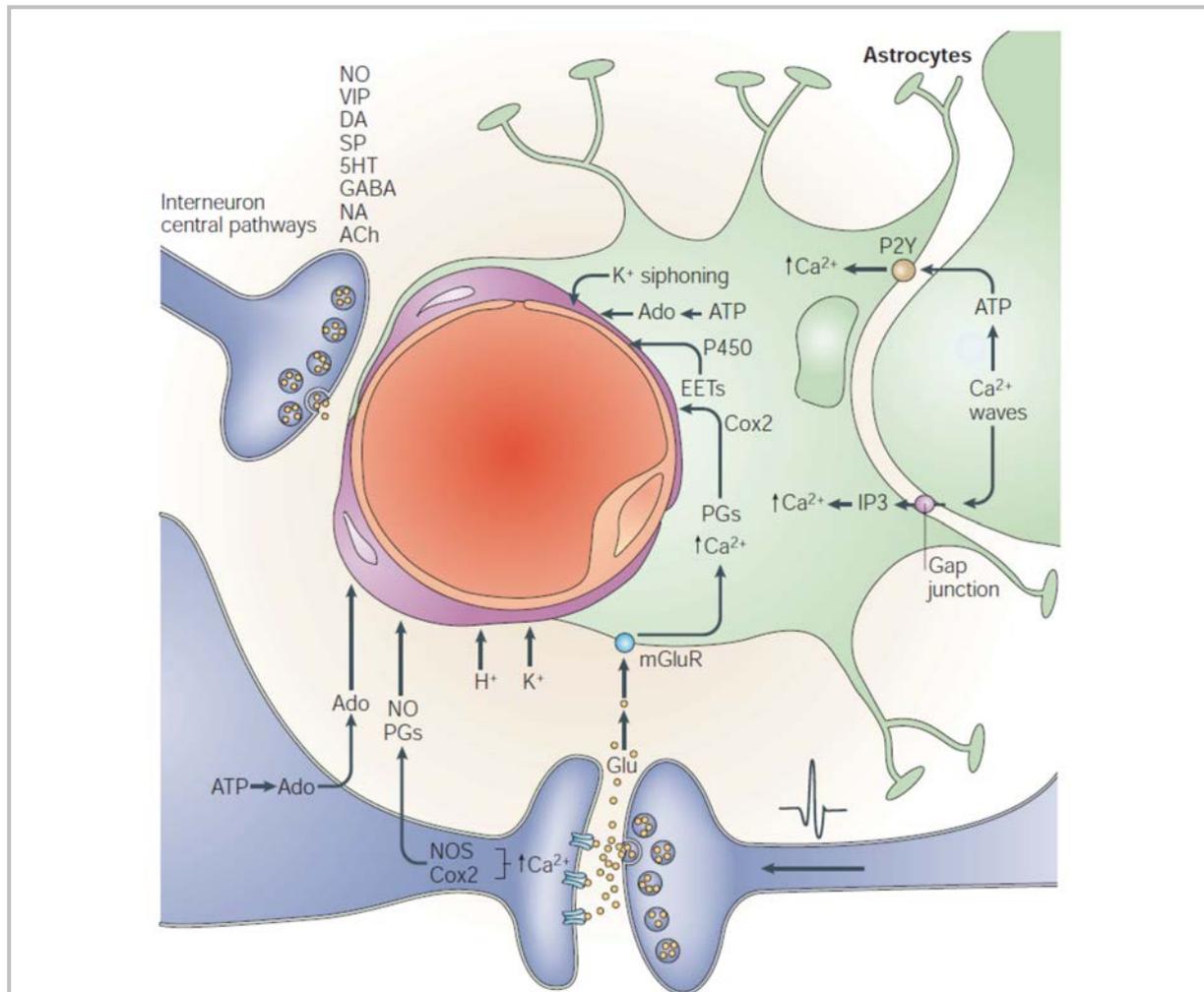


Figure 26. Un grand nombre de messagers vasoactifs d'origine neuronale et astrocytaire sont impliqués dans le couplage neurovasculaire

Les messagers vasoactifs sont synthétisés soit par les neurones, soit par les astrocytes et même par l'endothélium. Il existe un grand nombre de messagers dont les voies d'actions peuvent être entremêlées compliquant leurs études. Pour les abréviations non utilisées dans le corps du texte : Dopamine (DA) ; Substance P (SP) ; 5-Hydroxytryptamine (5-HT) ; Noradrénaline (NA) ; Acétylcholine (ACh) ; Adénosine (Ado). [Source : (Iadecola, 2004)]

²² COX : Cyclo-Oxygénase

²³ NMDA : N-méthyl-D-aspartate

²⁴ nNOS : neuronal Nitric Oxide Synthase (Forme neuronale de l'enzyme de synthèse du NO)

astrocytaires déclenche une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Une vague calcique se propage jusqu'aux prolongements astrocytaires interagissant avec les myocytes. Celle-ci active la PLA_2 ²⁵ menant à la production d'acide arachidonique qui est métabolisé selon deux voies bien distinctes : la voie des COXs et la voie des P450 époxygénases qui mènent respectivement à la libération de prostaglandines et d'EETs²⁶ (Iadecola, 2004).

Ces deux voies conduisent à la vasodilatation par action sur les myocytes au niveau artériolaire via une ouverture de canaux potassiques. D'autres médiateurs, différents des neurotransmetteurs, agissent aussi au niveau de l'unité neuro-glio-vasculaire comme l'adénosine ou les ions K^+ .

L'augmentation du métabolisme de l'ATP associée à l'activité neuronale conduit à la production d'adénosine, puissant vasodilatateur, libérée dans le milieu extracellulaire par des transporteurs spécifiques (Iloff et al., 2003). Elle a un effet direct au niveau des myocytes par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques $\text{A}_{2\text{A}}$ ²⁷ et $\text{A}_{2\text{B}}$ ²⁸. En plus de cette action directe sur le muscle lisse, l'adénosine agit aussi sur les astrocytes. L'ATP circule entre les astrocytes et est libérée par les jonctions communicantes. La fixation sur son récepteur spécifique P2Y ²⁹ induit des vagues calciques à l'origine des effets décrits précédemment. L'adénosine potentialise l'effet de ces vagues calciques induites par l'ATP. L'activation des récepteurs $\text{A}_{2\text{B}}$ mène à une augmentation de la concentration en AMPc ³⁰ et à une libération de Ca^{2+} , des stocks intracellulaires, encore plus massive dans l'astrocyte (Koehler et al., 2006).

L'acétylcholine libérée au niveau des synapses peut agir indirectement en augmentant la synthèse de NO par les cellules endothéliales comme le fait la glutamine, mais peut aussi agir directement sur les péricytes des capillaires pour produire une vasodilatation (Wu et al., 2003; Zhang et al., 1995). Les différents modes d'action de tous ces agents vasoactifs seront détaillés dans la partie B.II.

²⁵ PLA_2 : PhosphoLipase A_2

²⁶ EET : *EpoxyEicosaTrienoic Acid* (Acide époxyeicosatriénoïque)

²⁷ $\text{A}_{2\text{A}}$: Récepteur de type 2A de l'adénosine

²⁸ $\text{A}_{2\text{B}}$: Récepteur de type 2B de l'adénosine

²⁹ P2Y : Récepteur Purinergique 2 de type Y

³⁰ AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

Une série d'outils a vu le jour pour mesurer le flux sanguin et l'activité métabolique et électrique du cerveau. Ces différentes techniques sont basées sur des propriétés physiques distinctes. Pour les méthodes non invasives, on peut citer pour l'étude du flux sanguin notamment l'IRMf, l'IRM de perfusion, la TEP et le fNIRS³¹. Pour l'étude électrique du cerveau, la MEG³² et l'EEG³³. L'IOS³⁴, le VSD³⁵, le fUS³⁶, le laser Doppler, le laser Speckle, l'imagerie biphotonique ou la vidéomicroscopie infrarouge sont des méthodes invasives pouvant être utilisées sur des modèles animaux *in vivo* ou *ex vivo*. Ces différentes approches ont toutes leurs propres limitations en termes de résolutions spatiales et temporelles mais restent utilisées pour leurs propriétés complémentaires.

3. Comment mesurer les variations de débit sanguin cérébral et l'activité neuronale chez l'être humain?

L'IRMf est la méthode la plus communément utilisée pour étudier les bases neuronales de la cognition humaine. Elle se base sur les propriétés opposées de l'oxyhémoglobine, diamagnétique, et de la déoxyhémoglobine, paramagnétique. Ces caractéristiques magnétiques sont détectées par l'IRM et sont à l'origine de l'effet BOLD³⁷ (Logothetis, 2002;Schridde et al., 2008;Ogawa et al., 1990). En effet, l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine se comportant différemment dans un champ magnétique, la modification de leur rapport va induire des inhomogénéités de champ magnétique. C'est celles-ci qui vont être détectées par IRM. L'acquisition rapide d'images du cerveau par IRM permet ainsi d'étudier les variations du signal BOLD en réponse à une tâche donnée et d'y identifier indirectement le réseau neuronal impliqué.

L'IRM de perfusion peut être réalisée en marquant les noyaux d'hydrogène de l'eau intravasculaire artérielle par une inversion magnétique juste en amont de la région d'intérêt. Après un certain temps de transit de la région marquée, les spins marqués diffusent dans l'eau tissulaire. L'expérience est répétée sans marquage du sang artériel et les deux images sont soustraites. Les seuls spins qui ont une magnétisation différente entre les deux images sont les

³¹ fNIRS : *functional Near-InfraRed Spectroscopy*

³² MEG : MagnetoEncéphaloGraphie

³³ EEG : ElectroEncéphaloGraphie

³⁴ IOS : *Intrinsic Optical Signal*

³⁵ VSD : *Voltage Sensitive Dye*

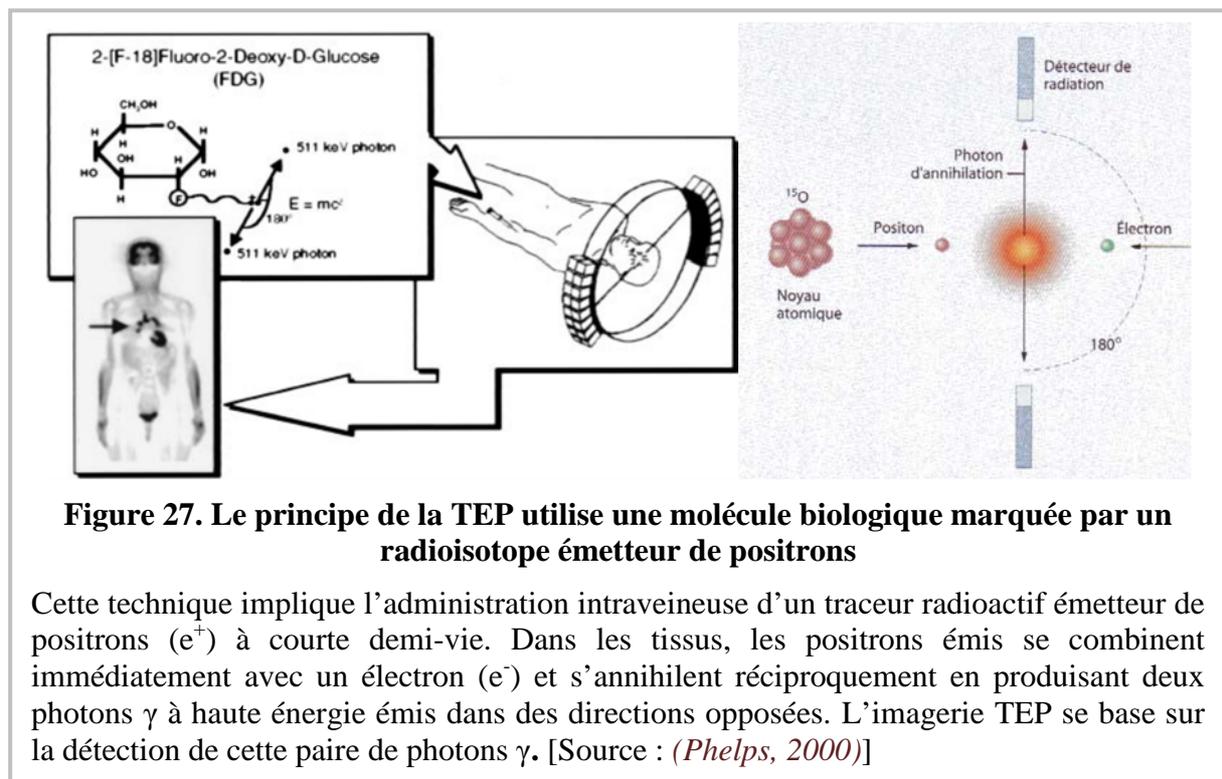
³⁶ fUS : *functional UltraSound imaging*

³⁷ BOLD : *Blood Oxygen Level Dependent*

spins artériels. Ainsi, l'intensité de signal sur l'imagerie de soustraction est proportionnelle à la perfusion. Cette technique permet une quantification absolue du débit sanguin cérébral.

La TEP reste un moyen actuel très utilisé pour mesurer les différents aspects de la physiologie des fonctions cérébrales *in vivo* (Phelps, 2000; Fox and Raichle, 1986). Cette technique implique l'administration intraveineuse d'un traceur radioactif émetteur de positrons à courte demi-vie. Dans les tissus, les positrons émis se combinent immédiatement avec un électron et s'annihilent réciproquement en produisant deux photons γ à haute énergie émis dans des directions opposées. L'imagerie TEP se base sur la détection de cette paire de photons γ (Figure 27).

En fonction du traceur radioactif utilisé, cette technique permet de visualiser le métabolisme glucidique (18-FDG³⁸), la synthèse de protéines, la distribution de récepteurs ou, ce qui nous intéresse ici plus particulièrement, le débit sanguin, le volume sanguin ou la consommation de dioxygène. Les radio-isotopes les plus utilisés sont l'oxygène-15, le fluore-18 et le carbone-11. Ces différents isotopes peuvent être intégrés dans diverses molécules organiques comme

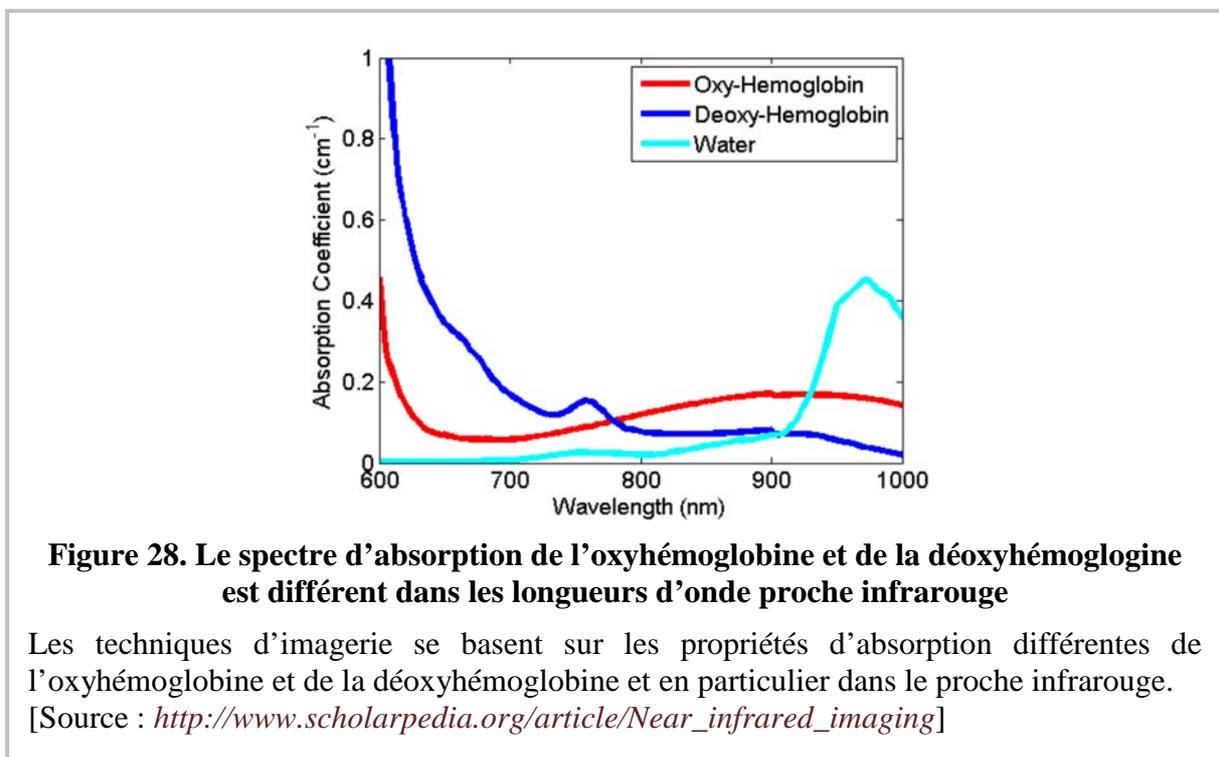


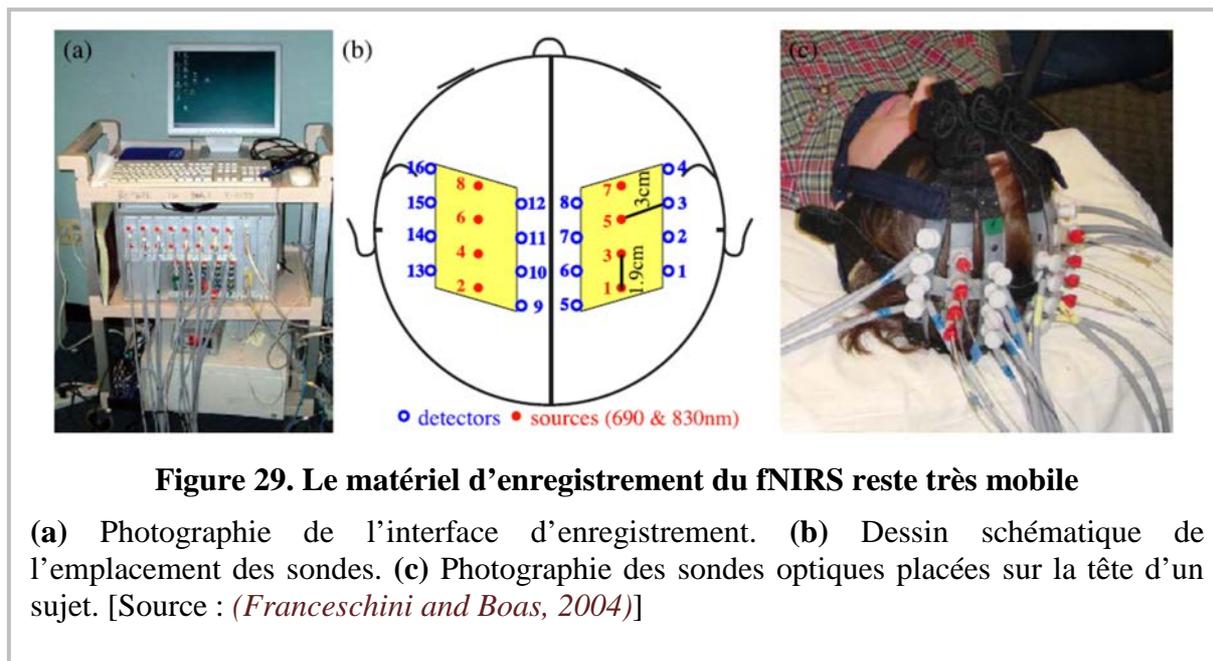
³⁸ FDG : FluoroDésoxyGlucose

les molécules d'eau, le glucose ou même des agonistes et antagonistes de récepteurs cérébraux.

La technique d'imagerie non invasive fNIRS a été décrite pour la première fois en 1977 par Jobsis (Jobsis, 1977). Elle est utilisée pour visualiser les changements hémodynamiques et l'oxygénation cérébrale (Franceschini et al., 2000). Cette technique d'optique non invasive permet entre autres de détecter des hématomes intracrâniens (Gopinath et al., 1993), d'étudier les changements hémodynamiques pendant le sommeil (Hoshi et al., 1994;Hoshi and Tamura, 1997) ou l'activation du cortex moteur par exemple (Obrig et al., 1996;Franceschini and Boas, 2004). Cette technique emploie des radiations optiques de longueurs d'onde non nocives pour l'être humain, entre 650 et 950 nm. Une résolution de l'ordre de la centaine de millisecondes peut être obtenue. La faible atténuation de ces longueurs d'onde dans le tissu permet une pénétration de plusieurs centimètres (< 5 cm) dans le tissu (Boas et al., 2004).

La différence d'absorption de l'oxyhémoglobine et de la déoxyhémoglobine dans le proche infrarouge permet de mesurer la différence de concentration entre ces deux espèces (**Figure 28**). La somme des concentrations des deux formes de l'hémoglobine permet de mesurer le volume sanguin cérébral tandis que les concentrations individuelles des deux formes de l'hémoglobine nous renseignent notamment sur la consommation en dioxygène.





Le DOI³⁹ est une technique d'imagerie récente se basant sur le fNIRS. Elle permet donc de suivre les changements hémodynamiques cérébraux mais aussi l'activité neuronale. En effet, le changement de conformation des cellules par l'activité neuronale induit une modification de la diffusion de la lumière. Cette différence dans la diffusion de la lumière permet d'en déduire l'activité neuronale (Stepnoski et al., 1991; Stepnoski et al., 1991). La technique de fNIRS et par extension la DOI sont des techniques pouvant être combinées avec l'IRMf, la TEP, la MEG ou encore l'EEG puisque le dispositif matériel permettant la mesure est mobile et peu onéreux par rapport aux précédentes méthodes (**Figure 29**).

L'EEG est une méthode d'enregistrement des potentiels électriques produit par le cerveau, en particulier par les cellules pyramidales corticales morphologiquement très polarisées. En effet, l'orientation perpendiculaire par rapport à la surface du crâne de ces cellules permet d'enregistrer ces potentiels électriques (**Figure 30**). Cependant, le potentiel électrique généré par une seule cellule est trop faible pour être détecté. C'est une sommation des potentiels électriques d'un grand nombre de cellules qui va permettre de fournir un signal détectable et analysable. Dès 1875, Richard Caton a publié le premier document faisant référence à un enregistrement d'une activité électrique spontanée du cortex cérébral sur un modèle animal. Le premier enregistrement EEG fut réalisé en 1924 par Hans Berger et confirma les observations faites pratiquement 50 ans auparavant. L'analyse des signaux d'EEG a permis de détecter les caractéristiques électriques de pathologies comme l'épilepsie.

³⁹ DOI : Diffuse Optical Imaging

Une autre méthode de mesure de l'activité électrique du cerveau est la MEG. Comme son nom l'indique, cette technique se base sur la détection des champs magnétiques. Ceux-ci sont produits par les courants ioniques principalement générés par les potentiels post-synaptiques des cellules pyramidales du cortex. La MEG est principalement sensible aux dipôles électriques qui sont orientés parallèlement à la surface du crâne.

En effet, seuls ces dipôles électriques vont pouvoir donner naissance à un champ magnétique mesurable à l'extérieur de la tête. Puisque les dendrites apicales des cellules pyramidales du cortex sont alignées de manière perpendiculaire à la surface du cortex, la MEG sera principalement sensible aux dipôles électriques localisés dans le cortex fissural (sillons et scissures corticales) qui représentent deux tiers de la surface corticale. Le champ magnétique produit par un seul potentiel post-synaptique étant trop faible pour être détecté par la MEG,

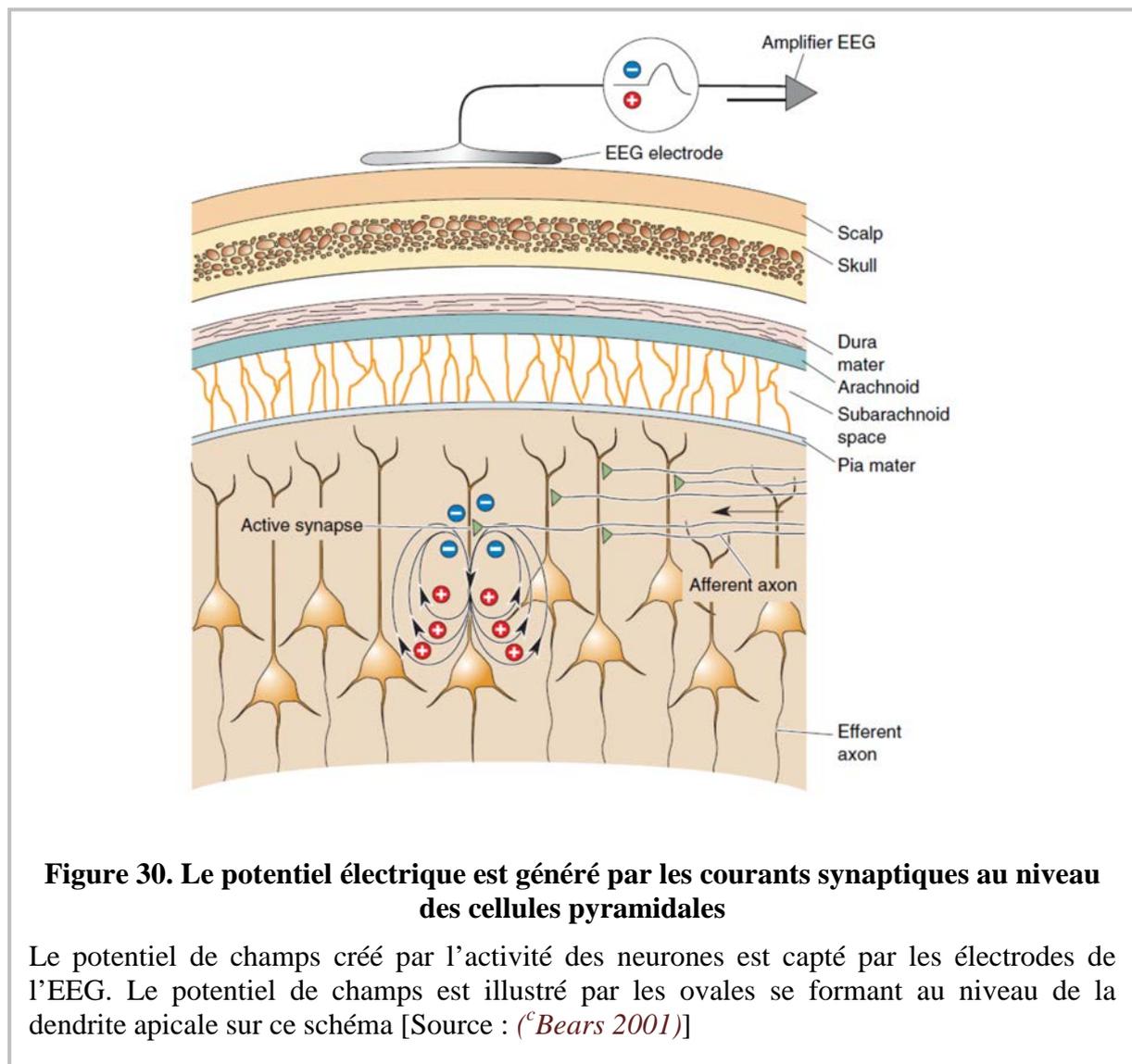


Figure 30. Le potentiel électrique est généré par les courants synaptiques au niveau des cellules pyramidales

Le potentiel de champs créé par l'activité des neurones est capté par les électrodes de l'EEG. Le potentiel de champs est illustré par les ovales se formant au niveau de la dendrite apicale sur ce schéma [Source : (^cBears 2001)]

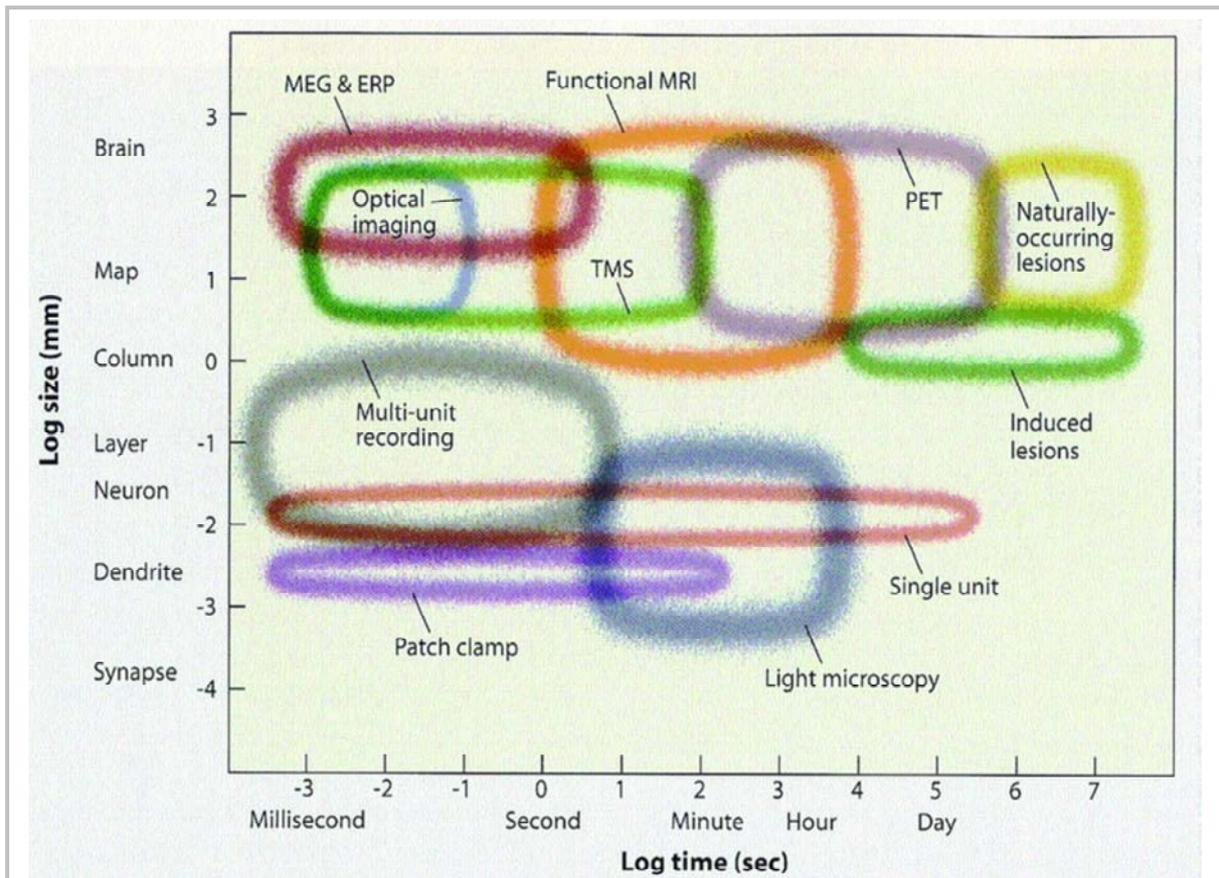


Figure 31. Les différentes techniques d'imagerie sont complémentaires autant au niveau des résolutions temporelles que spatiales

On peut constater que les différentes techniques sont complémentaires. En effet, elles possèdent toutes leurs propres résolutions temporelles et spatiales [Source : (Lane et al., 2009)]

c'est l'activité synchrone de millions de neurones qui est mesurée.

Toutes ces techniques possèdent leurs avantages et leurs inconvénients. La MEG et l'EEG ont une bonne résolution temporelle mais une faible résolution spatiale, bien qu'elle soit meilleure pour la MEG. Ces deux techniques diffèrent également par leur coût d'achat et d'utilisation, avec une utilisation très onéreuse de la MEG.

L'IRMf et la TEP ont toutes deux une résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Cependant, la résolution temporelle reste leur point faible. La résolution temporelle de l'IRMf reste meilleure que celle de la TEP, de l'ordre de la seconde. La résolution temporelle de la TEP dépend du marqueur radioactif utilisé et donc de la demi-vie de celui-ci (O^{15} 120 s ; C^{11} 20 min et F^{18} 120 min). La fNIRS reste plus facile et moins coûteuse que ces deux dernières. Cette technique a une résolution temporelle bien meilleure, de l'ordre de la milliseconde.

Cependant, sa perte de sensibilité dans le tissu profond (> 3 cm) ainsi que sa faible résolution spatiale reste ses désavantages. La TEP se base sur le devenir de molécule marqué tandis que l'IRMf et la fNIRS se basent sur les caractéristiques magnétiques et spectrales spécifiques de l'oxyhémoglobine et de la déoxyhémoglobine (**Figure 31**).

4. L'activité neuronale et les variations de débit sanguin cérébral peuvent être disséquées par des méthodes sur des modèles animaux

L'IOS est une technique d'imagerie utilisée pour la première fois par Hill & Keynes en 1948 (Hill and Keynes, 1949) puis développée par Grinvald et coll. (Grinvald et al., 1986). Cette technique permet de mesurer les changements de flux sanguin, les variations du métabolisme et l'augmentation du volume cellulaire associés à une activité neuronale (Stepnoski et al., 1991). La combinaison des résolutions spatiales et temporelles avec la possibilité de visualiser de larges aires corticales du cortex en fait une technique très efficace pour la cartographie du cerveau. Cette méthode se base sur les changements des propriétés d'absorption de la lumière du tissu cérébral lors d'une activité neuronale.

Les méthodes optiques permettent une imagerie de haute résolution. Elles offrent une exploration de la distribution spatiale de l'activité neuronale particulièrement pour les parties superficielles du cerveau comme le cortex cérébral. Comme nous l'avons vu précédemment, les changements d'absorption et de diffraction de la lumière dans le tissu cérébral sont utilisés pour déterminer une zone neuronale active.

La technique de VSD repose sur le développement de sondes fluorescentes sensibles aux potentiels. Ce colorant, sensible aux modifications de potentiels, s'incorpore dans la membrane lipidique. Les premières applications du VSD sur des tissus d'invertébrés ont montré qu'il était possible d'enregistrer les changements rapides de potentiel membranaire comme un PA (Salzberg et al., 1973; Tasaki et al., 1968). Cette technique a également été mise au point *in vivo* permettant de visualiser les activations neuronales suite à des stimulations dans le cortex somatosensoriel ou visuel (Orbach et al., 1985).

Le Laser Doppler Vélocimétrie permet de mesurer la vitesse des particules se déplaçant dans un fluide. Cette méthode, comme son nom l'indique, se base sur l'effet Doppler : la lumière du laser se disperse au contact d'une particule mobile et change de fréquence. Cette modification de fréquence est proportionnelle à la vitesse de la particule et au sens du

mouvement. La fréquence initiale et la fréquence obtenue après passage dans le fluide sont ensuite comparées. La vitesse du fluide peut donc être déterminée grâce à cette différence de fréquence (Riva et al., 1972). Cette technique permet notamment de mesurer le flux sanguin et d'en déterminer les zones vasculaires actives.

Le *laser speckle contrast imaging* est une technique d'imagerie qui permet de déterminer le flux sanguin cérébral. Lorsqu'un objet est illuminé avec la lumière d'un laser, un effet d'interférence aléatoire connu sous le nom de *speckle pattern* est produit. S'il y a un mouvement de cet objet, on va observer une fluctuation dans l'intensité de ce *speckle pattern*. Ces informations donnent des indications sur le mouvement d'objets. Une façon simple d'accéder à ces informations est d'enregistrer le *speckle pattern*. En effet, les fluctuations conduisent à des troubles dans le *speckle pattern*, induisant une réduction du contraste de celui-ci. Ainsi, les variations de vitesse sont codées par les modifications de contraste du *speckle pattern*. En illuminant le cortex avec la lumière d'un laser et en enregistrant le *speckle pattern*, des images relatives du flux sanguin cérébral sont obtenues. Ces images ont une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde et une résolution spatiale de la dizaine de microns (Dunn et al., 2001).

Le fUS est une technique récemment adaptée et développée par Mickaël Tanter et Mathias Fink. L'échographie classique, aussi appelée ultrasonographie, est depuis longtemps utilisée en imagerie médicale. Les ondes ultrasonores sont utilisées pour leurs caractéristiques de changement d'index de réfraction, permettant d'obtenir des images structurales du corps. Cependant, cette technique n'avait pas pu être adaptée aux champs de la neuroimagerie pour deux raisons importantes : l'obstacle de l'os crânien pour le passage des ondes ultrasonores et la faible sensibilité causée par le faible signal des petits vaisseaux sanguins cérébraux.

Cette technique se base sur l'imagerie ultrason sur des animaux anesthésiés. Elle offre une bonne résolution spatiotemporelle avec une grande sensibilité aux changements de flux sanguin. De récentes améliorations de cette technique et de la taille de la sonde ultrasonore rendent des études sur le rat libre et éveillé possible.

La microscopie biphotonique de fluorescence est une technique relativement récente, apparue en 1990 (Denk et al., 1990). Les molécules sont « excitées » suite à l'absorption simultanée de deux photons de longueur d'onde double de celle requise pour un processus d'absorption

classique. L'excitation se fera donc dans l'infrarouge au lieu du visible UV⁴⁰ habituel. On utilise des lasers pulsés à haute fréquence dont on focalise le rayonnement grâce à l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence n'a alors lieu qu'au point où la densité de photons est la plus élevée donc au point focal de l'objectif de microscope.

La résolution micrométrique constitue l'avantage majeur du microscope biphotonique. Il n'y a plus de fluorescence émise hors du point focal, supprimant ainsi le signal parasite. Par ailleurs, la longueur d'onde d'excitation se situe dans le proche infrarouge, typiquement de 700 à 1000 nm, qui est une plage de plus grande transparence des tissus biologiques. Les photons infrarouges sont également moins diffusés par le tissu et le faisceau excitateur pénètre donc mieux dans le tissu. Une imagerie des couches plus profondes est de ce fait possible.

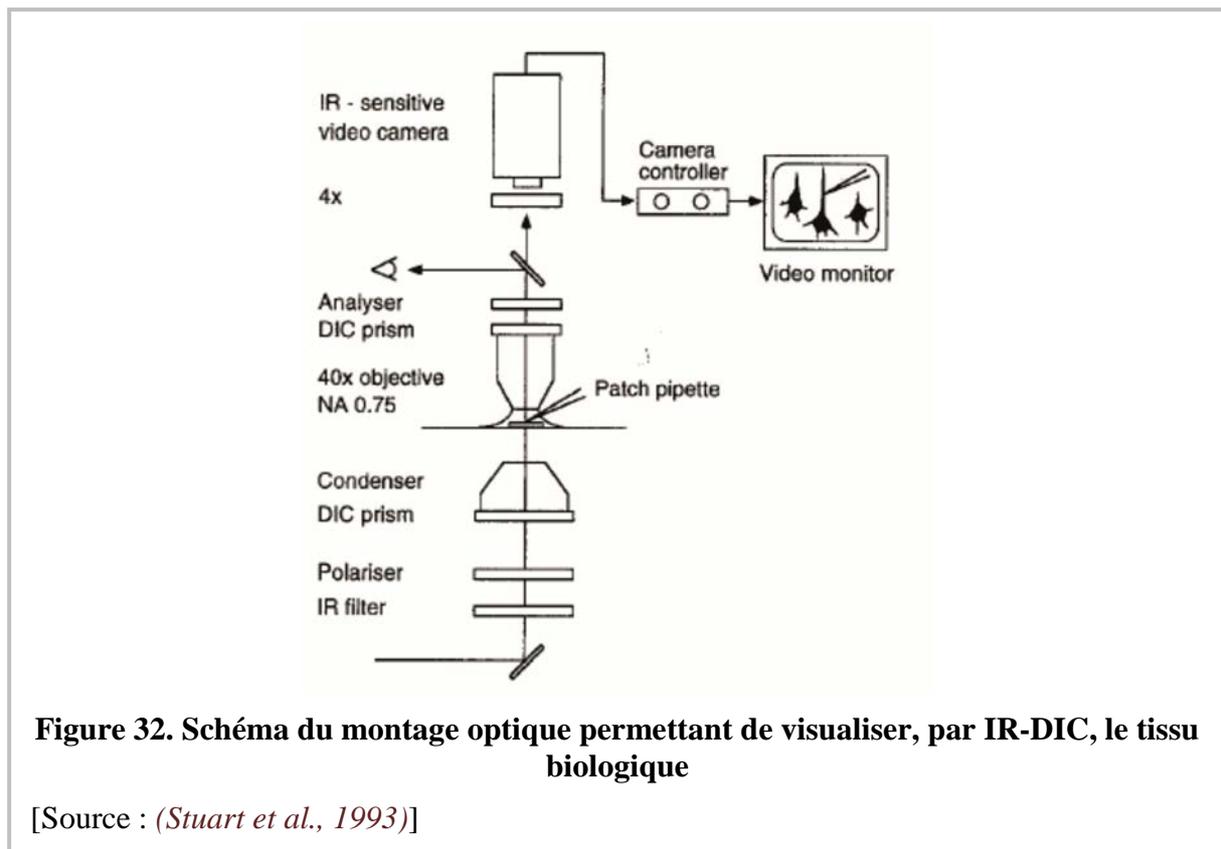
La vidéomicroscopie infrarouge correspond à une méthode *ex vivo*. Cette méthode a des applications dans plusieurs domaines. Cette technique se base sur les interférences différentielles de contraste (DIC⁴¹) optique des différents éléments du parenchyme cortical (ou d'une zone du cerveau, d'un autre organe...). Dodt et Zieglgansberger ont amélioré cette technique en utilisant le DIC combiné avec une illumination IR⁴² (Stuart et al., 1993; Dodt and Zieglgansberger, 1998)(**Figure 32**). Ceci a permis d'augmenter la résolution de l'image visualisée par la faible diffraction de la lumière infrarouge comparée à la lumière visible. Ce qui nous intéresse ici, c'est la possibilité d'observer les variations de diamètre des artérioles du parenchyme cortical (Sagher et al., 1993; Mishra et al., 2014).

Le principal inconvénient de ces méthodes reste leur caractère très invasif. Cependant, l'IOS, le VSD, la microscopie biphotonique et la vidéomicroscopie ont tous une très bonne résolution temporelle, de l'ordre de la milliseconde. Leur résolution spatiale est également très bonne puisqu'on peut visualiser des éléments de l'ordre du micromètre. Concernant les techniques d'IOS et de VSD, l'application *in vivo* se limite à la surface du cortex. La microscopie biphotonique permet une observation jusqu'à 500 µm, les champs latéraux étant plus difficilement accessibles du point de vue stéréotaxique. Il est à noter que le fUS permet d'avoir une résolution spatiale autour de 150-250 µm et une résolution temporelle de 50 à 2000 ms. Ces méthodes sont particulièrement appréciées pour les études des mécanismes

⁴⁰ UV : Ultra Violet

⁴¹ DIC : *Differential Interference Contrast*

⁴² IR : InfraRouge



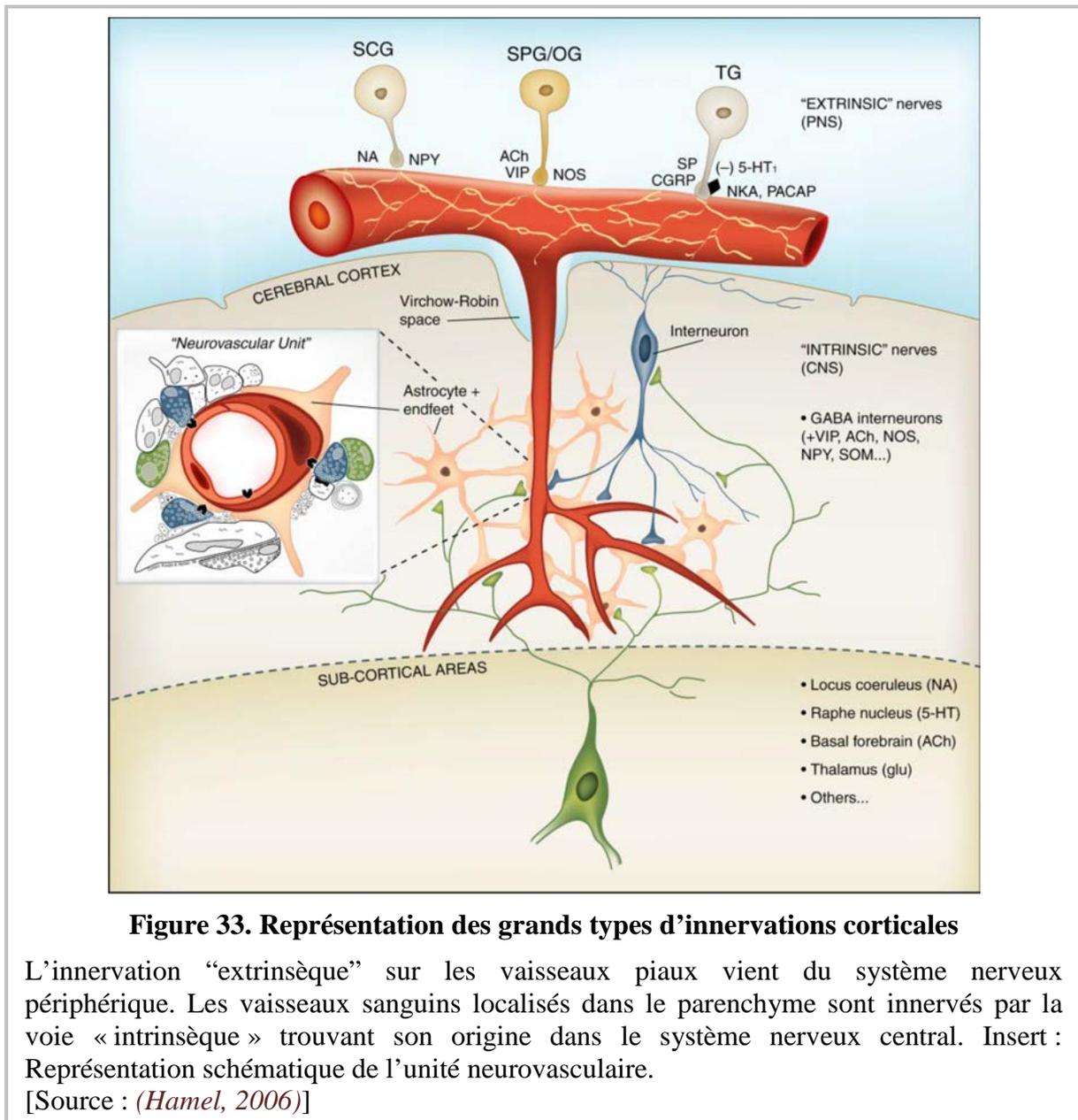
cellulaires et moléculaires fins qui se mettent en place lors d'activités neuronales autant en condition physiologique que pathologique.

II. La régulation du couplage neurovasculaire cortical a une origine extrinsèque et intrinsèque

Le tonus vasculaire est sous le contrôle de fibres nerveuses pouvant soit contracter soit dilater les vaisseaux sanguins. Deux grands types d'innervation se distinguent dans le cortex : l'innervation dite « extrinsèque » et l'innervation dite « intrinsèque » (Hamel, 2006).

1. La régulation extrinsèque périphérique agit de façon majoritaire sur les vaisseaux piaux

L'innervation extrinsèque, d'origine périphérique, concerne majoritairement les vaisseaux piaux. Il en existe trois types. Une innervation orthosympathique vasoconstrictrice. Cette dernière provient du ganglion cervical supérieur qui libère de la noradrénaline et du NPY. Une innervation parasympathique vasodilatatrice. Originaires des ganglions sphéno-palatins et



otiques, celle-ci libère de l'acétylcholine, du NO et du VIP. Enfin, une innervation sensorielle du ganglion trigéminal contenant du CGRP⁴³, de la substance P, de la neurokinine A et du PACAP⁴⁴. Cette innervation « extrinsèque » disparaît une fois l'espace de Virchow-Robin dépassé (**Figure 33**).

Malgré l'effet vasoconstricteur des neurotransmetteurs orthosympathiques sur les grosses artères cérébrales (Lincoln, 1995), la stimulation orthosympathique a de faibles effets sur le flux cérébral de repos en condition de pression artérielle standard (Faraci and Heistad, 1990).

⁴³ CGRP : Calcitonin Gene Related Peptide

⁴⁴ PACAP : Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide

Cependant, lors d'un déficit de l'autorégulation et une diminution de la résistance cérébrovasculaire, la stimulation orthosympathique diminue le flux sanguin cérébral (Tuor, 1992). Ainsi, un des rôles potentiels du système sympathique sur la circulation cérébrale serait d'élever la limite de l'autorégulation vers de hautes pressions. Ceci protégerait contre une augmentation de la pression veineuse, un dérèglement de la barrière hémato-encéphalique ou contre la formation d'un œdème (Lincoln, 1995;Faraci and Heistad, 1990).

La stimulation parasympathique a un effet vasodilatateur sur les artères cérébrales et augmente le flux sanguin cérébral (Suzuki and Hardebo, 1993). Le NO déplace la courbe d'autorégulation vers des valeurs de pressions plus faibles et aurait un rôle protecteur contre les ischémies cérébrales (Talman and Nitschke, 2007;Asahi et al., 2005).

L'innervation sensorielle du ganglion trigéminal est l'unique afférence sensorielle de la circulation cérébrale. Elle est impliquée dans la migraine et participe à la perception de la douleur lors de ce phénomène (Waeber and Moskowitz, 2005;Bolay et al., 2002).

La différence d'innervation entre les vaisseaux piaux et les artérioles du parenchyme cortical est causée, entre autres, par une différence de récepteur post-synaptique. En effet, les récepteurs situés sur les cellules musculaires lisses et l'endothélium varient en fonction de leur position corticale. Par exemple, les récepteurs noradrénergiques se composent de la sous unité $\alpha 1$ au niveau de l'artère cérébrale moyenne (Sandor, 1999) causant des vasoconstrictions par activation de la voie de la PLC⁴⁵-PKC⁴⁶. Cette réactivité des récepteurs $\alpha 1$ s'atténue sur les artères plus petites et devient absente des artérioles pénétrantes du parenchyme. En effet, ces récepteurs $\alpha 1$ sont remplacés par des récepteurs formés de sous unité β causant des vasodilatations (Lincoln, 1995). Une hétérogénéité similaire est retrouvée avec la sérotonine. Son effet contractant est retrouvé sur des petites artères (> 200 μm de diamètre) alors que son effet dilatateur est retrouvé sur des artérioles dont le diamètre est inférieur à 70 μm (Harper and MacKenzie, 1977;Lincoln, 1995).

L'existence d'une innervation périvasculaire de la circulation sanguine cérébrale est connue depuis des siècles (Willis, 1664). Cependant, son rôle est toujours aujourd'hui controversé. La densité d'innervation extrinsèque des vaisseaux piaux est très hétérogène. Par exemple, la densité d'innervation pour la sérotonine et la noradrénaline augmente sur l'axe rostro-caudal.

⁴⁵ PLC : PhosphoLipase C

⁴⁶ PKC : Protéine Kinase C

L'artère carotide interne est donc plus innervée que l'artère vertébro-basilaire. Ceci affecte le degré de vasoconstriction et les demandes métaboliques selon chaque territoire vasculaire du cerveau. De ce fait, il y a une hétérogénéité de réponse des artères cérébrales aux neurotransmetteurs.

2. La régulation intrinsèque d'origine sous-corticale régule le flux sanguin du cortex

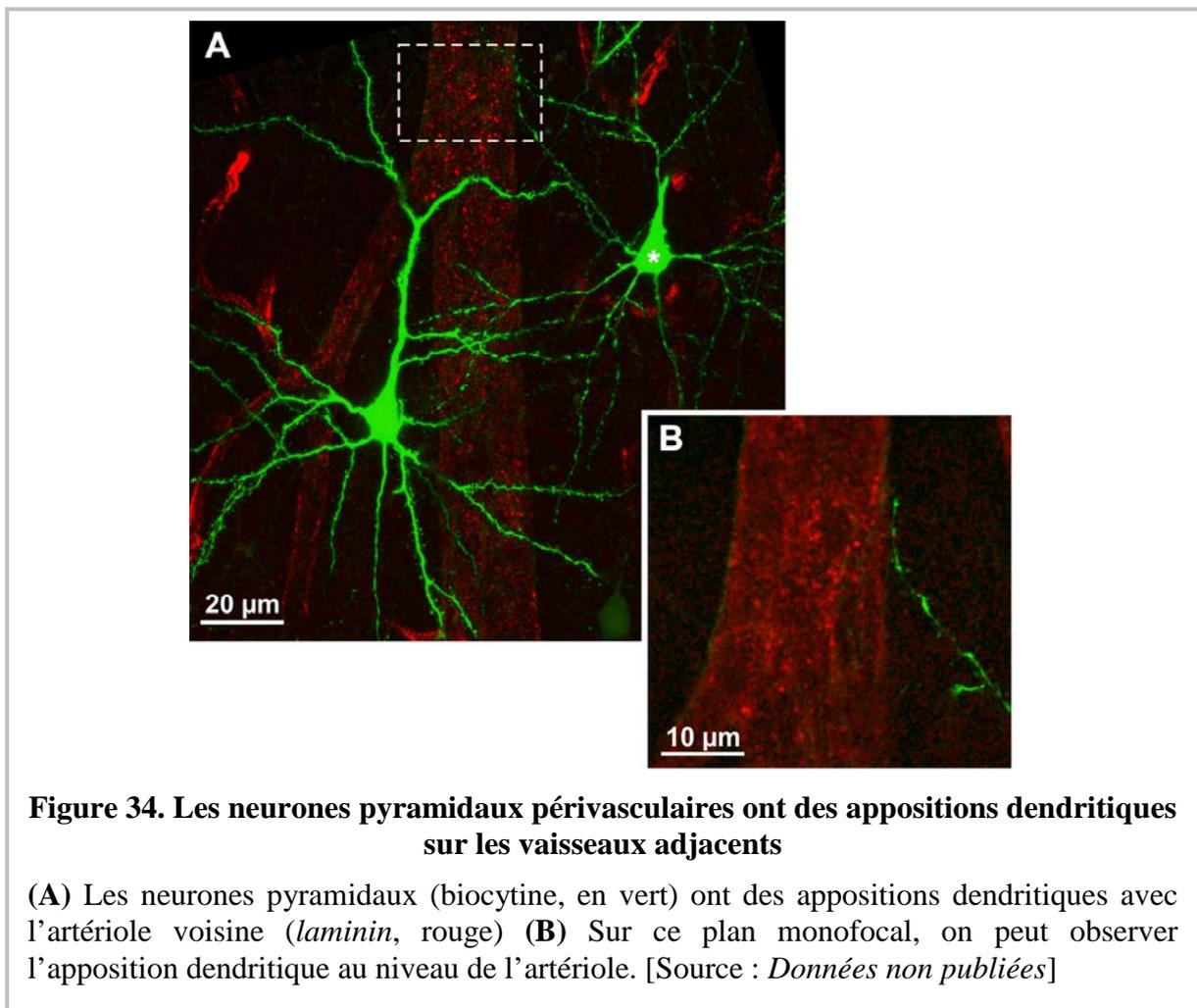
L'innervation intrinsèque concerne quant à elle des afférences centrales sous-corticales et intra-corticales (**Figure 33**). Les afférences sous-corticales périvasculaires sérotoninergiques du raphé (Cohen et al., 1995), noradrénergiques du *locus coeruleus* (Paspalas and Papadopoulos, 1996), cholinergiques du télencéphale basal (Vaucher and Hamel, 1995) et dopaminergique de l'aire tégmentale ventrale (Krimer et al., 1998) se projettent également sur les éléments neuronaux et astrocytaires du cortex. Elles induisent des réponses vasculaires complexes. Bien que la couverture astrocytaire des vaisseaux sanguins soit presque complète (Kacem et al., 1998), l'observation en microscopie électronique de coupes sériées a révélé que certaines de ces terminaisons sont directement apposées sur la lame basale externe des vaisseaux sanguins (Cohen et al., 1995;Paspalas and Papadopoulos, 1996).

3. De nombreux messagers vasoactifs régulent le flux sanguin cortical local

Le dernier type d'innervation « intrinsèque » est celui réalisé par les cellules du néocortex. Ici, on peut réellement parler d'innervation « intrinsèque ». Certains des messagers vasoactifs des innervations « extrinsèques » sont également des marqueurs de sous-populations d'interneurones. C'est notamment le cas du VIP, de l'acétylcholine, du NO et du NPY. Les neurones bipolaires à VIP co-expriment assez fréquemment l'acétylcholine transférase (Eckenstein and Baughman, 1984;Chedotal et al., 1994a) et la CCK (Papadopoulos et al., 1987;Kubota and Kawaguchi, 1997) dans les couches granulaires et supragranulaires.

Les terminaisons VIPergiques, cholinergiques (Chedotal et al., 1994b) et CCKergiques (Hendry et al., 1983) de ces neurones établissent des appositions périvasculaires, souvent dendritiques, sur les artérioles pénétrantes. Les neurones exprimant le NPY ou le NO présentent des contacts pouvant aller jusqu'à l'apposition directe du soma sur les vaisseaux (Abounader and Hamel, 1997; Estrada and DeFelipe, 1998; Estrada et al., 1993; Estrada and DeFelipe, 1998; Wang et al., 2004). Les neurones pyramidaux sont également susceptibles de libérer des substances vasoactives par leurs appositions dendritiques périvasculaires (**Figure 34**). Ces contacts sont généralement séparés de la paroi vasculaire par un simple feuillet astrocytaire.

L'ensemble des agents vasoactifs du néocortex est en étroite relation. Différents acteurs peuvent interagir dans les réponses vasculaires ce qui complexifie leurs études. De ce fait, les messagers du couplage neurovasculaire du cortex seront traités par classe dans la suite du manuscrit.



Glutamate

Le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau. Bien que celui-ci ne semble pas directement impliqué dans le couplage neurovasculaire, l'activation des récepteurs glutamatergiques, autant métabotropiques que ionotropiques induit un grand nombre de processus intracellulaires (Faraci and Breese, 1993;Bhardwaj et al., 2000;Dirnagl et al., 1993).

La liaison du glutamate sur ses récepteurs va conduire entre autres à une régulation du flux sanguin cérébral par une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} au niveau post-synaptique. Cette augmentation déclenche notamment l'activation de l'enzyme de synthèse du NO, la NOS⁴⁷, et par conséquent la production de NO (Faraci and Breese, 1993;Sattler et al., 1999). L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} induit également une activation de la PLA₂ qui va recruter l'acide arachidonique contenu dans la bicouche lipidique. Cette molécule peut ensuite être métabolisée selon plusieurs voies qui seront détaillées plus loin. Ce recrutement de l'acide arachidonique a aussi lieu dans les astrocytes par activation de la PLA₂. L'augmentation du métabolisme de l'ATP associée à l'activité neuronale conduit à la production d'adénosine, puissant vasodilatateur, libérée dans le milieu extracellulaire par des transporteurs spécifiques (Iliff et al., 2003).

Récemment, un autre mécanisme de déclenchement des réponses hémodynamiques, impliquant le glutamate et mettant en jeu les astrocytes, a été proposé. En plus des récepteurs glutamatergiques, les astrocytes disposent d'un autre moyen pour détecter l'activité synaptique excitatrice. Deux types de transporteurs du glutamate, GLAST⁴⁸ et GLT-1⁴⁹, sont spécifiquement exprimés par les astrocytes (Kanai, 1997;Danbolt, 2001). Le glutamate alors libéré dans l'espace extracellulaire lors de l'activité neuronale est capturé. Ce transport, en augmentant l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase, stimulerait la glycolyse astrocytaire et consécutivement, la capture de glucose à partir des vaisseaux sanguins (Pellerin and Magistretti, 1994;Kasischke et al., 2004;Vlassenko et al., 2006;Magistretti and Pellerin, 1999;Raichle and Mintun, 2006).

⁴⁷ NOS : *Nitric Oxide Synthase*

⁴⁸ GLAST : *GLutamate ASpartate Transporter*

⁴⁹ GLT-1 : *GLial glutamate Transporter 1*

Actuellement, le mécanisme à l'origine de l'augmentation de capture du glucose sanguin n'est pas connu. Cependant, plusieurs travaux confirment cette hypothèse. L'injection d'oligonucléotides antisens de GLAST, entraînant une sous régulation de ce transporteur, induit une diminution de plus de 50% des réponses métaboliques (mesure de la consommation de glucose) déclenchées par la stimulation des vibrisses (Cholet et al., 2001). On constate aussi que chez des souris KO pour GLAST, la capture de glucose dans le bulbe olfactif est réduit (Martin et al., 2012). De même, les réponses métaboliques induites par une stimulation sensorielle sont atténuées chez des souris déficientes pour chaque type de transporteur, GLAST ou GLT-1 (Voutsinos-Porche et al., 2003; Herard et al., 2005). Plus récemment, des expériences de pharmacologie *in vivo* ont montré que l'inhibition spécifique des transporteurs GLAST et GLT-1 réduit les réponses hémodynamiques dans le bulbe olfactif (Gurden et al., 2006; Petzold et al., 2008) et dans le cortex visuel (Schummers et al., 2008).

Le monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote, ou NO, est une petite molécule réactive impliquée dans de nombreuses régulations biologiques. Caractérisé il y a plus de 200 ans par Joseph Priestly, sa fonction de messenger biologique a été reconnue seulement dans le milieu des années 1980 (Furchgott and Zawadzki, 1980). Le NO est synthétisé à partir de L-arginine et de dioxygène par les enzymes NO synthases (**Figure 35**). Ces enzymes sont des hémoprotéines proches du cytochrome P450 (Snyder, 1992; Groves and Wang, 2000). Il existe trois types d'isoformes de la NOS :

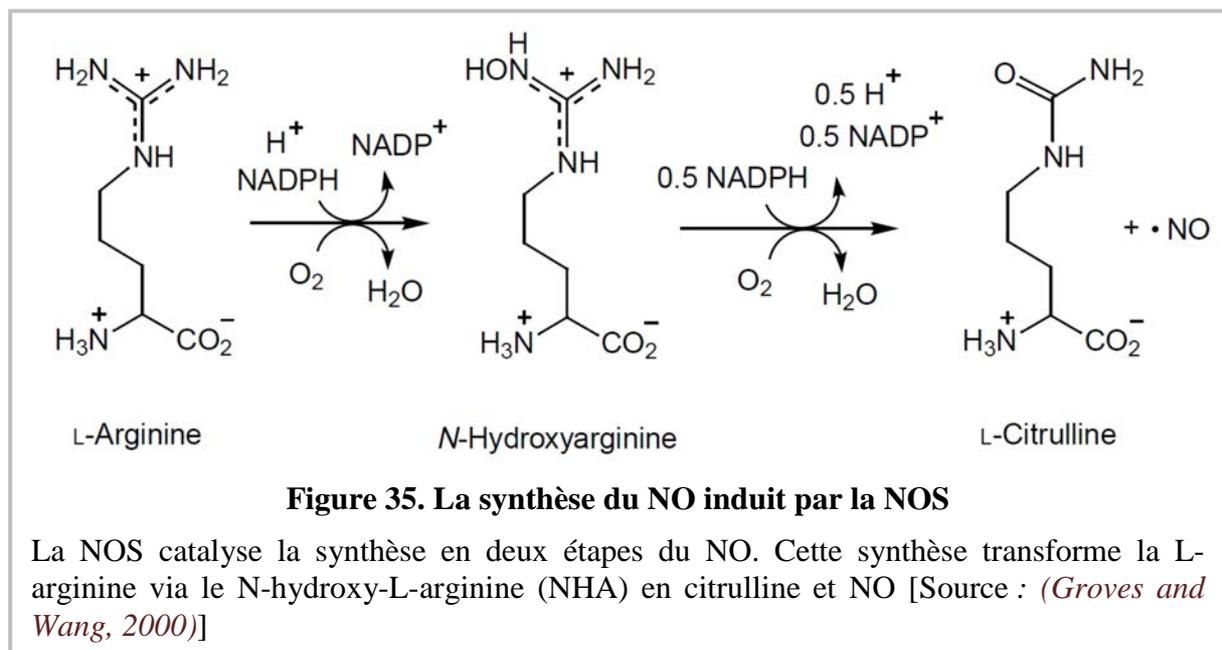
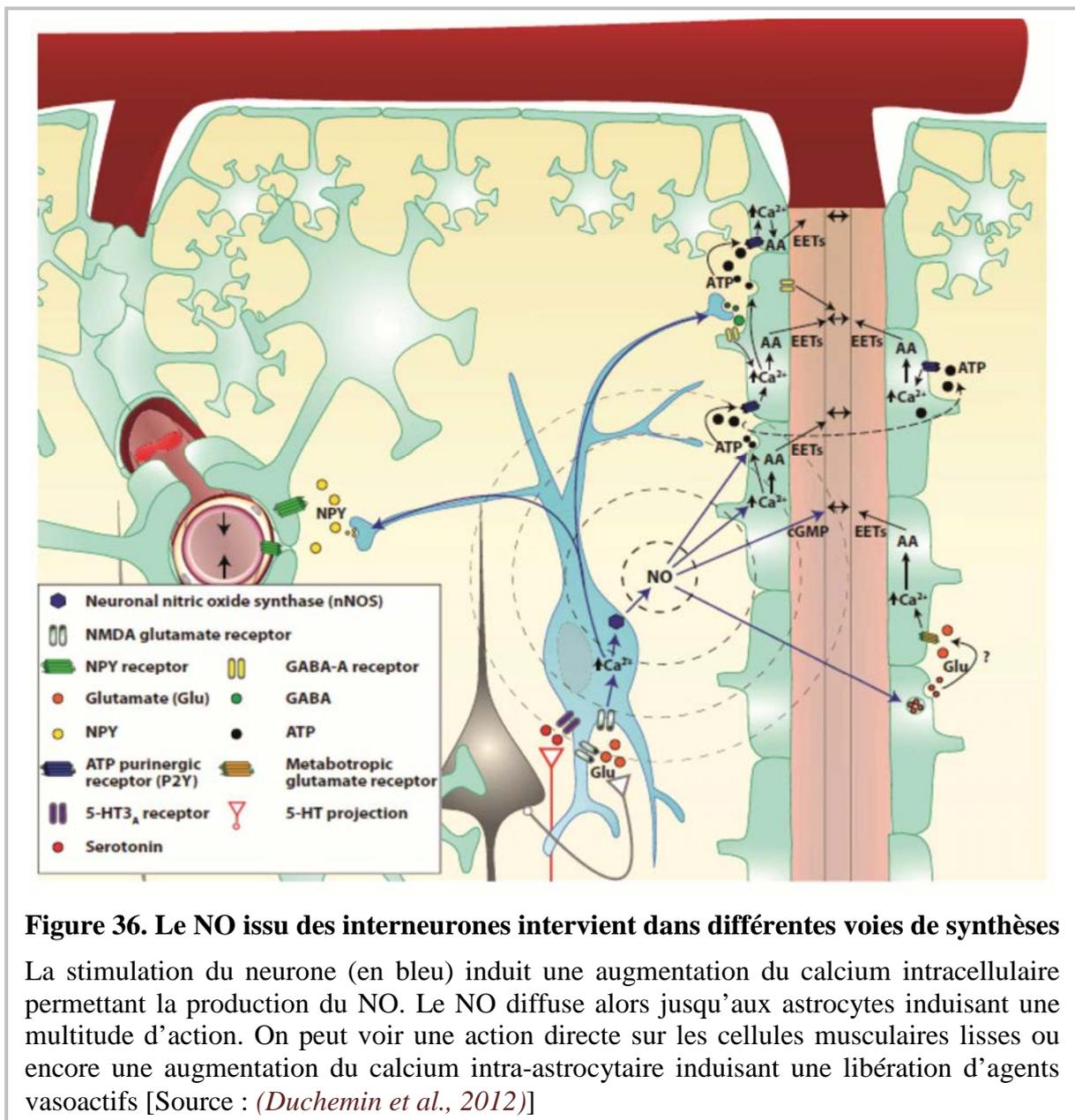


Figure 35. La synthèse du NO induit par la NOS

La NOS catalyse la synthèse en deux étapes du NO. Cette synthèse transforme la L-arginine via le N-hydroxy-L-arginine (NHA) en citrulline et NO [Source : (Groves and Wang, 2000)]

deux formes constitutives, d'origine endothéliale (eNOS⁵⁰) et neuronale (nNOS) et une forme inducible (iNOS⁵¹).

L'effet vasodilatateur de ce gaz dans le cerveau a été montré dans plusieurs études. Dans le cervelet, l'inhibition de la synthèse de NO provoque une réduction nette de la réponse hémodynamique induite par une stimulation électrique ou pharmacologique (Akgoren et al., 1994; Rancillac et al., 2006; Akgoren et al., 1996). L'utilisation de souris génétiquement modifiées, qui n'expriment pas la nNOS, a récemment confirmé ces résultats (Yang et al.,



⁵⁰ eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

⁵¹ iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase

2003). On peut noter que chez des souris KO⁵² pour la eNOS et la nNOS, les changements vasculaires sont les mêmes que chez les souris sauvages. Cependant, chez des souris KO pour la eNOS, les vasodilatations sont supprimées en présence de L-NA⁵³ (Ayata et al., 1996) alors que les réponses vasculaires sont inchangées chez des souris KO pour la nNOS (Ma et al., 1996). La forme neuronale de la NOS est donc impliquée dans les changements de flux sanguin induits par stimulation des vibrisses. De même dans le cortex somatosensoriel, les réponses vasculaires induites par une stimulation sensorielle (Dirnagl et al., 1994;Cholet et al., 1996;Stefanovic et al., 2007) ou électrique (Hoffmeyer et al., 2007) sont atténuées lorsque la synthèse de NO est inhibée.

Cependant, l'effet du NO est variable selon les régions cérébrales. En effet, Cholet et coll. ont montré que le NO jouait un rôle dans le couplage neurovasculaire dans le cortex somatosensoriel et le thalamus mais pas dans le noyau trigéminal primaire chez le rat (Cholet et al., 1996;Cholet et al., 1997). Des observations similaires ont été faites par stimulations des vibrisses sur des rats non anesthésiés. Le 7-NI⁵⁴ altère l'augmentation du flux cérébral dans le noyau thalamique ventroposteromédian et le dans le cortex. Par contre, il n'affecte pas les noyaux sensoriels trigéminaux principaux (Gotoh et al., 2001). En considérant la distribution des interneurons exprimant le NO et ces résultats, cela suggère l'idée d'un contrôle du flux sanguin cérébral venant des neurones GABAergiques [Figure 36 (Bertini et al., 1996;Mize et al., 1996)].

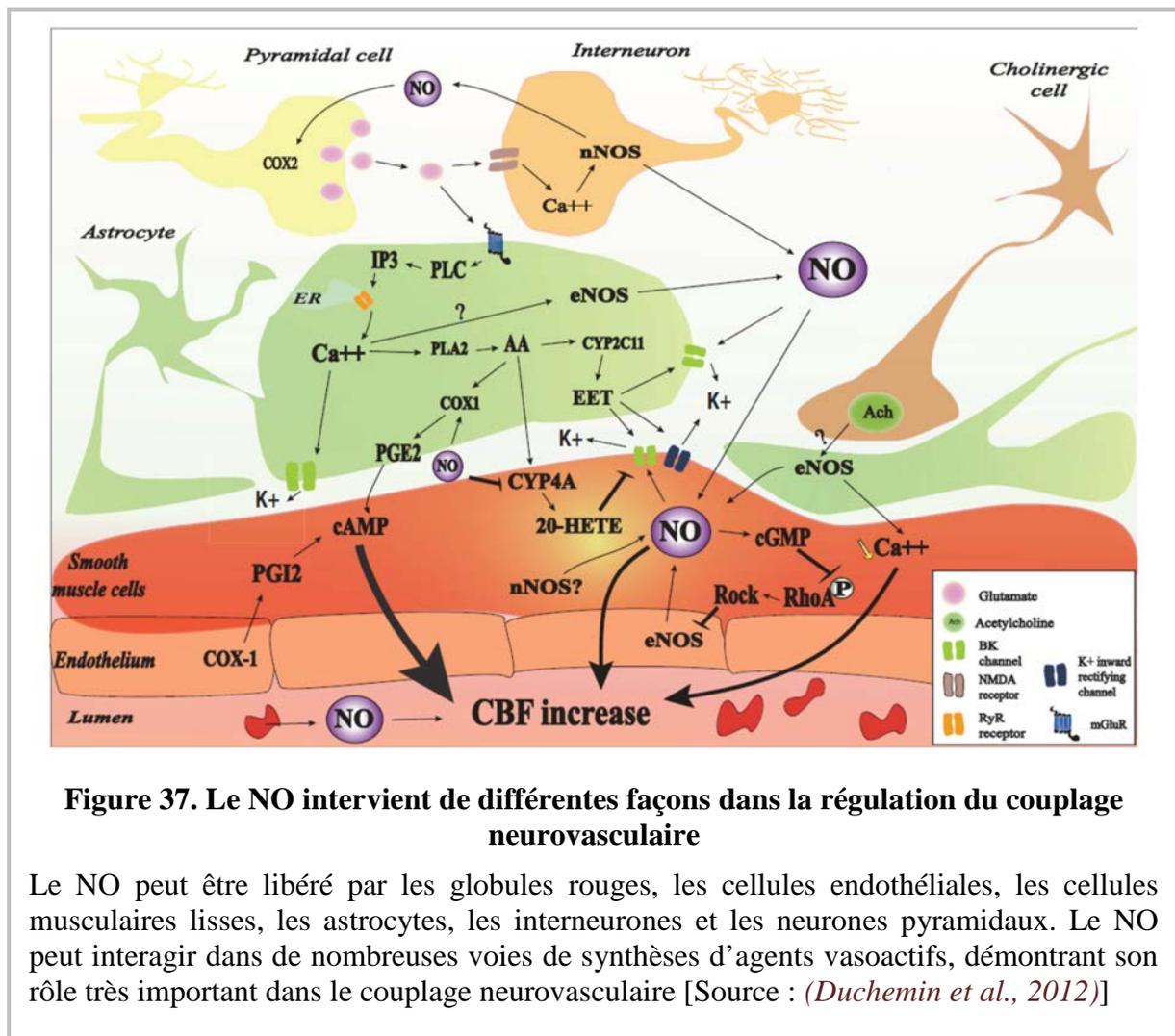
L'action du NO sur les différentes voies permettrait de moduler les réponses vasculaires (Figure 37). L'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire dans les interneurons suivant l'activation des récepteurs ionotropiques glutamatergiques et/ou sérotoninergiques serait responsable de l'initiation de la réponse vasculaire. Par contre, pour de longues stimulations, la libération de NO aurait un rôle permissif pour les autres agents vasomodulateurs permettant une augmentation du flux sanguin (pour revue, (Duchemin et al., 2012)).

Cependant, il existe aujourd'hui une controverse quant à l'action vasodilatatrice du NO dans le cortex somatosensoriel. En effet, dans cette région, le NO aurait plutôt un rôle permissif dans le couplage neurovasculaire. Lindauer et coll. ont montré que l'inhibition de la NOS

⁵² KO : Knock Out

⁵³ L-NA : nitro-L-arginine (inhibiteur de NOS)

⁵⁴ 7-NI : 7-Nitroindazole (inhibiteur de la nNOS)



mais aussi de la GC⁵⁵ soluble sensible au NO atténue la vasodilatation produite par la stimulation des vibrisses chez le rat. Cette atténuation est abolie en appliquant des donneurs de NO ou du GMPc⁵⁶. Leurs données suggèrent que la variation du flux sanguin cérébral aux stimulations somatosensorielles nécessite un niveau basal de NO/GMPc. Lors d'une stimulation des vibrisses, le NO a une action de modulateur plutôt que de médiateur de la relaxation vasculaire, permettant la vasodilatation par d'autres médiateurs (*Lindauer et al., 1999*).

Par ailleurs, la concentration de NO régulerait le tonus vasculaire dans le sens d'une vasodilatation ou d'une vasoconstriction [**Figure 38** (*Metea and Newman, 2006; Hirase, 2005; Rancillac et al., 2006; Straub and Nelson, 2007; Duchemin et al., 2012*)]. Des travaux

⁵⁵ GC : Guanylate Cyclase

⁵⁶ GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique

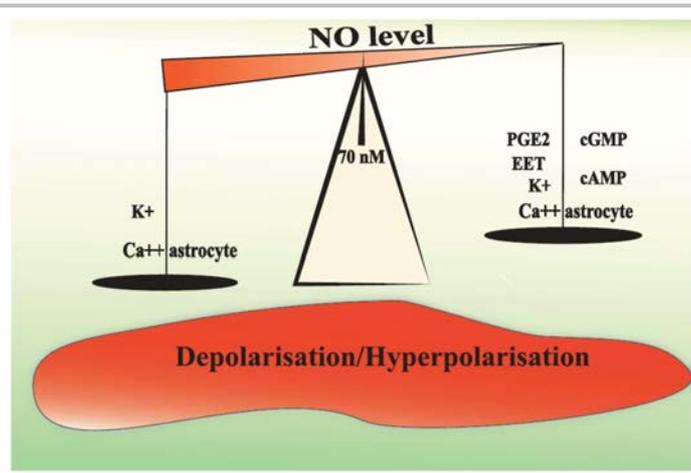


Figure 38. Le rôle hypothétique du NO

En fonction de la concentration de NO libéré dans le milieu extracellulaire, les réponses vasculaires peuvent être opposées. En effet, une augmentation modérée de la concentration en NO induit une libération d'agents vasodilatateurs et induit une relaxation des cellules musculaires lisses. Cependant, une augmentation très importante de la concentration en NO peut conduire à une libération accrue de potassium induisant des vasoconstrictions [Source : (Duchemin et al., 2012)]

récents de Mulligan et MacVicar ont déterminé les effets de l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par décaage de Ca^{2+} . Zonta et coll. ont eux induit une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire par activation des récepteurs métabotropiques du glutamate. Cependant, un fait important et différent de ces deux études est l'utilisation d'un bloquant de la synthèse du NO par Zonta et coll. Cela a induit un état « contracté » des cellules musculaires lisses vasculaires tandis que Mulligan et coll n'ont pas bloqué cette synthèse, induisant un état « relaxé » des cellules musculaires lisses (Zonta et al., 2003; Mulligan and Macvicar, 2004). Ces données suggèrent donc que les réponses vasculaires seraient également dépendantes de l'état de contraction ou de dilatation des artérioles.

En effet, les résultats de l'étude de Blanco et coll. ont montré qu'en fonction de l'état de contraction des vaisseaux parenchymateux, la réponse vasomotrice était différente. L'application du t-ACPD⁵⁷ sur des tranches de néocortex, activant les récepteurs métabotropiques astrocytaires du glutamate, induit des vasodilatations lorsque les artérioles sont contractées (jusqu'à 70% du diamètre initial) et des vasoconstrictions au-dessus de 70% du diamètre initial (Blanco et al., 2008).

⁵⁷ t-ACPD : *trans-1-AminoCyclopentane-1,3-Dicarboxylic acid* (agoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate de type II)

Peptides

Plus de cent neuropeptides ont été décrits à ce jour. Ils interviennent dans de nombreux processus comme dans la régulation du sommeil, de l'éveil, de la récompense, de la douleur ou encore dans les processus d'apprentissage. Il est intéressant de noter que ces peptides servent également à établir des classifications d'interneurones, comme nous l'avons vu dans la partie A.II.3. Certains de ces neuropeptides sont impliqués dans la régulation du flux sanguin cortical.

À la fin des années 1980 et au début des années 1990, des études ont montré l'implication du VIP, du NPY et de la SOM dans les variations de débit sanguin. En effet, par injection intraveineuse ou intracérébrale, le VIP induit une augmentation du flux sanguin tandis que le NPY et la SOM induisent une diminution du flux sanguin (Yaksh et al., 1987; Tuor et al., 1990; Long et al., 1992). De plus, le récepteur VPAC1⁵⁸, impliqué dans la dilatation des artères piales, est exprimé dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux corticaux (Fahrenkrug et al., 2000). De ce fait, le VIP induit une vasodilatation de ces vaisseaux. À l'opposé de l'action du VIP, le NPY et la SOM ont un effet vasoconstricteur (Cauli et al., 2004). Ces données sont appuyées par la présence des ARN⁵⁹ messagers (Abounader et al., 1999) et de la protéine (Bao et al., 1997) du récepteur Y du NPY au niveau des artérioles du néocortex (**Figure 39**).

Les astrocytes expriment également une diversité de récepteurs des neuropeptides produits par les interneurones GABAergiques périvasculaires (Martin et al., 1992; Viollet et al., 1997; Abounader and Hamel, 1997). Ceci suggère donc que les astrocytes seraient susceptibles d'intervenir dans les réponses vasculaires engendrées par le VIP, le NPY et la SOM des interneurones (Straub et al., 2006). Cependant, la libération de ces molécules par les astrocytes périvasculaires, apparentée au rôle vasodilatateur du GABA sur les vaisseaux (Fergus and Lee, 1997a), n'offre pas de réponse vasomotrice sélective contrairement à l'action directe des neuropeptides sur leur récepteur induisant une réponse vasculaire (Cauli et al., 2004).

Prostanoïdes

⁵⁸ VPAC1 : Récepteur au VIP

⁵⁹ ARN : Acide ribonucléique

Les prostanoides sont des éicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique, premier eicosanoïde chez les mammifères. Les prostaglandines sont formées dans un grand nombre de types cellulaires du corps. Ce sont des lipides qui agissent de façon autocrine ou paracrine. Ils ne sont pas stockés mais directement synthétisés à partir de la libération de l'acide arachidonique contenu dans la membrane lipidique. Le contrôle de la libération de l'acide arachidonique dépend entre autres du recrutement de la PLA₂, elle-même activée par une entrée de Ca²⁺ dans la cellule. Les prostanoides sont impliqués dans un très grand nombre de processus biologiques comme l'inflammation, la douleur ou la fièvre [Figure 40 (Funk, 2001)]. De plus, leur rôle dans le couplage neurovasculaire est également essentiel.

La synthèse des prostaglandines est dépendante de l'activité des enzymes limitantes appelées

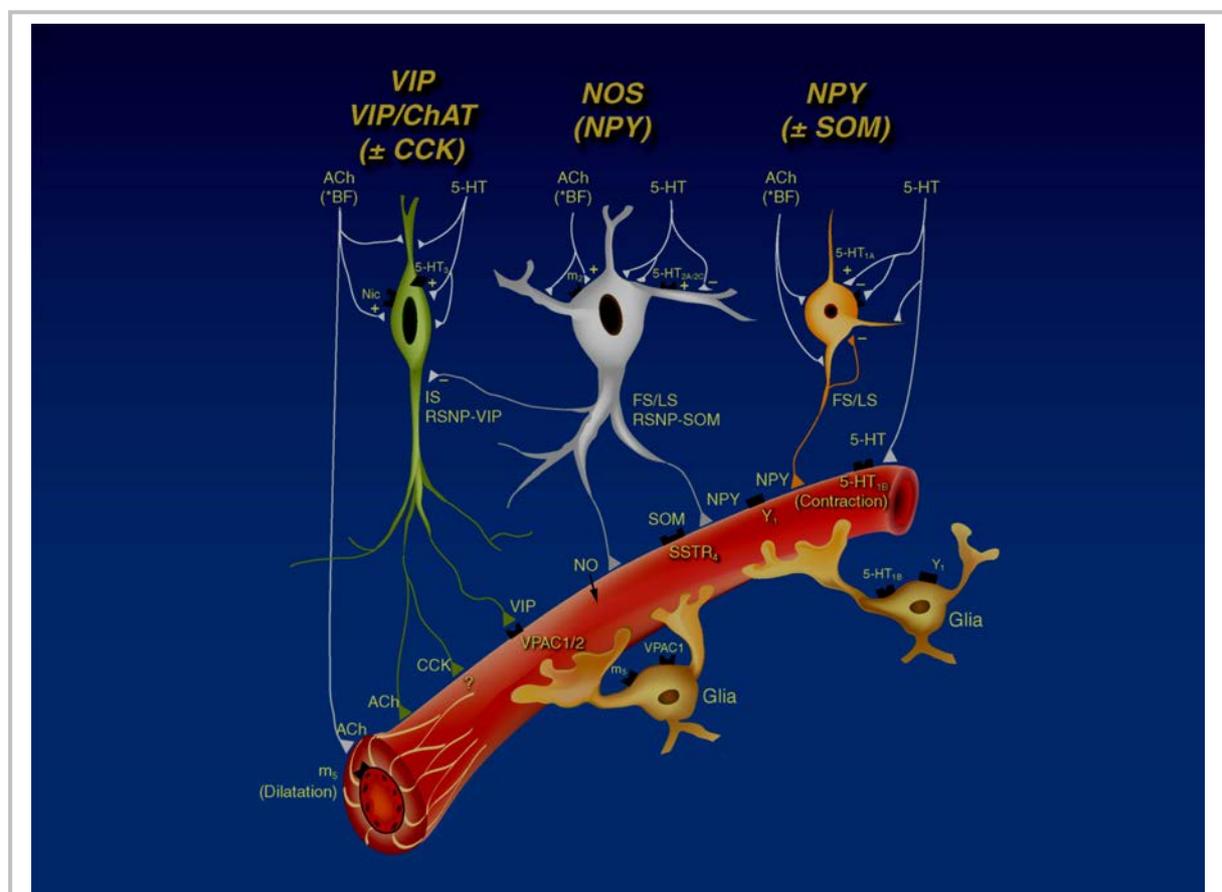
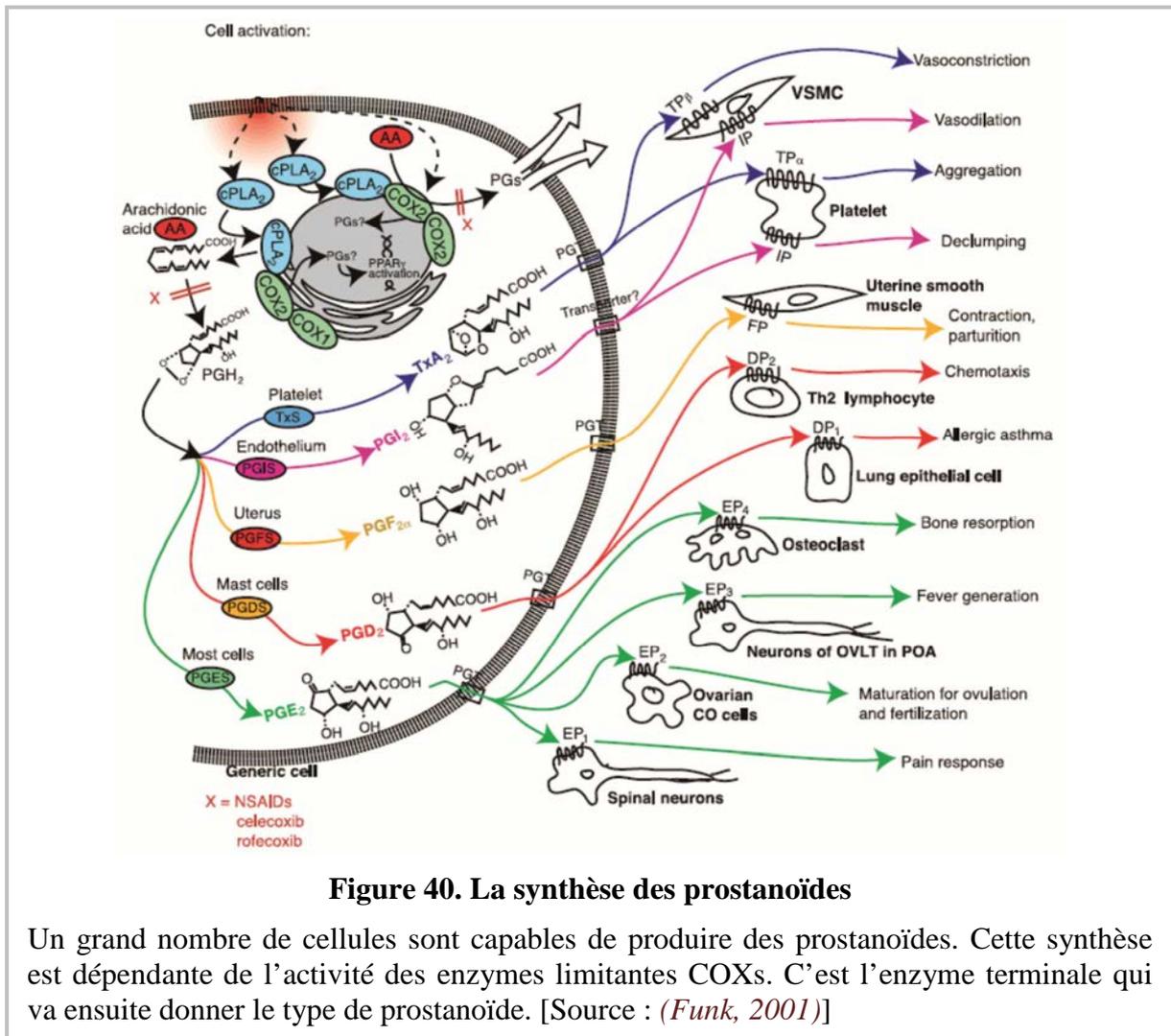


Figure 39. Rôle des différents peptides produits par les interneurones sur le couplage neurovasculaire

Les interneurones corticaux sont capables de réguler le flux sanguin cérébral par la libération de peptide comme la SOM, le NPY ou le NO. Ce sont également de potentiels relais pour les afférences extracorticales cholinergiques ou sérotoninergiques. [Source : (Cauli et al., 2004)]

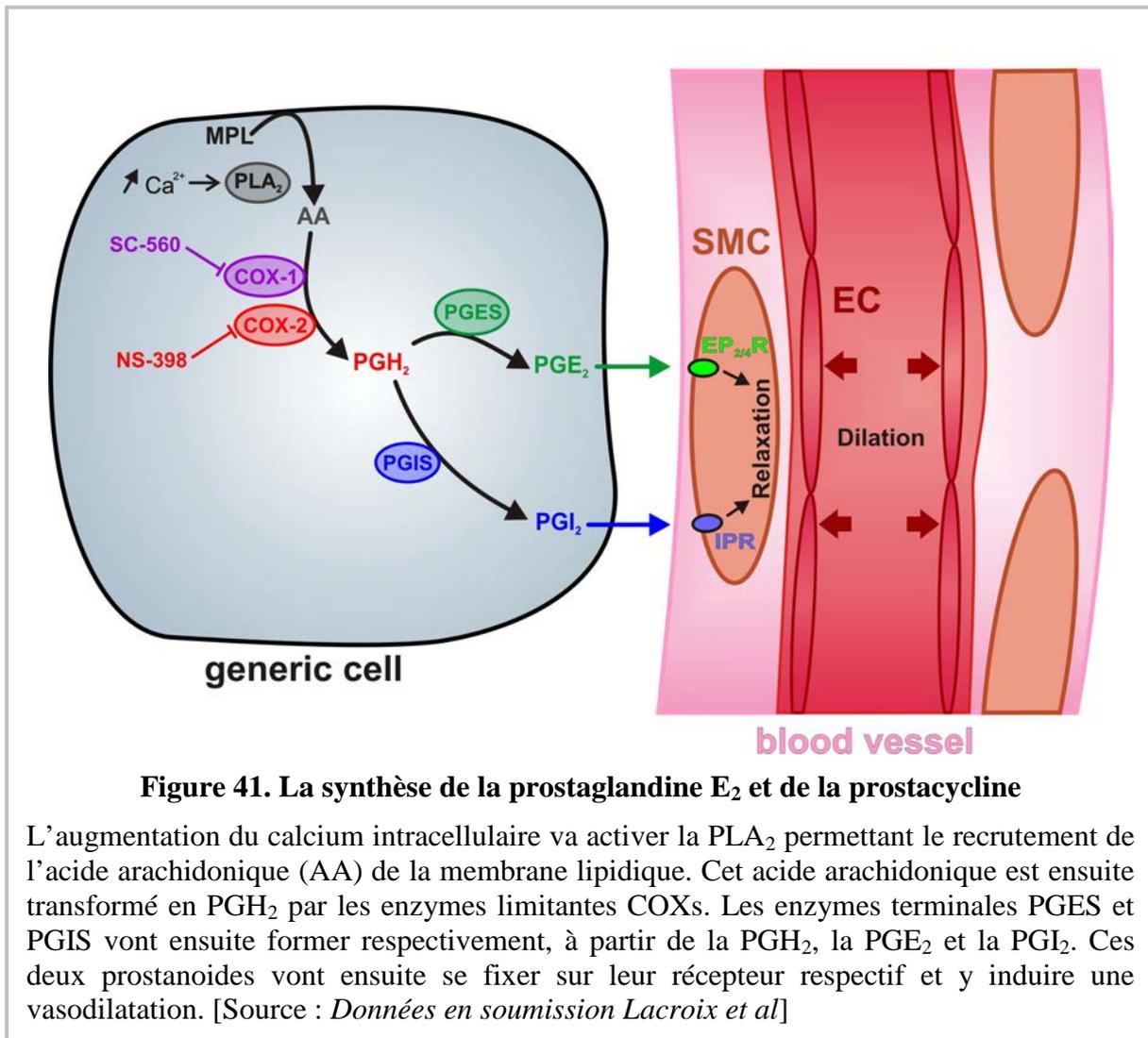


cyclo-oxygénases. Il en existe trois isoformes, la COX-1, la COX-2 et la COX-3. Cependant, la COX-3 est un variant d'épissage de la COX-1 (Chandrasekharan et al., 2002). Un fait intéressant à noter est que la COX-1 est connue pour être constitutive alors que la COX-2 serait plutôt la forme inducible. Cependant, Yamagata et coll. montrent une distribution constitutive de la COX-2 dans les neurones des couches superficielles du cortex cérébral (Yamagata et al., 1993). Ces données sont également appuyées par les travaux de Kaufmann qui montrent par immunohistochimie une localisation de la COX-2 dans les neurones pyramidaux (Kaufmann et al., 1996). Les COXs forment à partir de l'acide arachidonique le précurseur commun à toutes les prostaglandines, la PGH_2^{60} . Cette PGH_2 est ensuite

⁶⁰ PGH_2 : ProstaGlandine H₂

transformée soit en PGE₂⁶¹ par l'une des trois isoenzymes de la PGES⁶² soit en PGI₂⁶³ par la PGIS⁶⁴ (Figure 41).

Quatre types de récepteurs fixent la PGE₂ (EP1- EP4⁶⁵) et un récepteur (IP⁶⁶) fixe la PGI₂. Les récepteurs IP, EP2 et EP4 induisent une augmentation d'AMPc et sont appelés « relaxants ». Le récepteur EP1 induit une mobilisation de Ca²⁺ et constitue un récepteur « contractant ». Le récepteur restant, EP3, est considéré comme un récepteur « inhibiteur » puisqu'il implique



⁶¹ PGE₂ : ProstaGlandine E₂

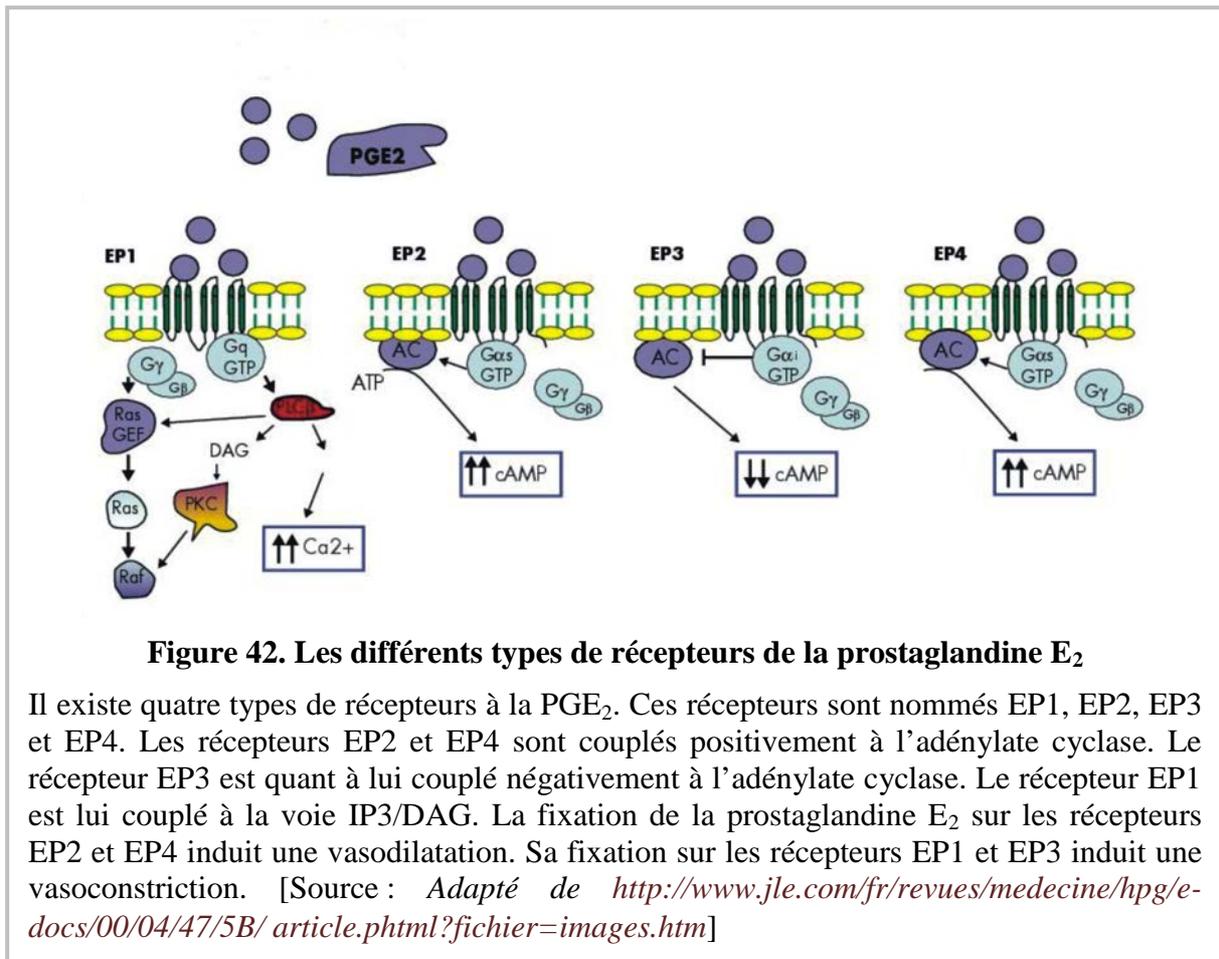
⁶² PGES : ProstaGlandine E₂ Synthase

⁶³ PGI₂ : Prostacycline

⁶⁴ PGIS : Prostacycline Synthase

⁶⁵ EP : Récepteur de la prostaglandine E₂

⁶⁶ IP : Récepteur de la prostacycline



une diminution de l'AMPC [Figure 42 (Narumiya and FitzGerald, 2001)].

Les prostaglandines et en particulier la PGE₂, participent à la réponse vasculaire. En effet, la PGE₂ peut induire une relaxation des cellules musculaires lisses par leur fixation sur leurs récepteurs (EP2 et EP4). Ceci induit une activation de la PKA⁶⁷ par l'AMPC et donc une diminution la phosphorylation des chaînes légères de myosine (Attwell et al., 2010). La dilatation obtenue par la PGE₂ est également le reflet d'une activation des canaux potassiques au niveau des cellules musculaires lisses. Leur potentiel de membrane devient plus négatif et induit une diminution de l'entrée de Ca²⁺ par les canaux calciques voltages dépendants (Serebryakov et al., 1994).

Des études autant *ex vivo* qu'*in vivo* ont montré l'implication des prostanoïdes dans les réponses vasculaires. En effet, les travaux de Niwa et coll. ont montré que le flux cérébral sanguin induit par la stimulation de vibrisses était diminué lorsque la COX-2 était bloquée.

⁶⁷ PKA : Protéine Kinase A

De plus, ce résultat a été observé autant avec l'application d'un inhibiteur de la COX-2 que sur une souris génétiquement manipulée aboutissant à l'absence du gène de la COX-2 (Niwa et al., 2000). Une autre étude du même groupe a pu montrer que la réponse vasodilatatrice engendrée par une stimulation des vibrisses n'était pas dépendante de la COX-1. En effet, ni l'application de l'inhibiteur spécifique de la COX-1 ni une souris KO pour le gène de la COX-1 ne modifient la réponse de flux sanguin à la stimulation des vibrisses (Niwa et al., 2001). Ces données suggèrent donc un rôle essentiel de la COX-2 constitutive dans les réponses vasodilatatrices induites par des stimulations des vibrisses.

De plus, l'étude *ex vivo* de Zonta et coll. a montré que l'application exogène de PGE₂ induisait une vasodilatation (Zonta et al., 2003). Cependant, une étude sur des artères isolées a montré un rôle inverse de la PGE₂ sur la réponse vasculaire. En effet, l'application de la PGE₂ sur des artérioles isolées induit une constriction artériolaire (Dabertrand et al., 2013). De plus, cette même étude a montré des vasodilatations par application de la PGI₂ (Dabertrand et al., 2013). Ces données sont appuyées par une étude montrant des vasodilatations sur des artères après application de la PGI₂ (Myren et al., 2011). Ces résultats contradictoires laissent encore une place au doute quant à l'action et à l'origine de la PGE₂.

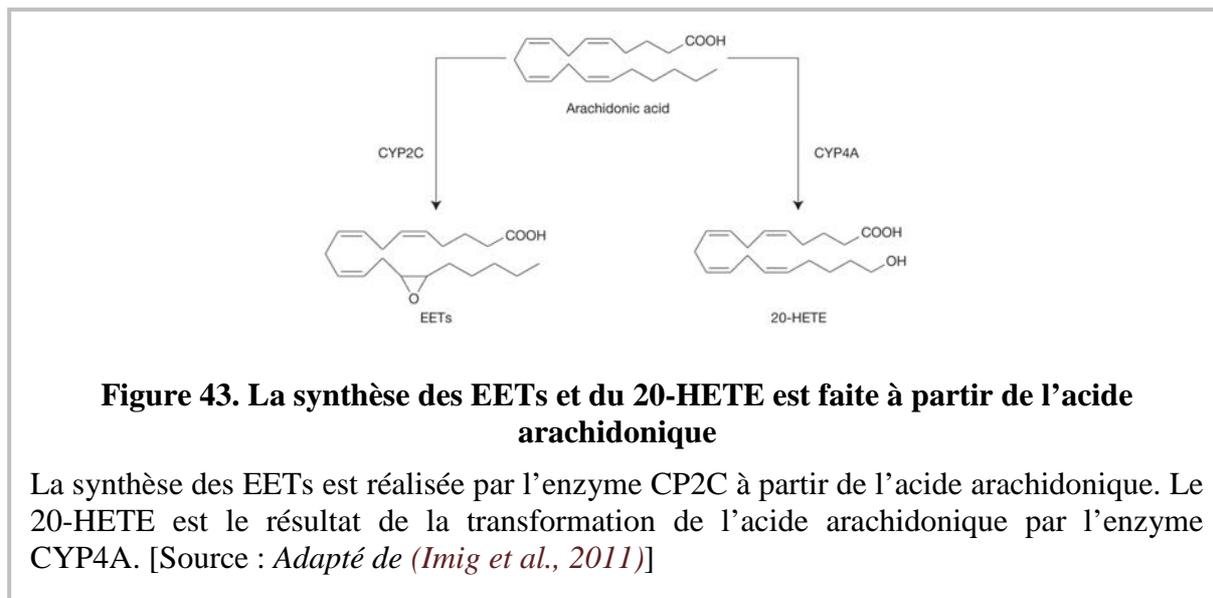
Acide époxy-eicosatriénoïque (EET) et Acide 20-hydroxy-eicosatétraénoïque (20-HETE)

Les EETs et le 20-HETE⁶⁸ sont des métabolites des CYPs⁶⁹. Les cytochromes P450 se répartissent en une grande famille d'enzymes. Les deux formes qui nous intéressent dans la formation des EETs et du 20-HETE correspondent respectivement à CYP2C et CYP4A [Figure 43 (Imig et al., 2011)].

Dérivés de l'acide arachidonique, les EETs et le 20-HETE sont produits par les cellules endothéliales, les astrocytes et les neurones. Ce sont des molécules qui régulent le flux cérébral. Elles ont donc un rôle important dans le couplage neurovasculaire. En effet, il a été démontré que les EETs étaient des médiateurs clés dans la dilatation des artérioles induite par l'activité neuronale et astrocytaire. A l'opposé, le 20-HETE serait un contributeur important dans les phases de constriction artériolaires (Filosa and Blanco, 2007;Koehler et al., 2006;Koehler et al., 2009;Peng et al., 2002).

⁶⁸ 20-HETE : *20-Hydroxy-EicosaTetraEonic acid* (Acide 20-hydroxy-écosatétraénoïque)

⁶⁹ CYP : CYtochrome P450



Dans les années 1980, des travaux sur la circulation périphérique ont commencé à révéler un rôle important des métabolites de l'acide arachidonique formés par les CYPs (Roman, 2002). Une classe de CYP, la CYP2C, forme par époxygénation les quatre régioisomères des EETs.

Les EETs ont une action d'hyperpolarisation des cellules musculaires lisses en ouvrant les canaux K_{Ca}^{70} (Gebremedhin et al., 1992; Campbell and Fleming, 2010). De plus, Early et coll. ont pu montrer une activation des TRPV4⁷¹ des cellules musculaires lisses suite à la libération de facteurs dérivés de l'endothélium (Earley et al., 2005). Cette activation des TRPV4 des cellules musculaires lisses provoque une libération de Ca^{2+} via le récepteur ryanodine suffisant pour activer les canaux K_{Ca} . Une étude récente de Dunn et coll. a montré une activation du récepteur IP3⁷² suite à l'activation du TRPV4, impliquant également une vasodilatation (Dunn et al., 2013).

Les EETs sont synthétisés par les astrocytes (Alkayed et al., 1996) et peuvent être métabolisés sous une forme moins active (acide dihydroxy-eicosatriénoïque) ou stockés dans une réserve située dans la membrane lipidique (Shivachar et al., 1995; Spector, 2009). Des travaux sur des cellules musculaires lisses isolées ont montré que les EETs ouvrent les canaux K_{Ca} et induisent une hyperpolarisation des cellules musculaires lisses et une relaxation des vaisseaux (Harder et al., 1998; Alkayed et al., 1996). Une application d'EETs *in vivo* sur les artérioles

⁷⁰ K_{Ca} : Canaux potassiques sensibles au calcium

⁷¹ TRPV4 : Isoforme 4 de la sous famille V des *Transient Receptor Potential*

⁷² IP3 : Inositol 1,4,5-triPhosphate

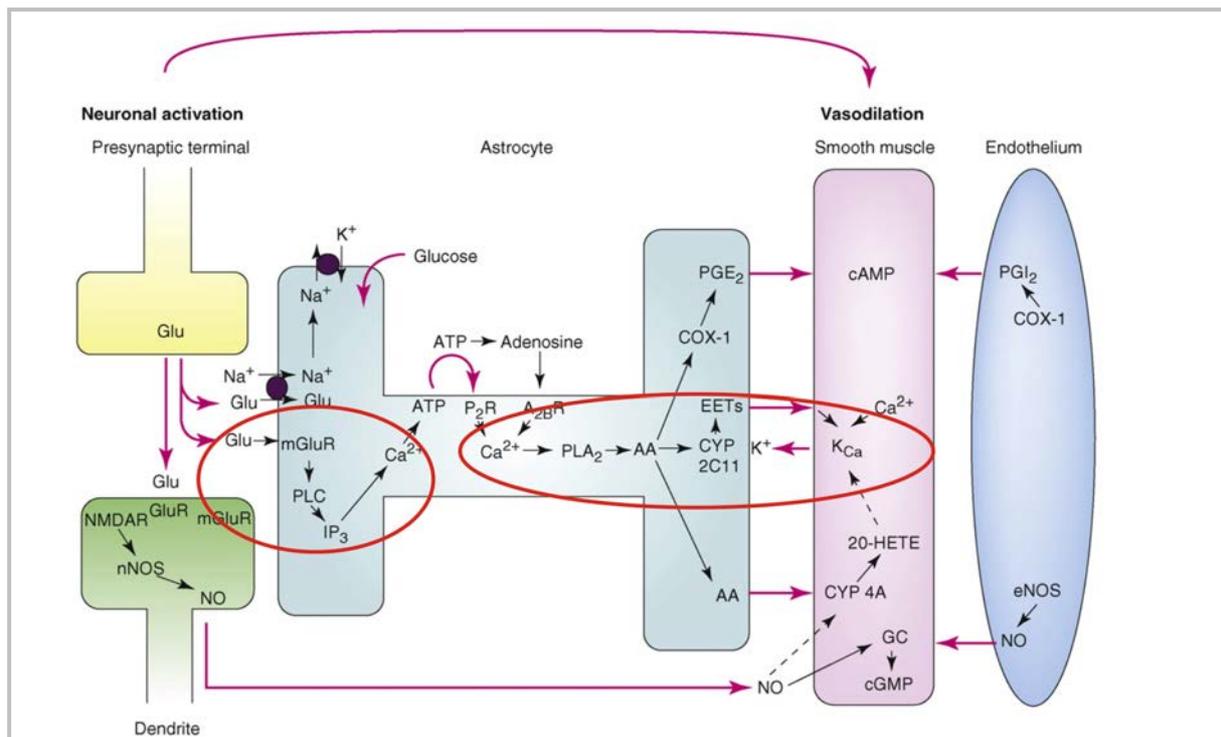


Figure 44. L'augmentation de calcium dans les astrocytes, à la suite d'une activité synaptique, induit une synthèse puis une libération d'EETs

L'activation des astrocytes par leurs récepteurs métabotropiques du glutamate induit une augmentation du calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium intracellulaire permet le recrutement de la PLA₂. L'acide arachidonique, contenu dans la membrane lipidique, est alors recruté et métabolisé par les enzymes de la famille des CYPs. Ces enzymes produisent les EETs qui sont alors libérés dans le milieu extracellulaire et y induisent des vasodilatations [Source : Adapté de (Koehler et al., 2009)]

piales augmente leur diamètre (Rzigalinski et al., 1999). Ces observations mènent à l'hypothèse selon laquelle la stimulation des récepteurs du glutamate des astrocytes mène à la formation et la libération des EETs. Ils vont alors avoir une action sur les cellules musculaires lisses et y induire une relaxation et donc une vasodilatation.

Cette hypothèse est confirmée par différentes études chez le rat. Dans le striatum, la perfusion du NMDA par microdialyse augmente le flux sanguin cérébral. Cette augmentation de flux est bloquée par l'inhibition de la NOS mais aussi par des inhibiteurs des époxygénases (Bhardwaj et al., 2000). De plus, l'activation physiologique du cortex cérébral par stimulation des vibrisses ou par stimulation électrique des pattes augmentant le flux cortical sanguin est diminuée en présence d'inhibiteurs de la synthèse des EETs (Peng et al., 2002; Peng et al., 2004). De ce fait, il est suggéré que les EETs participent à la réponse vasodilatatrice induite

par l'activation neuronale (**Figure 44**). Cependant, le mécanisme d'action des EETs et en particulier leur(s) récepteur(s), s'il(s) existe(nt), reste encore indéterminé.

Un autre eicosanoïde, le 20-HETE, est également un métabolite de l'acide arachidonique. Il est aussi produit par une CYP, le CYP4A (**Figure 43**) présent dans les cellules musculaires

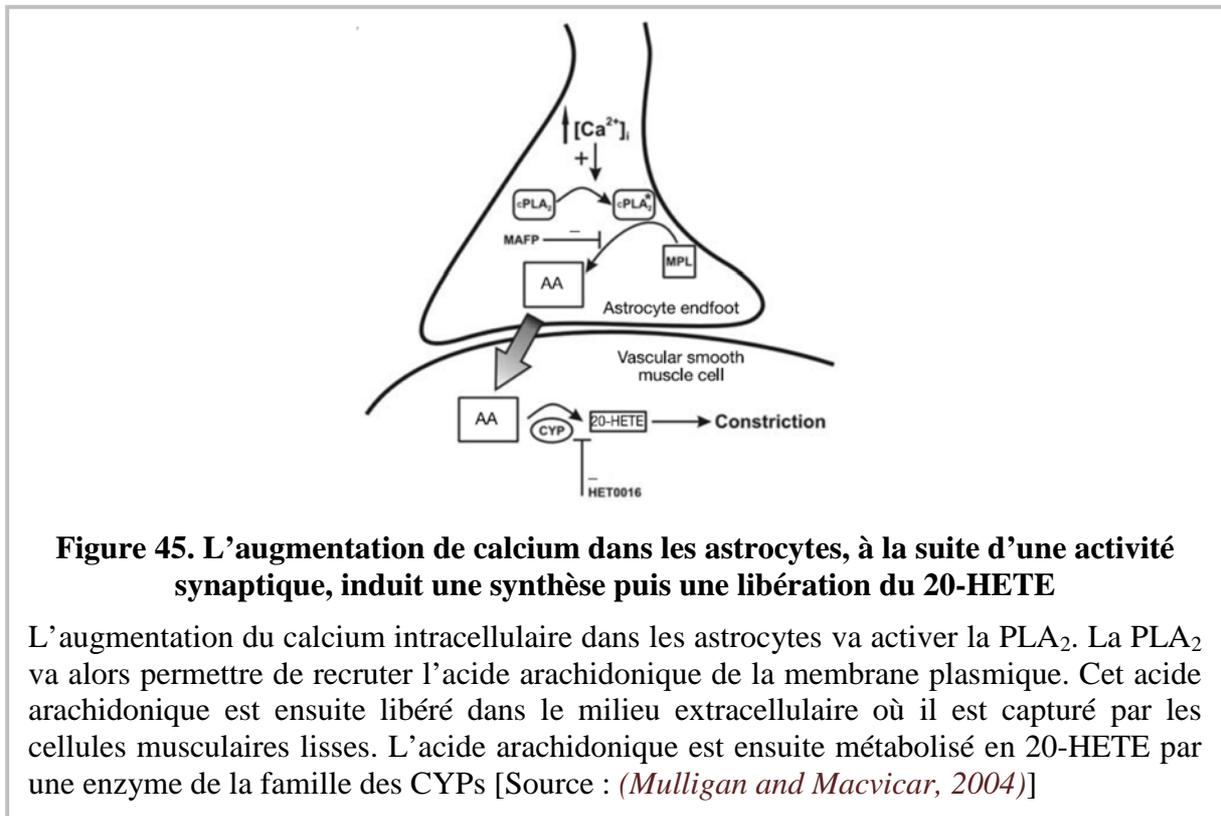


Figure 45. L'augmentation de calcium dans les astrocytes, à la suite d'une activité synaptique, induit une synthèse puis une libération du 20-HETE

L'augmentation du calcium intracellulaire dans les astrocytes va activer la PLA₂. La PLA₂ va alors permettre de recruter l'acide arachidonique de la membrane plasmique. Cet acide arachidonique est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire où il est capturé par les cellules musculaires lisses. L'acide arachidonique est ensuite métabolisé en 20-HETE par une enzyme de la famille des CYPs [Source : (Mulligan and Macvicar, 2004)]

lisses (Dunn et al., 2008;Gebremedhin et al., 2000). Il est à noter que les travaux sur des tranches d'hippocampe de Mulligan et MacVicar ont montré qu'une photolyse de Ca^{2+} cagé dans des astrocytes produit une vasoconstriction au niveau des artérioles voisines. Cette vasoconstriction est bloquée par l'inhibition de la PLA₂ ou de la synthèse du 20-HETE (**Figure 45**).

D'autres études ont montré une implication des métabolites des CYPs dans la rétine. Sur des tranches rétinales, une activation par la lumière ou une activation gliale résulte en une vasoconstriction dépendante du 20-HETE dans certaines artérioles ou une vasodilatation dépendante des EETs dans d'autres artérioles (Metea and Newman, 2006).

Plus récemment, Blanco et coll. ont démontré que l'application d'agoniste des récepteurs métabotropiques du glutamate sur des tranches de néocortex produit une réponse vasculaire polarisée. En effet, ils observent une vasoconstriction des vaisseaux avec un faible tonus

vasculaire et une vasodilatation sur des vaisseaux précontractés avec un analogue du thromboxane A₂ (Blanco et al., 2008). Ici, la réponse vasoconstrictrice est réduite en présence d'inhibiteur de la PLA₂, de la synthèse du 20-HETE et de la COX-1. Les réponses vasodilatatrices sont quant à elles supprimées en bloquant la PLA₂, la synthèse des EETs et la COX-1. Ces différents résultats suggèrent que la polarité des réponses médiées par les astrocytes, et notamment la libération des EETs et du 20-HETE, est dictée par le tonus vasculaire (Koehler et al., 2009).

Cependant, ces données sur tranche posent la question de connaître l'importance relative du 20-HETE comme médiateur de la réponse vasculaire *in vivo*. L'application de l'inhibiteur de la synthèse du 20-HETE *in vivo* n'a pas d'effet sur l'augmentation du flux mesuré par laser Doppler vélocimétrie chez la souris et n'a qu'un faible impact chez le rat (Liu et al., 2008). Ce défaut d'effet de l'inhibition du 20-HETE dépendrait de la synthèse normale du NO par la nNOS. En effet, le NO inhibe la formation du 20-HETE. Quand la nNOS est inhibée, le 20-HETE exerce une plus forte influence sur la réponse vasculaire provoquée par la stimulation des vibrisses tandis que la contribution des EETs diminue. Lorsque la synthèse du NO et du 20-HETE est bloquée ensemble, la contribution des EETs devient plus apparente (**Figure 46**).

Ions

De multiples voies cellulaires sont activées par l'augmentation de Ca²⁺ dans les astrocytes en réponse à une activation neuronale. Ceci est une évidence puisque l'inhibition pharmacologique ou les manipulations génétiques de nombreux médiateurs de la réponse vasculaire bloquent seulement une partie de la réponse vasculaire. Ainsi, une augmentation du Ca²⁺ dans les pieds astrocytaires active un grand nombre de protéines sensibles au Ca²⁺. Ces protéines sensibles aux Ca²⁺ incluent les canaux BK⁷³, qui libèrent des ions potassiques comme messagers vasoactifs. Dans la mesure où l'hyperémie fonctionnelle semble essentielle pour la survie, il n'est pas étonnant qu'un grand nombre de voies aboutissant à la même réponse soient présentes. Cependant, ces voies parallèles convergent toutes vers les canaux potassiques des cellules musculaires lisses des artérioles (**Figure 47**).

Un signal astrocytaire clairement identifié est le potentiel de vasodilatation et de vasoconstriction du potassium (Knot et al., 1996). La régulation du potassium extracellulaire par les astrocytes a été étudiée dans la rétine, où il a été suggéré un temps que les astrocytes

⁷³ BK : *Big Potassium channels* (Canaux potassiques à grande conductance)

ont une fonction associée à un siphonnage de potassium. Ce siphonnage se caractérise par une recapture du potassium d'une région où il est fortement concentré (région pérисynaptique) pour le libérer dans une région moins concentrée (région périvasculaire) (Kofuji and Newman, 2004). Cependant, une étude de l'équipe de Newman a remis en cause cette hypothèse. En effet, dans la rétine, une grosse dépolarisation astrocytaire, induisant une sortie de potassium, n'a pas d'effet sur le diamètre des vaisseaux. De plus, les vasodilatations induites par une stimulation lumineuse sont identiques sur des animaux sauvages et sur des animaux n'exprimant plus de canaux K_{ir}^{74} fonctionnels (Metea et al., 2007).

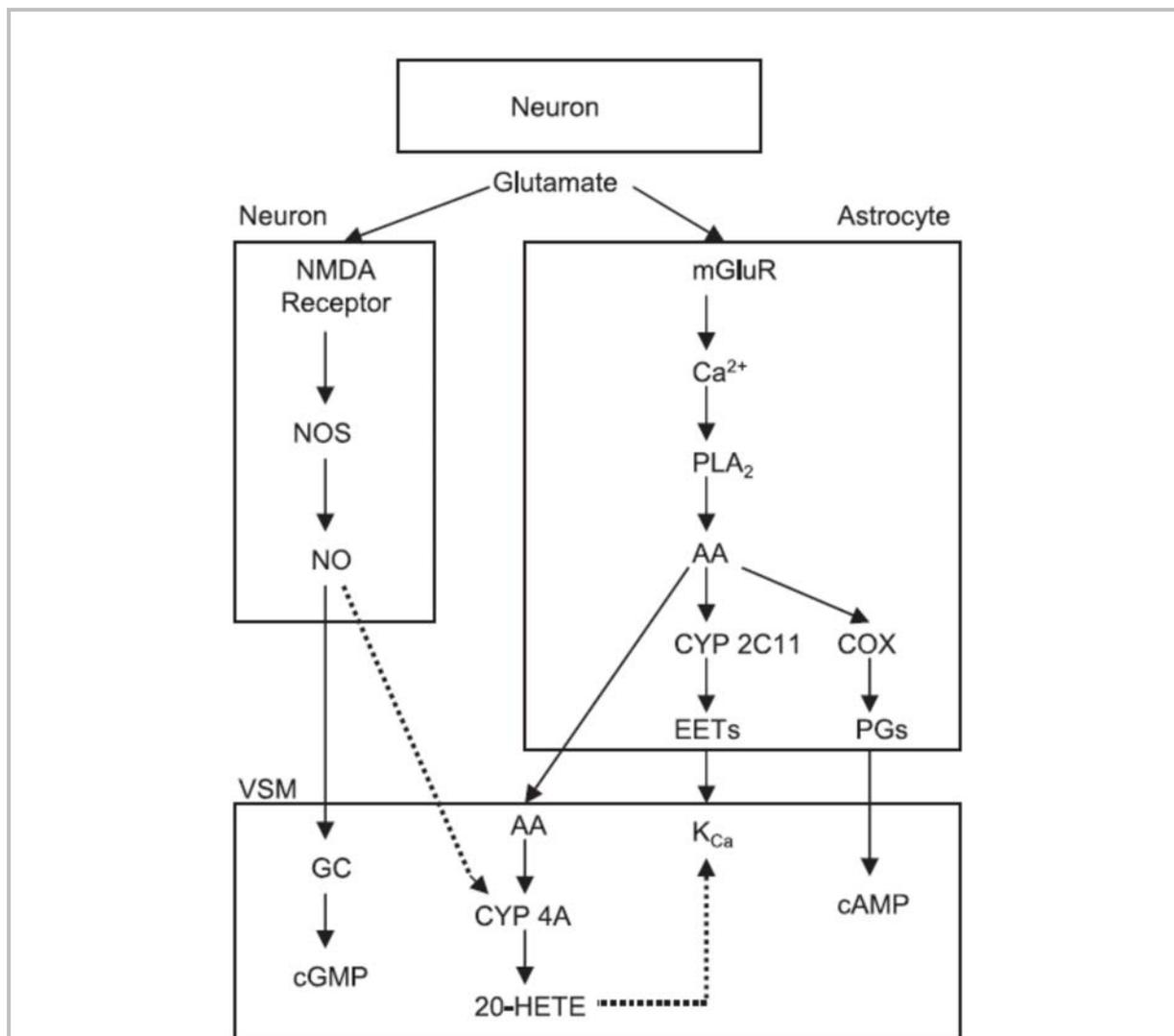


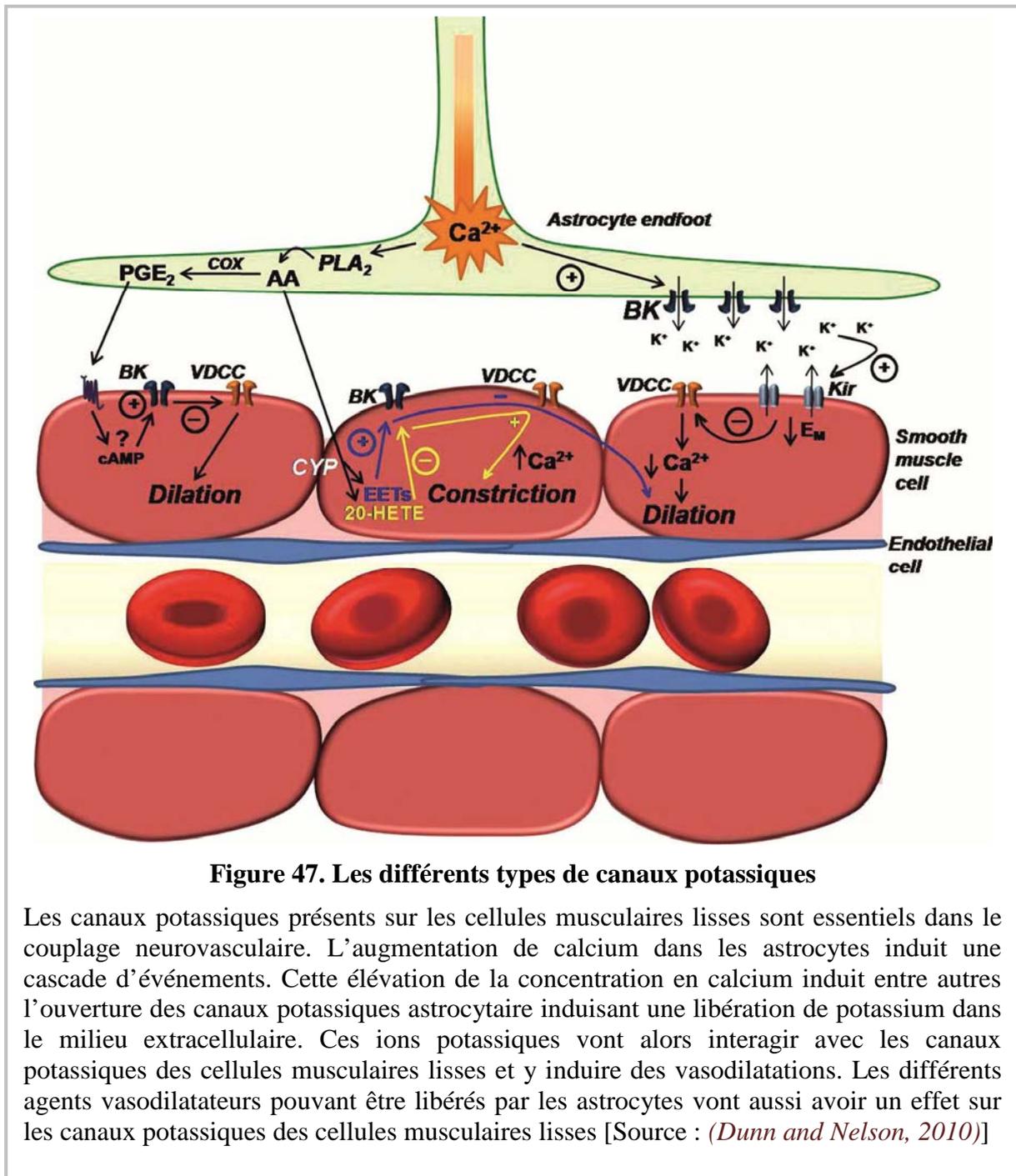
Figure 46. Le NO joue un rôle central dans la contribution à la réponse vasculaire des EETs et du 20-HETE

Le No est un acteur majeur dans le couplage neurovasculaire. Notamment, on peut voir qu'il joue un rôle de régulateur dans la formation du 20-HETE. En effet, le NO à un effet inhibiteur sur l'enzyme CYP4A et régulerait de ce fait négativement la formation du 20-HETE [Source : (Liu et al., 2008)]

Le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses artériolaires est essentiel dans la régulation du tonus vasculaire. Il est régulé par des canaux potassiques. L'ouverture des canaux potassiques des cellules musculaires lisses induit une sortie de potassium, résultant en une hyperpolarisation membranaire. L'inhibition des canaux potassiques entraîne quant à elle une dépolarisation. L'hyperpolarisation induite par l'ouverture des canaux potassiques entraîne une fermeture des VDCC⁷⁵, impliquant une diminution de l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule et aboutissant à une vasodilatation (Nelson et al., 1990). Ces canaux calciques sensibles au potentiel sont très sensibles aux changements de potentiel de membrane, montrant que même une faible fluctuation du potentiel de membrane induit de forts changements dans les flux calciques (Rubart et al., 1996). Ainsi, de faibles changements dans le potentiel de membrane peuvent avoir des effets sur le tonus vasculaire (Knot and Nelson, 1998).

Nelson et coll. ont montré que les dilatations induites par le potassium étaient dépendantes de l'activation des K_{ir} (Nelson and Quayle, 1995). Dans les cellules musculaires lisses du parenchyme, l'augmentation du courant K_{ir} avec une élévation de la concentration en potassium extracellulaire est associée à une suppression des oscillations calciques et à une vasodilatation (Filosa et al., 2006). L'augmentation modérée du potassium extracellulaire active les K_{ir} résultant en une hyperpolarisation du potentiel de membrane et une vasodilatation seulement pour des concentrations allant jusqu'à 20 mM. Ceci correspond à la concentration pour laquelle le potentiel d'équilibre du potassium est équivalent au potentiel de membrane des cellules musculaires lisses. Au-delà de cette valeur, la concentration en potassium extracellulaire dépolarise le potentiel de membrane des cellules musculaires lisses, active les VDCC et cause des vasoconstrictions.

⁷⁵ VDCC : *Voltage-Dependent Calcium Channel* (Canaux calciques voltages dépendants)



Un traitement avec du Ba^{2+76} bloque la dilatation induite par de modestes élévations de potassium extracellulaire. Cependant, il n'a pas d'effet sur les vasoconstrictions induites par une élévation de la concentration de potassium supérieure à 20 mM. Ces données suggèrent que les K_{ir} sont seulement impliqués dans la vasodilatation induite par une augmentation de la concentration en potassium (Filosa et al., 2006;Dunn and Nelson, 2010).

⁷⁶ Ba^{2+} : Barium (bloquant des K_{ir})

tPA

Le tPA⁷⁷ a émergé récemment comme un neuromodulateur aux multiples fonctions (Samson and Medcalf, 2006). Il est stocké dans les neurones et sa libération par exocytose est dépendante de l'activité cellulaire (Lochner et al., 2006). Il est également retrouvé dans les cellules endothéliales (Levin et al., 1997;Zlokovic et al., 1995;Schreiber et al., 1998) et les oligodendrocytes (Correa et al., 2011). Il est impliqué dans la neurotransmission, la plasticité synaptique, le remodelage dendritique, la libération de neurotransmetteurs, l'intégrité de la matrice extracellulaire ou dans l'influence qu'il peut avoir sur les fonctions du récepteur NMDA (Zhuo et al., 2000;Huang et al., 1996;Mataga et al., 2002;Nicole et al., 2001;Pawlak et al., 2005;Centonze et al., 2002). De plus, la libération du tPA par les cellules endothéliales module le tonus vasculaire et pourrait contribuer aux changements hémodynamiques induits lors de traumatismes ou d'ischémies cérébrales (Levin and del Zoppo, 1994;Armstead et al., 2004;Cipolla et al., 2000;Nassar et al., 2004).

Une étude récente de Park et coll. a démontré un rôle clé du tPA dans la réponse vasculaire (Park et al., 2008). Cette étude a montré que l'expression du tPA était cruciale pour obtenir une réponse vasculaire complète associée à l'activation du cortex en tonneau chez la souris. Cet effet sur le couplage neurovasculaire est dû à la potentialisation de la synthèse du NO pendant une activation des récepteurs NMDA. Le tPA va influencer l'état de phosphorylation de la nNOS et augmenter son activité. Le NO est donc libéré en plus grande quantité et pourrait intervenir dans le couplage neurovasculaire. Ces données établissent le tPA comme un facteur clé dans les événements post-synaptiques reliant l'activation du récepteur NMDA à la synthèse de NO et l'hyperémie fonctionnelle. De plus, ces données suggèrent qu'un défaut dans l'expression du tPA pourrait contribuer aux altérations du couplage neurovasculaire observées dans les pathologies cérébrales comme la maladie d'Alzheimer ou les ischémies cérébrales (Iadecola, 2004).

ATP et adénosine

L'adénosine est un agent vasodilatateur connu (Dirnagl et al., 1994). Les récepteurs de l'adénosine A_{2A} ont un rôle dans la dilatation des artérioles piales pendant une activité neuronale ou par activation directe par les récepteurs glutamatergiques (Iliff et al., 2003;Ohata et al., 2006). En plus d'avoir une action sur les récepteurs à l'adénosine situés sur les cellules

⁷⁷ tPA : *tissue Plasminogen Activator*

musculaires lisses, l'adénosine peut également jouer un rôle par l'intermédiaire des astrocytes qui expriment de nombreux types de récepteurs à l'adénosine (Fields and Burnstock, 2006). L'activation du récepteur A_{2B} peut augmenter le Ca^{2+} intracellulaire dans les astrocytes. De ce fait, l'adénosine pourrait également participer à la propagation de l'augmentation calcique à travers les prolongements astrocytaires (Pilitsis and Kimelberg, 1998).

Un rôle de l'adénosine dans l'hyperémie fonctionnelle est validé par le fait que l'antagoniste semi-sélectif des récepteurs de l'adénosine, la théophylline, atténue l'augmentation du flux sanguin pendant la stimulation des vibrisses. De plus, l'adénosine déaminase diminue également cette réponse vasculaire (Dirnagl et al., 1994). La dilatation des artérioles piales induite par de l'adénosine exogène est principalement due à l'activation des récepteurs A_{2A} de haute affinité, et dans une moindre mesure des récepteurs A_{2B} de basse affinité (Ngai et al., 2001; Shin et al., 2000).

L'adénosine dérive de l'ATP libérée dans les synapses comme co-neurotransmetteur. L'ATP est aussi libérée au travers des connexines astrocytaires où l'ATP peut agir directement sur les récepteurs P2Y adjacents. Cela favorise donc la propagation de l'influx calcique astrocytaire (Arcuino et al., 2002). La stimulation des récepteurs A_{2B} des astrocytes provoque une augmentation de l'AMPc (Peakman and Hill, 1994), de la synthèse de glycogène (Allaman et al., 2003) et du Ca^{2+} intracellulaire (Pilitsis and Kimelberg, 1998). L'adénosine potentialise également les vagues calciques évoquées par l'ATP via une action largement attribuée aux récepteurs A_{2B} (Jimenez et al., 1999).

III. Le couplage neurométabolique fournit l'énergie nécessaire aux fonctions neuronales

Depuis la première description des astrocytes par les neuroanatomistes du XIX^{ème} siècle, un rôle métabolique de ces cellules a été suggéré dans le système nerveux central. L'un des premiers mais néanmoins importants rôles des astrocytes dans les fonctions métaboliques concerne leurs capacités à capturer et à recycler le glutamate extracellulaire. Cependant, cette description a été suivie par d'autres, notamment concernant l'implication de ces cellules dans l'apport énergétique aux neurones. En effet, les astrocytes ont une capacité de glycolyse aérobie importante. Cette caractéristique métabolique est modulée par l'activité glutamatergique constituant l'étape initiale du couplage neurométabolique.

1. Il existe une étroite relation métabolique entre les astrocytes et les neurones

Dès les premières observations des astrocytes, le rôle de soutien dans l'apport énergétique avait été suggéré. En effet, l'observation d'un contact direct avec les vaisseaux et des prolongements des astrocytes avait amené Golgi à émettre cette hypothèse. Les avancées aussi bien en immunohistochimie qu'en microscopie électronique et à fluorescence ont pu confirmer ces dires. Non seulement il existe bien des pieds astrocytaires sur les vaisseaux sanguins, mais ces prolongements tapissent la quasi-totalité du lit vasculaire (Kacem et al., 1998).

En 1959, Hyden a mis au point une technique permettant d'observer individuellement les caractéristiques métaboliques des cellules (HYDEN, 1959;HYDEN et al., 2000). Basé sur cette technique, il observa, suite à une stimulation, une capacité de glycolyse des astrocytes et une capacité oxydative des neurones. Il postulat l'existence d'une coopération entre les astrocytes et les neurones. Cependant, la nature précise de cette interaction reste inconnue pendant plus de 30 ans (HAMBERGER and HYDEN, 1963).

Avec l'avènement de techniques de culture de nombreux types cellulaires du cerveau, il est devenu possible d'explorer les propriétés métaboliques de cellules uniques, incluant les astrocytes. De ce fait, il a été possible de montrer que les astrocytes avaient un taux glycolytique élevé avec une importante production de lactate comparé aux neurones (Walz and Mukerji, 1988). De plus, il a été montré que les astrocytes contenaient une réserve de glycogène contrairement aux neurones. Cette réserve d'énergie peut être mobilisée par la noradrénaline, le VIP, l'adénosine ou l'élévation de potassium extracellulaire (Magistretti et al., 1981;Magistretti et al., 1993;Hof et al., 1988;Choi et al., 2012). Il est intéressant de noter que le lactate est le produit final de la glycogénolyse et de la glycolyse dans les astrocytes et qu'il est libéré dans l'espace extracellulaire (Magistretti et al., 1993;Dringen et al., 1993).

La réserve de glycogène astrocytaire et l'importante production de lactate par la glycogénolyse et la glycolyse suggèrent que les astrocytes jouent un rôle majeur dans l'apport énergétique aux neurones.

2. Les astrocytes assurent la capture du glutamate issu de l'activité synaptique

Outre leur rôle dans l'apport énergétique aux neurones, les astrocytes assurent également un rôle dans le recyclage du glutamate. Bien que le glutamate soit le neurotransmetteur exciteur majeur du système nerveux central, sa concentration extracellulaire doit être finement contrôlée. Les astrocytes jouent ce rôle à la perfection.

Un système de recapture du glutamate existe au niveau des astrocytes. En effet, les transporteurs de haute affinité du glutamate K^+ dépendant, GLT-1 et GLAST, sont exprimés par les astrocytes (Danbolt, 2001; Cholet et al., 2001). Il est à noter que ces transporteurs sont également impliqués dans la régulation du couplage neurovasculaire, comme nous l'avons vu précédemment (Partie B.II.3). De plus, l'enzyme glutamine synthétase permettant la conversion du glutamate en glutamine est trouvée exclusivement dans les astrocytes (Martinez-Hernandez et al., 1977). La glutamine est ensuite libérée par les astrocytes puis capturée par les neurones. La glutamine est transformée en glutamate dans les neurones par l'enzyme glutaminase (Broer and Brookes, 2001). Il a été montré que la grande majorité du glutamate capté par les astrocytes (~80%) est transformée en glutamine (McKenna et al., 1996).

3. Recapture du glutamate et libération du lactate par les astrocytes : l'hypothèse de la « navette lactate »

L'hypothèse de la navette lactate a été développée par Luc Pellerin et Pierre Magistretti en 1994. Celle-ci stipule que la libération de glutamate par l'activité neuronale et son recyclage stimulerait la glycolyse et la production de lactate. Celui-ci serait alors transféré dans les neurones pour servir de substrat énergétique pour la production d'ATP par le métabolisme oxydatif [**Figure 48** (Pellerin and Magistretti, 1994)].

Le glutamate est libéré des synapses et a été identifié comme signal neuronal. Celui-ci permet de déclencher une recapture du glucose sanguin par les astrocytes. Ce mécanisme résulte en une activation des co-transporteurs glutamate- Na^+ menant à une entrée de glutamate et de Na^+ (Cholet et al., 2001; Voutsinos-Porche et al., 2003). Cette augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ induit une activation de la pompe Na^+-K^+ ATPase consommatrice

d'ATP. De plus, la transformation du glutamate en glutamine s'accompagne d'une hydrolyse de l'ATP. Cette demande en ATP va stimuler la capture du glucose sanguin par les astrocytes puis la glycolyse. Le glucose sera alors transformé en pyruvate puis en lactate. Celui-ci sera libéré et capturé par les neurones.

De nombreuses études sont venues ensuite appuyer ou étoffer cette hypothèse. Il a été montré que l'inactivation des gènes des co-transporteurs Na^+ -Glutamate diminuait l'utilisation de glucose lors d'une activation neuronale (Cholet et al., 2001; Voutsinos-Porche et al., 2003). Récemment des études *in vivo* sont allées plus loin en montrant que cette augmentation d'utilisation du glucose est due à une activité glycolytique accrue au niveau astrocytaire (Chuquet et al., 2010). La conséquence de l'utilisation du glucose par le glutamate est la production de lactate. Il est ensuite libéré dans le milieu extracellulaire pour soutenir l'activité neuronale.

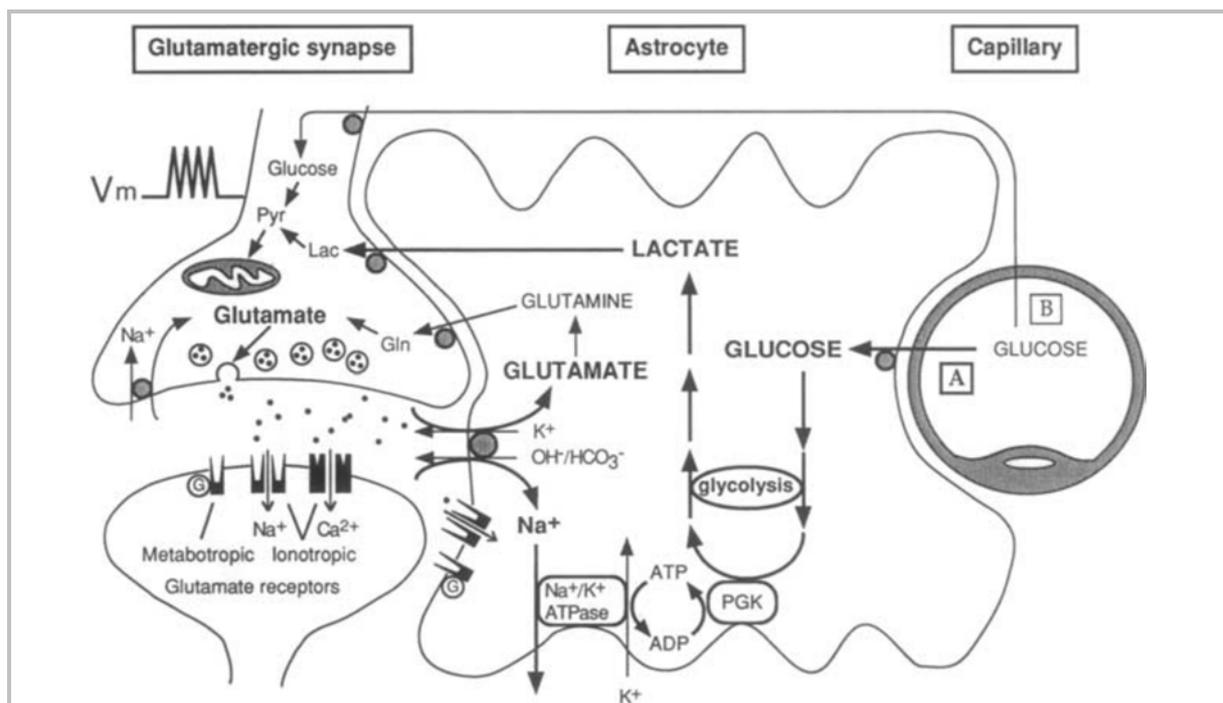


Figure 48. Hypothèse historique de la navette lactate

Ce schéma montre le mécanisme d'activation de la glycolyse dépendante du glutamate dans les astrocytes pendant une activation physiologique. Au niveau de la synapse glutamatergique, le glutamate dépolarise le neurone post-synaptique. Le glutamate est ensuite capturé par les astrocytes. Ce glutamate est co-transporté avec du sodium, induisant une augmentation de la concentration en sodium intracellulaire. Cette augmentation active la pompe Na^+/K^+ ATPase. Cette pompe consomme de l'ATP et active la glycolyse, qui produit du lactate dans les astrocytes. Ce lactate, après avoir été libéré dans l'espace extracellulaire est capté par les neurones qui l'utilisent comme substrat énergétique. [Source : (Pellerin and Magistretti, 2012)]

Curieusement, il est considéré de longue date que le lactate est un déchet des cellules du cerveau. De ce fait, il doit être évacué du parenchyme cérébral malgré son importance en tant que source énergétique (Dienel and Cruz, 2004). Cependant, des évidences ont été accumulées pendant plus de 50 ans montrant que le lactate est un des rares substrats oxydants alternatifs au glucose (McILWAIN, 1953;Pellerin, 2003;Wyss et al., 2011). De plus, en présence du glucose et du lactate, ce qui est le cas en condition physiologique, il a été montré que le lactate était préférentiellement utilisé comme substrat oxydant par les neurones (Itoh et al., 2003;Bouzier-Sore et al., 2003;Bouzier-Sore et al., 2006;Ivanov et al., 2011;Wyss et al., 2011).

L'utilisation de lactate par le cerveau est essentielle pour divers mécanismes neurophysiologiques comme le contrôle de la respiration (Erlichman et al., 2008;Barros, 2013) ou la régulation de la prise alimentaire (Parsons and Hirasawa, 2010). De plus, il a été montré également que le lactate avait un rôle critique dans le couplage neurovasculaire (Gordon et al., 2008;Barros, 2013), la récupération après une hypoxie (Schurr et al., 1997) et dans la neuroprotection (Bliss et al., 2004;Berthet et al., 2009). Une étude récente a montré, dans le *locus coeruleus*, que le lactate est également utilisé comme une molécule de signalisation par les astrocytes. Celle-ci permettrait une libération de norépinéphrine par les neurones du *locus coeruleus* (Tang et al., 2014). Il est donc clair que l'utilisation du lactate est essentielle dans le support de l'activité neuronale et des fonctions cérébrales (Barros, 2013).

La possibilité d'une navette lactate entre les neurones et les astrocytes est possible par l'expression de transporteurs spécifiques. La distribution des différents MCT⁷⁸ et LDH⁷⁹ semble également indiquer une tendance à la production et au relargage, via MCT1 et 4, du lactate. Ces deux transporteurs qui ont une faible affinité pour le lactate et une forte capacité de transport sont susceptibles de permettre une libération importante du lactate produit par les astrocytes. À l'inverse la présence dans les neurones du transporteur MCT2 présentant une forte affinité pour le lactate permettrait une entrée de lactate même pour des concentrations faibles. Son oxydation favorisée par la LDH_B permettrait son utilisation comme substrat énergétique (**Figure 49**).

Des études récentes (Bittner et al., 2011;Choi et al., 2012) ont montré que la stimulation par le glutamate de la glycolyse, au niveau astrocytaire, possède une cinétique assez lente. Ce serait

⁷⁸ MCT : MonoCarboxylate Transporteur

⁷⁹ LDH : Lactate DésHydrogénase

donc un mécanisme intervenant sur le long terme. Cette même étude montre également que le potassium, libéré dans la fente synaptique pendant une transmission neuronale, stimule très rapidement et de manière réversible la glycolyse au niveau astrocytaire. Cela suggère que plusieurs mécanismes aux cinétiques différentes interviennent dans le mécanisme de la navette lactate.

Des études ont montré que non seulement le glutamate augmente la capture du glucose par les astrocytes, mais il inhibe également le transport de glucose dans les neurones (Porras et al., 2004; Porras et al., 2008). Un autre mécanisme d'inhibition de la glycolyse neuronale serait dû à l'état redox de la cellule (Cerdan et al., 2006; Ramirez et al., 2007). L'augmentation de la

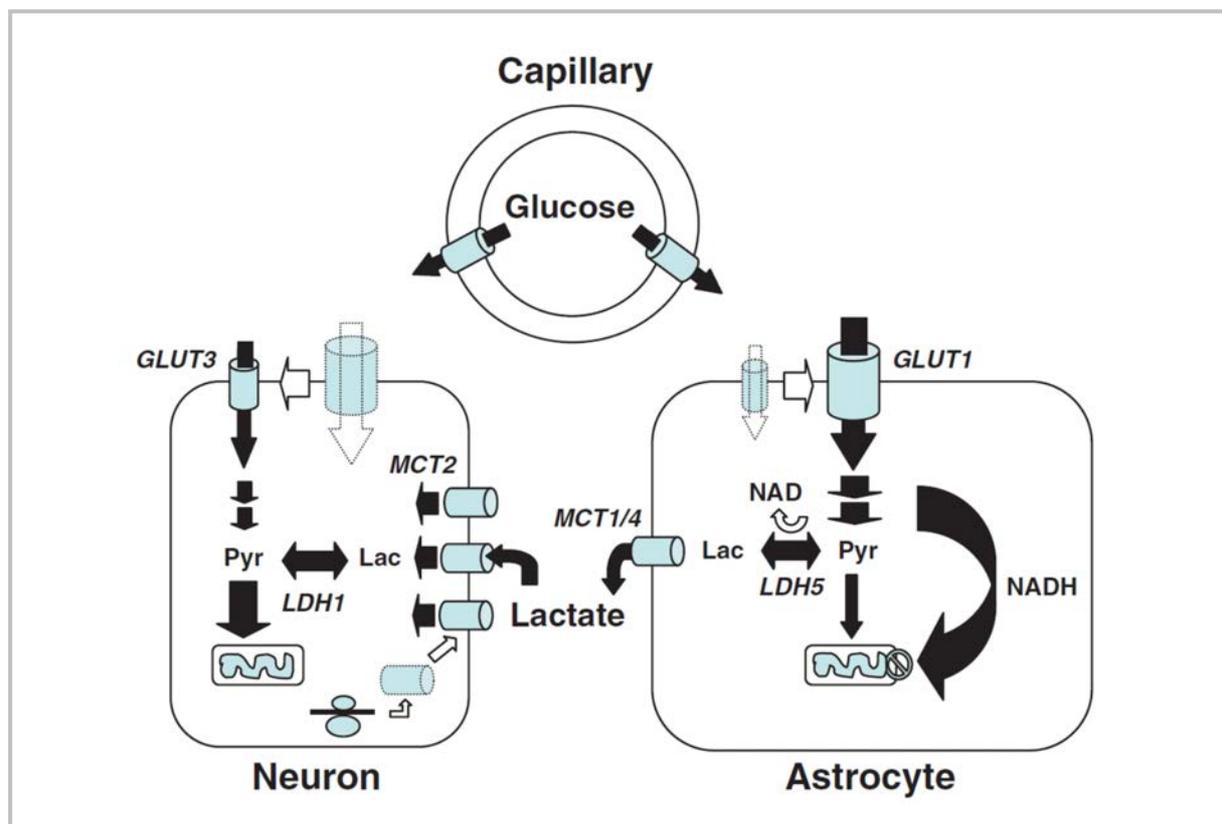


Figure 49. L'importance des MCTs et des LDHs dans la navette lactate

Différentes caractéristiques des astrocytes et des neurones suggèrent une compartimentalisation métabolique et l'existence d'un transfert de lactate entre les deux types cellulaires. Le glutamate active la glycolyse astrocytaire, active la capture et l'utilisation du glucose et forme du pyruvate. Les astrocytes possèdent la LDH5 permettant la conversion du pyruvate en lactate. Ce lactate formé est ensuite transporté dans le milieu extracellulaire par les transporteurs de haute affinité MCT1 et 4. Contrairement aux astrocytes, le glutamate réduit la capture de glucose dans les neurones. Pour compenser cela, les neurones captent le lactate via le transporteur MCT2. Le lactate est ensuite transformé par la LDH1 en pyruvate qui est ensuite métabolisé par la cellule pour former de l'ATP. [Source : (Pellerin and Magistretti, 2012)]

concentration de lactate lors de l'activité neuronale entraînerait une conversion du lactate en pyruvate dans les neurones et ainsi une réduction de NAD^+ en NADH ⁸⁰ (Williamson et al., 1967) qui inhiberait la glycolyse.

D'autres études sur les réseaux astrocytaires (Rouach et al., 2008) complètent et élargissent l'hypothèse initiale de la navette lactate. L'augmentation de l'activité glutamatergique entraînerait une augmentation de l'apport énergétique par le lactate, non seulement au niveau des synapses glutamatergiques actives, mais également dans les neurones environnants. Ce phénomène est possible grâce au réseau astrocytaire très important, mettant en jeu des jonctions communicantes et permettant la diffusion (Houades et al., 2008; Giaume et al., 2010), d'un astrocyte à ses voisins, des substrats énergétiques que sont le glucose et le lactate. Ainsi, l'augmentation de la capture du glucose et la production de lactate par les astrocytes auraient lieu sur toute une région autour du site initial de libération et de recyclage du glutamate et/ou du K^+ .

⁸⁰ NAD^+ : Nicotinamide Adenine Dinucléotide

Problématique

« Il est inutile de discuter avec les personnes qui n'acceptent que les preuves qui cadrent avec leur manière de pensée »

R Steiner

Le couplage neurovasculaire correspond à la relation étroite entre l'activité neuronale et la variation du flux sanguin. Son dérèglement, même minime, peut avoir de graves conséquences sur l'intégrité du cerveau. En effet, un déficit de perfusion même très localisé entraîne, en quelques secondes, un arrêt des fonctions cérébrales et, en quelques minutes, des dommages cellulaires irréversibles (Iadecola, 2004).

La découverte de l'hyperémie fonctionnelle par Roy et Sherrington à la fin du XIX^{ème} siècle (Roy and Sherrington, 1890), a ouvert un large champ d'investigations. Cette hyperémie fonctionnelle correspond à la dilatation des artérioles et des capillaires dans une région précise du cerveau concomitante avec la constriction d'une autre zone du cerveau éloignée. Ces événements sont spatialement restreints et se produisent en quelques secondes suite à une activation neuronale intense. Un grand nombre d'études ont pu mettre à jour des cellules et des molécules impliquées dans la régulation du couplage neurovasculaire.

Le couplage neurovasculaire est à la base des techniques d'imagerie cérébrale comme la tomographie par émission de positrons ou l'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique. Ces outils permettent de détecter l'activité neuronale en lien avec les changements hémodynamiques. Ce couplage est en outre altéré dans la maladie d'Alzheimer, les migraines ou encore les ischémies cérébrales (Iadecola, 2004;Waeber and Moskowitz, 2005;Levin and del Zoppo, 1994;Armstead et al., 2004;Cipolla et al., 2000;Nassar et al., 2004).

Dans la mesure où l'hyperémie fonctionnelle semble essentielle à l'homéostasie du tissu cérébral, il n'est pas étonnant qu'un grand nombre de voies aboutissant à la même réponse soient présentes. Cependant, l'identification des sources cellulaires et les molécules impliquées restent encore fortement débattues notamment concernant les prostanoïdes.

En effet, aujourd'hui, plusieurs études montrent des effets contradictoires des prostanoïdes et particulièrement de la prostaglandine E₂. Le potentiel à la fois de vasoconstriction et de vasodilatation de la prostaglandine E₂ s'explique par l'existence de différents récepteurs. Ceux-ci sont situés sur les cellules musculaires lisses des artérioles. Les récepteurs EP2 et EP4 sont couplés positivement à l'adénylate cyclase. Le récepteur EP3 est quant à lui couplé négativement à l'adénylate cyclase. Le récepteur EP1 est lui couplé à la voie IP3/DAG⁸¹. La

⁸¹ DAG : DiAcylGlycérol

fixation de la prostaglandine E₂ sur les récepteurs EP2 et EP4 induit une vasodilatation. Sa fixation sur les récepteurs EP1 et EP3 induit une vasoconstriction.

Des études *in vivo* ont montré une vasodilatation dépendante de l'enzyme de synthèse COX-2 des prostanoides suite à la stimulation des vibrisses chez la souris (Niwa et al., 2000; Niwa et al., 2001). Ces études suggèrent un rôle des dérivés de la COX-2, à savoir la PGE₂ et la PGI₂. De plus, des études *in vitro* ont montré des effets opposés sur les variations de diamètre des artérioles. En effet, l'application de la prostaglandine E₂ ou de la prostacycline sur tranche de cortex induit des vasodilatations (Zonta et al., 2003; Gordon et al., 2008) alors que des vasoconstrictions sont obtenues sur artérioles isolées (Dabertrand et al., 2013). Une autre étude à quant à elle pu mettre en évidence une polarité dans la réponse vasomotrice de la prostaglandine E₂ au niveau de l'aorte. En effet, les vasodilatations obtenues pour de faibles concentrations de PGE₂ se transforment en vasoconstriction pour des concentrations plus élevées (> 0,1 μM) (Tang et al., 2008).

Cet effet contradictoire de la PGE₂ sur les réponses vasomotrices mais aussi le manque d'information sur l'origine cellulaire de la PGE₂ et de la PGI₂ en fait une étude particulièrement intéressante. De plus, ces prostanoides sont connus pour être impliqués dans diverses pathologies comme la migraine (Myren et al., 2010) ou la maladie d'Alzheimer (Iadecola, 2004; Shi et al., 2012). Une identification précise du rôle et de l'origine de ces prostanoides permettrait de cibler les recherches thérapeutiques menant à un traitement efficace de ces pathologies.

Le but de cette étude est d'identifier : la (les) source(s) de ces prostanoides, la voie de biosynthèse des prostanoides vasodilatateurs et les récepteurs impliqués dans les réponses vasodilatatrices. Afin de répondre à ces questions, plusieurs méthodes autant *in vitro* qu'*in vivo* ont été utilisées.

Matériels et Méthodes

« La véritable musique est le silence et toutes les notes ne font qu'encadrer ce silence »

Miles Davis

Dans l'étude sur le rôle des neurones pyramidaux dans le couplage neurovasculaire cortical, j'ai travaillé *ex vivo* sur des tranches aiguës de cortex somatosensoriel de rongeurs. J'ai utilisé une approche pluridisciplinaire combinant l'électrophysiologie (technique de patch-clamp), la biologie moléculaire (RT-PCR en multiplex sur cellule unique), la pharmacologie (application de bloquants de la biosynthèse et des récepteurs aux prostanoides) et de vidéomicroscopie infrarouge (visualisation des réponses vasculaires). Dans l'étude sur la localisation cellulaire et subcellulaire du tPA, j'ai utilisé la méthode de RT-PCR sur cellule unique après patch-clamp. Dans un souci de simplification, les données techniques (matériels, compositions des milieux...) concernant ces deux articles ne seront pas traitées dans cette partie. Pour y avoir accès, se référer à la partie « matériels et méthodes » des articles correspondants.

Dans l'étude sur l'influence du lactate et des canaux K_{ATP} ⁸² sur l'activité neuronale, j'ai utilisé l'imagerie cellulaire du couple $NAD^+/NADH+H^+$ ainsi que l'imagerie FRET⁸³ du biosenseur ATP. Dans la mesure où cet article est en préparation, les matériels et méthodes de ces deux outils seront détaillés ci-après.

I. RT-PCR sur cellule unique après patch-clamp

Cette technique combine le patch-clamp sur tranches (Edwards et al., 1989; Stuart et al., 1993) et la RT-PCR (Lambolez et al., 1992). Le neurone est identifié visuellement par vidéomicroscopie infrarouge. La pipette de patch-clamp est délicatement approchée avec une pression positive. Ceci permet de dégager localement le tissu et d'éviter que des débris cellulaires empêchent la formation d'un scellement de haute résistance et viennent contaminer la pipette. Après être passé en configuration « cellule attachée », de brèves succions permettent de passer en configuration « cellule entière ». Il y a alors une continuité physique et électrique entre le milieu intrapipette et le cytoplasme cellulaire. A la fin de l'enregistrement électrophysiologique, le contenu cytoplasmique de la cellule est aspiré à l'intérieur de la pipette. Durant toute cette procédure, le contact étroit entre la pipette et la membrane est contrôlé visuellement et électriquement. Un maximum de contenu cytoplasmique est ainsi collecté. Le prélèvement est toutefois arrêté si une rupture du scellement se produit. La pipette contenant le cytoplasme est ensuite délicatement éloignée de la cellule. Dans la mesure du possible, on essaie d'obtenir une configuration « *outside-out* »,

⁸² K_{ATP} : Canaux potassiques sensibles à l'ATP intracellulaire

⁸³ FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

c'est-à-dire qu'une portion de membrane cellulaire vient refermer l'extrémité de la pipette. Le contenu de la pipette est ensuite éjecté dans un tube de PCR dans lequel on effectue successivement une transcription inverse et une amplification des ADNc⁸⁴ par PCR.

Dans la première étape de PCR, les différentes amorces sont mélangées. C'est cette étape qui constitue réellement la PCR en multiplex. Cette première amplification s'effectue avec un nombre relativement restreint de cycles de PCR (20 cycles). Le but de cette étape est d'augmenter suffisamment le nombre de copies d'ADNc pour permettre une répartition fiable des amplicons de 1^{ère} PCR en aliquots. Ceux-ci serviront de matrices dans la seconde étape d'amplification. Dans les 2^{ndes} PCR, chacun des produits est individuellement amplifié avec son couple d'amorces spécifiques. Les produits de ces PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. La RT-PCR en multiplex permet, à partir d'une même cellule, de détecter de nombreuses espèces d'ARNm. Cette technique offre donc la possibilité à partir d'un seul neurone, d'étudier l'expression des ARNm de nombreux marqueurs de population neuronale. Dans cette étude nous avons analysé l'expression du transporteur vésiculaire du glutamate (VGluT1⁸⁵) pris comme marqueur de neurones glutamatergiques et des deux enzymes de synthèse du GABA (GAD⁸⁶65 et GAD67) prises comme marqueurs de neurones GABAergiques. Nous avons également analysé l'expression de l'isoforme neuronale de la NO synthase (NOS-1) comme marqueur de neurones nitreurgiques, de trois protéines de liaison du Ca²⁺ (CB⁸⁷, PV, CR⁸⁸) et de quatre neuropeptides (NPY, VIP, SOM et CCK).

Cette technique nous a également permis d'étudier l'expression des enzymes de la voie de biosynthèse des prostanoides à savoir : les deux enzymes limitantes COX-1 et COX-2, les isoformes des enzymes terminales de la synthèse de la PGE₂, cPGES⁸⁹, mPGES-1⁹⁰ et mPGES-2⁹¹ ainsi que PGIS, enzyme terminale de la synthèse de la prostacycline. J'ai aussi déterminé la présence de l'ARNm du tPA.

⁸⁴ ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

⁸⁵ VGluT1 : *Vesicular Glutamate Transporter 1* (Transporteur vésiculaire du glutamate de type 1)

⁸⁶ GAD : *Glutamic Acid Decarboxylase* (enzyme de synthèse du GABA)

⁸⁷ CB : CalBindine D-28k

⁸⁸ CR : CalRetinine

⁸⁹ cPGES : Forme cytosolique de la PGES

⁹⁰ mPGES-1 : Forme microsomale de type 1 de la PGES

⁹¹ mPGES-2 : Forme microsomale de type 2 de la PGES

II. Analyse des propriétés de décharge des neurones

Les propriétés électrophysiologiques utilisées peuvent être séparées en 3 grands groupes (Ascoli et al., 2008) : les propriétés électriques passives, les propriétés du profil de décharge de PA, et les propriétés des PAs.

1. Propriétés électriques passives de membrane

Potentiel de repos (RMP). Le potentiel de pipette (V_p) est mesuré juste après le passage en configuration cellule entière. Le potentiel de repos est déterminé par la formule : $RMP = V_p - V_L$ où V_L est le potentiel de jonction liquide.

Résistance d'entrée de la cellule (R_{in}). Sur un échelon de courant (ΔI) entraînant une hyperpolarisation d'environ 10 mV (ΔV) (Kawaguchi, 1995) est calculé: $R_{in} = \Delta V / \Delta I$

Constante de temps de la membrane (τ_{IC}). La constante de temps est déterminée à partir de la même trace que pour R_{in} par un ajustement de la réponse de potentiel par une exponentielle standard à une composante (Kawaguchi, 1995). L'ajustement se fait entre le point de départ de l'hyperpolarisation jusqu'au point négatif maximal. La formule de l'exponentielle permet de trouver la valeur de τ_{IC} .

Capacitance membranaire (C_m). C_m est déterminée d'après la formule : $C_m = \tau_{IC} / R_m$

Sag. Les conductances cellulaires sont déterminées à partir des courbes courant/potentiel réalisées avant (G_{hyp}) et après (G_{sag}) le fléchissement du potentiel membranaire sous-tendu par le courant I_h . Le « sag » représente la diminution de cette conductance membranaire calculée par la formule : $Sag = (G_{sag} - G_{hyp}) / G_{sag}$. (Halabisky et al., 2006).

2. Propriétés de décharge de PA au seuil

Rhéobase. Représente le courant minimum à injecter sur une durée de 800 ms pour atteindre le seuil d'émission de PA. Elle indique l'excitabilité d'un neurone.

Latence du premier PA. Sur la première trace présentant un PA, nous mesurons la latence de l'émission du premier PA caractéristique du comportement électrophysiologique LS retrouvé dans les neurones de morphologie neurogliaforme. (Kawaguchi, 1995; Tamas et al., 2003; Ascoli et al., 2008; Karagiannis et al., 2009).

Paramètres d'adaptation de fréquence au seuil. Le comportement électrophysiologique proche du seuil de décharge de PA est très informatif. On distingue des décharges continues de PA à des fréquences faibles (McCormick et al., 1985; Kawaguchi, 1995; Ascoli et al., 2008), des décharges en bouffée de PA qui ne déchargent pas en dessous de certaines fréquences (McCormick et al., 1985; Kawaguchi and Kubota, 1996; Cauli et al., 1997; Porter et al., 1998) et des décharges accélérantes (Simon et al., 2005). Pour décrire ces différents comportements, nous avons réalisé la courbe des fréquences instantanées en fonction du temps pour l'échelon de courant induisant au moins 3 PAs. L'ajustement de cette courbe par une droite d'équation : $F_{\text{threshold}} = m_{\text{threshold}} \cdot t + F_{\text{min}}$; donne les valeurs de $m_{\text{threshold}}$ (adaptation) et F_{min} , (fréquence minimale de décharge). Les neurones avec un comportement de décharge en bouffée ont des valeurs F_{min} élevées et une adaptation importante. Les neurones à décharge accélérante présentent des valeurs F_{min} basses et une adaptation négative. Les neurones à décharge continue possèdent des valeurs intermédiaires.

3. Propriétés de décharge de PA

Accommodation. Sur la trace présentant la diminution transitoire de l'amplitude des PAs la plus prononcée, nous mesurons la différence de potentiel entre le pic du PA de moindre amplitude et celui du plus grand des PA suivants (Cauli et al., 2000).

Paramètres d'adaptation de fréquence en régime saturant. Une décharge de PA à haute fréquence avec pas ou peu d'adaptation est une caractéristique des neurones FS (McCormick et al., 1985; Kawaguchi, 1993; Cauli et al., 1997). Les fréquences maximales sont déterminées à partir de la trace précédant une réduction importante de l'amplitude des PA signifiant une saturation de la décharge de PA. La courbe des fréquences instantanées de décharge de PA est ajustée par une exponentielle et une droite adaptée d'(Halabisky et al., 2006) d'équation $F_{\text{Saturation}} = A_{\text{sat}} \cdot e^{-t/\tau_{\text{sat}}} + t \cdot m_{\text{sat}} + F_{\text{max}}$. A_{sat} et τ_{sat} correspondent à l'amplitude et la constante de temps de l'adaptation rapide; m_{sat} est la pente de l'adaptation lente et F_{max} la fréquence maximale de décharge. Les neurones FS se démarquent par une F_{max} élevée avec peu ou pas d'adaptation (Kawaguchi and Kubota, 1993; Cauli et al., 1997; Cauli et al., 2000).

4. Propriétés des potentiels d'action

Les propriétés des PA sont déterminées sur la première trace présentant au moins deux PA.

Amplitudes (A1 et A2) et Durées à mi-hauteur (D1 et D2) des deux premiers PAs. (Kawaguchi, 1993;Cauli et al., 1997). Des durées courtes sont caractéristiques des neurones FS (McCormick et al., 1985;Kawaguchi and Kubota, 1993;Kawaguchi, 1993). Les variations d'amplitude et de durée en ces 2 premiers PA sont également calculées respectivement par les formules $(A1-A2)/A1$ et $(D2-D1)/D1$ (Cauli et al., 1997;Cauli et al., 2000).

Hyperpolarisation après le PA (AHP, AfterHyperPolarization). Nous avons distingué trois profils types d'AHP : mono- (une composante : AHPf), biphasique (deux composantes : AHPf et AHPs) et complexe (trois composantes : AHPf, et AHPs séparé par une dépolarisation, ADP) (Beierlein et al., 2000;Povysheva et al., 2007). Selon ces profils nous avons extrait les amplitudes et les temps de leurs différentes composantes (AHPf, AHPs, T_{AHPf} , T_{AHPs}) par rapport au seuil du PA et dans le cas des AHP complexes l'amplitude et le temps au pic de l'ADP (ADP et T_{ADP}). En absence d'AHPs et d'ADP ces valeurs ont été arbitrairement placées à 0.

III. Réactivité vasculaire *ex vivo*

Cette technique s'appuie sur la visualisation au cours du temps des changements de diamètre luminal d'artérioles pénétrantes. Les vaisseaux sont sélectionnés visuellement par vidéomicroscopie infrarouge. Pour qu'un vaisseau sanguin soit sélectionné, il faut (i) qu'il se situe à une profondeur de 20 à 90 μm par rapport à la surface de la tranche, (ii) que son diamètre luminal soit clairement visible et qu'il soit compris entre 10 et 30 μm et (iii) que sa longueur dans le plan d'observation soit supérieure à 50 μm . Avant toute mesure de diamètre, une période de stabilisation de la tranche d'une durée comprise entre 30 et 45 min est réalisée (Zonta et al., 2003).

Afin de mimer le tonus vasculaire, qui est absent sur ce modèle *ex vivo*, l'utilisation d'un agoniste des récepteurs au thromboxane A2 est nécessaire (U46619, 50-75 nM). Une période contrôle de 5 min est observée avant son application. Les différents agents pharmacologiques sont appliqués 30 min après le début de l'application du U46619, à l'exception de la TTX qui est appliquée qu'après 45 min. L'application du NMDA (5 min, 30 μM) se fait après 60 min d'incubation avec le U46619.

Les images de vidéomicroscopie infrarouge des vaisseaux sont acquises à une fréquence d'échantillonnage de 0,16 Hz. Toutes les images des piles temporelles sont préalablement

réalignées en utilisant le script « MultiStackReg » du logiciel Image J avant toute analyse. La mesure semi-automatique des variations de diamètre des vaisseaux des piles alignées est réalisée grâce à un programme développé sous l'environnement Matlab 2009b dans le laboratoire d'E. Hillman (Columbia University). L'algorithme se base sur les propriétés du profil d'intensité des parois vasculaires luminales observées en vidéomicroscopie infrarouge par gradient de contraste (Dodt and Zieglansberger, 1998).

Afin d'éviter les potentielles erreurs dues à une instabilité des vaisseaux, seuls les diamètres lumineux stables sont pris en considération. Deux périodes de stabilité sont prises en compte (i) la période contrôle et (ii) la période de contraction stable. Cette stabilité est évaluée en calculant la déviation relative standard (RSD [déviation standard divisée par la moyenne, exprimée en pourcentage]). Une valeur de RSD supérieure à 5% pour la période contrôle ou supérieur à 10% pour la période de contraction stable correspond à un critère de rejet. La valeur de la vasodilatation maximale est obtenue en prenant la valeur maximale après le début de l'application du NMDA en considérant comme ligne de base l'état précontracté stable du vaisseau.

III. Imageries cellulaires

L'imagerie cellulaire du couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ a été réalisée sur des tranches de néocortex aiguës. L'imagerie FRET a quant à elle été réalisée sur des tranches en survie.

1. Animaux et préparation des tranches

Toutes les expériences ont été menées selon la directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 Novembre 1986 (86/609/EEC). Des rats Wistar âgés de 16 à 21 jours ont été décapités et leur cerveau rapidement prélevé et déposé dans du LCRA⁹² (composition en mM: NaCl 126; KCl 2,5; NaH_2PO_4 1,25; CaCl_2 2; MgCl_2 1; Glucose 10; Saccharose 15; NaHCO_3 26) glacé et saturé par un mélange O_2/CO_2 (95%/5%) contenant 1 mM d'acide kynurénique (antagoniste non spécifique des récepteurs du glutamate). Des tranches coronales de cortex en « tonneaux » (300 μm d'épaisseur) ont été préparées au vibratome (Leica, VT1000S). Après une heure d'incubation à température ambiante (25°C), les tranches sont placées dans une chambre d'enregistrement d'un microscope droit à platine fixe (Olympus

⁹² LCRA : Liquide CéphaloRachidien artificiel

BX51 WI) perfusée à température ambiante à un débit de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec du LCRa oxygéné dépourvu d'acide kynurénique.

2. Autofluorescence du couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$

Cette technique s'appuie sur les propriétés intrinsèques de fluorescence du couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$. En effet, le NADH est fluorescent lorsqu'il est soumis à une illumination entre 340 et 360 nm tandis que le NAD^+ n'est pas fluorescent. Une illumination de la tranche est réalisée pendant 800 ms à une longueur d'onde de 365 nm par un système de diodes électroluminescentes (Precise Excite, CoolLED) connecté au port d'épifluorescence du microscope. Les images de fluorescences sont capturées par une caméra digitale refroidie à -30°C (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific) en réalisant un binning 4x4 de manière à minimiser les temps d'exposition. Le champ d'observation est déterminé dans les couches II/III à l'objectif 40X par visualisation de la fluorescence NADH.

La largeur du spectre de lumière incidente est affinée grâce à un miroir dichroïque (HC TBS 395/495/610, Semrock). Le spectre d'émission du NADH est collecté au travers d'un filtre passe bande (HC 425/527/685, Semrock).

Pendant toute la durée de l'enregistrement, les images de fluorescence du NADH sont acquises toutes les 10 s grâce au logiciel Imaging Workbench 6.23 (Indec Biosystem). Les tranches sont continuellement illuminées à 780 nm par un système de diodes électroluminescentes (Thorlabs) monté sur le port de transmission du microscope. Les images de transmission IR sont dirigées vers le port arrière d'émission du microscope au moyen d'un miroir dichroïque (725 DCSPXR, Semrock) et visualisées à une fréquence vidéo de 25 Hz grâce à une caméra CCD⁹³ analogique (ST-70/CE, Sony) connectée à un moniteur. La visualisation en temps réel de l'image IR permet de corriger les éventuelles dérives du plan focal en utilisant des repères visuels dans le parenchyme.

La conversion du lactate en pyruvate et inversement fait intervenir le couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$. De ce fait, l'intensité d'émission du NADH a été étudiée en présence de 2,5 mM de glucose qui nous sert de référence. Après 5 min de ligne de base, 15 mM de lactate ou 15 mM de pyruvate sont ajoutés pendant 15 min.

⁹³ CCD : *Charge-Coupled Device* (dispositif à transfert de charge)

3. Expression en tranches du biosenseur FRET

La transduction du biosenseur d'ATP, AT1.03-YEMK, est réalisée par un virus Sindbis déficient pour la réplication (Drobac et al., 2010). Des tranches coronales de cortex de rats âgés de 12 à 14 jours sont préparées comme décrit dans le premier paragraphe de la section précédente « Autofluorescence du couple $\text{NAD}^+/\text{NADH}+\text{H}^+$ ».

Les tranches sont alors déposées sur des Millicells (Millipore) placées dans des boîtes de pétri à 35°C. Celles-ci contiennent 1280 μL de milieu de survie (50% HBSS⁹⁴, 50% MEM⁹⁵, 30mg.ml⁻¹ de glucose et 100 Unités de pénicilline/streptomycine). Après avoir enlevé l'excédent de LCRA, 8 μl de vecteur viral, correspondant à environ 5.10^5 particules, sont délicatement déposés sur toute la surface du cortex. Les tranches sont alors incubées entre 16 et 18h à 35°C en atmosphère humidifiée avec 5% de CO_2 pour permettre l'expression des sondes FRET par les cellules transduites. Après le temps d'incubation, les tranches sont placées pendant 30 min dans du LCRA saturé en O_2/CO_2 puis placées dans la chambre d'enregistrement du microscope. La chambre est thermostatée à 25°C (Minichamber I, Luigs and Neumann) et perfusée à un débit de 2 mL.min⁻¹ de LCRA dépourvu d'acide kynurénique.

Les composés pharmacologiques sont successivement perfusés dans le bain de la chambre d'enregistrement. Le iodoacétate (200 μM) est ajouté au temps $t=5$ min et le cyanure de potassium (1 mM) est ajouté au temps $t=15$ min.

4. Imagerie intracellulaire de l'ATP par biosenseur FRET

L'efficacité de la transduction est évaluée à l'objectif 4X par visualisation de la fluorescence YFP du biosenseur. Les tranches sont excitées à 500 nm par un système de diodes électroluminescentes (Precise Excite, CoolLED) connecté au port d'épifluorescence du microscope. La largeur du spectre de lumière incidente est affinée par un filtre passe bande (HC500/24, Semrock) et la fluorescence jaune est réfléchiée par un miroir dichroïque (HC BS 520, Semrock) et collectée grâce à un filtre d'émission passe bande (HC 542/27, Semrock) monté dans un cube à filtres.

⁹⁴ HBSS : *Hank's Balanced Salt Solution*

⁹⁵ MEM : *Minimum Essential Medium*

Les images de fluorescences sont capturées par une caméra digitale refroidie à -30°C (CoolSNAP HQ2, Roper Scientific) en réalisant un binning 2x2 de manière à minimiser les temps d'exposition. Le champ d'observation est déterminé dans les couches II/III à l'objectif 40X par visualisation de la fluorescence YFP. Les images FRET et CFP sont obtenues par excitation à 440 nm avec le système de diodes électroluminescentes. La largeur du spectre de lumière incidente est affinée par un filtre passe bande (HC 438/24, Semrock) et la fluorescence collectée grâce à un miroir dichroïque (HC BS 458, Semrock). La sélection des deux types d'images est obtenue grâce à une roue à filtres (Lambda 10B, Sutter Instruments) montée sur le port avant d'émission du microscope équipé de filtres passe bande pour l'émission de la fluorescence CFP (HC 483/32 Semrock) et YFP (HC 542/27, Semrock).

Pour minimiser la phototoxicité et le photoblanchiment induits par l'excitation à 440 nm, les paramètres d'acquisition des images CFP et FRET sont optimisés en ajustant l'intensité d'illumination du système de diodes électroluminescentes (1 à 5% de l'intensité maximale) et le temps d'exposition (50 à 150 ms) de façon à obtenir des niveaux moyens d'intensité de fluorescence compris entre 300 et 700 sur les 4096 possible (caméra 12 bits). Une fois ces paramètres déterminés, une période de repos de 5 min est observée (Aoki and Matsuda, 2009).

Pendant toute la durée de l'enregistrement, un couple d'images CFP et FRET est acquis toutes les 15 s grâce au logiciel Imaging Workbench 6.23 (Indec Biosystem). Les tranches sont continuellement illuminées à 780 nm par un système de diodes électroluminescentes (Thorlabs) monté sur le port de transmission du microscope. Les images de transmission IR sont dirigées vers le port arrière d'émission du microscope au moyen d'un miroir dichroïque (725 DCSPXR, Semrock) et visualisées à une fréquence vidéo de 25 Hz grâce à une caméra CCD analogique (ST-70/CE, Sony) connectée à un moniteur. La visualisation en temps réel de l'image IR permet de corriger les éventuelles dérives du plan focal en utilisant des repères visuels dans le parenchyme.

5. Analyse des données d'imagerie

Afin de corriger d'éventuelles dérives sur les axes x-y des tranches, les piles d'images CFP et FRET ainsi que les piles d'images d'autofluorescence du NADH acquises au cours du temps sont systématiquement réalignées en utilisant le script « MultiStackReg » du logiciel Image J.

Des régions d'intérêts correspondant aux corps cellulaires des neurones sont manuellement délimitées et leurs intensités moyennes sont mesurées.

Imagerie NADH

Les tranches pour lesquelles les intensités moyennes sont instables ou non linéaires durant la période contrôle sont rejetées. Les données sont ensuite normalisées par rapport au point de départ en utilisant la formule $\Delta F=(F-F_0)/F_0$, où F est la valeur d'intensité au temps t et F_0 la valeur de l'intensité initiale. La moyenne du ΔF pour chaque tranche est ensuite réalisée puis la moyenne de toutes les tranches est effectuée pour obtenir la courbe de variation de l'intensité du NADH en fonction du temps.

Imagerie FRET

Les rapports des intensités YFP/CFP sont ensuite calculés. Les tranches pour lesquelles ces rapports sont instables ou non linéaires durant la période contrôle sont rejetées. Les éventuelles dérives linéaires de la ligne de base sont déterminées avec le logiciel Clampfit (MDS). La correction est appliquée à l'intégralité des mesures en divisant pour chaque neurone les rapports par la fonction affine de la ligne de base (John et al., 2008). Les variations relatives des rapports corrigés (ΔR) sont calculées grâce à la formule $\Delta R=(R-R_0)/R_0$, où R est le rapport au temps t et R_0 le rapport initial.

Résultats

*« L'histoire humaine n'est qu'un effort incessant d'invention, et la perpétuelle évolution est
une perpétuelle création »*

Jean Jaurès

Discours à la jeunesse, Albi, 1903

Cette partie du manuscrit présente les résultats et les articles obtenus durant mon doctorat.

Durant ces trois années, j'ai pu prendre part à trois articles.

Le premier est mon travail principal de thèse. Dans celui-ci, je me suis penché sur l'origine cellulaire et moléculaire des prostanoïdes vasodilatateurs que sont la prostaglandine E₂ et la prostacycline. Comme ces deux prostanoïdes sont connus pour induire des vasodilatations, je me suis également intéressé aux cibles de ces deux prostanoïdes.

Le deuxième article présenté ci-après correspond à la suite d'une partie du travail de thèse d'Anastassios Karagiannis. Ce travail s'est intéressé à l'influence du lactate sur l'activité des neurones via les canaux potassiques sensibles à l'ATP. Dans cette étude, je me suis principalement intéressé à l'utilisation du lactate comme source d'énergie pour les neurones.

Le troisième et dernier article décrit ici correspond à un travail en collaboration avec l'équipe du Pr Denis Vivien du laboratoire « Sérine Protéases et Physiopathologie de l'Unité neurovasculaire » à Caen. Cette étude s'est intéressée à la localisation cellulaire et intracellulaire du *tissue plasminogen activator* dans le cortex. J'ai réalisé, pour cette étude, la caractérisation cellulaire et moléculaire des neurones tPAergiques de la couche V du néocortex chez le rongeur.

Ces différents travaux m'ont permis de réaliser :

-Un article en premier auteur soumis dans la revue *Neuron* : « Sources and targets of vasodilatory prostanoids in the rodent neocortex ».

-Un article en deuxième auteur en préparation: « Multifaceted roles of lactate in the cerebral cortex ».

-Un article en collaboration en préparation pour une soumission dans la revue *Journal of Neuroscience* : « tissue plasminogen activator-ergic neurons are a subpopulation of pyramidal cells in the rodent neocortex ».

A. Article I : Origines et cibles des prostanoïdes vasodilatateurs dans le néocortex de rongeurs

Dans cet article, une approche électrophysiologique, moléculaire et immunohistologique m'a permis d'étudier la distribution cellulaire des enzymes de synthèse des prostanoïdes vasodilatateurs (PGE₂ et PGI₂). De plus, afin d'identifier les cibles de la PGE₂ et de la PGI₂, une étude pharmacologique de la réactivité vasculaire a été réalisée. Des données en collaborations obtenues *in vivo* par stimulation des vibrisses chez le rat et par stimulation optogénétique des neurones pyramidaux chez la souris ont permis d'étudier l'implication des prostanoïdes et de leur(s) source(s) cellulaire(s) dans les vasodilatations.

I. Le couplage neurovasculaire cortical est régi par de nombreux messagers vasoactifs

Le couplage neurovasculaire, correspondant à l'étroite relation entre l'activité neuronale et le flux sanguin, est primordial pour le bon fonctionnement du cerveau. Bien que ce processus soit essentiel, ses mécanismes cellulaires et moléculaires restent encore largement débattus. L'importance de sa compréhension réside dans sa dérégulation lors de pathologies comme la maladie d'Alzheimer ou encore dans les accidents vasculaires cérébraux. En effet, il est altéré par des dysfonctionnements des éléments neuronaux, astrogliaux ou encore vasculaires de l'unité neurovasculaire (Iadecola, 2004).

Dans le néocortex, de nombreux messagers d'origine multiple sont impliqués dans le couplage neurovasculaire (Cauli and Hamel, 2010; Attwell et al., 2010; Carmignoto and Gomez-Gonzalo, 2010). Parmi ceux-ci, les prostanoïdes vasodilatateurs jouent un rôle important puisqu'ils représentent la moitié de la réponse hyperémique à une stimulation sensorielle (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011). Les prostanoïdes sont des dérivés de l'acide arachidonique produit par les enzymes limitantes COX-1 et/ou COX-2. L'action des enzymes terminales de synthèse de ces lipides spécifie leur nature (Funk, 2001).

Dans le néocortex, la PGE₂ et la PGI₂ sont les deux prostanoïdes vasodilatateurs majeurs. Ils exercent leur action sur les récepteurs EP2, EP4 et IP (Woodward et al., 2011). Cependant, malgré l'importance de ces prostanoïdes dans le couplage neurovasculaire, leur origine cellulaire mais également leur(s) cible(s) restent encore indéterminées.

Ce travail a permis de montrer, *in vivo* et *in vitro*, l'implication essentielle de la COX-2, et pas de la COX-1, ainsi que des récepteurs de la PGE₂ EP2 et EP4 dans le couplage neurovasculaire du cortex. De plus, en utilisant une méthode d'immunohistochimie et de RT-PCR sur cellule unique, ces travaux ont mis en évidence une localisation de la COX-2 et de la PGES dans les neurones pyramidaux du cortex. Les neurones pyramidaux sont donc capables de synthétiser la PGE₂. En utilisant une méthode de stimulation optogénétique *in vivo* des neurones pyramidaux, nous avons pu mettre en évidence une implication de ces neurones et de la COX-2 dans les réponses vasculaires induites. Ces données montrent que les neurones pyramidaux et la PGE₂, sont, respectivement, la source majeure et le messager vasoactif clé dans les réponses vasodilatatrices du cortex somatosensoriel.

II. Les neurones pyramidaux et la COX-2 dans les réponses vasculaires

Cette section présente un résumé de mon sujet principal de thèse. Les données *in vivo* ont été effectuées en collaboration par l'équipe de Pr Edith Hamel à Montréal (implication des récepteurs EP2, EP4 et IP dans les réponses vasculaires initiées par stimulation des vibrisses chez le rat) et par l'équipe du Pr Tim Murphy à Vancouver (Stimulation optogénétique des neurones pyramidaux chez la souris).

1. Le NMDA induit des vasodilatations dépendantes de la COX-2

Le NMDA est connu pour libérer de la PGE₂ (Pepicelli et al., 2005) et induire des vasodilatations (Fergus and Lee, 1997b). Sur tranche de néocortex, nous avons déterminé la voie de biosynthèse des prostanoïdes ainsi que leurs récepteurs impliqués dans ces réponses médiées par le NMDA. Afin de déduire l'implication des prostanoïdes dans les réponses vasculaires induites par l'application du NMDA (**Figure 50A, B et C, noir**), une étude pharmacologique a été effectuée. L'application de l'inhibiteur de la COX-2 induit une diminution presque totale de la réponse vasodilatatrice (**Figure 50 A, rouge et Figure 50a**). Par contre, l'inhibiteur de la COX-1 n'a pas d'effet sur la dilatation maximale (**Figure 50, violet et Figure 50a**). De plus, l'antagonisme des récepteurs EP2 (**Figure 50B, orange**), EP4 (**Figure 50B, vert**) et IP (**Figure 50C, bleu**) diminue significativement la réponse maximale de dilatation (**Figure 50b**).

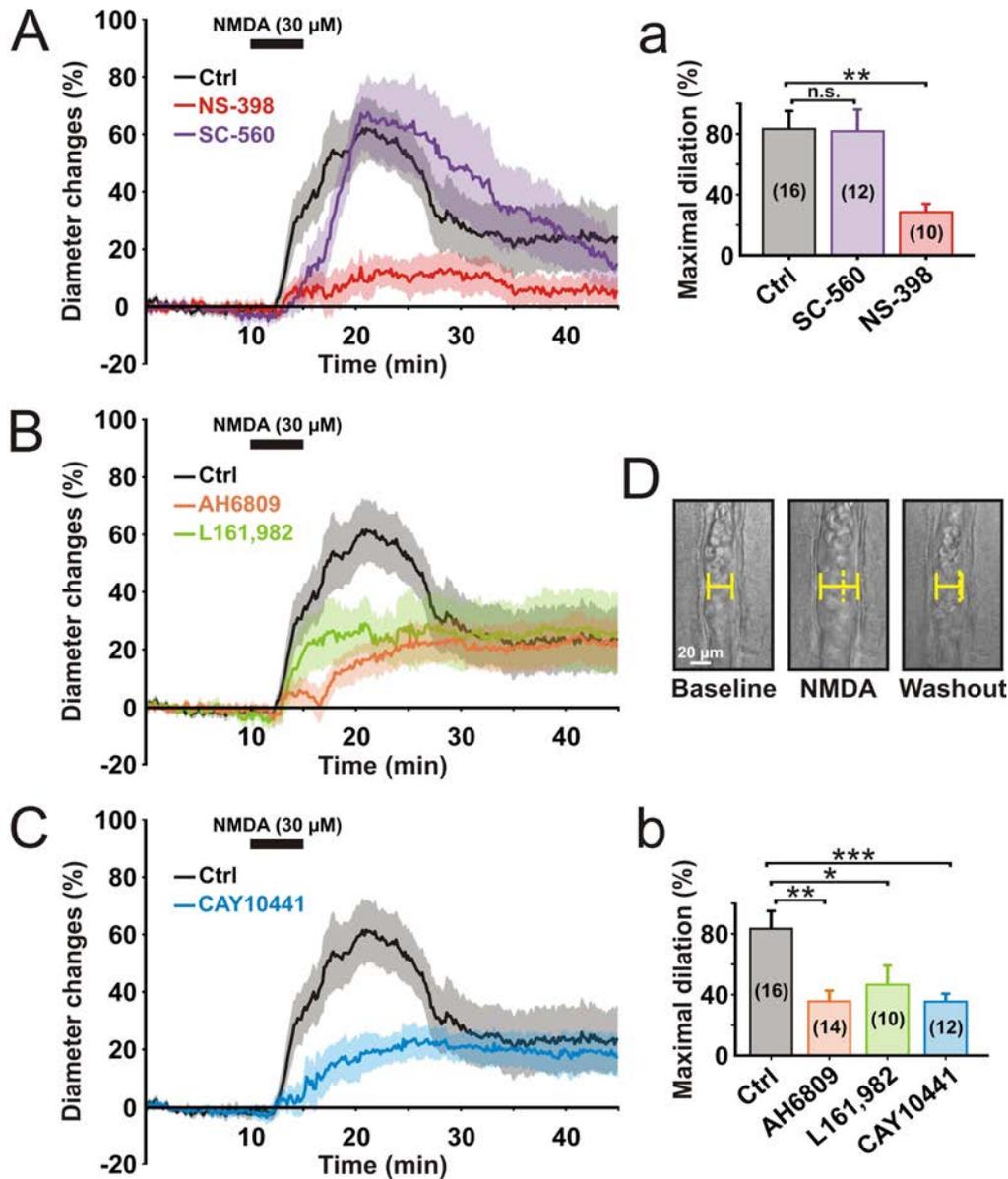


Figure 50. Les vasodilatations induites par le NMDA sont dépendantes de la COX-2 et des récepteurs EP2, EP4 et IP

(A, B et C) Variation du diamètre d'artéριοles pénétrantes suite à l'application de NMDA pendant 5 min. La courbe en noire présentée en (A), (B) et (C) correspond à la réponse vasodilatatrice initiée par le NMDA. La présence de l'inhibiteur de la COX-2 (NS-398, **rouge**) bloque pratiquement totalement la réponse dilatatrice. Par contre, l'application du SC-560, inhibiteur de la COX-1, n'a pas d'effet (A, **violet**). La réponse dilatatrice est également bloquée en présence des antagonistes des récepteurs EP2 (B, AH6809, **orange**), EP4 (B, L161,982, **vert**) et IP (C, CAY10441, **bleue**). (a et b) Histogramme de la dilatation maximale en fonction des conditions. (D) Exemple représentatif d'une artéριοle. L'application du NMDA induit une vasodilatation qui est réversible. *,** et *** correspondent à une valeur statistique de $p < 0,05$, $0,01$ et $0,001$ respectivement. n.s. non significatif.

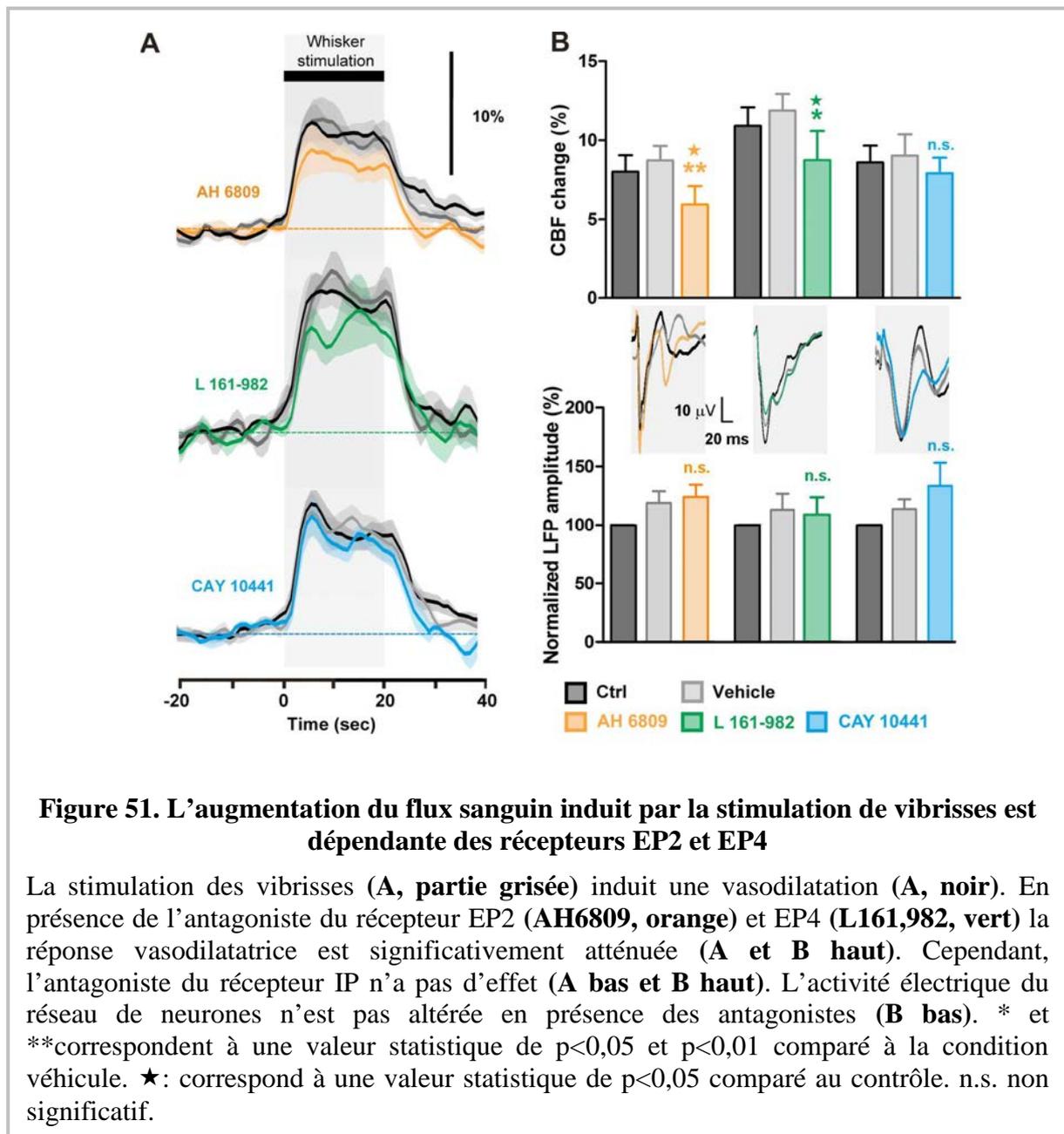


Figure 51. L'augmentation du flux sanguin induit par la stimulation de vibrisses est dépendante des récepteurs EP2 et EP4

La stimulation des vibrisses (**A, partie grisée**) induit une vasodilatation (**A, noir**). En présence de l'antagoniste du récepteur EP2 (**AH6809, orange**) et EP4 (**L161,982, vert**) la réponse vasodilatatrice est significativement atténuée (**A et B haut**). Cependant, l'antagoniste du récepteur IP n'a pas d'effet (**A bas et B haut**). L'activité électrique du réseau de neurones n'est pas altérée en présence des antagonistes (**B bas**). * et ** correspondent à une valeur statistique de $p < 0,05$ et $p < 0,01$ comparé à la condition véhicule. ★: correspond à une valeur statistique de $p < 0,05$ comparé au contrôle. n.s. non significatif.

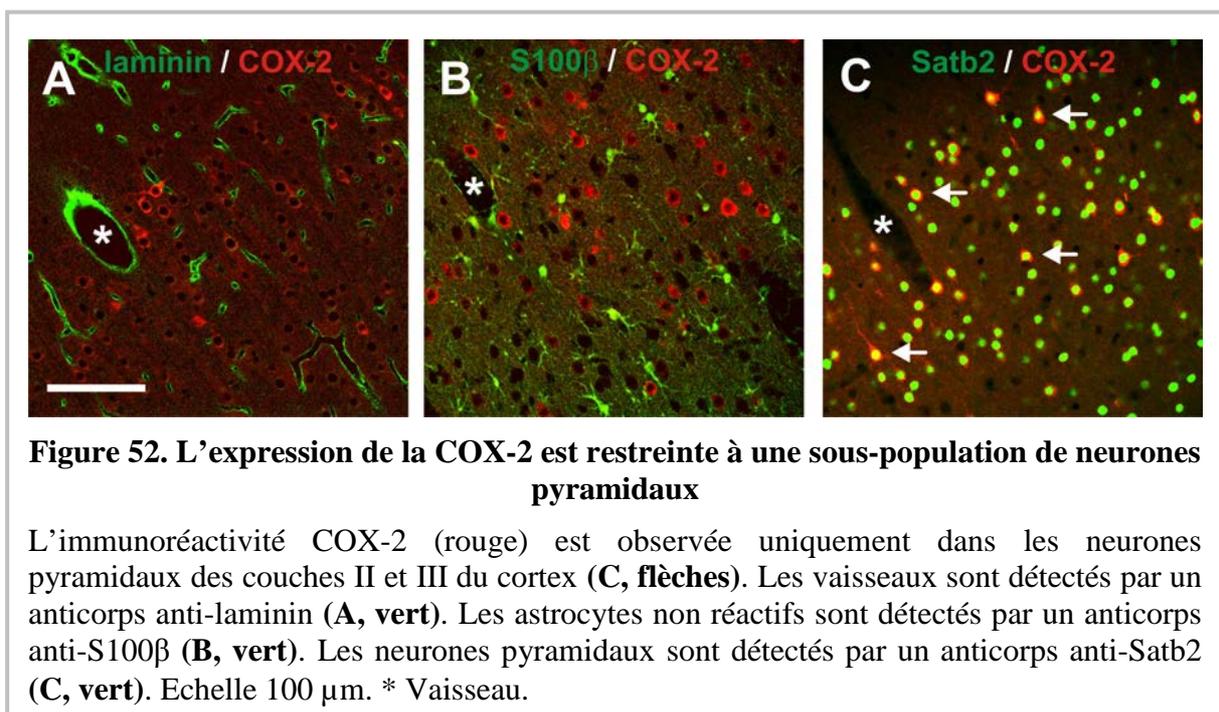
In vivo, les vasodilatations induites par la stimulation de vibrisses sont dépendantes de la COX-2 (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011). Afin de déterminer le rôle des récepteurs EP2, EP4 et IP dans ces vasodilatations, des stimulations de vibrisses ont été effectuées chez le rat en présence de leur antagoniste respectif.

Les résultats montrent que la stimulation des vibrisses induit une vasodilatation dépendante des récepteurs EP2 et EP4 (dans la première phase de dilatation) mais pas des récepteurs IP (**Figure 51**). Ces données confirment donc l'implication majeure de la PGE₂ dans les réponses vasculaires.

2. Les neurones pyramidaux sont équipés pour la synthèse de la PGE₂ via l'activité COX-2

Bien que la COX-2 soit impliquée dans les réponses vasodilatatrices induites par le NMDA, son origine cellulaire reste en suspens. Afin de lever cette incertitude, nous avons utilisé une méthode immunohistochimique et une méthode de RT-PCR sur cellule unique afin de déterminer la localisation des enzymes de la voie de biosynthèse des prostanoides. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux couches superficielles du cortex où la COX-2 est prédominante (Breder et al., 1995; Yamagata et al., 1993).

La COX-2 est retrouvée de façon constitutive dans environ 30% des neurones pyramidaux (**Figure 52C**). La COX-2 n'est pas retrouvée dans les vaisseaux (**Figure 51A**) et très peu dans les astrocytes (**Figure 52B**). Cependant, bien que les neurones pyramidaux expriment la COX-2, l'origine de la synthèse des prostanoides vasodilatateurs reste encore indéterminée.

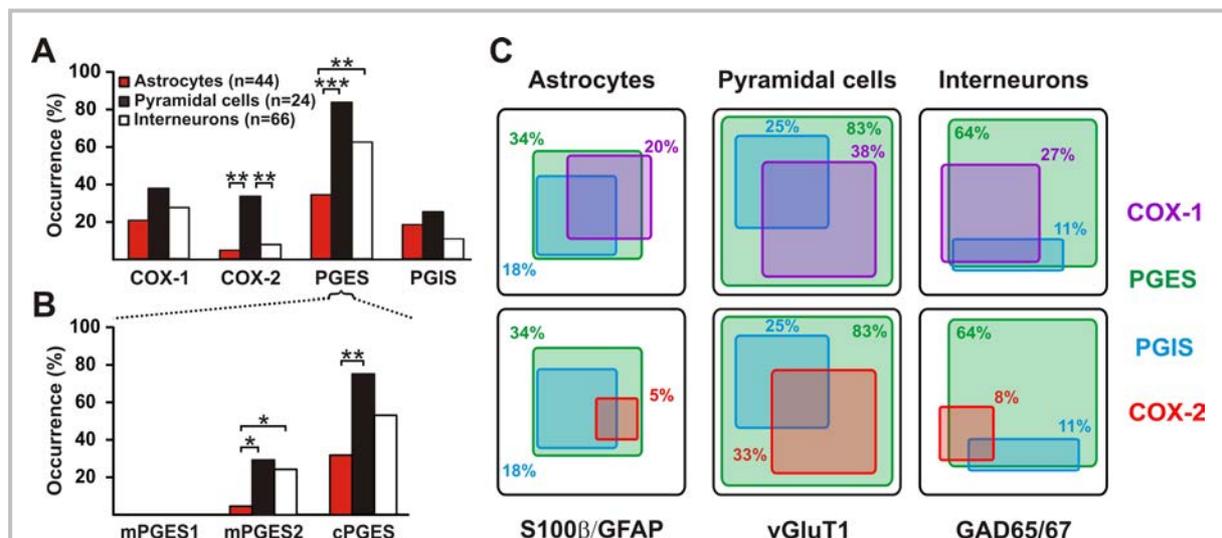


L'étude par RT-PCR sur cellule unique a permis de se focaliser sur les enzymes de la voie de biosynthèse des prostanoides. Nous nous sommes intéressés aux neurones et aux astrocytes. Les astrocytes ont été identifiés par la sulforodamine 101, un colorant fluorescent vital d'astrocytes corticaux (Nimmerjahn et al., 2004). Ces cellules ont un profil électrophysiologique caractéristique faisant apparaître une courbe courant/potentiel linéaire,

un potentiel de membrane hyperpolarisé (-87.9 ± 1.3 mV), une faible résistance d'accès (46.7 ± 7.7 M Ω) et une absence de PA (Zhou et al., 2006).

Concernant les enzymes de biosynthèse des prostanoides, l'expression de la COX-2 est très marginale dans les astrocytes (5%). On retrouve dans 20% d'entre eux la COX-1, en accord avec les données de la littérature [Figure 53A (Takano et al., 2006; Lecrux et al., 2011)]. De plus, seulement deux isoformes de la PGES sont retrouvés dans ces astrocytes, avec une proportion de 32% pour la cPGES et de 5% pour la mPGES2. La mPGES1 est absente des astrocytes. La PGIS est quant à elle retrouvée dans 18% des astrocytes (Figure 53A et B). Il est intéressant de noter que les astrocytes qui expriment COX-1 co-expriment également la cPGES (Figure 53C). Ces données confirment que les astrocytes périvasculaires sont capables de synthétiser de la PGE₂ via l'activité de la COX-1 (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008; Lecrux et al., 2011).

Les neurones ont été sélectionnés par leurs formes et leurs types de décharge. De plus, l'étude



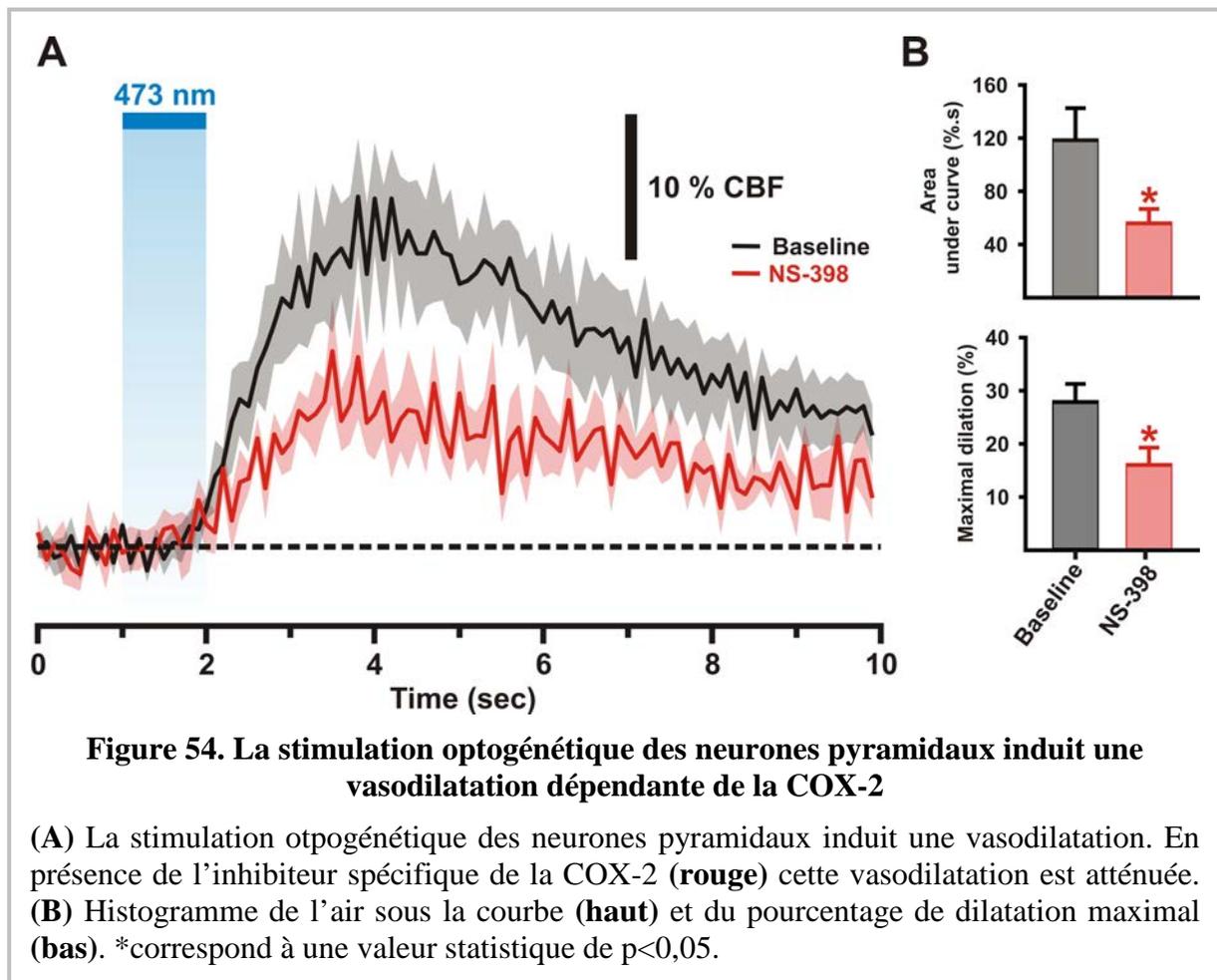
par RT-PCR permet de détecter les marqueurs spécifiques des neurones pyramidaux glutamatergiques (présence de VgluT1 et absence des GAD65 et 67). Les interneurones expriment quant à eux au moins une des deux GADs (GAD65 et/ou GAD67). La COX-2 est détectée dans 33% des neurones pyramidaux et dans seulement 8% des interneurones. La COX-1 est retrouvée de façon homogène dans les deux types de neurones, avec 35% d'expression dans les neurones pyramidaux et 27% dans les interneurones (**Figure 53A**).

Concernant les enzymes terminales de biosynthèse des prostanoïdes, on retrouve la cPGES dans 75% des cellules pyramidales et dans 53% des interneurones. mPGES2 est exprimée dans 53% des neurones pyramidaux et dans 24% des interneurones (**Figure 53**). La forme microsomale de type 1 de la PGES est absente des deux types de neurones. La PGIS est retrouvée dans 25% des neurones pyramidaux et dans 11% des interneurones. Il est intéressant de noter que toutes les cellules pyramidales dans lesquelles on détecte COX-2 expriment au moins une des isoformes de la PGES. La COX-2 est principalement retrouvée dans les neurones pyramidaux. De plus, on retrouve plus fréquemment au moins une des isoformes de la PGES dans ces neurones par rapport aux astrocytes et aux interneurones (**Figure 53C**). Ces données montrent donc que les neurones pyramidaux ont la capacité de produire la PGE₂, et dans une moindre mesure la PGI₂, via l'activité de la COX-2.

3. Les neurones pyramidaux à COX-2 induisent des vasodilatations *in vivo*

Le blocage de l'activité neuronale par la TTX⁹⁶ diminue la réponse vasodilatatrice induite par le NMDA (donnée non montrée). Cela suggère donc que l'activité neuronale est nécessaire dans ces vasodilatations. Afin de déterminer l'implication des neurones pyramidaux à COX-2 dans les vasodilatations, nous avons réalisé une stimulation optogénétique des neurones pyramidaux combinée avec une imagerie du flux sanguin par *laser speckle*. L'activation des neurones pyramidaux induit une vasodilatation qui est atténuée en présence de l'inhibiteur spécifique de la COX-2 (**Figure 54**). Ces données montrent donc que les neurones pyramidaux sont capables d'induire des vasodilatations dépendantes de l'activité de la COX-2.

⁹⁶ TTX : TétrodoToXine (Bloquant des canaux sodiques voltages dépendants)



III. La libération de la PGE₂ par les neurones pyramidaux déclenche une vasodilatation dans le néocortex de rongeurs

Ces travaux ont permis de confirmer l'importance de la COX-2 dans le couplage neurovasculaire cortical. De plus, l'origine cellulaire ainsi que la nature des prostanoides impliqués ont pu être déterminées. En effet, nous avons montré que les neurones pyramidaux étaient la source majeure de PGE₂ et dans une moindre mesure, de PGI₂. Une fois la synthèse de PGE₂ effectuée, celle-ci va être libérée et se fixer sur les récepteurs EP2 et EP4 pour induire des vasodilatations.

IV. Article

SOURCES AND TARGETS OF VASODILATORY PROSTANOIDS IN THE RODENT NEOCORTEX

Alexandre Lacroix^{1,2,3}, Xavier Toussay^{1,2,3,4}, Eitan Anenberg⁵, Clotilde Lecrux⁴, Anastassios Karagiannis^{1,2,3}, Fabrice Plaisier^{1,2,3}, Patrick Chausson^{1,2,3}, Frédéric Jarlier^{1,2,3}, Sean A Burgess⁶, Elizabeth MC Hillman⁶, Timothy H Murphy⁵, Edith Hamel⁴, and Bruno Cauli^{1,2,3}.

1- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, 9 Quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France.

2- CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, 9 Quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France.

3- INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, 9 Quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France.

4- Laboratory of Cerebrovascular Research, Montreal Neurological Institute, McGill University, 3801 rue University, Montréal, Québec H3A 2B4, Canada.

5- Department of Psychiatry, University of British Columbia, 4N1-2255 Wesbrook Mall Detwiller Pavilion, Vancouver, British Columbia V6T 1Z3, Canada.

6- Department of Biomedical Engineering, Columbia University, 351L Engineering Terrace, 1210 Amsterdam Avenue, New York, NY 10027, USA.

Running title: PROSTANOIDS IN NEUROVASCULAR COUPLING

HIGHLIGHTS

- Neurovascular coupling involves COX-2 derived PgE2 and EP2 and EP4 receptors.
- Pyramidal cells are the main cell type equipped for COX-2 derived PgE2 synthesis.
- Photostimulation of pyramidal cells evokes COX-2 dependent vascular responses.

CORRESPONDING AUTHOR:

Bruno Cauli, Neuroscience Paris Seine CNRS UMR 8246, INSERM UMR-S 1130, UPMC UMR 18, 9 Quai St. Bernard 75005 Paris, France.

Telephone: (33) 1 44 27 25 80 Facsimile: (33) 1 44 27 25 84.

E-mail: bruno.cauli@snv.jussieu.fr

SUMMARY

Vasodilatory prostanoids play a key role in neurovascular coupling (NVC) but their cellular origin and the receptors involved remain unclear. Prostaglandin E2 (PgE2) and prostacyclin (Pgi2) are the main vasodilatory prostanoids sequentially produced by rate limiting cyclooxygenases (COX) and terminal synthesizing enzymes. We showed that NMDA-induced vasodilatations and hyperemic responses evoked by whisker stimulation involved COX-2 activity and activation of the PgE2 receptors EP2 and EP4. The characterization of prostanoid producing cells by immunocytochemistry and single-cell reverse transcriptase-PCR (scRT-PCR) revealed that pyramidal cells are the main cell type equipped for PgE2 synthesis, one third of them co-expressing COX-2 and a PgE2 synthase (PGES). Consistent with their importance in NVC, optogenetic stimulation of pyramidal cells evoked COX-2 dependent hyperemic responses *in vivo*. These observations identify pyramidal cells as the main source of PgE2 in NVC and EP2 and EP4 as vasodilatory receptors involved in this process.

INTRODUCTION

Neurovascular coupling (NVC), the tight link between neuronal activity and local cerebral blood flow, is essential for normal brain function. It is also the physiological basis of functional brain imaging techniques such as positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging widely used to infer neuronal activity with hemodynamic contrasts (Lauritzen, 2005; Buzsaki et al., 2007). In several pathologies including Alzheimer's disease and stroke, NVC is notably altered by dysfunctions in the neuronal, astroglial, and/or vascular elements of the neurovascular unit (Iadecola, 2004).

Despite this physiopathological importance the cellular and molecular mechanisms of NVC remain elusive. In the neocortex they involve various messengers (Cauli and Hamel, 2010; Attwell et al., 2010) among which vasodilatory prostanoids accounting for about half of the hyperemic response play a key role (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011). Prostanoids are arachidonic acid derivatives (Figure 1) produced by the sequential action of rate-limiting cyclooxygenases (COX) and terminal synthesizing enzymes specifying their nature (Funk, 2001). Presumably because of the lack of selective inhibitors for terminal enzymes, most studies relied only on impairing COX-1 and/or COX-2 (Niwa et al., 2000; Niwa et al., 2001;

Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008; Lecrux et al., 2011; Liu et al., 2012), hence the undetermined nature of the NVC prostanoids.

In the neocortex PgE2 and PgI2 are the main prostanoids relaxing vascular smooth muscle cells (Figure 1) through their action on EP2, EP4 and IP receptors (Woodward et al., 2011). Although pharmacological blockade of the receptors provides a means to identify the NVC prostanoids, their use is still poorly documented (Hall et al., 2014) and has been limited by the confounding constrictive effect of the PgE2 receptor EP1 (Dabertrand et al., 2013).

The cellular sources of the NVC prostanoids are also uncertain since different synthesizing enzymes are expressed in various cell types including neurons, astrocytes, microglia and endothelial cells (Breder et al., 1992; Breder et al., 1995; Kaufmann et al., 1996; Siegle et al., 2000; Vazquez-Tello et al., 2004; Wang et al., 2005; Cahoy et al., 2008; Lecrux et al., 2011).

In our attempt to address these unknowns we found by ex vivo and in vivo approaches, that COX-2 and the PgE2 receptors EP2 and EP4 are essential contributors of the NVC responses in the cerebral cortex. Using immunocytochemistry and scRT-PCR we established that pyramidal cells are the major cell type equipped for COX-2 derived PgE2 synthesis. We further demonstrated their importance by combining in vivo optogenetic photostimulation of pyramidal cells and pharmacological manipulations of the NVC response. Thus, this body of evidence identifies pyramidal cells and PGE2, respectively, as the major source and key vasoactive messenger of NVC responses in the somatosensory cortex.

RESULTS

COX-2 derived prostanoids are involved in NMDA-induced vasodilations.

Cortical functional hyperemia requires the activation of NMDA receptors for its full expression (Gsell et al., 2006; Lecrux et al., 2011). Since NMDA has been shown to promote the release of the vasodilatory PgE2 and PgI2 (Lazarewicz and Salinska, 1995; Pepicelli et al., 2005), we sought to determine the biosynthetic pathways and the prostanoid receptors underlying NMDA-induced vasodilations by an ex vivo stimulation approach (Fergus and Lee, 1997).

Bath application of NMDA (30 μ M) in cortical slices evoked arteriolar dilations (n=16, Figure 2). To determine whether prostanoids were involved, slices were pretreated with the

COX-1 inhibitor, SC 560 (100 nM, n=12). SC 560 did not alter the maximal amplitude or the magnitude (Figure 2A, C and Table S1) of the vasodilations. In marked contrast, COX-2 inhibition with NS 398 (10 μ M, n=10) dramatically reduced the maximal amplitude and magnitude of the response (Figure 2A, C and Table S1). Correspondingly, non-selective COXs inhibition with Indomethacin (5 μ M, n=6) abolished almost completely the NMDA responses (Figure 2A, C and Table S1). These observations confirm the prominent role of COX-2 metabolites in NVC (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011).

Blockade of EP2/EP1 receptors with AH 6809 (10 μ M, n=14) strongly reduced the maximal amplitude and the magnitude of NMDA-induced vasodilations (Figure 2 A, C and Table S1). Selective EP4 antagonism with L 161-982 (1 μ M, n=10) impaired the maximal amplitude of vasodilations (Figure 2A, C and Table S1). Blockade of IP receptor with CAY 10441 (200 nM, n=12) reduced the maximal amplitude and the magnitude of vasodilations (Figure 2A, C and Table S1). The reduction of NMDA-induced vasodilations by EP2, EP4 and IP receptor antagonists and during COX-2, but not COX-1 inhibition suggests that PgE2 and PgI2 derived from COX-2 activity underlie these vascular responses.

The NVC response to sensory stimulation recruits PgE2 vasodilatory receptors.

Since NVC responses to sensory stimulations involve NMDA receptors and COX-2 metabolites (Niwa et al., 2000; Gsell et al., 2006; Lecrux et al., 2011) we next sought to determine whether EP2, EP4 and IP receptors were involved in the NVC response to sensory stimulation. Consistent with the results in acute slices, AH 6809 (1 μ M, n=6) and L 161-982 (100 μ M, n=4) significantly reduced the NVC responses to whisker stimulation, without altering the whisker-evoked neuronal activity measured by the amplitude of the local field potentials (LFPs, Figure 3). In contrast, IP receptor blockade with CAY 10441, even at high concentrations (100 μ M, n=5), had no effect on the NVC or the evoked electrophysiological response (Figure 3).

Pyramidal cells are the main cell type constitutively expressing COX-2.

We next examined the cellular distribution of COX-2 in the different cellular elements of the neurovascular unit. We focused on supragranular layers of the rat somatosensory cortex in which COX-2 predominates (Breder et al., 1995). COX-2 immunolabeling was abundant in layer II-III (Figure 4). It consisted in perinuclear staining and was absent from the vascular

bed immunostained for laminin (Figure 4A). Similarly, a few S100 β -immunolabelled astrocytes ($3.0 \pm 1.2\%$, $n=79$ of 2647) were weakly COX-2 immunopositive (Figure 4B). In contrast, virtually all COX-2 cells displayed a nucleus positive for Satb2, a transcription factor of pyramidal cells (Lee et al., 2010b). COX-2 cells accounted for $28.3 \pm 1.6\%$ of Satb2 neurons ($n=950$ of 3362, Figure 4C). This indicates that pyramidal neurons, over astrocytes and vascular cells, are the main cell type constitutively expressing COX-2 (Breder et al., 1995; Kaufmann et al., 1996; Wang et al., 2005; Lecrux et al., 2011). Nonetheless it remains unclear whether COX-2 derived vasodilatory prostanoids are directly produced by pyramidal neurons or if their synthesis is transcellular as suggested for 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) (Attwell et al., 2010).

Astrocytes have the capability to synthesize COX-1 derived PgE2.

To address this issue we determined at the single-cell level the cellular distribution of PgE2 and PgI2 synthesizing enzymes including the rate limiting and the terminal synthesizing enzymes (Figure 1). Two scRT-PCR protocols were respectively designed for astrocyte and neuron characterizations (see Supplemental experimental procedure). The efficiency of the protocols was assessed on 500 pg of total RNA purified from rat neocortex. Figure S1 shows that for each protocol all specific mRNAs are detected and confirms the sensitivity of the scRT-PCR procedure (Cauli et al., 1997).

Astrocytes were vitally stained with Sulforhodamine 101 ($n=35$) or Texas Red hydrazide ($n=9$), two related fluorescent dyes of cortical astrocytes (Nimmerjahn et al., 2004) (see Supplemental experimental procedure). Labeled cells were selected in the vicinity of an arteriole and at the border of layers I and II (Figure 5A) which contain a high density of astrocytes (McCaslin et al., 2011). Cells were also selected according to the presence of a prominent perivascular process ($n=39$, Figure 5A) or a cell body directly apposed on an arteriole ($n=6$). In line with their glial identity (Zhou et al., 2006), they exhibited small somata (Figure 5A and Table S2). Whole-cell recordings revealed a linear I/V curve (Figure 5B), a hyperpolarized membrane potential (-87.9 ± 1.3 mV), a low input resistance (46.7 ± 7.7 M Ω) and an inability to generate action potentials which are all characteristics of cortical astrocytes (Zhou et al., 2006). The molecular analysis of these cells revealed the expression of at least one of the two astrocytic markers; the glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 β (Figure 5C). Consistent with a low level of GFAP in quiescent astrocytes (Wilhelmsson et al.,

2006), GFAP was detected in half of the astrocytes whereas S100 β was expressed in most astrocytes (98%, n=43 of 44).

As previously observed (Takano et al., 2006; Lecrux et al., 2011), COX-1 was detected in a subpopulation of perivascular astrocytes (20%, n=9 of 44, Figures 5C and 6). In agreement with our immunocytochemical observations (Figure 4B), a minority of S100 β positive astrocytes expressed COX-2 (5%, n=2 of 44, Figure 6). The PGES isoform, mPGES1, was never observed (Figures 5C and 6B) in contrast with mPGES2 and cPGES, respectively detected in 5% (n=2 of 44) and 32% (n=14) of the cells (Figures 5C and 6B). PGIS was detected in 8 cells (18%, Figure 6A and C) and was systematically co-expressed with cPGES. Interestingly expression of cPGES (89%, n=8 of 9, $p < 0.001$) and PGIS (44%, n=4 of 9, $p < 0.05$) was enriched in COX-1 positive astrocytes. Of note, the two COX-2 expressing astrocytes were also COX-1 and cPGES positive. These data confirm the capability of perivascular astrocytes to synthesize COX-1 derived PgE2 (Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008) and PgI2 to a lesser extent.

Pyramidal cells are the main cell type equipped for COX-2 derived PgE2 biosynthesis.

We next characterized layer II-III neurons to confirm at the mRNA level our immunocytochemical observations (Figure 4C) and further determine the expression profile of PgE2 and PgI2 synthesizing enzymes. Pyramidal cells exhibited a prominent apical dendrite extending from a large triangular soma (n=24, Figure 5D inset and Table S2). In contrast, collected interneurons (n=66) displayed a round (n= 4), ovoid (n= 16) or fusiform soma (n= 46, Figure 5F inset). Whole-cell current clamp recordings revealed a resting membrane potential more hyperpolarized in pyramidal cells than in interneurons (Figure 5D, F and Table S3). Pyramidal cells fired larger and wider action potentials than interneurons (Figure 5D, F and Table S4). They also discharged at a lower frequency (Figure 5D, F and Table S5). This confirms the regular spiking phenotype of pyramidal cells (Karagiannis et al., 2009). Consistently, the molecular analysis of pyramidal cells revealed expression of the vesicular glutamate transporter, vGluT1 (Figure 5E) but none of the two GABA synthesizing enzymes (GADs). Cholecystokinin (CCK) and, to a lesser extent, calbindin (CB) but not the other interneuron markers (Table S6), were frequently observed (Andjelic et al., 2009). In contrast, interneurons expressed at least one of the two GADs and frequently the interneuron makers (Figure 5G and Table S6), particularly of calretinin (CR), neuropeptide Y (NPY) and vasoactive Intestinal peptide (VIP). These electrophysiological and molecular data confirm

the glutamatergic and the GABAergic phenotypes of pyramidal cells and interneurons respectively.

COX-1 was respectively observed in 38% (n=9 of 24, Figure 5E) and 27% (n=18 of 66) of pyramidal cells and interneurons and COX-2 in 33% of pyramidal cells (n=8 of 24, Figure 5E) but only in 8% of interneurons (n=5 of 66, Figure 5G and 6). Interestingly, all COX-2 positive interneurons co-expressed VIP (Figure 5G) that represented 16% of VIP interneurons (n=5 of 32). Coexpression of both isoforms occurred in 17% of pyramidal cells (Figure 5E) and in 5% of interneurons. Alike astrocytes, mPGES1 was never detected in neurons (Figures 5E, G and 6B). In contradistinction, mPGES2 and cPGES were respectively detected in 29 (n=7 of 24) and 75% (n=18 of 24 Figure 5E) of pyramidal cells and in 24 (n=16 of 66) and 53% (n=35 of 66) of interneurons (Figures 5G and 6B). Interestingly, expression of at least one terminal PgE2 synthesizing enzyme was observed in all COX-1 or COX-2 positive pyramidal cells (Figures 5E and 6C) and in a majority of interneurons positive for COX-1 (94%, n=17 of 18) or COX-2 (80%, n=4 of 5, Figures 5G and 6C). PGIS was expressed in 25% of pyramidal cells (n=6 of 24, Figure 6A and C) and only in 11% of interneurons (n=7 of 66, Figures 6A and C). These data are indicative of the capability of subpopulations of cortical neurons to synthesize PgE2 and, to a lesser extent, PgI2.

The occurrence of COX-1 was similar in astrocytes, pyramidal cells and interneurons (Figure 6). In contrast, our immunocytochemical and scRT-PCR data showed that pyramidal neurons were the main cell type constitutively expressing COX-2 (Figure 4, 6A and C). Expression of at least one PGES was more frequent in neurons than in astrocytes (Figure 6A and B). cPGES was the main isoform in the three cell types, particularly in pyramidal cells (Figure 6B). Expression mPGES2 was infrequent in neurons and very rare in astrocytes (Figure 6B). Similarly, PGIS was rather rare in neurons and astrocytes (Figure 6A and C). These data indicate that perivascular astrocytes and cortical neurons are better equipped to produce PgE2 than PgI2. They also suggest that pyramidal neurons are the main source of PgE2 required in NVC. Accordingly, NMDA-induced vasodilations were dramatically reduced by blockade of action potentials with tetrodotoxin (TTX 5 μ M, Figure 2) indicating that neuronal activity is required for these responses.

Optogenetic stimulation of pyramidal cells induces COX-2 dependent hyperemic responses.

To evaluate functionally the capability of pyramidal cells to release vasodilatory prostanoids *in vivo*, we combined direct optogenetic stimulation of Channelrhodopsin-2 (ChR-2) expressing neurons with laser speckle imaging of blood flow (Scott and Murphy, 2012). Efficient expression of ChR-2 was obtained by crossing Emx1-Cre mice (Gorski et al., 2002) with the Ai32 mice (Madisen et al., 2012) which permits a Cre-dependent expression of ChR2 and a robust photoexcitability of pyramidal cells (Madisen et al., 2012). Photoexcitation at 473 nm (100Hz, 5ms, 3mW, n=5) of Emx1-Cre;Ai32 mice (n=5) elicited a rapid and transient increase in blood perfusion (Figure 7) that was not observed with Thy1-YFP mice that do not express ChR2 (Figure 7B and C, n=4). Consistent with the release of COX-2 derived PgE2, laser speckle contrast changes evoked by photoexcitation of Emx1-Cre;Ai32 pyramidal cells were reduced by application of the COX-2 inhibitor NS 398 (100 μ M, Figure 7B and C). These optogenetic results confirm that activation of pyramidal cells is sufficient to release COX-2 derived vasodilatory prostanoids.

DISCUSSION

Here we identified the cell-type specific pathway responsible for the synthesis of vasodilatory prostanoids involved in NVC (Figure 1). We confirmed the importance of COX-2 in this process by showing the requirement of its activity for the full expression of the NVC response (Niwa et al., 2000; Lecrux et al., 2011). Further, we identified PgE2 as the main vasodilatory prostanoid by demonstrating the implication of EP2 and EP4 receptors. We reported that pyramidal cells are the main cell type equipped for PgE2 synthesis derived from COX-2 activity. Moreover we demonstrated the key role of pyramidal cells by showing that their increased activity through direct optogenetic stimulation evoked COX-2 dependent NVC responses.

Cellular distribution of PgE2 and PgI2 synthesizing enzymes.

Our data showing the expression of COX-1 in various cell types are supported by previous observations demonstrating its astroglial and neuronal expression (Breder et al., 1992; Li et al., 1993; Yermakova et al., 1999; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008; Cahoy et al., 2008; Lecrux et al., 2011). COX-1 cellular distribution is even more widespread when considering that microglia and endothelial cells also express this isoform (Yermakova et al., 1999; Tang and Vanhoutte, 2008; Tanaka et al., 2009; Lecrux et al., 2011). In contrast, we confirmed by immunocytochemistry and scRT-PCR that constitutive COX-2 expression is

largely restricted to a subpopulation of pyramidal neurons, rarely in astrocytes and virtually absent from the vascular bed (Yamagata et al., 1993; Breder et al., 1995; Kaufmann et al., 1996; Wang et al., 2005; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008; Cahoy et al., 2008; Lecrux et al., 2011). We also found that 16% of VIP interneurons express COX-2. In cortical layer II-III VIP interneurons represent 40% of the 5-HT₃ interneurons accounting for about 50% of all interneurons (Lee et al., 2010b). Since interneurons represent 20% of all cortical neurons (Tamamaki et al., 2003), COX-2 expressing VIP interneurons represent a small subpopulation (~0.6% of layer II-III neurons), which is likely to play a minor role in NVC. The mPGES2 was essentially detected in neurons as already documented (Sang et al., 2005; Cahoy et al., 2008; Chaudhry et al., 2010). cPGES was observed in all cell types investigated, and particularly in pyramidal cells, in good agreement with previous reports (Vazquez-Tello et al., 2004; Sang et al., 2005; Cahoy et al., 2008; Chaudhry and Dore, 2009). Finally, we confirmed a rather infrequent PGIS expression in parenchymal cells (Mehl et al., 1999; Cahoy et al., 2008). Altogether these observations indicate that PgE₂ is the major vasodilatory prostanoids that can be produced by neurons and astrocytes (Bishai and Coceani, 1992).

Origins of vasodilatory prostanoids in NVC

It is well documented that perivascular astrocytes can release COX-1, but not COX-2, derived vasodilatory prostanoids consecutive to the activation of group I metabotropic glutamate receptors and intracellular Ca²⁺ surge (Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008). However, the recruitment of this pathway during sensory stimulations is uncertain. Indeed, pharmacological and genetic evidence showed that such stimuli elicit COX-2, but not COX-1, dependent hyperemic responses (Niwa et al., 2000; Niwa et al., 2001; Lecrux et al., 2011) indicating that astrocytic prostanoids are not recruited by sensory stimulation. Furthermore even the implication of group I metabotropic glutamate receptors signaling in NVC has been recently questioned (Calcinaghi et al., 2011; Sun et al., 2013; Nizar et al., 2013).

We instead focused on NMDA receptors because their activation is required for the full expression of the NVC response to sensory stimulation (Gsell et al., 2006; Lecrux et al., 2011) and induces the release of the vasodilators PgE₂ and PgI₂ (Lazarewicz and Salinska, 1995; Pepicelli et al., 2005). Similarly to the in vivo context NMDA-induced vasodilations were dramatically impaired by COX-2 inhibition. Although NMDA has been shown previously to induce nitric oxide (NO) dependent vasodilations (Fergus and Lee, 1997), our

observation showing the implication of COX-2 are not incompatible with an involvement of NO since NO is also required to suppress the vasoconstricting 20-HETE synthesis (Hall et al., 2014). In addition NO stimulates the activity of both COX-1 and COX-2 (Salvemini et al., 1993) which, in the case of COX-2, could play a yet underdetermined permissive role in NVC (Lindauer et al., 1999).

Our results suggesting that COX-2 derived PgE2 released during sensory stimulation has a pyramidal origin are supported by optogenetic evidence. Indeed, selective photostimulation of CamKII α pyramidal cells that extensively coexpress COX-2 (Kaufmann et al., 1996), evoked a hyperemic response (Lee et al., 2010a; Ji et al., 2012). In addition, the NVC responses induced by photostimulation of pyramidal neurons are virtually insensitive to ionotropic glutamate receptors blockade (Scott and Murphy, 2012), which further points to release of vasodilatory messengers by pyramidal cells. Consistently, we found that the optogenetic photostimulation of pyramidal cells induced COX-2 dependent hyperemic responses.

Prostanoid receptors in neurovascular coupling

The prostanoid receptors EP2, EP4 and IP are expressed in cerebrovascular smooth muscle cells (Davis et al., 2004; Myren et al., 2010; Myren et al., 2011; Dabertrand et al., 2013). We observed both ex vivo and in vivo an impairment of the NVC responses by the EP2 and EP4 antagonists. These data suggesting an involvement of PgE2 are consistent with recent observations showing a recruitment of EP4 receptors in glutamate evoked cerebral vasodilations (Hall et al., 2014). Antagonism of both EP2 and EP4 receptors reduced the maximal amplitude of NMDA-induced vasodilations, but their magnitude were only impaired by the EP2 antagonist, indicating that EP2 receptors may have a longer lasting vasodilatory effect than EP4 receptors. This is compatible with the reported agonist-induced internalization of EP4 receptor but not of EP2 receptor (Desai et al., 2000). This further suggests that EP2 receptor is the major vasodilatory PgE2 receptor activated during a sustained hyperemic response. Although the IP antagonist impaired NMDA-induced vasodilations in slices, it did not alter the hyperemic response to sensory stimulation. Since we show that both responses are essentially mediated by COX-2, this indicates that PGI2 release induced by NMDA in slices (Lazarewicz and Salinska, 1995) is likely derived from COX-2 activity, consistent with the preferred contribution of COX-2 over COX-1 in PGI2 biosynthesis (Ruan et al., 2011), and the reported production of COX-2 derived PGI2 production in brain (Hetu and Riendeau, 2005). Furthermore our data confirmed the expression of PGIS in some pyramidal neurons

(Mehl et al., 1999; Siegle et al., 2000). The difference we observed between ex vivo and in vivo neurovascular responses is probably due to the fact that bath application of NMDA recruit more massively NMDA receptors than a physiological sensory stimulus, resulting in enhanced PgI2 biosynthesis and release.

Prostanoids in health and disease

Expression of COX-2 can be induced in different cell types by various physiopathological conditions including synaptic plasticity, seizure, cortical spreading depression, stroke, neuroinflammation and Alzheimer's disease (Yamagata et al., 1993; Hoozemans et al., 2001; Ikeda-Matsuo et al., 2006; Cui et al., 2008; Choi et al., 2009; Font-Nieves et al., 2012). In addition to COX-2, the terminal PGES isoform mPGES1, normally present at a low basal level, is also inducible (Yamagata et al., 2001; Mancini et al., 2001; Ikeda-Matsuo et al., 2006; de Oliveira et al., 2008; Akitake et al., 2013). Such transcriptional upregulations lead to pathological levels of PgE2 with consequences among others on cell survival, edema formation or neuroinflammation (Ikeda-Matsuo et al., 2006; Choi et al., 2009; Stark and Bazan, 2011). Besides these deleterious effects, NVC is also likely to be altered by high levels of PgE2 that will tend to desensitize the dilatory EP4 receptors (Desai et al., 2000) thereby diminishing the response. Similarly high levels of PgE2 will increase the recruitment of the low affinity vasoconstrictor EP1 receptor (Boie et al., 1997; Dabertrand et al., 2013). This shift in receptor activity can convert PgE2-induced vasodilations into vasoconstrictions (Tang et al., 2008).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Male Wistar rats (postnatal days 17.0 ± 0.1 ; Janvier) were used for patch-clamp recordings and vascular reactivity in acute slices. Adult Wistar or Sprague Dawley rats (250-300 g) were used for immunostaining (n=3) or whisker-induced NVC experiments (n=15). Jackson Laboratory Line B6;129P-Emx1tm1Jlr/J (Gorski et al., 2002) mice were crossed with B6;129S-Gt(ROSA)26Sortm32.1(CAG-COP4*H134R/EYFP)Hze/J mice (Madisen et al., 2012). 6 male and female 2-4 month-old animals from the resultant strain weighing 20-30g were used for optogenetic experiments. 2 B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)2Jrs/J mice of the same age and weight were used for controls. All animals were housed in a temperature-controlled (21–

25°C) room under daylight conditions and were given water ad libitum. Experiments were approved by the animal ethics committees of the respective Institutions.

Slice preparation

Coronal slices (300 μm thick) of the rat barrel cortex were prepared from Wistar rats as previously described (Karagiannis et al., 2009), see supplemental experimental procedures for details. Experiments were performed at $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Extracellular solution was aCSF gassed with 95% O_2 and 5% CO_2 containing (in mM): 126 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4 , 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 26 NaHCO_3 , 10 glucose, 15 sucrose.

Vascular reactivity

After a resting period of at least 30 min after slice transfer (Zonta et al., 2003), diving arterioles in layers I-III exhibiting a luminal diameter of 10-30 μm and remaining in the focal plane for at least 50 μm were selected (Cauli et al., 2004). Images of arterioles were acquired every 10 s using digital CCD cameras (CoolSnap HQ2, Roper Scientific, or QIClick, QImaging) and Imaging Workbench 6.0.25 (INDEC BioSystems) or Image Pro Plus 6.3.1 (MediaCybernetics) softwares. Luminal diameter was measured using custom analysis software developed in MATLAB (Mathworks). After 5 min of baseline arterioles were precontracted by constantly superfusing the thromboxane A₂ agonist 9,11-dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F₂ α (U46619; 50-75 nM) to compensate for their limited myogenic tone in brain slices (Sagher et al., 1993). NMDA (30 μM) was bath-applied for 5 min after 60 min of U46619 superfusion (Figure S2). COX-1/2 inhibitors and prostanoid receptor antagonists were applied 30 min before NMDA application and throughout all the duration of the experiment and TTX 15 min before NMDA application. Dilatory responses are expressed as changes relatively to the precontracted state. The magnitude of vasodilations was defined as the integral of diameter changes measured for a period of 1000 s following the onset of vasodilation. U46619, NMDA, SC 560, NS 398, AH 6809; L 161-982 were purchase from Enzo Life Sciences, CAY 10441 from Cayman chemical, Indomethacin from Sigma and TTX from Latoxan.

Whole-cell recordings

Patch pipettes ($5.5 \pm 0.1 \text{ M}\Omega$) pulled from borosilicate glass were filled with 8 μl of RNase free internal solution containing in (mM): 144 K-gluconate, 3 MgCl_2 , 0.5 EGTA, 10 HEPES,

pH 7.2 (285 / 295 mOsm). Whole-cell recordings were performed at $27.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for labeled astrocytes (see supplemental experimental procedures) and neurons using a patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, MDS). Data were filtered at 5-10 kHz and digitized at 50 kHz using an acquisition board (Digidata 1440, MDS) attached to a personal computer running pCLAMP 10.2 software package (MDS).

Cytoplasm harvest and scRT-PCR

At the end of the whole-cell recording lasting less than 20 min, the cytoplasmic content was aspirated in the recording pipette. The pipette's content was expelled into a test tube and RT was performed in a final volume of 10 μl as described previously (Lambolez et al., 1992). Two scRT-PCR protocols were designed to probe simultaneously for the expression of prostanoids synthesizing enzymes and well established markers of cortical astrocytes (Houades et al., 2008) or neurons (Karagiannis et al., 2009). Prostanoids synthesizing enzymes (Figure 1) included COX-1 and COX-2, the terminal PGES mPGES1, mPGES2 and cPGES and PGIS. Astrocytes markers included S100 β and GFAP. Neuronal markers included the vGluT1, the two isoforms of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65 and GAD67), the neuronal isoform of Nitric Oxide Synthase (NOS-1), CB, CR, and Parvalbumin (PV), NPY, VIP, Somatostatin (SOM), and CCK. Two-step amplification were performed essentially as described (Cauli et al., 1997) using the primer pairs listed in Table S7. 10 μl of each individual PCR product were run on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide using ΦX174 digested by HaeIII as a molecular weight marker. The sizes of the PCR-generated fragments were as predicted by the mRNA sequences (Table S7).

Double Immunofluorescence

Rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and their brain were perfusion-fixed (500 ml of ice-cold 4% paraformaldehyde, PFA, in 0.1M phosphate buffer, pH 7.4), and post-fixed by immersion in 4% PFA (2 h, 4°C). Brains were then cut in 50 μm -thick coronal sections with a HM 650V vibratome (Microm). Sections were simultaneously incubated with the primary antibodies against COX-2 and the cell-type specific marker. Antibodies included goat anti-COX-2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-S100 β (1:2000, Swant), rabbit anti-Satb2 (1:1000, abcam) and mouse anti-laminin (1:5000, Millipore). The respective reactions visualized with donkey-specific Alexa Fluor 488 and 555 secondary antibodies (1:400, Invitrogen). Sections were mounted on gelatin-coated slides for

visualization and analysis of immunostained material using a confocal microscope (SPE, Leica).

NVC to whisker stimulation using laser Doppler flowmetry (LDF)

Rats were anesthetized (urethane, 1g/ml, i.p.), cannulated in the femoral artery for blood gas and blood pressure measurements (Table S8), and placed in a stereotaxic frame (David Kopf instruments). Body temperature was maintained at 37°C using a rectal probe connected to a homeothermic blanket (Harvard apparatus). The posterior atlanto-occipital membrane was exposed for intracisternal (ic) injection (1µL/min) of vehicle and drugs using a 30G needle connected to a 10µL Hamilton syringe driven by a Harvard infusion pump. Left whiskers were trimmed, attached to a glass capillary connected to a Piezo actuator (Piezo systems, inc) placed in a Faraday cage and driven by an isolated pulse stimulator (8Hz, A-M systems, Model 2100) controlled by PowerLab (AD instruments). Seven stimulation blocks (40 s baseline, 20 s stimulation) were given for each condition (control, vehicle and drug) with only one drug being tested in each rat. The skull over the right barrel cortex was thinned to translucency for positioning of the laser-Doppler probe (Transonic Systems). Tungsten microelectrodes (FHC, Inc) were inserted bilaterally in the barrel cortex using stereotaxic manipulators for recording of LFPs through a 2-channel amplifier (A-M systems, Model 1800), a reference screw being placed on the dura over the frontal cortex. Electrophysiological data were filtered (10-500Hz), amplified and acquired at 10kHz through a PowerLab (AD instruments), and analyzed using script written in MATLAB (MathWorks).

Laser-speckle contrast imaging and optogenetic stimulation

Mice were anaesthetized with 5% isoflurane in air which was reduced to 1-1.5% during surgery. Body temperature was maintained at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ by a heating pad which had its intensity controlled by temperature feedback from a rectal probe. The mouse was secured in a custom made head hold using cyanoacrylate and dental cement and a craniotomy was made over the right forelimb sensorimotor cortex. The dura was left intact. Agarose dissolved in HEPES buffered ACSF, pH 7.3, to 1.5% was placed over the surface of the cortex at 37°C. The surface of the cortex was then covered with a No.1 130, 160-µm thick glass coverslip. Before imaging, the brain was warmed to ~37°C by pumping warm water through tubing attached to the custom built stainless steel headhold (Xie et al., 2013). During stimulation

procedures anesthesia was switched to a ketamine/xylazine combination (100/10 mg/kg) which was supplemented as required.

The surface of the cortex was illuminated with a 784 nm 32 mW StockerYale SNF-XXX_885 s-35 laser (Stocker and Yale) with a beam expander directed at the cortex at a 30° angle. Light intensity was controlled with a polarizer. The flow of blood cells and resultant blurring in the interference patterns (Briers, 2001) was detected by a CCD camera (Dalsa 1M60). Image acquisition was performed using EPIX XCAP software (v2.2). Ten trials for each stimulation parameter consisting of 100-130 frames were acquired at 10 Hz with a 10 ms exposure time. Using MATLAB (Mathworks) each 1024X1024 pixel image in the stack was variance filtered spatially with a kernel size of 3 pixels. Blood flow measurements were estimated as the inverse square of speckle contrast values which were scaled between minimum and maximum flow rate (Cheng and Duong, 2007). Minimum flow was determined from contrast values measured from the mouse cortex after the animal was euthanized. For stimulation a 473 nm laser beam (Crystalaser, collimated to ~100 µm diameter, 5 ms pulses, 3.3 mW, 100Hz, 1 sec) was targeted to forelimb sensorimotor cortex (Scott and Murphy, 2012). Light from the 473nm laser was blocked from contaminating the speckle signal as detected by the camera by a 715 nm longpass filter. Regions of interest selected for assessment of speckle contrast over time were 1mm² and centered at the site where the laser was targeted over the cortex.

After baseline assessment of light-evoked hemodynamic responses the agarose was removed from the cortical surface and NS 398 (Tocris, 100 µM dissolved in DMSO and diluted in ACSF) was administrated directly on the cortex for 30 min. Agarose was then reapplied to the cortex (37°C), covered with a cover slip, and laser speckle contrast imaging ensued. The magnitude of CBF change was defined as the integral of CBF changes measured from the onset of stimulation to the end of the recording.

Statistical analyses

Comparison of the occurrence of expressed genes between different cell types was done according to:

$$|\epsilon| = \frac{|p_a - p_b|}{\sqrt{\frac{pq}{n_a} + \frac{pq}{n_b}}},$$

where p_a and p_b represent the percentage of occurrence, and n_a and n_b represent the number of individuals in populations a and b. The variable p denotes the percentage of occurrence in the overall population with $q = 1-p$. The quantity $|\varepsilon|$ was tested against a normal distribution (Fisher and Yates, 1963) to determine statistical significance of the difference of expression. Bonferroni correction was also used for multiple cell type comparison. Statistical significance of electrophysiological and morphological properties, vascular responses and light-induced CBF responses was determined using the Mann-Whitney U test.

LDF data were extracted for every second using LabChart software (AD instruments), and whisker-evoked CBF changes over baseline for the seven stimulation blocks were averaged. Drug effects (at the maximum dose and time efficacy determined in preliminary experiments) were compared by repeated-measures ANOVA, followed by a post-hoc Newman-Keuls test between each condition. LFPs on the contralateral and corresponding ipsilateral barrel cortex were averaged every 125 ms for each 20 s stimulation, and the LFP amplitude, defined as the difference between the maximal and minimum values, was averaged over the repeated blocks and normalized from control condition. Statistical analyses were performed with Prism4 (GraphPad Software) or Statistica (Statsoft). All values are expressed as means \pm SEM.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Human Frontier Science Program (HFSP, RGY0070/2007, BC and EMCH), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR 2011 MALZ 003 01, BC and “IHU Institut de Neurosciences Translationelles de Paris”, BC), the Fondation pour la Recherche sur le Cerveau / Rotary Club de France (BC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-84209, EH and MOP-12675 THM) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (EH). THM and BC were supported by a joint UPMC and UBC collaborative grant. Part of this work was coordinated by CEA/MIRCen/IB2M and supported by the association France Alzheimer (BC). AK was supported by a Fondation pour la Recherche Médicale fellowship (FDT20100920106). We thank the Cell Imaging facility of the IBPS (Paris, France).

REFERENCES

Akitake, Y., Nakatani, Y., Kamei, D., Hosokawa, M., Akatsu, H., Uematsu, S., Akira, S., Kudo, I., Hara, S., and Takahashi, M. (2013). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in

alzheimer's disease and its deletion mitigates alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *J. Neurosci. Res.* 91, 909-919.

Andjelic,S., Gallopin,T., Cauli,B., Hill,E.L., Roux,L., Badr,S., Hu,E., Tamas,G., and Lambolez,B. (2009). Glutamatergic nonpyramidal neurons from neocortical layer VI and their comparison with pyramidal and spiny stellate neurons. *J. Neurophysiol.* 101, 641-654.

Attwell,D., Buchan,A.M., Charpak,S., Lauritzen,M., MacVicar,B.A., and Newman,E.A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232-243.

Bishai,I., and Coceani,F. (1992). Eicosanoid formation in the rat cerebral cortex. Contribution of neurons and glia. *Mol. Chem. Neuropathol.* 17, 219-238.

Boie,Y., Stocco,R., Sawyer,N., Slipetz,D.M., Ungrin,M.D., Neuschafer-Rube,F., Puschel,G.P., Metters,K.M., and Abramovitz,M. (1997). Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 340, 227-241.

Breder,C.D., Dewitt,D., and Kraig,R.P. (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J. Comp Neurol.* 355, 296-315.

Breder,C.D., Smith,W.L., Raz,A., Masferrer,J., Seibert,K., Needleman,P., and Saper,C.B. (1992). Distribution and characterization of cyclooxygenase immunoreactivity in the ovine brain. *J. Comp Neurol.* 322, 409-438.

Briers,J.D. (2001). Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas.* 22, R35-R66.

Buzsaki,G., Kaila,K., and Raichle,M. (2007). Inhibition and brain work. *Neuron* 56, 771-783.

Cahoy,J.D., Emery,B., Kaushal,A., Foo,L.C., Zamanian,J.L., Christopherson,K.S., Xing,Y., Lubischer,J.L., Krieg,P.A., Krupenko,S.A., Thompson,W.J., and Barres,B.A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28, 264-278.

Calcinaghi,N., Jolivet,R., Wyss,M.T., Ametamey,S.M., Gasparini,F., Buck,A., and Weber,B. (2011). Metabotropic glutamate receptor mGluR5 is not involved in the early hemodynamic response. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 31, e1-10.

Cauli,B., Audinat,E., Lambolez,B., Angulo,M.C., Ropert,N., Tsuzuki,K., Hestrin,S., and Rossier,J. (1997). Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J. Neurosci.* 17, 3894-3906.

Cauli,B., and Hamel,E. (2010). Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenergetics.* 2, 9.

Cauli,B., Tong,X.K., Rancillac,A., Serluca,N., Lambolez,B., Rossier,J., and Hamel,E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J. Neurosci.* 24, 8940-8949.

- Chaudhry,U., Zhuang,H., and Dore,S. (2010). Microsomal prostaglandin E synthase-2: cellular distribution and expression in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* 223, 359-365.
- Chaudhry,U.A., and Dore,S. (2009). Cytosolic prostaglandin E synthase: expression patterns in control and Alzheimer's disease brains. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* 24, 46-51.
- Cheng,H., and Duong,T.Q. (2007). Simplified laser-speckle-imaging analysis method and its application to retinal blood flow imaging. *Opt. Lett.* 32, 2188-2190.
- Choi,S.H., Aid,S., and Bosetti,F. (2009). The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 174-181.
- Cui,Y., Kataoka,Y., Inui,T., Mochizuki,T., Onoe,H., Matsumura,K., Urade,Y., Yamada,H., and Watanabe,Y. (2008). Up-regulated neuronal COX-2 expression after cortical spreading depression is involved in non-REM sleep induction in rats. *J. Neurosci. Res.* 86, 929-936.
- Dabertrand,F., Hannah,R.M., Pearson,J.M., Hill-Eubanks,D.C., Brayden,J.E., and Nelson,M.T. (2013). Prostaglandin E(2), a postulated astrocyte-derived neurovascular coupling agent, constricts rather than dilates parenchymal arterioles. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 33, 479-482.
- Davis,R.J., Murdoch,C.E., Ali,M., Purbrick,S., Ravid,R., Baxter,G.S., Tilford,N., Sheldrick,R.L., Clark,K.L., and Coleman,R.A. (2004). EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br. J. Pharmacol.* 141, 580-585.
- de Oliveira,A.C., Candelario-Jalil,E., Bhatia,H.S., Lieb,K., Hull,M., and Fiebich,B.L. (2008). Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. *Glia* 56, 844-855.
- Desai,S., April,H., Nwaneshiudu,C., and Ashby,B. (2000). Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol. Pharmacol.* 58, 1279-1286.
- Fergus,A., and Lee,K.S. (1997). Regulation of cerebral microvessels by glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 754, 35-45.
- Fisher,R.A., and Yates,F. (1963). *Statistical tables for biological, agricultural and medical research* (Edinburgh: Oliver & Boyd).
- Font-Nieves,M., Sans-Fons,M.G., Gorina,R., Bonfill-Teixidor,E., Salas-Perdomo,A., Marquez-Kisinousky,L., Santalucia,T., and Planas,A.M. (2012). Induction of COX-2 Enzyme and Down-regulation of COX-1 Expression by Lipopolysaccharide (LPS) Control Prostaglandin E2 Production in Astrocytes. *J. Biol. Chem.* 287, 6454-6468.
- Funk,C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294, 1871-1875.
- Gordon,G.R., Choi,H.B., Rungta,R.L., Ellis-Davies,G.C., and MacVicar,B.A. (2008). Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456, 745-749.

- Gorski, J.A., Talley, T., Qiu, M., Puelles, L., Rubenstein, J.L., and Jones, K.R. (2002). Cortical excitatory neurons and glia, but not GABAergic neurons, are produced in the Emx1-expressing lineage. *J. Neurosci.* 22, 6309-6314.
- Gsell, W., Burke, M., Wiedermann, D., Bonvento, G., Silva, A.C., Dauphin, F., Buhle, C., Hoehn, M., and Schwindt, W. (2006). Differential effects of NMDA and AMPA glutamate receptors on functional magnetic resonance imaging signals and evoked neuronal activity during forepaw stimulation of the rat. *J. Neurosci.* 26, 8409-8416.
- Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., O'Farrell, F.M., Buchan, A.M., Lauritzen, M., and Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55-60.
- Hetu, P.O., and Riendeau, D. (2005). Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. *Biochem. J.* 391, 561-566.
- Hoozemans, J.J., Rozemuller, A.J., Janssen, I., De Groot, C.J., Veerhuis, R., and Eikelenboom, P. (2001). Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol.* 101, 2-8.
- Houades, V., Koulakoff, A., Ezan, P., Seif, I., and Giaume, C. (2008). Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J. Neurosci.* 28, 5207-5217.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 347-360.
- Ikeda-Matsuo, Y., Ota, A., Fukada, T., Uematsu, S., Akira, S., and Sasaki, Y. (2006). Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 11790-11795.
- Ji, L., Zhou, J., Zafar, R., Kantorovich, S., Jiang, R., Carney, P.R., and Jiang, H. (2012). Cortical neurovascular coupling driven by stimulation of channelrhodopsin-2. *PLoS. ONE.* 7, e46607.
- Karagiannis, A., Gallopin, T., David, C., Battaglia, D., Geoffroy, H., Rossier, J., Hillman, E.M., Staiger, J.F., and Cauli, B. (2009). Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J. Neurosci.* 29, 3642-3659.
- Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Pegg, J., Bremer, M., and Isakson, P. (1996). COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2317-2321.
- Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crepel, F., and Rossier, J. (1992). AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9, 247-258.
- Lauritzen, M. (2005). Reading vascular changes in brain imaging: is dendritic calcium the key? *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 77-85.
- Lazarewicz, J.W., and Salinska, E. (1995). N-methyl-D-aspartate-evoked release of cyclo-oxygenase products in rabbit hippocampus: an in vivo microdialysis study. *J. Neurosci. Res.* 40, 660-666.

- Lecrux,C., Toussay,X., Kocharyan,A., Fernandes,P., Neupane,S., Levesque,M., Plaisier,F., Shmuel,A., Cauli,B., and Hamel,E. (2011). Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J. Neurosci.* 31, 9836-9847.
- Lee,J.H., Durand,R., Gradinaru,V., Zhang,F., Goshen,I., Kim,D.S., Fenno,L.E., Ramakrishnan,C., and Deisseroth,K. (2010a). Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature* 465, 788-792.
- Lee,S., Hjerling-Leffler,J., Zaghera,E., Fishell,G., and Rudy,B. (2010b). The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J. Neurosci.* 30, 16796-16808.
- Li,S.R., Wu,K.K., Anggard,E., and Ferns,G. (1993). Localization of prostaglandin G/H synthase gene expression in rat brain by in situ hybridization. *Biol. Signals* 2, 77-83.
- Lindauer,U., Megow,D., Matsuda,H., and Dirnagl,U. (1999). Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am. J. Physiol* 277, H799-H811.
- Liu,X., Li,C., Falck,J.R., Harder,D.R., and Koehler,R.C. (2012). Relative contribution of cyclooxygenases, epoxyeicosatrienoic acids, and pH to the cerebral blood flow response to vibrissal stimulation. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 302, H1075-H1085.
- Madisen,L., Mao,T., Koch,H., Zhuo,J.M., Berenyi,A., Fujisawa,S., Hsu,Y.W., Garcia,A.J., III, Gu,X., Zanella,S., Kidney,J., Gu,H., Mao,Y., Hooks,B.M., Boyden,E.S., Buzsaki,G., Ramirez,J.M., Jones,A.R., Svoboda,K., Han,X., Turner,E.E., and Zeng,H. (2012). A toolbox of Cre-dependent optogenetic transgenic mice for light-induced activation and silencing. *Nat. Neurosci.* 15, 793-802.
- Mancini,J.A., Blood,K., Guay,J., Gordon,R., Claveau,D., Chan,C.C., and Riendeau,D. (2001). Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J. Biol. Chem.* 276, 4469-4475.
- McCaslin,A.F., Chen,B.R., Radosevich,A.J., Cauli,B., and Hillman,E.M. (2011). In vivo 3D morphology of astrocyte-vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 31, 795-806.
- Mehl,M., Bidmon,H.J., Hilbig,H., Zilles,K., Dringen,R., and Ullrich,V. (1999). Prostacyclin synthase is localized in rat, bovine and human neuronal brain cells. *Neurosci. Lett.* 271, 187-190.
- Myren,M., Baun,M., Ploug,K.B., Jansen-Olesen,I., Olesen,J., and Gupta,S. (2010). Functional and molecular characterization of prostaglandin E2 dilatory receptors in the rat craniovascular system in relevance to migraine. *Cephalalgia* 30, 1110-1122.
- Myren,M., Olesen,J., and Gupta,S. (2011). Pharmacological and expression profile of the prostaglandin I(2) receptor in the rat craniovascular system. *Vascul. Pharmacol.* 55, 50-58.

- Nimmerjahn,A., Kirchhoff,F., Kerr, and Helmchen,F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nature Methods* 1, 31-37.
- Niwa,K., Araki,E., Morham,S.G., Ross,M.E., and Iadecola,C. (2000). Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J. Neurosci.* 20, 763-770.
- Niwa,K., Haensel,C., Ross,M.E., and Iadecola,C. (2001). Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ. Res.* 88, 600-608.
- Nizar,K., Uhlirova,H., Tian,P., Saisan,P.A., Cheng,Q., Reznichenko,L., Weldy,K.L., Steed,T.C., Sridhar,V.B., Macdonald,C.L., Cui,J., Gratiy,S.L., Sakadzic,S., Boas,D.A., Beka,T.I., Einevoll,G.T., Chen,J., Masliah,E., Dale,A.M., Silva,G.A., and Devor,A. (2013). In vivo Stimulus-Induced Vasodilation Occurs without IP3 Receptor Activation and May Precede Astrocytic Calcium Increase. *J. Neurosci.* 33, 8411-8422.
- Pepicelli,O., Fedele,E., Berardi,M., Raiteri,M., Levi,G., Greco,A., jmone-Cat,M.A., and Minghetti,L. (2005). Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 93, 1561-1567.
- Ruan,C.H., So,S.P., and Ruan,K.H. (2011). Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease. *Life Sci.* 88, 24-30.
- Sagher,O., Zhang,X.Q., Szeto,W., Thai,Q.A., Jin,Y., Kassell,N.F., and Lee,K.S. (1993). Live computerized videomicroscopy of cerebral microvessels in brain slices. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 13, 676-682.
- Salvemini,D., Misko,T.P., Masferrer,J.L., Seibert,K., Currie,M.G., and Needleman,P. (1993). Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7240-7244.
- Sang,N., Zhang,J., Marcheselli,V., Bazan,N.G., and Chen,C. (2005). Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. *J. Neurosci.* 25, 9858-9870.
- Scott,N.A., and Murphy,T.H. (2012). Hemodynamic Responses Evoked by Neuronal Stimulation via Channelrhodopsin-2 Can Be Independent of Intracortical Glutamatergic Synaptic Transmission. *PLoS. ONE.* 7, e29859.
- Siegle,I., Klein,T., Zou,M.H., Fritz,P., and Komhoff,M. (2000). Distribution and cellular localization of prostacyclin synthase in human brain. *J. Histochem. Cytochem.* 48, 631-641.
- Stark,D.T., and Bazan,N.G. (2011). Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Differentially Modulate Neuronal Cyclooxygenase-2 Function, Lipid Peroxidation, and Neuroprotection. *J. Neurosci.* 31, 13710-13721.
- Sun,W., McConnell,E., Pare,J.F., Xu,Q., Chen,M., Peng,W., Lovatt,D., Han,X., Smith,Y., and Nedergaard,M. (2013). Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339, 197-200.

- Takano,T., Tian,G.F., Peng,W., Lou,N., Libionka,W., Han,X., and Nedergaard,M. (2006). Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat. Neurosci.* 9, 260-267.
- Tamamaki,N., Yanagawa,Y., Tomioka,R., Miyazaki,J., Obata,K., and Kaneko,T. (2003). Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp Neurol.* 467, 60-79.
- Tanaka,S., Nakamura,T., Sumitani,K., Takahashi,F., Konishi,R., Itano,T., and Miyamoto,O. (2009). Stage- and region-specific cyclooxygenase expression and effects of a selective COX-1 inhibitor in the mouse amygdala kindling model. *Neurosci. Res.* 65, 79-87.
- Tang,E.H., Jensen,B.L., Skott,O., Leung,G.P., Feletou,M., Man,R.Y., and Vanhoutte,P.M. (2008). The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E2 in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 78, 130-138.
- Tang,E.H., and Vanhoutte,P.M. (2008). Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics* 32, 409-418.
- Vazquez-Tello,A., Fan,L., Hou,X., Joyal,J.S., Mancini,J.A., Quiniou,C., Clyman,R.I., Gobeil,F., Jr., Varma,D.R., and Chemtob,S. (2004). Intracellular-specific colocalization of prostaglandin E2 synthases and cyclooxygenases in the brain. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 287, R1155-R1163.
- Wang,H., Hitron,I.M., Iadecola,C., and Pickel,V.M. (2005). Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. *Cereb. Cortex* 15, 1250-1260.
- Wilhelmsson,U., Bushong,E.A., Price,D.L., Smarr,B.L., Phung,V., Terada,M., Ellisman,M.H., and Pekny,M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 17513-17518.
- Woodward,D.F., Jones,R.L., and Narumiya,S. (2011). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol. Rev.* 63, 471-538.
- Xie,Y., Chen,S., Anenberg,E., and Murphy,T.H. (2013). Resistance of optogenetically evoked motor function to global ischemia and reperfusion in mouse in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 33, 1148-1152.
- Yamagata,K., Andreasson,K.I., Kaufmann,W.E., Barnes,C.A., and Worley,P.F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11, 371-386.
- Yamagata,K., Matsumura,K., Inoue,W., Shiraki,T., Suzuki,K., Yasuda,S., Sugiura,H., Cao,C., Watanabe,Y., and Kobayashi,S. (2001). Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. *J. Neurosci.* 21, 2669-2677.

Yermakova,A.V., Rollins,J., Callahan,L.M., Rogers,J., and O'Banion,M.K. (1999). Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1135-1146.

Zhou,M., Schools,G.P., and Kimelberg,H.K. (2006). Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *J. Neurophysiol.* 95, 134-143.

Zonta,M., Angulo,M.C., Gobbo,S., Rosengarten,B., Hossmann,K.A., Pozzan,T., and Carmignoto,G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* 6, 43-50.

FIGURE LEGENDS

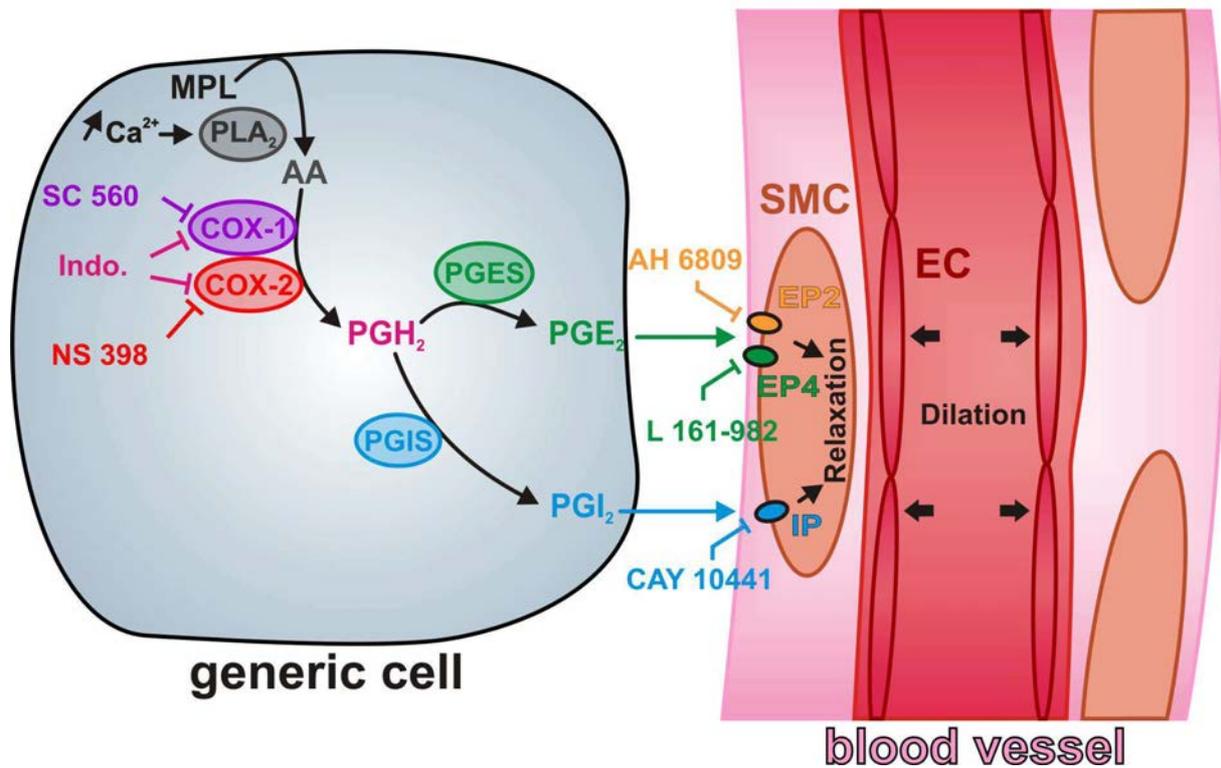


Figure 1. Biosynthesis and vasodilatory effects of P_gE₂ and P_gI₂

Increased intracellular calcium activates phospholipase A₂ (PLA₂). Arachidonic acid (AA) is released from membrane phospholipids (MPL) by PLA₂ and metabolized by COX-1 or COX-2 to produce the intermediary prostaglandin H₂ (P_gH₂). P_gE₂ and P_gI₂ are respectively synthesized from P_gH₂ by PGES and PGIS. Upon binding and action on type 2 or 4 P_gE₂ (EP2/4) or P_gI₂ (IP) receptors these two prostanoids relax smooth muscle cells (SMC) and dilate blood vessels. EC: endothelial cells. SC 560 and NS 398 are selective COX-1 and COX-2 inhibitors respectively. Indomethacin (Indo.) is a non-selective COX-1/2 inhibitor. AH 6809, L161-982 and CAY 10441 are EP2, EP4 and IP antagonists respectively.

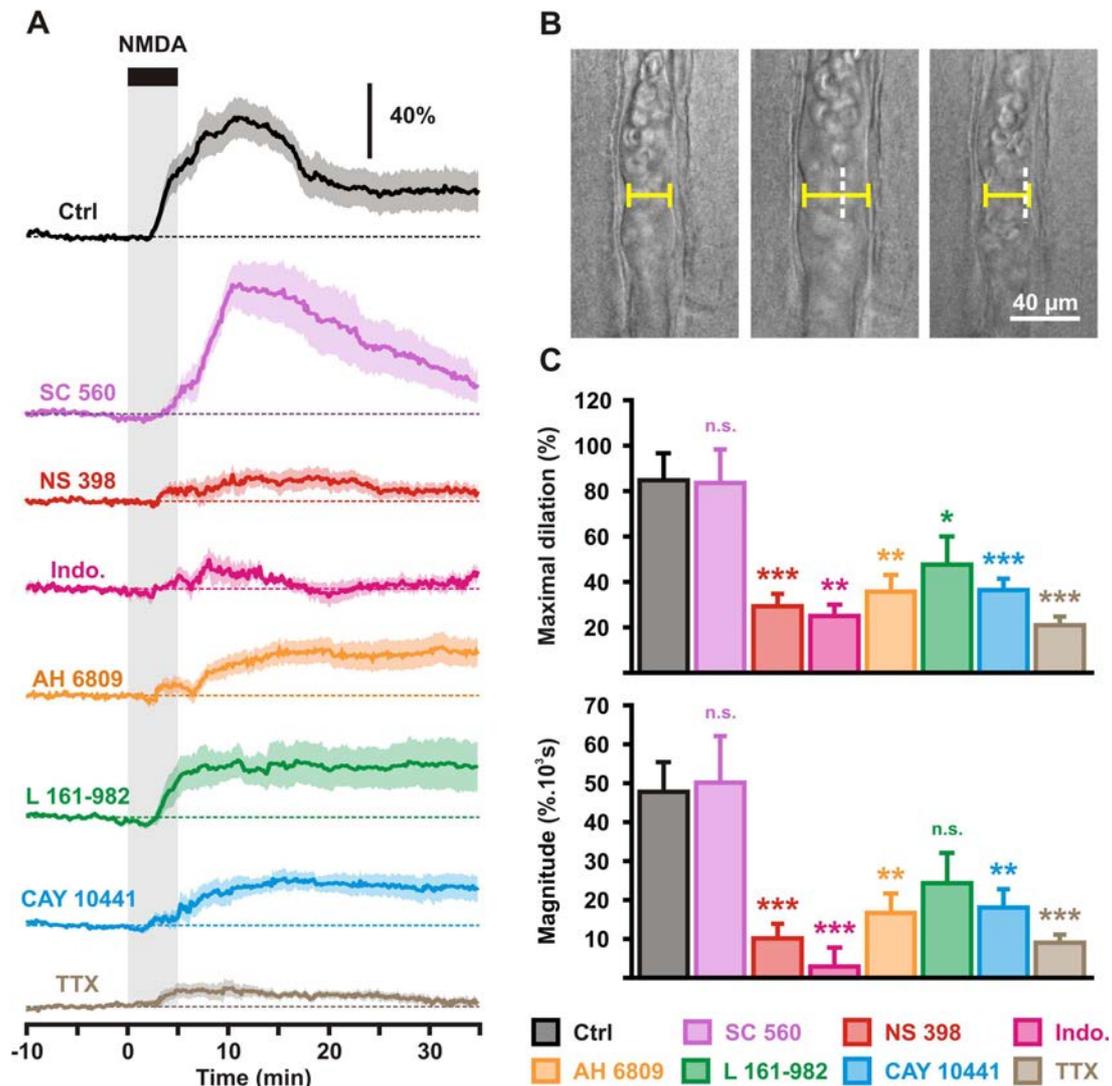


Figure 2. Characterization of NMDA-induced vasodilations

(A) Mean diameter changes induced by 5 min bath applications of NMDA (30 μ M; black bar and vertical grey zone). The SEM envelopes the mean traces. The horizontal dashed lines represent the initial diameters. The vertical scale bar indicates the relative diameter changes. Under control conditions (Ctrl, black) NMDA induces partially reversible vasodilations. COX-1 inhibition by SC 560 (purple) did not alter the vascular response. Selective inhibition of COX-2 by NS 398 (red) and non-selective COX-1/2 inhibition by indomethacin (Indo., magenta) dramatically reduced the vascular responses. Antagonism of EP2, EP4 and IP receptors respectively by AH 6809 (orange), L 161-982 (green) and CAY 10441 (blue) reduced the vascular responses. Blockade of action potentials by tetrodotoxin (TTX, brown) dramatically reduced the vascular responses. (B) Representative example showing infrared images of a precontracted diving arteriole that reversibly dilated to NMDA application. Pial surface is upward. White dashed vertical lines indicate the initial position of the vessel wall. (C) Histograms summarizing the effects of COX-1/2 inhibition, EP2 EP4 and IP receptors antagonism and action potentials blockade on maximal amplitude (upper histograms) and magnitude (lower histograms) of NMDA-induced vasodilations. Histograms are color coded as in (A). *, ** and *** statistically significant with $p < 0.05$; 0.01 and 0.001 respectively n.s., not statistically significant.

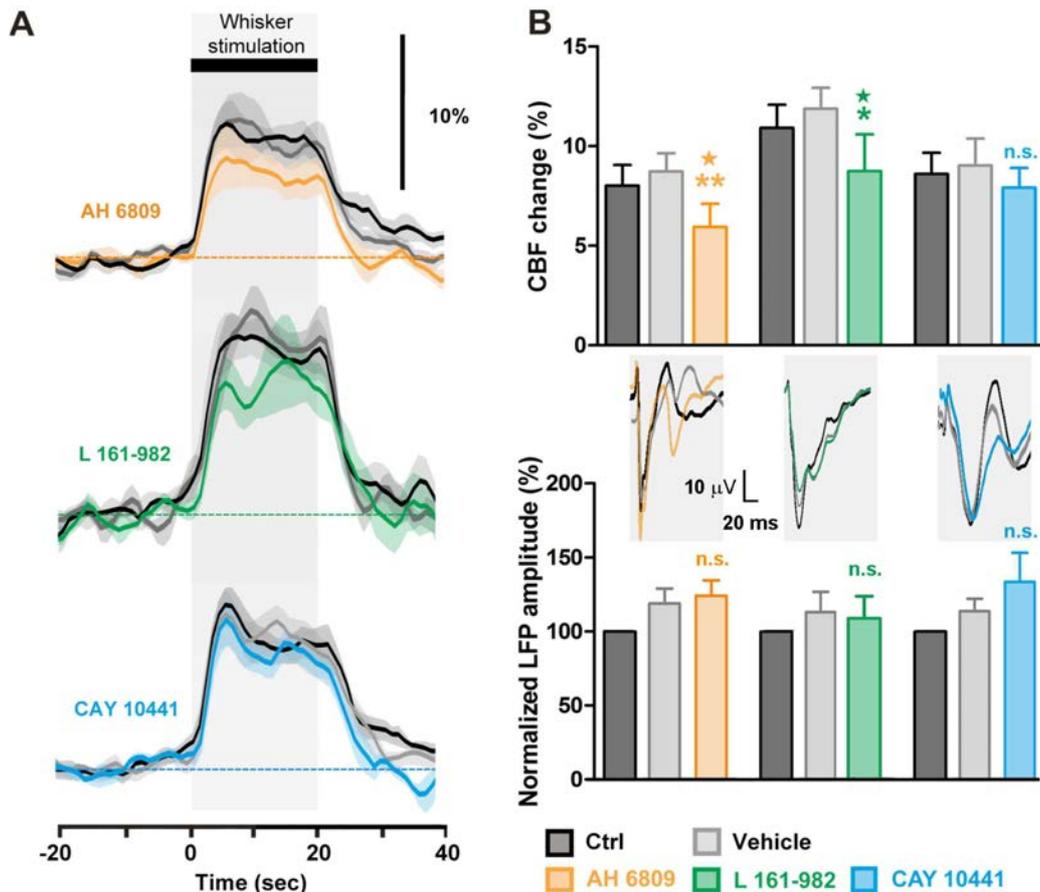


Figure 3. Effects of EP2, 4 and IP receptors blockade on the NVC response to sensory stimulation

(A) Whisker stimulation (grey zone, top black bar) induced increases in CBF in the contralateral barrel cortex under control conditions (Ctrl, black lines). The evoked response was not altered by vehicle (grey line) whereas the EP1/EP2 receptor antagonist AH 6809 (1 μ M, orange) and EP4 receptor antagonist L 161-982 (100 μ M), but not the IP receptor antagonist CAY 10441 (100 μ M, blue), significantly decreased this response. Drug vehicles had no effect on the evoked CBF response, and only CAY 10441 and its vehicle slightly, but significantly, affected baseline blood flow (data not shown). The SEM envelopes the mean traces. (B) Histograms of the whisker-evoked changes in CBF (top panel) and in LFPs (bottom panel) by AH 6809 (n=6 and 4, respectively), L 161-982 (n=4) or CAY 10441 (n=5 and 3). Whisker stimulation induced increases in the amplitude of the LFPs in the contralateral barrel cortex as shown by the representative tracings for each compound (middle panel in B), with minimal changes being observed on the ipsilateral cortex (not shown). Contralateral LFP amplitude under Ctrl conditions was normalized at 100% in each rat for comparison. *, $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ when compared to vehicle conditions, \square : $p < 0.05$ when compared to Ctrl conditions, n.s., not statistically significant.

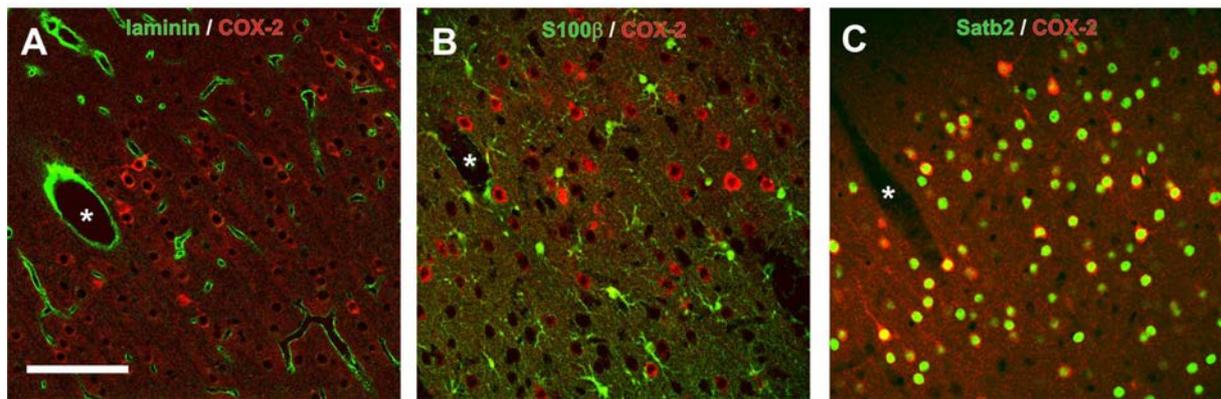


Figure 4. Expression of COX-2 in the neurovascular unit

Double immunofluorescence showing the constitutive expression of COX-2 (red). scale bar: 100 μm . * denote diving blood vessels. (A) COX-2 immunolabelling is absent from the vascular bed immunostained for laminin (green). (B) S100 β immunostained astrocytes (green) are COX-2 negative. (C) COX-2 immunopositive cells are also Satb2 positive (green).

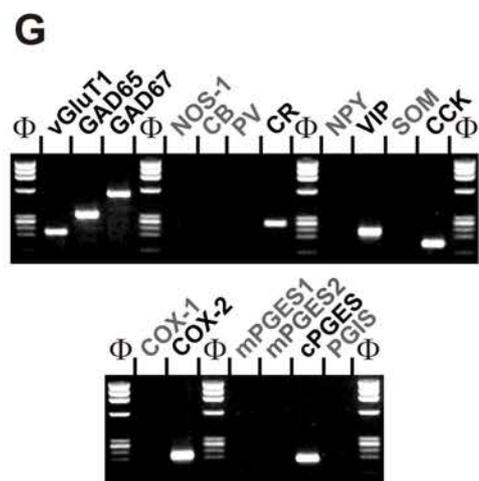
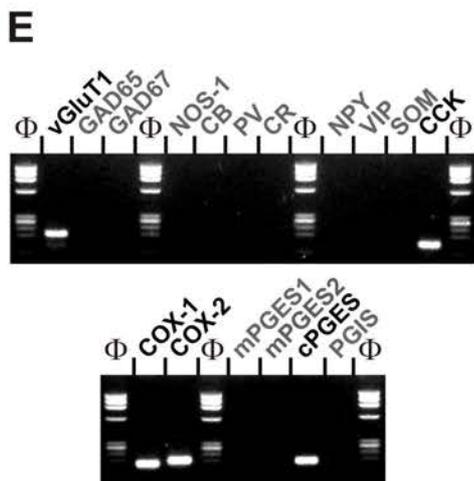
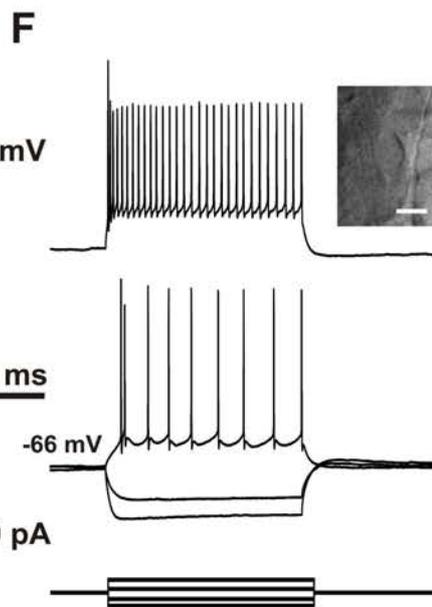
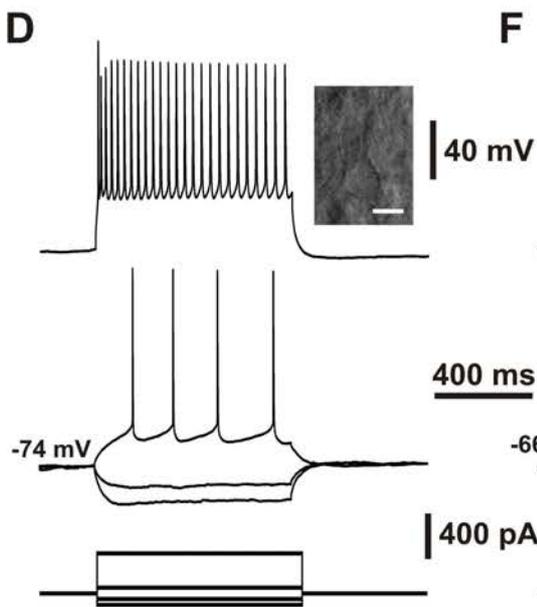
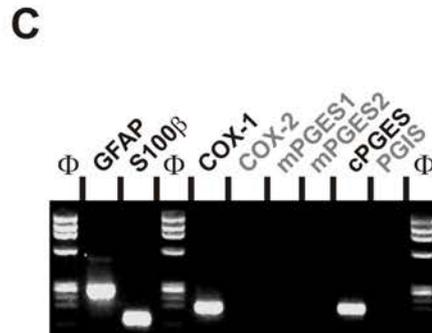
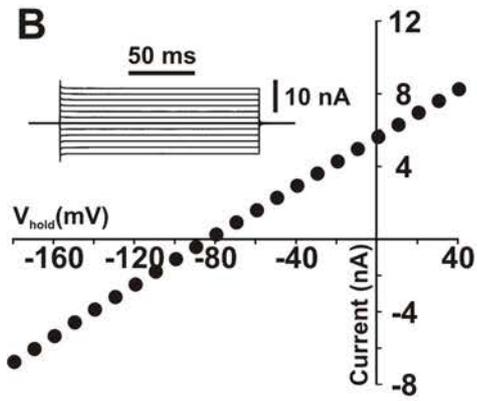
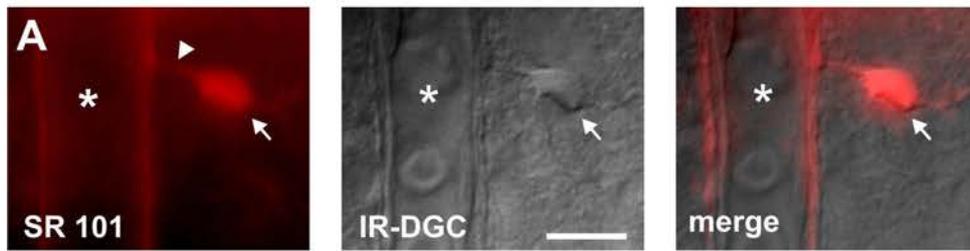


Figure 5. Characterization of prostanoid producing cells

Vital staining of a perivascular astrocyte with SR101. Wide-field fluorescence image of the SR101-labeled cortical astrocyte (left panel) showing an intensely labeled cell body (arrow) sending a process (arrowhead) onto a diving arteriole (*). Corresponding field of view observed under IR-DGC illumination (middle panel) and superimposition of the two images (right panel). Pial surface is upward; scale bar 10 μm . (B) Electrophysiological characterization in voltage clamp mode of the astrocyte shown in (A). Note the linear I/V curve, the low input resistance (slope) and the hyperpolarized resting membrane potential (0 nA intercept) characteristic of passive astrocytes. The inset illustrates representative current responses evoked by voltage steps (from -180 mV to 40 mV, 20 mV increments) used to determine the I/V curve at steady state. (C) RT-mPCR analysis of the same astrocyte (A and B) revealing expression of GFAP, S100 β , COX-1 and cPGES. (D) Voltage responses induced by injection of current pulses (bottom traces). Inset: IR-DGC image of the recorded layer II-III pyramidal cell, pial surface is upward (scale bar, 10 μm). In response to just-above-threshold current pulse, this neuron fired action potentials with a long lasting biphasic AHP and little frequency adaptation (middle trace). Near saturation it showed the typical firing of a regular spiking neuron with marked frequency adaptation and spike amplitude accommodation (upper trace). (E) The pyramidal cell shown in (D) expressed vGluT1, CCK, COX-1, COX-2 and cPGES. (F) Voltage responses induced by injection of current pulses (bottom traces). Inset: IR-DGC image of the recorded radially oriented fusiform interneuron, pial surface is upward (scale bar, 10 μm). Note the high input resistance of the cell observed at hyperpolarizing current pulses (middle traces). In response to just-above-threshold current pulse, this interneuron fired a first action potential with a monophasic AHP followed by action potentials with complex AHP. Near saturation this neuron showed the firing of an adapting-VIP interneuron with marked frequency adaptation and spike amplitude accommodation (upper trace). (G) This interneuron expressed vGluT1, GAD65, GAD67, CR, VIP, CCK, COX-2, and cPGES.

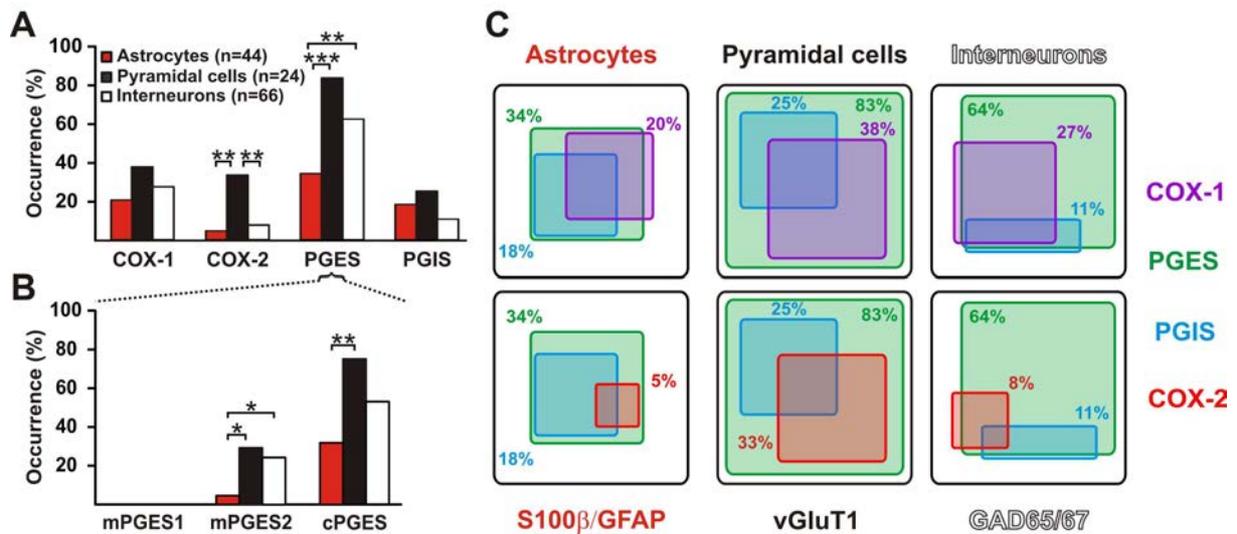


Figure 6. Expression profiles of the PGE₂ and PgI₂ synthesizing enzymes.

(A) PGES denotes expression of mPGES1,2 and/or cPGES. Cortical pyramidal neurons of layers II-III express much more frequently COX-2, than perivascular astrocytes and interneurons. (B) Expression profiles of the three PGES isoforms. mPGES1 is not detected in any cell types. mPGES2 is more frequently observed in pyramidal neurons than in astrocytes. cPGES is detected in the three cell types. *, ** and *** statistically significant with $p < 0.05$, < 0.01 and < 0.001 respectively. (C) The occurrence of cells positive for an enzyme is proportional to the size of the box in a given cell type. Co-expression of PGES (green) and PGIS (blue) with COX-1 (upper panels, purple) and with COX-2 (lower panels, red) in astrocytes (S100 β and/or GFAP positive, left panels), pyramidal cells (vGluT1 positive, middle panels) and interneurons (GAD65 and/or 67 positive, right panels).

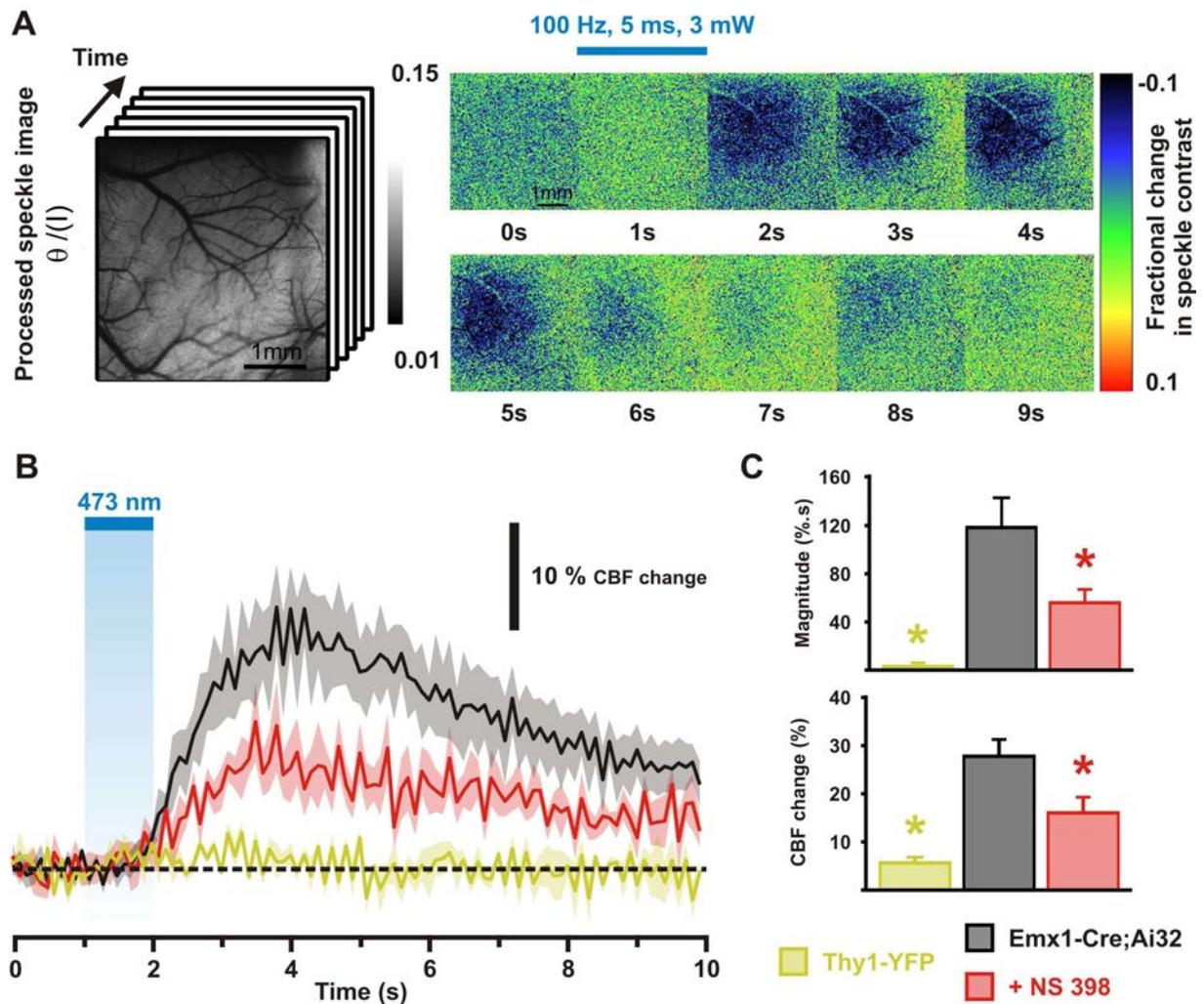


Figure 7. Optogenetic stimulations of pyramidal cells evoke COX-2 dependent hyperemic responses

(A) Variance filtered speckle contrast image. Darker tones represent higher velocity blood flow. Montage of fractional change in speckle contrast images from cortical optogenetic stimulation of an Emx1-Cre;Ai32 mouse. (B) Optogenetically evoked increases in blood flow, the scaled inverse square of speckle contrast, before (black trace) and after application of NS 398 (red trace, n=5). Blue light excitation (473 nm) in Thy1-YFP mice (yellow, n=4) does not evoke increase in blood flow. The SEM envelopes the mean traces. (C) Histograms summarizing the effects of photostimulation on magnitude (upper histograms) and maximal changes (lower histograms) of blood flow in Thy1-YFP and Emx1-Cre;Ai32 mice before and after NS 398 application. * Statistically different from Emx1-Cre;Ai32 mice baseline with $p < 0.05$.

B. Article II : Influence du lactate et des canaux K_{ATP} sur l'activité neuronale

Dans cet article, une approche électrophysiologique, moléculaire, pharmacologique et génétique a permis d'étudier la distribution des canaux K_{ATP} dans les neurones corticaux et leur influence sur l'excitabilité neuronale. L'implication de ces canaux dans un mécanisme de sensibilité au lactate des neurones corticaux a aussi été étudiée. J'ai pris part à ces travaux avec une étude complémentaire visant à déterminer l'utilisation du lactate comme substrat énergétique neuronal. Pour ce faire, j'ai utilisé les propriétés intrinsèques d'autofluorescence du couple $NAD^+/NADH+H^+$ ainsi qu'un biosenseur FRET sensible à l'ATP.

I. L'apport énergétique est essentiel pour les neurones

Un apport énergétique minimal et constant reste vital pour maintenir l'homéostasie du tissu cérébral. Une étroite communication entre les différents acteurs cellulaires contrôlant cet apport est indispensable. Les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins assurent, bien qu'indirectement, l'approvisionnement en dioxygène et en glucose. Les astrocytes, partie intégrante de la barrière hémato-encéphalique (Kacem et al., 1998; Iadecola and Nedergaard, 2007), jouent très probablement un rôle d'intermédiaire métabolique en reliant l'activité neuronale et l'apport énergétique (Pellerin and Magistretti, 2012; Rouach et al., 2008). Enfin, les neurones représentent des consommateurs d'énergie importants de par leur activité importante lors de processus neuronaux.

Dans le cortex, la relation entre l'apport énergétique et l'activité neuronale a principalement été considérée sous un aspect centré sur les neurones. Ceux-ci vont contrôler, de façon directe ou indirecte, l'afflux sanguin par les différents messagers vasoactifs qu'ils expriment. Cependant, l'activité glycolytique et la production de lactate par les astrocytes via la libération de glutamate (Voutsinos-Porche et al., 2003) et de K^+ (Bittner et al., 2011) durant l'activité synaptique peut aussi jouer un rôle dans cet approvisionnement énergétique. Dans ce point de vue orienté vers les neurones, les autres types cellulaires vont être au service de ces derniers pour répondre à leur demande énergétique.

Ce travail a montré une distribution ubiquitaire des canaux K_{ATP} dans tous les types neuronaux du cortex. La présence de ce canal leur confère une sensibilité métabolique. Les neurones corticaux sont donc des senseurs du niveau de lactate extracellulaire. Cela va moduler leur activité par le biais de la phosphorylation oxydative, la production d'ATP et la régulation des canaux K_{ATP} .

II. Le lactate comme substrat énergétique neuronal

Cette section présente un résumé d'une partie des travaux de thèse d'Anastassios Karagiannis. Elle présente aussi mon implication dans ce travail concernant l'étude sur l'utilisation du lactate par les neurones corticaux.

1. Les canaux K_{ATP} régulent l'activité neuronale

Afin de déterminer si les voies métaboliques du glucose influencent différemment l'activité électrique des neurones corticaux, une approche électrophysiologique par patch-clamp combinée à de la pharmacologie a permis de mettre en évidence la présence de canaux K_{ATP} dans les neurones corticaux. En effet, l'application de diazoxide⁹⁷ entraîne une hyperpolarisation des neurones, alors qu'en présence du tolbutamide⁹⁸, une dépolarisation des neurones est observée. La majorité des neurones corticaux, qu'ils soient glutamatergiques (83%) ou GABAergiques (84%), présente ce profil pharmacologique des canaux K_{ATP} .

Afin d'identifier les sous-unités régulatrices de ces canaux K_{ATP} , SUR1⁹⁹ ou SUR2A/B, deux activateurs agissant sur ces sous unités différentes ont été utilisés. Contrairement au diazoxide [(sélectif pour les sous-unités SUR1 et SUR2B (Moreau et al., 2005)], qui entraîne l'apparition de courants sortants, le pinacidil [sélectif pour les sous-unités SUR2A et SUR2B (Moreau et al., 2005)] n'a aucun effet. Ici encore, la très large majorité des neurones glutamatergiques (92%) et GABAergiques (93%) étudiés possédaient des canaux K_{ATP} fonctionnels. Le profil pharmacologique des réponses (activation des courants par le diazoxide mais pas par le pinacidil), en accord avec les données récentes de la littérature (Cao et al., 2009), suggère que SUR1 est la sous-unité régulatrice des canaux K_{ATP} des neurones corticaux.

⁹⁷ Diazoxide : Activateur large spectre des canaux K_{ATP}

⁹⁸ Tolbutamide : Bloquant des canaux K_{ATP}

⁹⁹ SUR : *SulfonylUrea Receptor* (Récepteur aux sulfonilurées)

Ces données pharmacologiques ont été confirmées par une approche combinée d'électrophysiologie par patch-clamp et de RT-PCR sur cellule unique. Les sous-unités K_{ir} 6.2 et SUR1 ont été détectées dans les neurones. La sous-unité SUR2A qui confère la sensibilité au pinacidil est absente des neurones. Il est également intéressant de noter que les sous-unités K_{ir} 6.2 et SUR1 sont détectées aussi bien dans les neurones glutamatergiques que dans les interneurones GABAergiques.

L'absence, à l'heure actuelle, d'agents pharmacologiques permettant de déterminer la présence des sous-unités K_{ir} 6.1 ou K_{ir} 6.2 des canaux K_{ATP} suggère l'utilisation d'une autre méthode. Afin de confirmer les données moléculaires de RT-PCR sur cellule unique montrant que K_{ir} 6.2 est la sous-unité la plus fréquemment observée, une approche génétique a été utilisée. Les courants sortants induits par une déplétion intracellulaire d'ATP ont été comparés entre une lignée de souris sauvage et une lignée de souris invalidée pour le gène K_{ir} 6.2 (K_{ir} 6.2^{-/-}). En utilisant un milieu intra pipette dépourvu d'ATP et riche en Na⁺ (20 mM), stimulant la pompe Na/K ATPase par la forte concentration de Na⁺ du milieu intra pipette (Liss et al., 2005), nous avons provoqué une hydrolyse rapide de l'ATP intracellulaire. Cette hydrolyse de l'ATP a induit l'apparition de courants sortants dans les neurones corticaux de rats et de souris sauvages. Sur des souris K_{ir} 6.2^{-/-}, cette apparition de courant sortant est absente. L'absence de courants potassiques sortants dans les neurones corticaux des souris K_{ir} 6.2^{-/-} confirme donc que les canaux K_{ATP} des neurones corticaux sont bien composés de la sous-unité K_{ir} 6.2.

Ces données suggèrent que, par l'intermédiaire d'une modulation des canaux K_{ATP} , les neurones corticaux sont susceptibles d'ajuster leur potentiel membranaire en fonction du rapport intracellulaire d'ATP/ADP. Ceci offre la possibilité de déterminer quels sont les substrats métaboliques préférentiels utilisés pour la synthèse d'ATP dans ces neurones.

2. Les neurones sont capables de métaboliser le glucose et le lactate

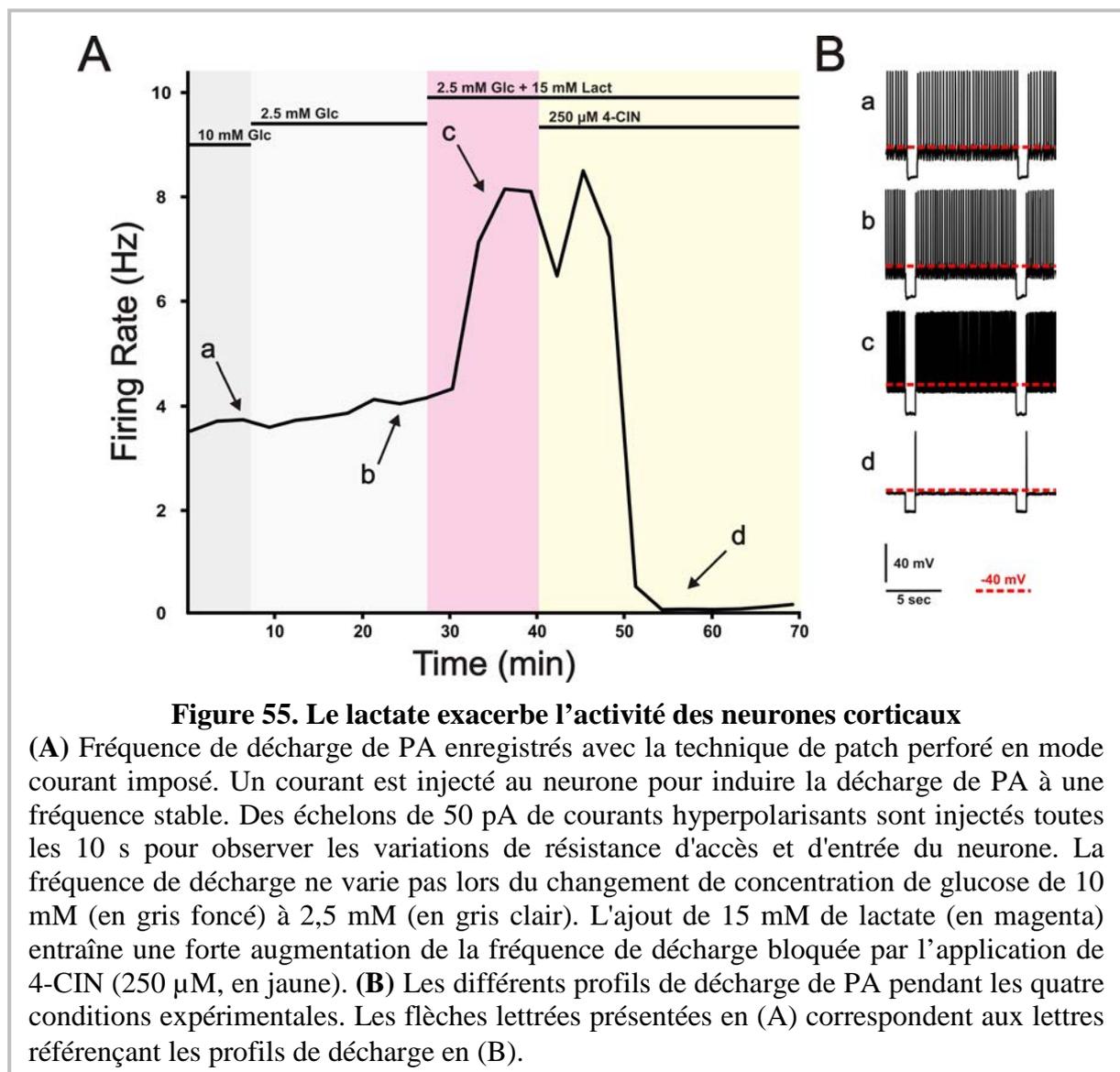
Une étude moléculaire visant à cribler l'expression de différents transporteurs du glucose a permis de confirmer que GluT3¹⁰⁰ est le transporteur majoritaire du glucose dans les neurones (Maher et al., 1992; Aller et al., 1997; McEwen and Reagan, 2004). De manière similaire, MCT 1 et 2 sont les principaux transporteurs neuronaux des monocarboxylates (Pierre and

¹⁰⁰ GluT3 : *Glucose Transporter 3*

Pellerin, 2005; Hashimoto et al., 2008). De plus, les sous-unités LDH_A et LDH_B¹⁰¹ ont également été retrouvées dans les neurones autant glutamatergiques que GABAergiques.

3. Les neurones ont une sensibilité plus élevée pour le lactate que pour le glucose

Afin de déterminer quels sont les substrats énergétiques préférentiellement utilisés par les neurones corticaux, les niveaux intracellulaires d'ATP ont été suivis en mesurant la modulation des canaux K_{ATP} par l'apport énergétique extracellulaire et le métabolisme. Pour préserver le métabolisme intracellulaire (Liss et al., 2005), l'enregistrement des neurones a été effectué dans la configuration patch perforé du patch-clamp (Horn and Marty, 1988).



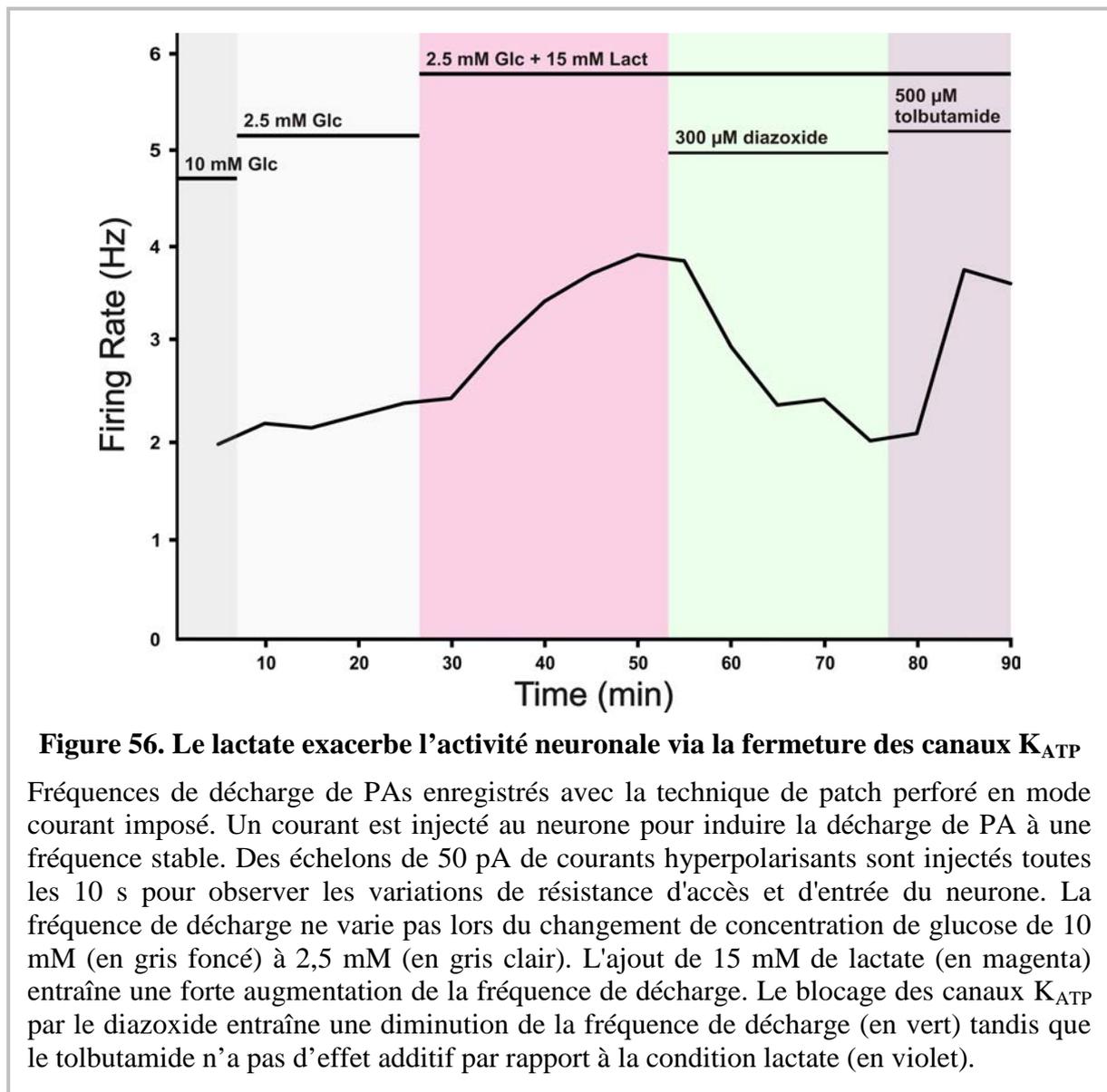
¹⁰¹ LDH : Lactate DesHydrogénase

De manière à mimer une activité neuronale, les neurones ont reçu une injection de courant dépolarisant de manière à induire un taux de décharge stable de PA (5.6 ± 1.1 Hz). La modulation des canaux K_{ATP} a été suivie en analysant le changement du taux de décharge de PA induit par une modification de l'environnement extracellulaire. Le passage de la condition 10 mM à 2,5 mM de glucose n'induit pas de changements significatifs des taux de décharge induits. En revanche, l'ajout de lactate (15 mM) au 2,5 mM de glucose, une condition isoénergétique aux 10 mM de glucose, double le taux de décharge de PA des neurones (**Figure 55 ; Figure 55Ba** par rapport à **Figure 55Bc**). Le blocage du transport facilité des monocarboxylates par le 4-CIN¹⁰² inhibe totalement l'effet du lactate et ramène le taux de décharge des neurones à un niveau inférieur à celui de la condition 10 mM de glucose seul (**Figure 55, Figure 55Ba** par rapport à **Figure 55Bd**), suggérant un rôle prépondérant de ces transporteurs dans l'apport énergétique.

Afin de démontrer l'implication des canaux K_{ATP} dans ce phénomène de sensibilité au lactate, des modulateurs pharmacologiques des canaux K_{ATP} ont été utilisés. En activant les canaux K_{ATP} avec le diazoxide, l'effet du lactate est totalement aboli (**Figure 56**). L'application du tolbutamide restaure le taux induit de décharge de PA observé en présence de lactate (**Figure 56**). Le fait qu'un blocage pharmacologique des canaux K_{ATP} par le tolbutamide n'ait pas d'effet dans la condition lactate 15 mM suggère que les canaux K_{ATP} sont déjà fermés.

Le mécanisme de sensibilité au lactate semble donc bien passer par une fermeture des canaux K_{ATP} . Pour confirmer ces résultats, la sensibilité au lactate des neurones corticaux de souris sauvages (souris $K_{ir} 6.2^{+/+}$) et celle des neurones de souris invalidées pour le gène $K_{ir} 6.2$ (souris $K_{ir} 6.2^{-/-}$) a été décryptée. L'absence de la sous unité $K_{ir} 6.2$ du canal K_{ATP} supprime la sensibilité au lactate chez les souris $K_{ir} 6.2^{-/-}$, confirmant ainsi l'implication des canaux K_{ATP} dans la sensibilité au lactate. Ces dernières expériences montrent donc que le suivi des changements d'activités neuronales par une modulation des canaux K_{ATP} induits par des modifications de l'environnement extracellulaire peut être utilisé pour déterminer le métabolisme énergétique des neurones.

¹⁰² 4-CIN : α -cyano-4-hydroxycinnamic acid

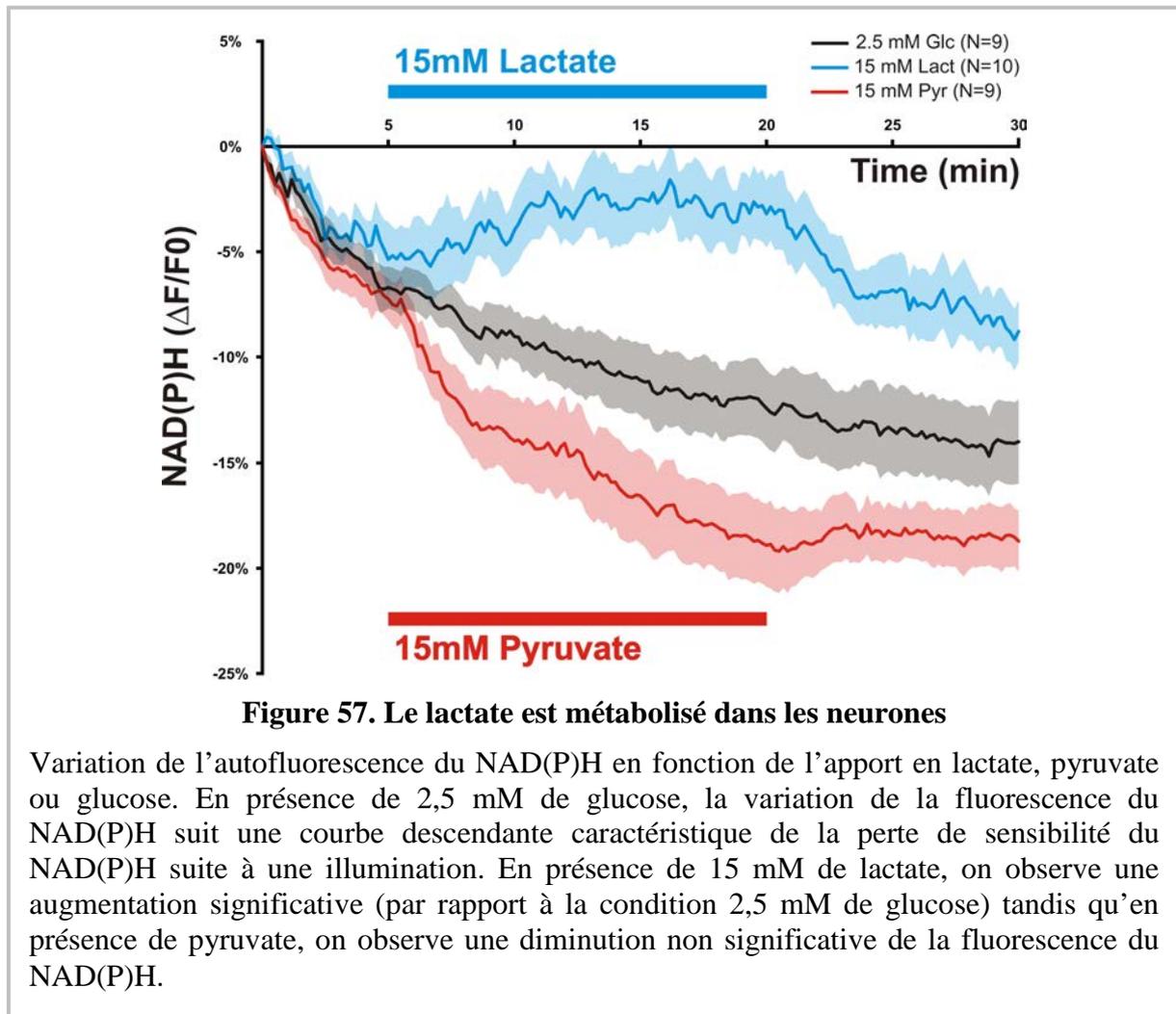


De plus, une augmentation du taux de décharge de PA lors de l'application de pyruvate (15 mM) est similaire à celle observée avec le lactate (15 mM). Ces résultats suggèrent que l'effet du lactate sur l'activité neuronale semble passer par sa conversion en pyruvate.

4. Les neurones ont une capacité de phosphorylation oxydative accrue

Afin de déterminer si les neurones sont capables de transformer le lactate en énergie, la conversion du lactate en pyruvate par les LDH a été disséquée. La conversion du lactate en pyruvate dans la cellule s'accompagne d'une réduction du NAD^+ en $NADH+H^+$ et la conversion du pyruvate en lactate s'accompagne donc d'une oxydation du $NADH+H^+$ en NAD^+ . En considérant les propriétés d'autofluorescence du couple $NADH/NAD^+$, il est

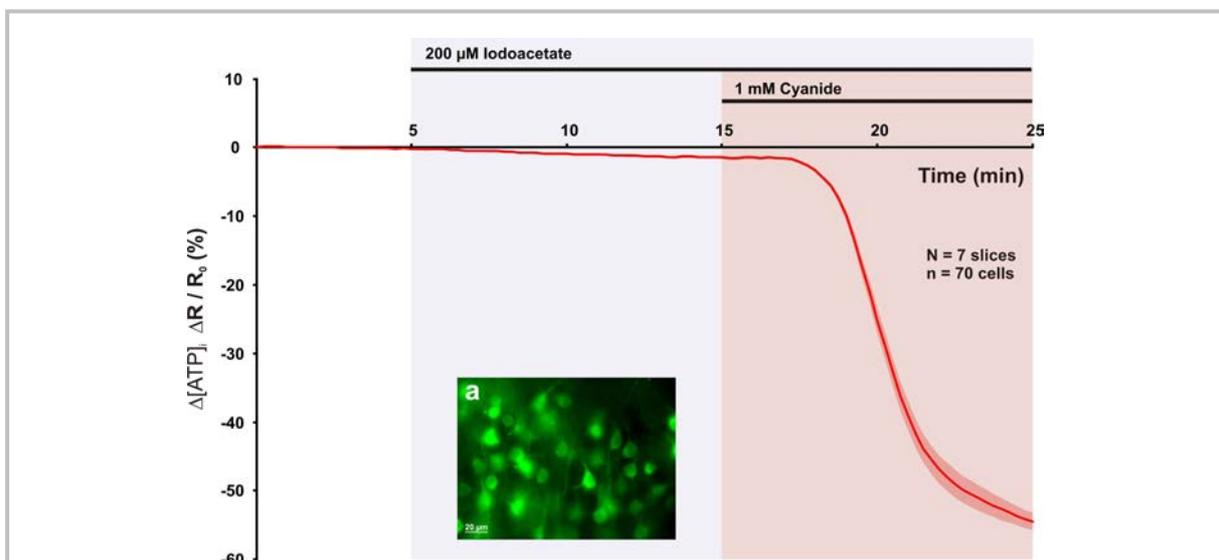
possible de suivre la conversion du lactate et du pyruvate dans la cellule. En effet, la mesure optique du couple NADH/NAD^+ est relativement simple puisque le NADH est fortement fluorescent alors que le NAD^+ n'est pas fluorescent (Chance et al., 1962). Le spectre d'excitation du NADH se situe entre 340 et 360 nm et son spectre d'émission se situe entre 430 et 450 nm. De ce fait, l'intensité d'autofluorescence récoltée est proportionnelle à la quantité de NADH dans la cellule.



L'application de cette technique nous a permis de montrer que le lactate était bien transporté du milieu extracellulaire vers l'intérieur des neurones. De plus, celui-ci est également métabolisé dans les neurones puisque la fluorescence du NADH augmente en présence de lactate (Figure 57). L'application de pyruvate diminue la fluorescence du NADH , montrant une conversion du pyruvate en lactate. Ces données suggèrent donc que les neurones possèdent les LDHs permettant l'interconversion du lactate en pyruvate.

Afin de déterminer la voie métabolique préférentielle utilisée par les neurones, une étude par biosenseur FRET a été réalisée. Un senseur ATP a été transduit dans des neurones pyramidaux pour visualiser par quelle voie métabolique ce dernier est métabolisé. Ce biosenseur FRET se base sur la paire CFP/YFP. En absence d'ATP, l'excitation de la CFP à 435 nm émet à une longueur d'onde maximale de 475 nm. La présence d'ATP induit un changement conformationnel de la sonde et donc un rapprochement de la CFP avec la YFP. Ce changement tridimensionnel permet un transfert d'énergie de la CFP à la YFP. En effet, l'énergie obtenue par l'excitation de la CFP à 435 nm va être transférée à la YFP. Cette dernière va alors émettre de la lumière à une longueur d'onde maximale de 527 nm. La variation du rapport d'intensité de fluorescence de la YFP sur la CFP va permettre de déterminer les variations de la concentration en ATP intracellulaire.

Sous 10 mM de glucose extracellulaire, l'application de iodoacétate, bloquant de la glycolyse, induit une très légère diminution de l'ATP intracellulaire. Cependant, en bloquant la phosphorylation oxydative par le cyanure, on observe une diminution de 50% du rapport FRET/CFP. Ces données d'imagerie cellulaire montrent donc que les neurones produisent leur ATP et donc leur énergie principalement par phosphorylation oxydative (**Figure 58**).



III. Les neurones tirent leur énergie principalement du lactate qui est transformé en ATP modulant leur activité par les canaux K_{ATP}

Ce travail a montré une distribution ubiquitaire des canaux K_{ATP} dans tous les types neuronaux du cortex. La présence de ceux-ci leur confère une sensibilité métabolique. Les neurones corticaux sont donc des senseurs du niveau de lactate extracellulaire qui va moduler leur activité par le biais de la phosphorylation oxydative, la production d'ATP et la fermeture des canaux K_{ATP} (Figure 59).

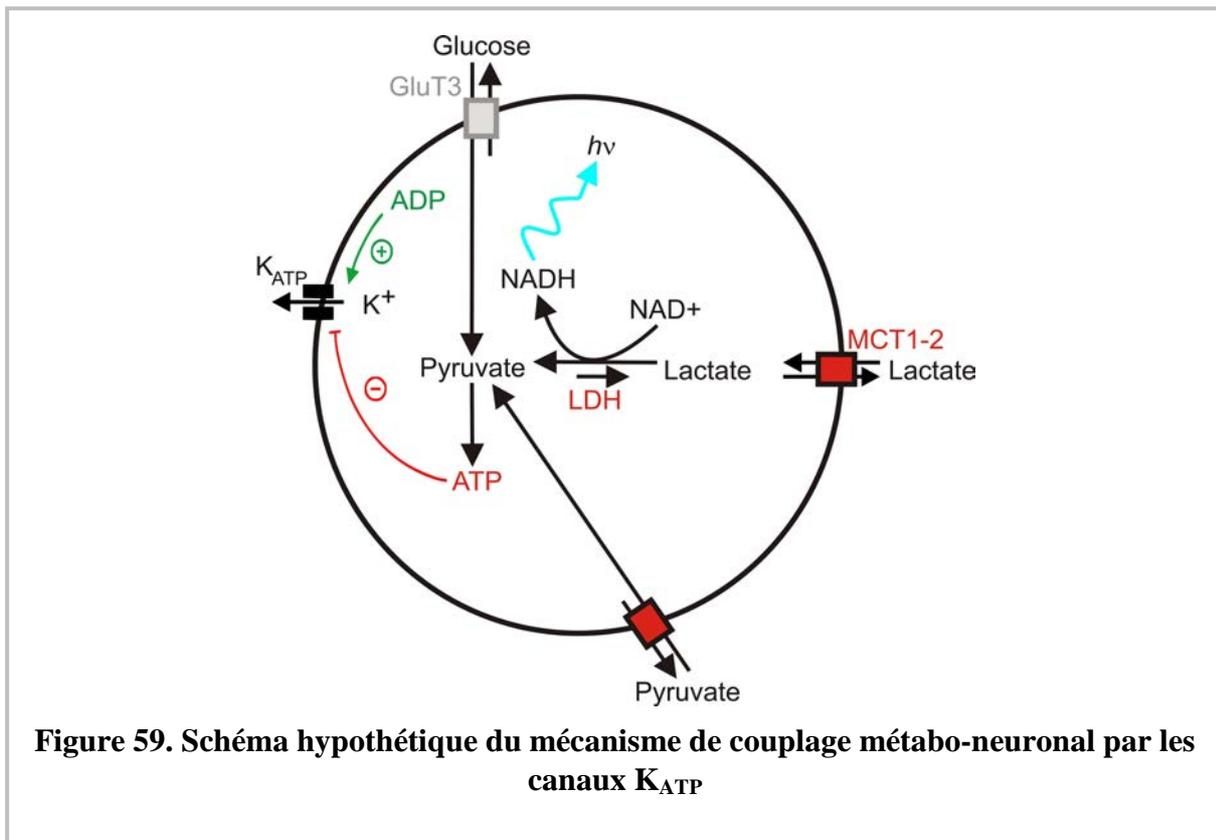


Figure 59. Schéma hypothétique du mécanisme de couplage métabo-neuronal par les canaux K_{ATP}

C. Article III : Preuve de l'existence d'une sous-population de neurones pyramidaux exprimant le *tissue plasminogen activator* dans le néocortex de rongeurs

Dans cet article en collaboration, une approche combinée d'immunohistochimie, de microscopie électronique et de RT-PCR sur cellule unique a permis d'étudier la distribution cellulaire, et en particulier neuronale, du tPA. J'ai réalisé pour cette étude les travaux de RT-PCR sur cellule unique dans la couche V du cortex de rat.

I. Le tPA est une molécule multifonction mais sa localisation cellulaire reste peu connue

Depuis une vingtaine d'années, outre son implication dans la dégradation du système fibrinolytique (Tanswell et al., 1989), le tPA s'est vu doter d'une multitude de nouveaux rôles. On peut citer notamment son rôle dans la migration cellulaire, la survie cellulaire ou la plasticité synaptique. En effet, de nombreuses études montrent son implication en tant que gliotransmetteur, de neuromodulateur ou de composant de la matrice extracellulaire (Tsirka et al., 1997; Baranes et al., 1998; Wang et al., 1998; Nicole et al., 2001; Mataga et al., 2002).

L'origine cellulaire du tPA est multiple. On le trouve dans les cellules endothéliales qui en produisent en réponse à une dégradation vasculaire (Levin et al., 1997; Zlokovic et al., 1995; Schreiber et al., 1998). Il est aussi exprimé dans les cellules gliales mais sa distribution reste encore incomplète. Pour l'instant, les preuves de la présence de l'ARNm et de l'activité du tPA dans les astrocytes a été principalement décrit *in vitro* (Fernandez-Monreal et al., 2004; Joo et al., 2010; Ludwig et al., 1996; Hultman et al., 2008; Casse et al., 2012). Pour certains auteurs seulement, le tPA est retrouvé dans la microglie (Joo et al., 2010; Tsirka et al., 1997)(Ludwig et al., 1996). Une étude récente a montré *in vivo* la présence du tPA dans les oligodendrocytes (Correa et al., 2011).

Dans le système nerveux central, l'ARNm et la protéine du tPA ont été trouvés dans les structures comme l'hippocampe (Salles and Strickland, 2002; Madani et al., 1999; Echeverry et al., 2010), le cervelet (Raoult et al., 2014) ou l'amygdale (Pawlak et al., 2003; Bennur et al.,

2007). Cependant, le sous-type neuronal ainsi que la localisation vésiculaire du tPA reste inconnus.

Cette étude s'est intéressée à la distribution du tPA dans le cerveau adulte, principalement dans les aires corticales autant au niveau cellulaire qu'intracellulaire. L'utilisation d'un traitement à la colchicine a permis de bloquer le transport axodendritique du tPA. De ce fait, la présence du tPA a pu être mise en évidence pour la première fois dans les neurones des couches II, III, V et VI du cortex granulaire restroplénial, somatosensoriel primaire, perirhinal et piriforme. De plus, le tPA a été mis en évidence dans une sous-population de neurones glutamatergiques par une utilisation combinée d'électrophysiologie, de RT-PCR sur cellule unique et d'immunohistochimie. Concernant la localisation vésiculaire, une étude par microscopie électronique a mis en évidence un stockage du tPA dans des vésicules à cœur dense pré-synaptique. Cette étude montre pour la première fois, *in vivo*, la présence de tPA dans une sous-population de neurones glutamatergiques.

II. Le tPA est exprimé dans un type de neurone particulier...

Dans cette section, un résumé sera fait de l'article présenté ci-après. Les données de cette section font part des résultats les plus importants de l'étude.

1. L'expression du tPA dans le système nerveux central se localise dans certains types cellulaires

Afin de révéler la présence du tPA dans le tissu perfusé de cerveau de souris adulte, une étude immunohistochimique a été réalisée. Celle-ci a permis de montrer que le tPA est présent dans certains types cellulaires (**Figure 60**). En effet, la présence du tPA est confirmée dans les cellules endothéliales (**Figure 60, c**) (Levin et al., 1997; Zlokovic et al., 1995; Schreiber et al., 1998), les oligodendrocytes (**Figure 60, d**) (Correa et al., 2011), les mastocytes (**Figure 60, e**) (Valent et al., 2002; Sillaber et al., 1999) et les épendymocytes (**Figure 60, f**) (Ware et al., 1995). Au contraire, le tPA est absent des péricytes (**Figure 60, g**), de la microglie (**Figure 60, h**) et des astrocytes (**Figure 60, i**). Bien que le tPA semble absent des corps cellulaires des neurones (**Figure 60, j**), il est détecté dans certaines fibres (**Figure 61**).

En effet, on observe une immunoréactivité du tPA dans les fibres moussues de l'hippocampe (**Figure 61, a**), dans certaines fibres de l'habenula médian (**Figure 61, b**) et dans certaines fibres de l'éminence hypothalamique médiane (**Figure 61, c**). De plus, on retrouve des corps

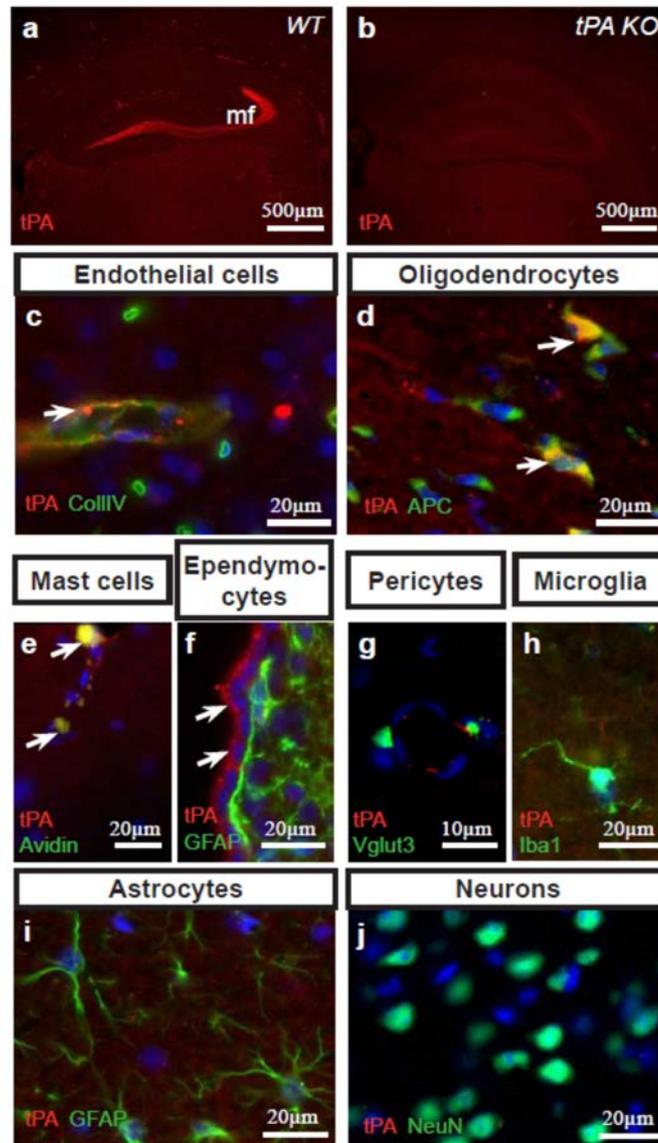
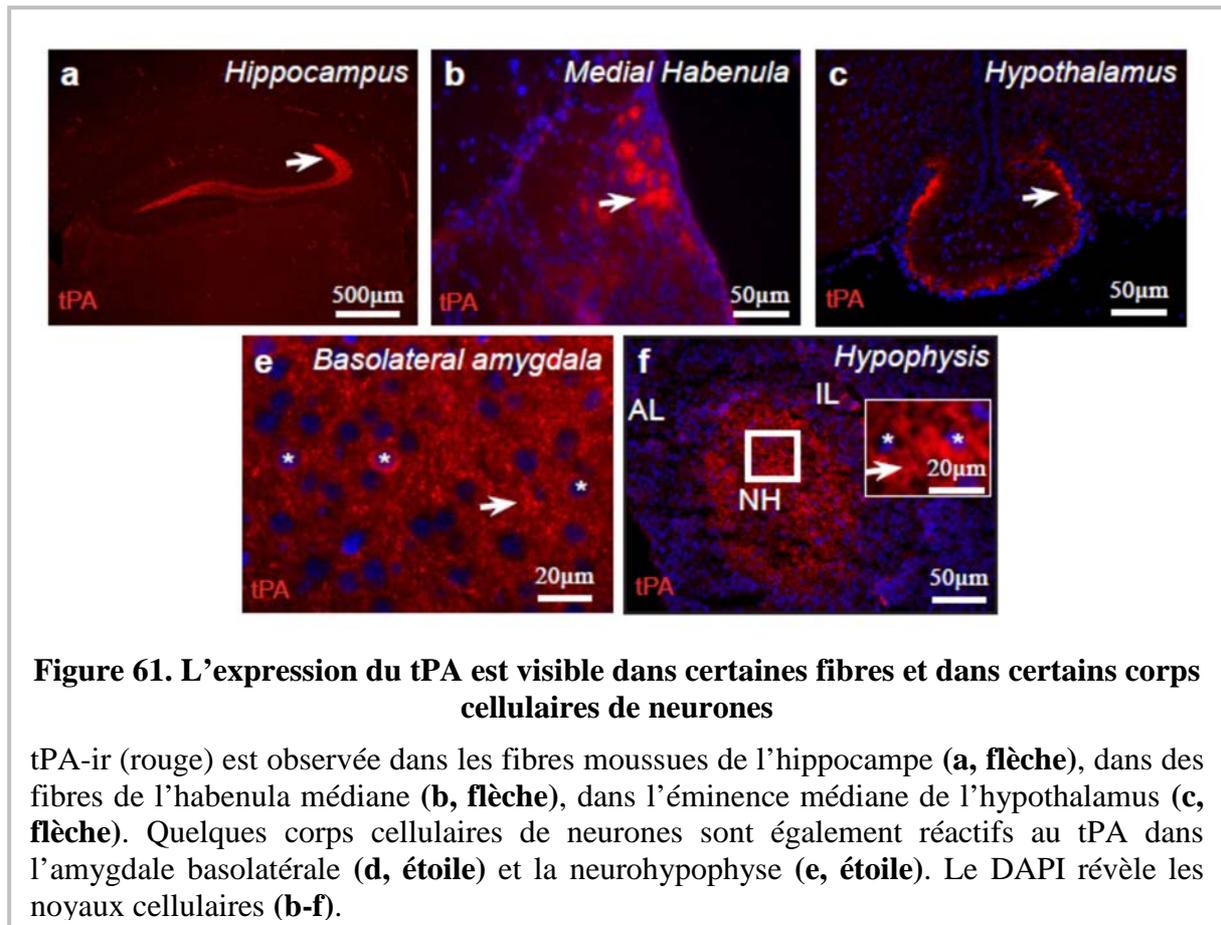


Figure 60. L'expression du tPA est localisée dans certains types cellulaires

Spécificité de l'anticorps anti-tPA murin (**a-b**) : comme attendu, l'immunoréactivité du tPA (tPA-ir, rouge) est observée dans les fibres moussues (mf) chez la souris adulte sauvage (**a**) mais est absente chez la souris adulte KO pour le gène du tPA (**b**). De plus, tPA-ir est observée dans : (**c**) les vaisseaux sanguins révélés par un anticorps anti-collagène IV (flèche), (**d**) les oligodendrocytes révélés par un anticorps anti-APC (flèches), (**e**) les mastocytes révélés par un anticorps anti-avidine (flèches) et (**f**) les épendymocytes révélés par la GFAP et localisés autour des ventricules (flèches). Cependant, tPA-ir est absent : (**g**) des péricytes révélés par un anticorps anti-VGluT3, (**h**) de la microglie révélée par un anticorps anti-Iba-1, (**i**) des astrocytes révélés par un anticorps anti-GFAP et (**j**) des neurones révélés par un anticorps anti-NeuN. Le DAPI est utilisé pour révéler les noyaux cellulaires.



cellulaires de neurones positifs pour le tPA dans l'amygdale basolatérale (**Figure 61, e**) et la neurohypophyse (**Figure 61, f**). Cela suggère que l'expression du tPA doit être confinée aux neurites.

Afin de vérifier cette hypothèse, un traitement *in vivo* à la colchicine, permettant de bloquer le transport axodendritique du tPA a été réalisé. Ce traitement permet de mettre en évidence une accumulation de tPA dans le corps cellulaire au niveau du gyrus denté (**Figure 62b et 62b'**) associée à une diminution de l'immunoréactivité du tPA des fibres moussues allant vers le CA3 (**Figure 62c et 62c'**). La présence de tPA est également décelée dans le corps cellulaire des neurones pyramidaux des régions CA3 (**Figure 62c et 62c'**), CA2 (**Figure 62d et 62d'**), CA1 (**Figure 62e et 62e'**) et dans le corps cellulaire des neurones du *fasciola cinereum* (**Figure 62f et 62f'**). On retrouve également le tPA dans 10 à 15% des neurones du cortex granulaire rostrospinal (**Figure 63a et b**), du cortex somatosensoriel primaire (**Figure 63c et d**), du cortex perirhinal (**Figure 63 e et f**) et du cortex piriforme (**Figure 63 g et h**).

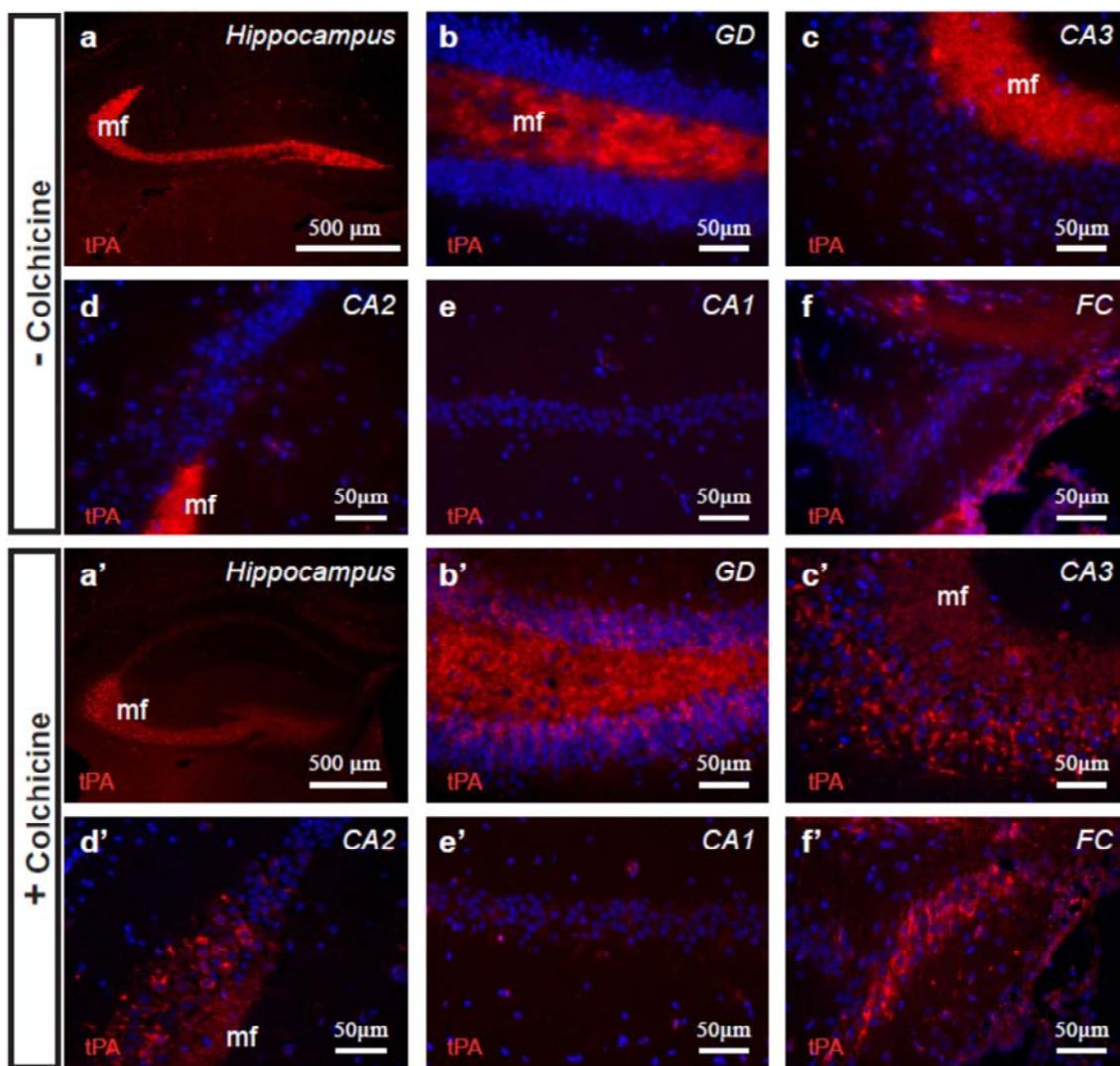


Figure 62. Le blocage *in vivo* du transport axodendritique par la colchicine révèle des neurones tPAergiques

Immunohistochimie pour le tPA sur des tranches d'hippocampe de souris adultes non traitées à la colchicine (-Colchicine) ou traitées à la colchicine (+Colchicine). Sur les tranches non traitées par la colchicine, tPA-ir est observée dans les fibres moussues (**a**) à travers le gyrus denté (**b**), le CA3 (**c**) et le CA2 (**d**). Il n'y a pas de tPA-ir dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe (**b-f**). Sur les tranches traitées à la colchicine, le tPA-ir est retrouvée dans les fibres moussues bien que l'immunoréactivité soit plus faible que sans traitement à la colchicine (**a et a'**). On trouve le tPA-ir également dans le corps cellulaire des neurones du gyrus denté (**b'**), du *comus ammonis* (CA1-3, **c'-e'**), et du *fasciola cinereum* (**f'**). Le DAPI est utilisé pour révéler le noyau des cellules.

En utilisant une méthode combinée d'électrophysiologie par patch-clamp et de RT-PCR sur cellule unique, nous avons pu mettre en évidence la nature glutamatergique des neurones exprimant le tPA (**Figure 64**). Sur 30 neurones pyramidaux, l'ARNm du tPA a été trouvé

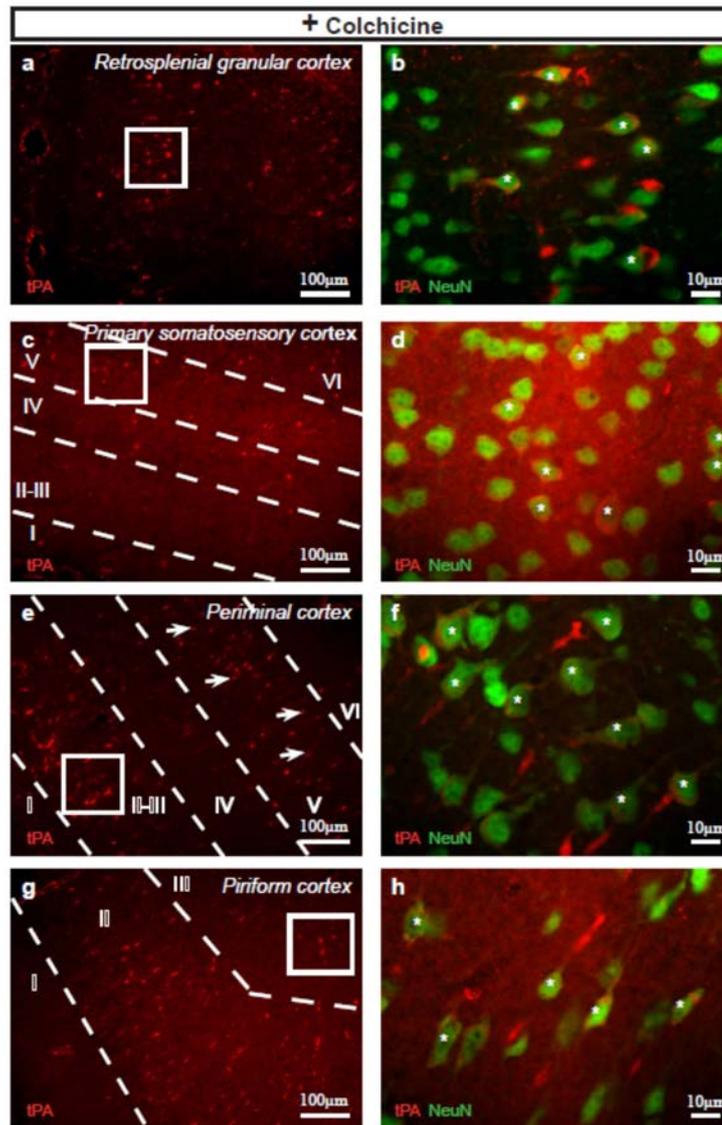


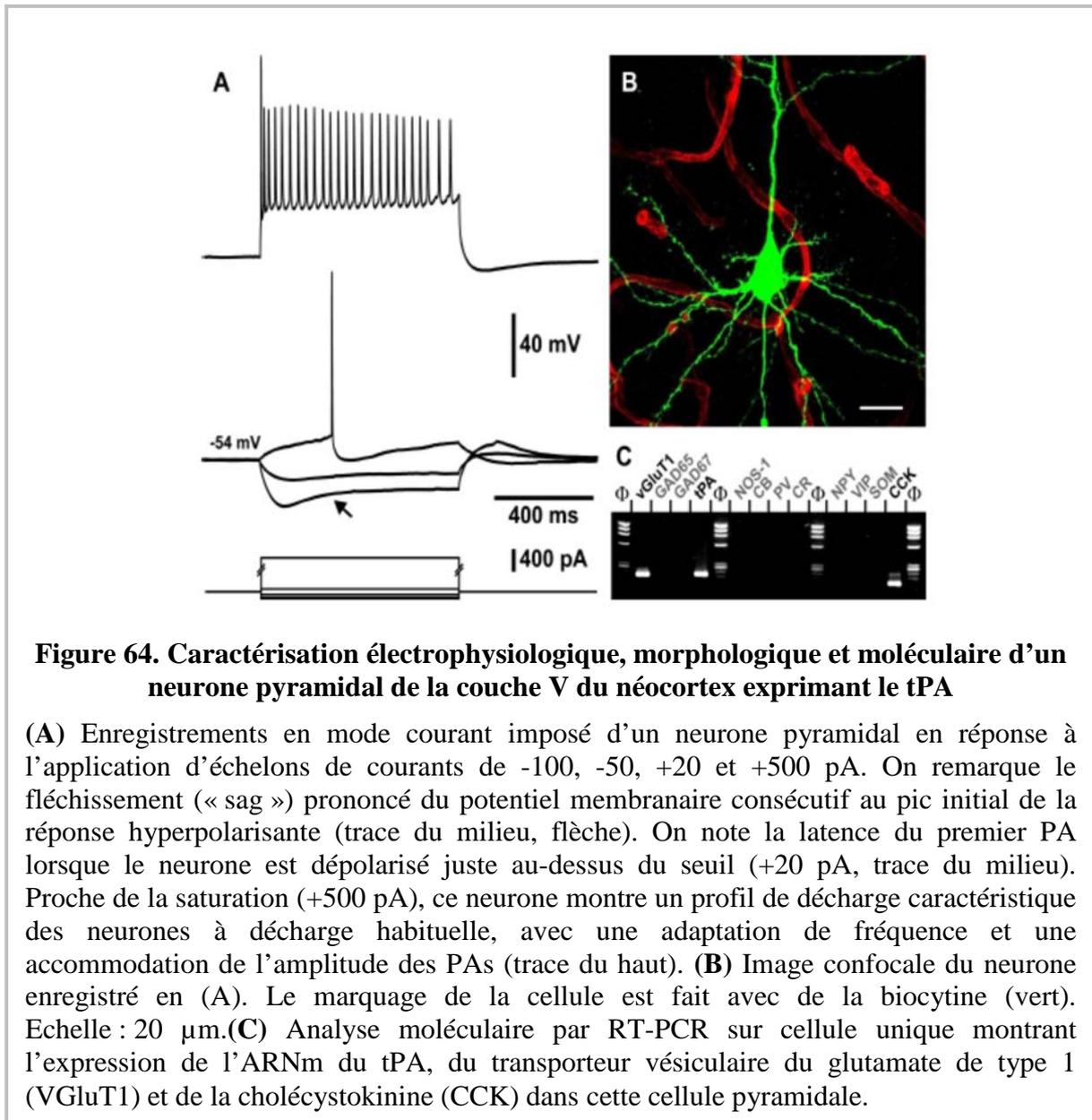
Figure 63. Le blocage *in vivo* du transport axodendritique par la colchicine révèle des neurones tPAergiques dans 4 cortex

La distribution du tPA-ir (rouge) est montrée à faible grossissement (**a, c, e, g**) et à fort grossissement (**b, d, f, h**). Dans le cortex granulaire restrosplinal, le tPA-ir est observée dans les neurones de la couche II (**a et b [étoile]**). Dans le cortex somatosensoriel primaire les neurones tPA sont retrouvés avec une forte immunoréactivité dans les couches V et VI (**c**) et une faible immunoréactivité dans les couches II et III (**c et d [étoile]**). Dans le cortex pirihinal, les couches II-III (**e et f [étoiles]**) et V (**e [flèche]**) présentent une forte immunoréactivité pour le tPA. Le tPA-ir est retrouvée dans les couches II et III du cortex piriforme (**g et h [étoiles]**).

dans 3 cellules pyramidales, soit 10%. Le tPA n'a jamais été retrouvé dans les interneurons (données non montrées).

2. Le tPA est stocké dans des vésicules permettant sa libération dans le milieu extracellulaire

La libération de neurotransmetteur, contenu dans des organites, est dépendante d'une exocytose dépendant du Ca^{2+} . Afin de tester si des vésicules sont capables de stocker et/ou de libérer du tPA, des organites contenant la synaptobrevin-2 ont été isolés d'extrait de cerveau de rat. La partie cytoplasmique de la protéine synaptobrevin-2 a été utilisée afin d'isoler ces vésicules (Crippa, 2007; Martineau et al., 2008). La caractérisation de la composition de ces vésicules a permis de voir qu'elles contiennent le tPA. De plus, la présence de tPA a également été confirmée par microscopie électronique à la suite d'un traitement à la colchicine. En effet, le tPA est retrouvé dans des vésicules au niveau du corps cellulaire, des



fibres et des terminaisons synaptiques.

III. ...formant une sous-population de neurones glutamatergiques excitateurs tPAergiques

Des évidences immunohistochimiques, électrophysiologiques et transcriptionnelles ont permis de démontrer la présence de tPA dans un type cellulaire particulier. En effet, les neurones glutamatergiques excitateurs du cortex expriment le tPA. Celui-ci est retrouvé dans des vésicules situées dans le corps cellulaire et les terminaisons synaptiques. Ces données permettent donc de proposer le concept de neurone tPAergique capable de libérer le tPA dans le milieu extracellulaire.

IV. Article

TISSUE PLASMINOGEN ACTIVATOR-ERGIC NEURONS ARE A SUBPOPULATION OF PYRAMIDAL CELLS IN THE RODENT NEOCORTEX

RUNNING TITLE: TPA-ERGIC NEURONS

Morgane Louessard¹, Alexandre Lacroix^{2,3,4}, Nurul Aqmar Mohamad Nor Hazalin⁶, Axel Montagne¹, Flavie Lesept¹, Magalie Martineau⁵, Bertrand Lambolez^{2,3,4}, Bruno Cauli^{2,3,4}, Jean-Pierre Mothet⁶, Denis Vivien^{1,*}, Eric Maubert^{1,*}

Affiliations:

¹ Inserm, Inserm U919, Serine Proteases and Pathophysiology of the neurovascular Unit. Université Caen Basse-Normandie, GIP Cyceron, Caen, France.

² Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, 9 Quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France.

³ CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, 9 Quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France.

⁴ INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, 9 Quai Saint Bernard, F-75005, Paris, France.

⁵ Department of Cellular Biophysics, Institute for Medical Physics and Biophysics, University of Muenster, Muenster, Germany.

⁶ Aix Marseille University, CRN2M UMR7286 CNRS, Marseille, France

* authors with equal contribution

Correspondence to authors may be processed by mail to D. VIVIEN, 14 Bvd Henri Becquerel, GIP Cyceron, 14000 CAEN, France), phone (+33.2.31.47.01.66), fax (+33.2.31.47.02.22) or email (vivien@cyceron.fr).

Acknowledgments: This work was supported by grants from the INSERM (French National Institute for Health and Medical Research) (D.V.), the University of Caen-Basse Normandie (D.V.), Era-net Neuron program “ProteA” EU FP7 (D.V.), TC2N (Trans Channel Neuroscience Network) (D.V.), ANR (French national research agency grants XXXX (D.V.) and ANR 2011 MALZ 003 01 (B. C.) and the Regional Council of Lower Normandy. This work was also supported by a PhD fellowship from the Malaysia Government (N.N.H) and by operating grants from Centre National de la Recherche Scientifique (J-P.M.), France Alzheimer (J-P.M.) and Université Aix-Marseille (J-P.M.)

ABSTRACT

Surprisingly, although an extensive literature describes different functions and mechanisms of action of the extracellular serine protease tissue plasminogen activator (tPA) in the physiology and pathologies of the central nervous system (CNS), clear information of its regional, cellular and subcellular distribution in the brain are still lacking. We provide here a set of immunological, electrophysiological, biochemical and transcriptional evidence demonstrating that tPA positive cortical neurons (in rodents) are a subpopulation (10 to 15 % of the total neurons) of excitatory glutamatergic pyramidal neurons of the layers II-III, V and VI, in which tPA is stored in synaptobrevin-2 large dense synaptic vesicles. tPA is also expressed in neurons of other structures such as the hippocampus, amygdala and hypothalamus. Altogether, this study allows us to propose the concept of cortical excitatory tPA-ergic neurons.

INTRODUCTION

Due to its early described high affinity for fibrin and its ability to activate plasminogen into plasmin (ASTRUP & STAGE 1952; Rijken et al. 1979), tissue plasminogen activator (tPA) is mostly known as a key protease of the fibrinolytic system (Tanswell et al.,1989). These last two decades, accumulating evidences have shown that in addition of its roles in the vascular system, tPA plays critical functions in the central nervous system (CNS). There, by acting either as an enzyme or a growth factor-like molecule, tPA behaves as an extracellular matrix regulator and a neuromodulator, thus controlling key events like cell migration, cell survival or synaptic plasticity (Tsirka & Rogove 1997; Baranes et al. 1998; Wang et al. 1998; Nicole et al. 2001; Mataga et al. 2004). As a consequence, throughout life, tPA is involved in several physiological and pathological CNS processes, including learning and memory, anxiety, epilepsy, stroke, Alzheimer's disease or spinal cord injury (Siconolfi & Seeds 2003; Baranes et al. 1998; Madani et al. 1999; Obiang et al. 2012; Pawlak et al. 2003; Melchor et al. 2003; Ledesma et al. 2003; Bukhari et al. 2011; Lemarchant et al. 2014; Melchor & Strickland 2005). The neuronal functions of tPA are achieved through plasminogen -dependent or -independent effects (Yepes et al. 2009). For instance, tPA-mediated generation of plasmin controls the degradation of the extracellular matrix (Tsirka & Rogove 1997), leading to axonal growth during development or neuronal death during brain injuries. In addition, tPA can also process pro-neurotrophins including the pro-nerve growth factor (NGF) or the pro-brain derived neurotrophic factor (pro-BDNF) into their mature forms (Bruno & Cuello 2006; Bruno & Cuello 2012; Pang et al. 2004; Rodier et al. 2014). tPA is also known to bind and/or

activate a set of neuronal receptors such as low density lipoprotein receptor-related proteins (LRPs) (Zhang et al. 2007; Benchenane et al. 2005; Herz & Strickland 2001; Yepes et al. 2003; Polavarapu et al. 2007; Zhang et al. 2009), N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) (Nicole et al. 2001; Matys & Strickland 2003; Samson et al. 2008; Wu et al. 2013), annexin-II (Siao & Tsirka 2002; Lee et al., 2007) and epidermal growth factor receptors (EGFRs) (Correa et al., 2011). Thus as highlighted tPA is a key signalling molecule for the healthy and diseased brain. It is why understanding when, how and where tPA in the CNS is engaged is mandatory. It is notably of paramount importance to decipher which specific cell-type if any could process and release tPA. We investigated here the distribution of tPA in the adult brain, especially in cortical areas, both at the cellular and ultrastructural levels. Using Colchicine treatment to block the axo-dendritic transport we unmasked the presence of tPA in neurons (Stanić et al. 2011; Dostál & Libusová 2014). This allowed to disclose the presence of tPA positive neurons in layers II-III, V and VI of the retrosplenial granular, primary somatosensory, perirhinal and piriform cortices, different brain areas in which its expression has not been described so far. Single cell transcriptomic analyses performed in combination with electrophysiological recordings, as well as immunohistology, revealed that the neuronal expression of tPA is restricted to glutamatergic neurons. Biochemical and electron microscopy revealed a storage of tPA in synaptobrevin-2 positive synaptic dense core vesicles. Altogether, we provide here the first in vivo evidence of the existence of tPA-ergic neurons exhibiting typical properties of excitatory glutamatergic neurons.

RESULTS

Expression of tPA in CNS cells. The presence of tPA in the different cell types of the CNS was revealed by immunohistochemistry on perfused brain tissues from adult mice (Figure 1 and Table 3). Immunostainings from hippocampal tissue sections confirmed the presence of tPA in the mossy fiber pathway (from the hile of the dentate gyrus to CA3 area) (Salles & Strickland 2002) in wild type animals but not in tPA KO animals taken as negative controls (Fig. 1a and b). As previously reported, tPA immunoreactivity was observed in endothelial cells (Levin et al. 1997; Zlokovic et al. 1995; Schreiber et al. 1998) (Fig. 1c), oligodendrocytes (Correa et al. 2011) (Fig. 1d), mastocytes (Valent et al. 2002; Sillaber et al. 1999) (Fig. 1e) and ependymocytes (Ware et al. 1995) (Fig. 1f). In contrast, pericytes (Fig. 1g), microglial cells (Fig. 1h) and astrocytes (Fig. 1f and i) were found to be negative for tPA immunostaining. Similar patterns of distribution were observed from perfused rat brain (Table 3). Focusing on neurons, tPA positive immunostaining were observed in hippocampal mossy

fibers (Fig. 2a), in some fibers of the medial habenula, (Fig.2b), in some fibers of the hypothalamic median eminence (Fig. 2c) and in fibers of the neurohypophysis (Fig. 2d). Although some tPA positive neuronal cell bodies were detected in basolateral amygdala (Fig. 2e), no tPA positive neuronal soma was revealed in cortical areas or in hippocampus (Fig. 1j and Fig. 3a-f).

In vivo blockage of the axo-dendritic transport unmasks tPA positive neurons. The lack of tPA in cortical neurons was questionable considering the abundant literature reporting a neuronal expression of tPA and subsequent functions (Castorina et al. 2013; Li et al. 2013; Teesalu et al. 2004; Tsirka & Rogove 1997; Gualandris et al. 1996). It is why we decided to block a possible tPA axo-dendritic transport by stereotaxic injections of colchicine and thus possibly unmask its presence in neuronal cell bodies (Fig. 3a-f vs 3a'-f' without vs after colchicine treatment respectively). In the mice hippocampus, colchicine treatment led to an accumulation of tPA in neuronal cell bodies of the dentate gyrus (Fig. 3b vs 3b') associated with reduced levels of tPA in the corresponding mossy fibers that reached CA3 (Fig. 3c vs 3c'). We also revealed an accumulation of tPA in pyramidal neuronal cell bodies in CA3 (Fig. 3c vs 3c'), CA2 (Fig.3d vs 3d'), CA1 (Fig. 3e vs 3e') and in neuronal cell bodies of the fasciola cinereum (Fig. 3f vs 3f'). Colchicine treatment also unmasked the presence of tPA in cortical neurons in both mice and rats (Fig. 4 a-b vs 4a'-b' without vs after colchicine treatment respectively). Overall, we revealed 10 to 15% of the total number of neurons positive for tPA (4374 tPA positive neurons of a total of 28774 NeuN positive neurons counted) (Fig. 5d) in the retrosplinal granular cortex (Fig. 5Ca and 5Cb), the primary somatosensory cortex (Fig. 5Cc and 5Cd), the perirhinal cortex (Fig. 5Ce and 5Cf) and the piriform cortex (Fig. 5Cg and 5Ch) Interestingly, the distribution of the tPA positive neurons was restricted to a subpopulation of pyramidal-shaped neurons of layers II-III, V and VI (Fig. 5C).

tPA positive neurons are glutamatergic. We then investigated further the ex vivo expression of neuronal tPA by combining single cells electrophysiological recordings and transcriptomic analyses (Fig. 6). The single cell RT-PCR protocol was designed to probe simultaneously for the expression of tPA and 10 molecular markers classically used to define cortical neuronal subtypes (Ascoli et al 2008): the vesicular glutamate transporter (vGluT1), the GABA-synthesizing enzymes (glutamic acid decarboxylases, GAD 65 and GAD 67); three calcium-binding proteins (calretinin [CR], calbindin [CB] and parvalbumin [PV]); and four neuropeptides including Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), somatostatin (SOM),

cholecystikinin (CCK) and neuropeptide Y (NPY). Pyramidal cells (n = 30) and interneurons (n = 13) were first selected according to their somatodendritic appearance and by their characteristic electrophysiological features. Detection of vGluT1 and absence of GAD (vGluT1+/GAD-) was indicative of a glutamatergic identity whereas detection of GAD (GAD+) denoted a GABAergic phenotype. The expression of tPA was observed in 3 cells out of 30 pyramidal neurons of the rat neocortical layer V but was never detected in GABAergic interneurons (n=13). Figure 6B is an example of a biocytin labelled pyramidal neuron expressing tPA. These tPA positive glutamatergic neurons exhibited a typical pyramidal shaped soma extending a prominent apical dendrite, basal spiny dendrites (Fig. 6B), long duration action potentials and pronounced spike amplitude accommodation and spike frequency adaptation which are typical morphological and electrophysiological features of Layer V Regular Spiking pyramidal neurons (Fig. 6A-B) (Connors & Gutnick 1990; McCormick et al. 1985). Interestingly, all tPA positive pyramidal cells expressed CCK (Fig. 6C). To confirm pyramidal identity of tPA positive neurons, immunohistochemistry for vGluT1, GAD67 and CCK were performed from both mouse (Fig. 7a-e) and rat (Fig. 7f-j) brain tissues pre-treated with colchicine. We confirmed the presence of tPA in neurons also positive for vGluT1 (Fig. 7a and f), CCK (Fig.7b and g) and T-box brain 1 (tbR1) a transcription factor characteristic of glutamatergic neurons (Hevner et al. 2001) (Fig. 7c and h) in cortical areas of both species. In contrast, tPA positive neurons are negative for the GABA-synthesizing enzyme GAD67 (Fig. 7d and i). These data provide the first evidence that the cortical neurons that express the tPA correspond to a subpopulation of glutamatergic pyramidal cells.

Subcellular localization of tPA. Ca²⁺-dependent exocytosis of neurotransmitters requires their compartmentalization into secretory organelles (Jahn & Fasshauer 2012). To test whether such vesicles are indeed capable of storing and/or transporting neuronal tPA, we immunisolated synaptobrevin-2 (Sb2)-containing organelles from a low speed supernatant (LSS) of rat brain extracts (Crippa et al. 2006; Martineau et al. 2008). Immunoblot analysis of the immunisolated Sb2 synaptic vesicles (SVs) (Fig. 8A) revealed that isolated SVs contain typical vesicular membrane proteins such as synaptotagmin I (Syt I), synaptophysin (Syn) and the glutamatergic marker Vglut1 (Fig. 8B). The immunisolates were virtually free of contamination by endosomes (Fig. 8B) as evident from the absence of signals for transferrin receptor (TfR). As confirmed by the glutamate-induced acidification of the isolated SVs, our preparation represents a functional population of glutamatergic SVs (Fig. 8C). Interestingly,

we also evidenced that at least some of the *in vivo* Sb2 positive glutamatergic vesicles also contain tPA (Fig. 8D). The presence of tPA containing synaptic vesicles was confirmed by confocal immunofluorescence analyses demonstrating a co-localization of tPA with synaptobrevin-2-positive vesicles (Fig. 9B). To further determine the subcellular localization of neuronal tPA *in vivo*, especially whether tPA is stored in particular subtype of vesicles, high resolution immunoperoxidase or immunogold electron microscopy analyses were performed in mice (Fig. 9A a-f) from cerebral cortices previously treated by colchicine. tPA-containing large dense round-shaped organelles (i.e., large dense core vesicle-like structures) were observed in the neuronal cell bodies (Fig. 9Ea and b), fiber tracks (Fig. 9Ac) and asymmetric synaptic terminations (Fig. 9Ad). These data were confirmed by using immunogold revelation of tPA, with tPA detected in large vesicles within neuronal bodies (Fig. 9Af) and fiber tracks (Fig. 9Ae). Altogether, these data provide the first evidence that the neuromodulator tPA is characteristic of a sub-population (10-15%) of cortical pyramidal excitatory glutamatergic neurons stored in synaptobrevin-2 positive large dense vesicles.

DISCUSSION

The extracellular serine protease tissue plasminogen activator (tPA) is now recognized as a critical modulator of physiological and pathological conditions in the central nervous system. Surprisingly, although an extensive literature describes different functions and mechanisms of action of tPA in the CNS, key uncontroversial information including its regional, cellular and subcellular distribution in the brain are still lacking. Up to now, endothelial cells forming microvessels are considered as the major source of tPA (Levin et al. 1997; Zlokovic et al. 1995; Schreiber et al. 1998). Although tPA mRNA and tPA proteolytic activity have been detected in astrocytes, this was reported either *in vitro* (Fernández-Monreal, López-Atalaya, Benchenane, Cacquevel, et al. 2004; Joo et al. 2010; Ludwig et al. 1996; Hultman et al. 2008; Cassé et al. 2012) or following brain injuries (Adhami et al. 2008; Kim et al. 2011; Xin et al. 2010). tPA was also found in microglia by some (Joo et al. 2010; Tsirka & Rogove 1997) but not all authors (Ludwig et al. 1996). Oligodendrocytes do not display a tPA activity *in vitro* (Kalderon et al. 1990), but a recent study showed positive immunostaining for tPA *in vivo* (Correa et al., 2011). Perivascular mast cells (Valent et al. 2002; Sillaber et al. 1999), pericytes (Yamamoto et al. 2005; Kose et al. 2007), ependymocytes (Ware et al. 1995) and infiltrating blood cells (Tabengwa et al. 2002) are other putative sources of tPA in the CNS. In the present study, in the adult healthy mouse or rat brains, we confirmed positive immunostainings for tPA in endothelial cells, oligodendrocytes, mast cells and

ependymocytes, but not in astrocytes, microglia and pericytes (Fig.1). Focusing on neurons, our present study, performed *in vivo*, in two species and in healthy conditions did not allow us to detect tPA in cell bodies of hippocampal or cortical neurons. However, we showed tPA was present in neuronal cell bodies within the amygdala and in the hippocampal mossy fiber pathway as expected (Echeverry et al. 2010; Madani et al. 1999; Salles & Strickland 2002; Pawlak et al. 2003). This seems to contradict the solid literature attributing a role of endogenous tPA in the cortex and hippocampus (Pawlak et al. 2005; Madani et al. 1999; Gorter et al. 2007; Seeds et al. 1995) and the documented presence of tPA in neurons (Cho et al. 2013; Ludwig et al. 1996; Müller & Griesinger 1998; Castorina et al. 2013; Li et al. 2013; Teesalu et al. 2004; Docagne et al. 1999; Gualandris et al. 1996; Tsirka & Rogove 1997). Indeed, *in vitro* studies revealed that tPA is concentrated at the growth cone during neuritogenesis (Krystosek & Seeds 1981; García-Rocha et al. 1994; Pittman et al. 1989), locally synthesized in dendrites (Lochner et al. 1998; Shin et al. 2004) and released following depolarization (transfected GFP-tPA) (Lochner et al. 1998; Lochner et al. 2008). However, blocking the axono-dendritic transport using the microtubule uncoupling agent colchicine, allowed us to unmask tPA in a significant fraction of hippocampal and cortical neuronal cell bodies. This effect was selective of neurons, since the pattern of tPA expression after colchicine treatment was unchanged in other cell types (may be excepted for a limited number of astrocytes). This colchicine-induced unmasking of tPA immunoreactivity can be explained either by a rare expression of tPA or by its too fast turn-over. Anyhow, this approach allowed us to map for the first time cerebral tPA positive neurons. In hippocampus, tPA was ferreted out in CA1, CA2 and CA3 neuronal cell bodies, in neurons of dentate gyrus (excepted in rats as previously reported, Salles and Strickland, 2002) and fasciola cinereum. In the cerebral cortex, tPA positive neurons appeared in almost all cortical areas, including the retrosplenial granular, the primary somatosensory, the perirhinal and the piriform cortices. Interestingly, not all cortical neurons are positive for tPA, with a distribution restricted between 10 to 15% of neurons in all the cortices investigated. tPA is also expressed in neurons of other structures such as amygdala, Bed nucleus of the stria terminalis or cingulum. These data are in agreement with the reported physiopathological functions of tPA in the CNS. For example, tPA was reported to be critically involved in spatial learning and memory processes known to involve both the hippocampus and the entorhinal cortex (Madani et al. 1999; Gorter et al. 2007), in anxiety behaviour known to involve the amygdala (Pawlak et al. 2003; Bennur et al. 2007; Yepes & Lawrence 2004) and in a number of sensorimotor tasks (Seeds et al. 1995). In pathological conditions, tPA was reported to play critical roles in delayed hippocampal

neuronal death following kainate exposure (Tsirka & Rogove 1997; Siao et al. 2003; Nagai et al. 1999), in seizure (Yepes et al. 2003; Tsirka & Gualandris 1995) and in survival and death of cortical neurons (Tsirka & Rogove 1997; Yepes et al. 2003). In order to characterize the phenotype of tPA-ergic neurons, neurons of the rat somatosensory cortex were patched and subjected to combined electrophysiological and transcriptomic analyses. Using this strategy, we found that neurons containing the mRNA for tPA display the characteristic electrophysiological, morphological and molecular features of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. tPA positive pyramidal cells displayed the characteristic features of regular spiking neurons (McCormick et al. 1985), including long duration action potentials and pronounced spike frequency adaptation. Biocytin labelling of recorded neurons revealed that tPA positive neurons are pyramidal spiny neurons and none of the tPA positive neurons expressed exclusive markers of GABA-ergic interneurons. Immunohistochemical analysis showing presence of the vesicular glutamate transporter 1, cholecystokinin, and the transcription factor tbR1 in tPA neurons largely confirmed their pyramidal phenotype.

Our finding that tPA-ergic neurons are excitatory fits with the reported functional link between tPA and NMDA receptor-dependent glutamatergic signalling (Nicole et al. 2001; Baron et al. 2010), involved in long-term potentiation (LTP) (Pang et al. 2004; Zhuo et al. 2000; Baranes et al. 1998; Madani et al. 1999), synaptic plasticity (Yepes & Lawrence 2004; Samson & Medcalf 2006), seizure (Yepes et al. 2003; Tsirka & Gualandris 1995), neuronal death (Baron et al. 2010; Nagai et al. 1999) and survival (Yepes & Lawrence 2004; Wu et al. 2013; Echeverry et al. 2010). Of note, most tPA positive neurons receive projections from GABA-ergic neurons. In vitro, neuronal depolarization induced by GABA receptors antagonists such as bicuculline, lead to a massive release of neuronal tPA (Nicole et al. 2001; Centonze et al. 2002). Accordingly, when the subcellular localization of tPA was determined on colchicine treated mouse tissues by electron microscopy, although we revealed cytoplasmic staining, we also confirmed the presence of tPA containing vesicles in neuronal cell bodies, fibers and synapses. The mean diameter of tPA containing vesicles is approximately of 200 nm, usually reported for large dense core vesicles (Park & Kim 2009). Immunoprecipitations performed with an antibody for synaptobrevin-2 confirmed the presence of tPA in neuronal vesicles. It is known that large dense vesicles are positive for synaptobrevin-2 (Tobin et al. 2012). Co-immunostainings of tPA combined with synaptobrevin-2 also confirmed the co-localization of tPA with synaptic vesicles. The presence of tPA in synaptic vesicles, that seem to be large dense vesicles, is relevant with the

literature that report of possible the presence of tPA in synaptic spine (Lochner et al. 1998; Lochner et al. 2008), its possible constitutive neuronal release (Shin et al. 2004) and also its early and massive release from synapses following either tetanus toxin (Nicole et al. 2001), KCl (Lochner et al. 2008; Fernández-Monreal et al. 2004) or bicuculin induced depolarization (Cassé et al. 2012). This observation is also relevant with its neuromodulatory functions, especially its ability to bind post-synaptic NMDA receptors and promote their signalling (Nicole et al. 2001; Fernández-Monreal et al. 2004) including the late phase of Long Term Potentiation (L-LTP) (Baranes et al. 1998; Zhuo et al. 2000) and excitotoxicity (Baron et al. 2010).

Altogether, we provide here a set of immunological, electrophysiological and transcriptional evidence demonstrating the presence of a subtype of excitatory glutamatergic pyramidal neurons with tPA-containing synaptic vesicles that allow us to propose the concept of tPA-ergic neurons.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Male Swiss mice (n=6), tPA deficient (tPA KO ; n=4), their C57Bl6/J wild type control (n=4) and Wistar Rats (n=6) (8-10 weeks) provided by CURB (Caen, France) were housed with a 12-hour light/12-hour dark cycle in standard polypropylene cages (Charles River, France) with free access to water and food (SDS Dietex, France). Experiments were performed in accordance with the French (Decree 87/848) and the European Communities Council (Directive 86/609) guidelines.

Immunohistochemistry

Control or treated mice and rats were deeply anesthetized and transcardially perfused with 0.9% NaCl heparinized followed by a mixture of 2% paraformaldehyde (PAF) and 0.2% picric acid in 0.1 M sodium phosphate buffer , pH 7.4 (150 ml or 400ml, respectively). Brains were removed, washed in veronal buffer containing 20% sucrose, and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Coronal sections (8-10µm) were cut on a cryostat, collected on poly-D-lysine slides and stored at -80°C.

Coronal adjacent brain sections (8-10µm) were incubated, overnight at 4°C, with primary antisera alone or in double-labelling experiments. Adapted secondary F(ab')₂ coupled to TRITC or FITC (1:600; Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) were used for visualization under epifluorescence or confocal microscopy illumination. Washed sections

were cover slipped with antifade medium containing DAPI. Sections were examined with a microscope (DM6000; Leica). Images were digitally captured using a camera (CoolSNAP; Photometrics) and/or with an inverted confocal microscope (SP5, Leica). Images were visualized respectively with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and LAS AF lite software (LEICA). tPA immunoserum was pre-incubated overnight with low concentrations of rtPA which resulted in the abolition of labeling in both mice and rats blood vessels as in mice mossy fibers pathway. The specificity of tPA immunostainings was undoubtedly reinforced by the fact that a sheep commercial antibody give similar immunostainings in both mice and rats sections. Pilot experiments were performed to confirm the specificity and the optimal dilution of the various primary commercial antisera used. In all single labelling experiments, F(ab')₂ fragments gave any labelling in an immunoreaction where the respective primary antiserum was omitted. Single labeling was carried out in parallel with double labelling on adjacent sections and we ensured that each primary antibody give similar results in single or double staining experiments. In this last case, omission of one of the secondary antibody from the cocktail resulted in the corresponding fluorescence observed in single staining. Finally, when a primary antibody was revealed by a cocktail of secondary antibodies only one fluorescence, corresponding to fluorophore used to reveal the primary antibody, was observed.

Table 1: Primary antibodies used in this study

All antibodies used and their specificity as follows:

Antigen	Host	Code	Dilution	Source
tPA*	Rabbit	gift	1/1500	University of Leuven
tPA	Sheep	SASMPA	1/1500	Molecular innovation
tPA	Goat	sc 5239	1/1000	Santa cruz
Col-IV	Goat	1340-01	1/1500	Southern Biotech
Iba1	Goat	ab5076	1/800	Abcam
APC	Mouse	ab16794	1/600	Abcam
GFAP	Chicken	ab4674	1/800	Abcam
NeuN	Mouse	MAB377	1/1500	Millipore
Avidin fluoroscein		A2901	1/800	Sigma
Vglut 1	Guinea-pig	AB5905	1/800	Millipore
Vglut 3	Guinea-pig	AB5421	1/800	Millipore

tbr1	Chicken	NG1895557	1/1000	Millipore
GAD67	Mouse	ab26116	1/3000	Abcam
CCK	Goat	sc 21617	1/800	Santa cruz
Sb2 [#]	Mouse	gift	1/10000	Max Planck Institute
Chb [#] (N-term)	Mouse	gift	1/1000	Max Planck Institute
Sytl	Mouse	105 221	1/4000	Synaptic System
Syp	Mouse	101 011	1/2000	Synaptic System
TfR	Mouse	13-6800	1/1000	Invitrogen

*: gift from H.R. Lijnen, Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium (Roussel et al. 2009; Correa et al. 2011) Declerck et al., 1995;

#: gift from R. Jahn, Department of Neurobiology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Goettingen, Germany (Edelmann et al. 1995).

In vivo colchicine treatment

Mice and rats were deeply anesthetized and maintained with 2% isoflurane in a 70%/30% gas mixture (N₂O/O₂) and the rectal temperature was maintained at 37±0.5°C. Anesthetized mice and rats were placed into Kopf stéréotaxic instrument. The skulls were exposed, and small bore holes were drilled with a dental burr to allow intraventricular injection to be targeted by borosilicate glass pipettes (mice AP - 0.2mm from Bregma ; L +/- 1 mm from midline ; V -2,0 mm deep to the surface and rats AP - 0.92 mm from Bregma;L +/- 1,5 mm from midline; V -3,4 mm deep to the surface). Half of animals in each group was injected with 2µl/5µl of colchicine solution (containing 35µg/150µg of colchicine) and the other half was injected with 2 µl/5µl of vehicles for mice and rats respectively. The dose of Colchicine injected was chosen based on previous work (Stanić et al. 2011; Mascagni & McDonald 2003)

Quantification of cortical tPA positive neurons

The image analysis was performed using ImageJ software. The proportion of neurons expressing tPA was obtained by dividing the total number of neurons (as revealed by NeuN immunostaining) by the number of tPA positive neurons in randomly selected tree forebrain section per animal (5-9 images per cortical area per section(n=3) per animal ; N=3). Cortical area was located using stereotaxic Atlas. Neuron was considered tPA positive when the

fluorescence signal was distinguishable from the background (parenchymal autofluorescence).

Whole-cell recordings

Young rats were decapitated, their brains quickly removed, and coronal slices (300 μm thick) containing the barrel cortex were cut using a vibratome (Karagiannis et al. 2009). Individual slices were transferred to a recording chamber and perfused (1–2 ml/min) with oxygenated aCSF (20–25°C). Patch pipettes (4–8 M Ω) were filled with 8 μl of autoclaved K-gluconate-based RT-PCR internal solution. Neurons were visualized in the slice using infrared videomicroscopy with Dodt gradient contrast optics. Whole-cell electrophysiological properties were recorded in current clamp mode as described previously (Karagiannis et al. 2009). Membrane potential values were corrected for liquid junction potential.

Single-cell RT-PCR

At the end of the recording, the cell cytoplasm was aspirated in the recording pipette, expelled into a test tube, and reverse transcription (RT) performed (Lambolez et al. 1992). The single cell RT-PCR protocol was designed to probe simultaneously the expression of tPA and the neuronal markers vesicular Glutamate Transporter 1 (vGluT1), the two isoforms of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65 and GAD67), three calcium binding proteins [Calbindin D28k (CB), Calretinin (CR), and Parvalbumin (PV)], and four neuropeptides [Neuropeptide Y (NPY), Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP), Somatostatin (SOM), and Cholecystokinin (CCK)]. Two amplification steps were performed essentially as described (Cauli et al. 1997), with 10 μl of the RT reaction products using the primer pairs as follows:

Table 2: PCR primers

Genes Accession #	First PCR primers	Size (bp)	Second PCR nested primers	Size (bp)
vGluT1 NM_05385 9.1	^a Sense, 361: GGCTCCTTTTCTGGGGGTAC ^a Antisense, 600: CCAGCCGACTCCGTTCTAAG	259	^a Sense, 373: TGGGGGTACATTGTCACTCAGA ^a Antisense, 553:ATGGCAAGCAGGGTATGTGA C	201
GAD65 NM_01256 3.1	^b Sense, 713: TCTTTTCTCCTGGTGGTGCC ^b Antisense, 1085: CCCCAAGCAGCATCCACAT	391	^a Sense, 743: TGTACGCCATGCTCATTGCC ^a Antisense, 1032: CAGCTACAGCCAAGAGAGGATCA	312
GAD67 NM_01700 7.1	^c Sense, 529: TACGGGGTTCGCACAGGTC ^c Antisense, 1109: CCCCAAGCAGCATCCACAT	599	^a Sense, 581: TGGATATCATTGGTTTAGCTGGC ^a Antisense, 1065: TCACATATGTCTGCAATCTCCTGG	508
CB NM_03198 4.2	^c Sense, 134: AGGCACGAAAGAAGGCTGGAT ^c Antisense, 544: TCCCACACATTTTGATTCCCTG	432	^c Sense, 166: CCTGAGATGAAAACCTTTGTGG ^c Antisense, 392: CACGGTCTTGTGGCTTTCTCTA	249
PV NM_02249 9.2	^c Sense, 115: AAGAGTGCGGATGATGTGAAGA ^c Antisense, 480: ATTGTTTCTCCAGCATTTTCCAG	388	^a Sense, 151: CTGGACAAAAGACAAAAGTGGCT ^a Antisense,376: AGAAGGGCTGAGATGGGGC	244
CR NM_05398 8.1	^c Sense, 142: CTGGAGAAGGCAAGGAAAGGT ^c Antisense, 429: AGGTTTCATCATAGGGACGGTTG	309	^a Sense, 157: AAAGGTTCTGGCATGATGTCC ^a Antisense, 401: TCAGGAGGTCGGACAGAAATC	265
NPY NM_01261 4.1	^c Sense, -45: GCCAGAGCAGAGCACCC ^c Antisense, 292: CAAGTTTCATTTCCATCACCA	359	^a Sense, -21: CAGAGACCACAGCCCGCC ^a Antisense, 261: CTTCAAGCCTTGTCTGGGG	302
VIP NM_05399 1.1	^c Sense, 189: TGCCTTAGCGGAGAATGACA ^c Antisense, 456: CCTCACTGCTCCTCTTCCCA	287	^a Sense, 208: ACGCCCTATTATGATGTGTCCAG ^a Antisense, 402: TTTGCTTTCTAAGGCGGGTG	214
SOM NM_01265 9.1	^c Sense, 43: ATCGTCCTGGCTTTGGGC ^c Antisense, 231: GCCTCATCTCGTCTGCTCA	208	^a Sense, 75: GCCCTCGGACCCAGACT ^a Antisense, 207: TGGGGCAAATCCTCAGGC	150
CCK NM_01282 9.1	^c Sense, 177: CGCACTGCTAGCCGATACA ^c Antisense, 373: TTTCTCATTCCGCCTCTCC	216	^a Sense, 192: ATACATCCAGCAGGTCCGCA ^a Antisense, 320: TGGGTATTCGTAGTCTCAGCAC	151
tPA NM_01315 1	Sense, 1037: GTTCTGCTGGGTGCTATCTGC Antisense, 1276: GGTCAGGGAGGCAGGCAGT	258	Sense, 1054: TCTGCCGCCACTGCTTT Antisense, 1235: TGGGCACACTGACTGGAATCTG	203

Note: Position 1, first base of the start codon. a (Gallopín et al. 2006), b (Bochet et al. 1994), c (Cauli et al. 1997).

Immuno-isolation of synaptic vesicles (SVs)

All steps were performed at 4–6°C. The brain of 8-12 week old male Wistar rat was homogenized with a glass/Teflon homogenizer (10 strokes at 2500 rpm) in homogenization buffer [4 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 100 mM K₂-tartrate, 2 mM MgCl₂, and protease

inhibitor cocktail (Complete EDTA-free; Roche)] immediately after decapitation. The homogenate was centrifuged for 25 min at 35,000 x g. The resulting supernatant (Input, containing 3 mg/ml protein) was incubated with monoclonal antibodies against Sb2 for 1 h under rotation and with magnetic beads coupled to protein G (Ademtech) for an additional 1 h. The beads were further washed three times with homogenization buffer. Bead pellets were resuspended in SDS-PAGE sample buffer before being processed for gel electrophoresis and immunoblotting with standard methods or in appropriate buffer for additional analysis. Isolations with murine IgG were used as a control.

Acidification assay

Immunoisolated vesicles were eluted in 100 mM citrate, pH 2.5 for 45 min at RT and resuspended in acidification assay buffer 2X to get a final buffer composition of 10 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 4 mM KCl, 4 mM MgSO₄ and 0.32 M sucrose. The acidification assay was performed by measuring the fluorescence quenching of acridine orange (AO, Invitrogen) (Martineau et al., 2013; Maycox et al., 1988). The reaction was started by adding 10 mM MgATP in a stirred microcuvette containing 50 µl of vesicles and 20 µM AO, equilibrated at 32 °C. The reaction was stopped after 15-20 min by adding 50 mM (NH₄)₂SO₄ to dissipate the proton gradient across the vesicular membrane and release AO from the vesicular lumen. Changes of fluorescence were measured with a Photon Technology International spectrofluorimeter (excitation: 490 nm; emission: 530 nm). Traces were normalized to the fluorescence at t = 0 and corrected for baseline shifts induced by volume changes associated with the addition.

Ultrastructural analysis pre-embedding immunocytochemistry

In an attempt to determine the subcellular distribution of tPA immunoreactivity in cortical neurons of treated (n=2) and untreated mice (n=2), animals were deeply anesthetized and transcardially perfused with PAF containing 0.15 % of glutaraldehyde and proceeded for pre-embedding immunocytochemistry. Brains were cut on a vibratome and coronal sections (70 µm thick) were proceeded for pre-embedding immunostaining procedure provided by Aurion (Wageningen, The Netherlands). Briefly, after aldehyde inactivation and permeabilization with Triton X-100, the sections were incubated for 24 h at 4°C with the rabbit anti-tPA (1:1500) in a solution containing 1% BSA in PBS. Sections were then rinsed in PBS and incubated overnight at 4°C with secondary antibodies coupled to peroxidase

(Donkey Fab'2 fragments anti-rabbit IgG (1:1000; Jackson ImmunoResearch) or 12 nm gold particules (1:100; Goat anti-rabbit IgG, Aurion). For immunoperoxidase detection, rinsed sections were placed 3–6 min in a solution containing 3,3'-diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Fast-DAB; Sigma-Aldrich). For immunogold detection, sections were rinsed and fixed in phosphate buffer containing 2% of glutaraldehyde.

Tissue sections were post fixed in 1 or 2 % osmium tetroxide respectively for 30 min (Immunogold detection) to 2 h. (Immunoperoxidase) and then dehydrated through a series of graded ethanols and propylene oxide and flat-embedded in Emded 812 (Electron Microscopy Sciences) between two treated glass slides. Ultrathin sections (70 nm thickness) from cortical areas were cut with a diamond knife (DRUKKER) using a Leica ultracut R (Leica Microsystems). The sections were collected on GILDER grids (Electron Microscopy Science) and counterstained or not (to visualized DAB precipitates) with uranyl acetate and lead citrate, and examined using a 1011 transmission electron microscope (JEOL). Microscopic images were captured with an ORIUS 200 camera system (GATAN).

FIGURE LEGENDS

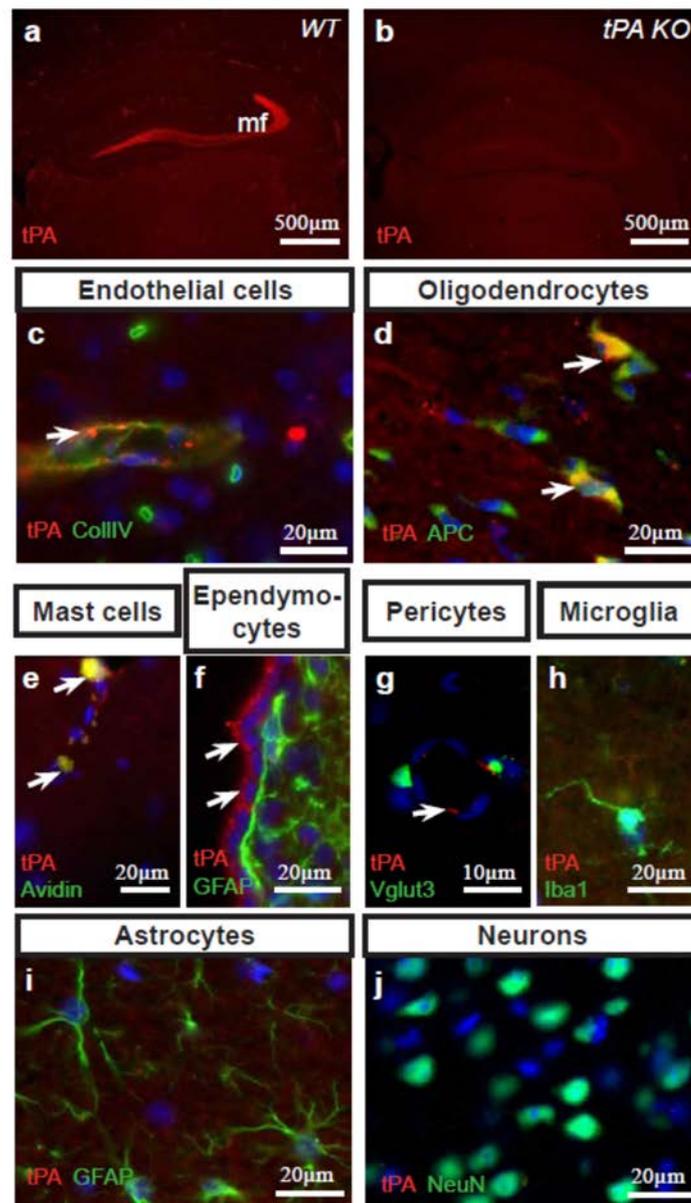


Figure 1: Cell type specificity of tPA expression in the adult mouse brain.

Specificity of tPA immunostainings (a-b ; red). Whereas no immunoreactivity was detected in the mossy fiber (mf) of adult tPA knock-out (tPA KO) mouse (b), positive immunostaining was revealed in adult wild type (WT) mouse (a). Localization of tPA immunoreactivity (tPA-ir) in CNS cells (c-j). Double immunofluorescent stainings performed with an antibody raised against tPA (red) in combination with a set of antibodies specific of each cell type analysed (green). tPA-ir was observed in endothelial cells with the basal lamina revealed with an antibody raised against coll-IV (c and g ; arrows), in mature oligodendrocytes also positive for APC (d ; arrows), in mast cells stained by avidin-FITC (e ; arrows) and ependymocytes underlying ventricles (f ; arrows). tPA-ir was absent in vGlut3 positive pericytes (g), in Iba1 positive microglial cells (h), in GFAP Positive astrocytes (f and i) and in NeuN positive neurons (j). Dapi (blue) was used to reveal nuclei. (c-j).

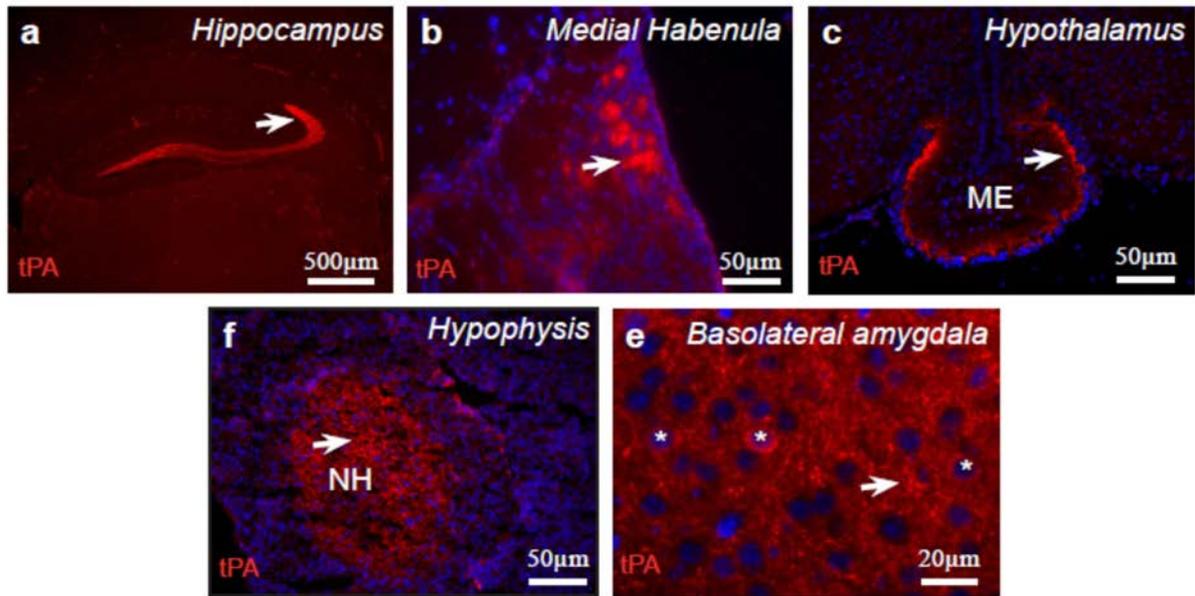


Figure 2: Expression of tPA in different areas of the adult mouse brain.

tPA-ir (red) was observed in the mossy fibers of the hippocampus (a ; arrow), in fibers of the medial habenula (b ; arrow), in fibers of the median eminence of the hypothalamus (c ; arrow), in fibers of the neurohypophysis (NH)(d ; arrow) and in fibers (arrow) and some neuronal cell bodies (stars) of the basolateral amygdala (d). Dapi (blue) was used to reveal nuclei (b-e).

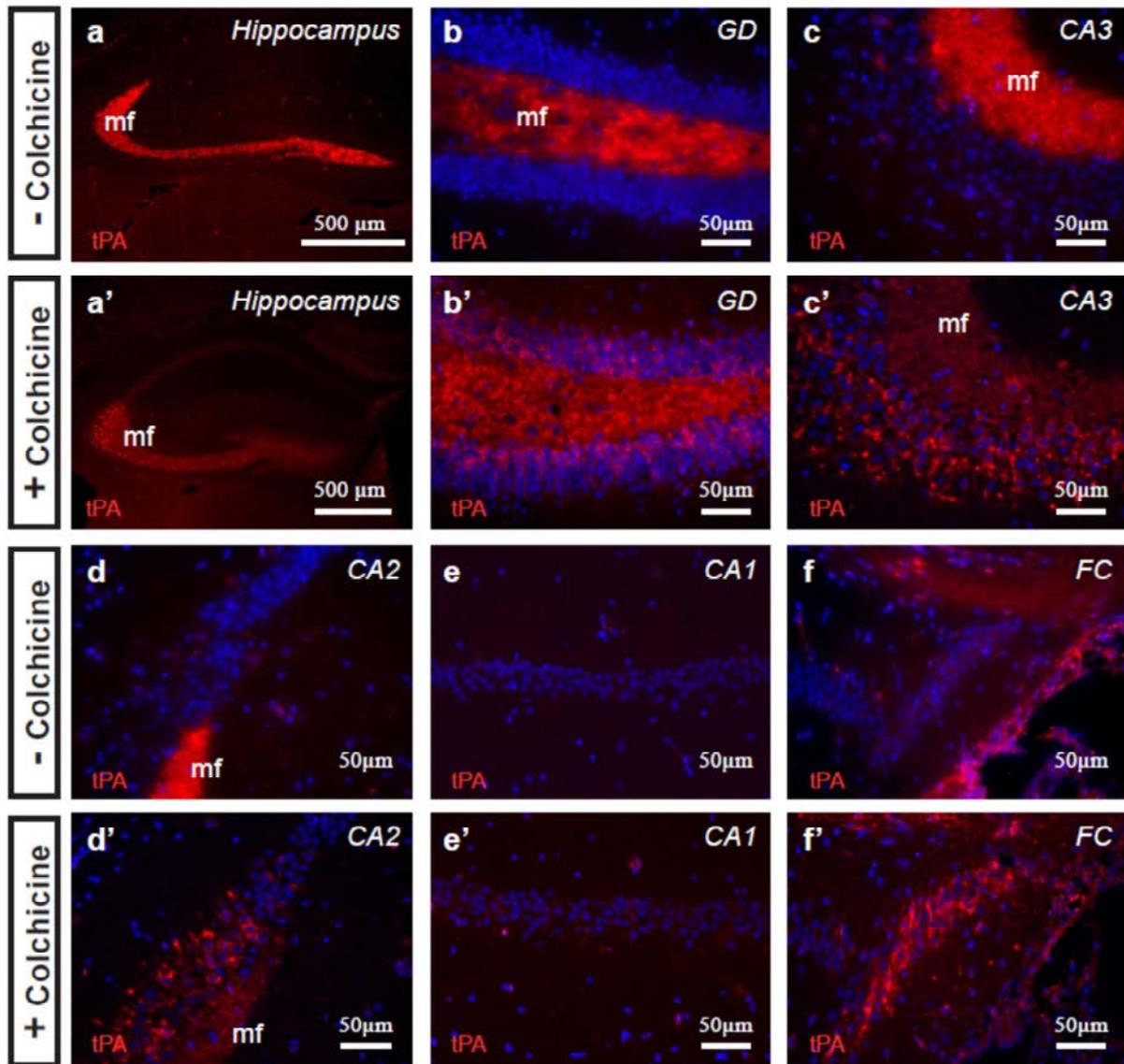


Figure 3: In vivo blockage of the axo-dendritic transport unmasks tPA positive neurons in adult mouse hippocampi.

Immunohistochemistry for tPA performed on hippocampal brain sections from untreated mice (a-f) revealed tPA-ir (red) only in mossy fibers (a). In the mossy fibers pathway, tPA-ir was observed from the hilus region of the dentate gyrus (DG) to the CA3 subfield. tPA-ir was absent in granular neurons of the DG (b), in pyramidal neurons of CA3 (c), CA2 (d) CA1 (e) and in neurons of the fasciola cinerea (FC ; f). Immunohistochemistry for tPA performed on hippocampal brain sections from colchicine treated mice (a'-f') revealed a decreased tPA-ir in the mossy fibers pathway (a'), a positive tPA-ir in somata of neurons throughout the hippocampal regions, in the granular neurons of the DG (b'), in the pyramidal cell layer of the cornus ammonis in regions 1 to 3 (CA1-3 ; c'-e'), and in neurons of the fasciola cinerea (FC ; f'). Dapi (blue) was used to reveal nuclei (b-f and b'-f').

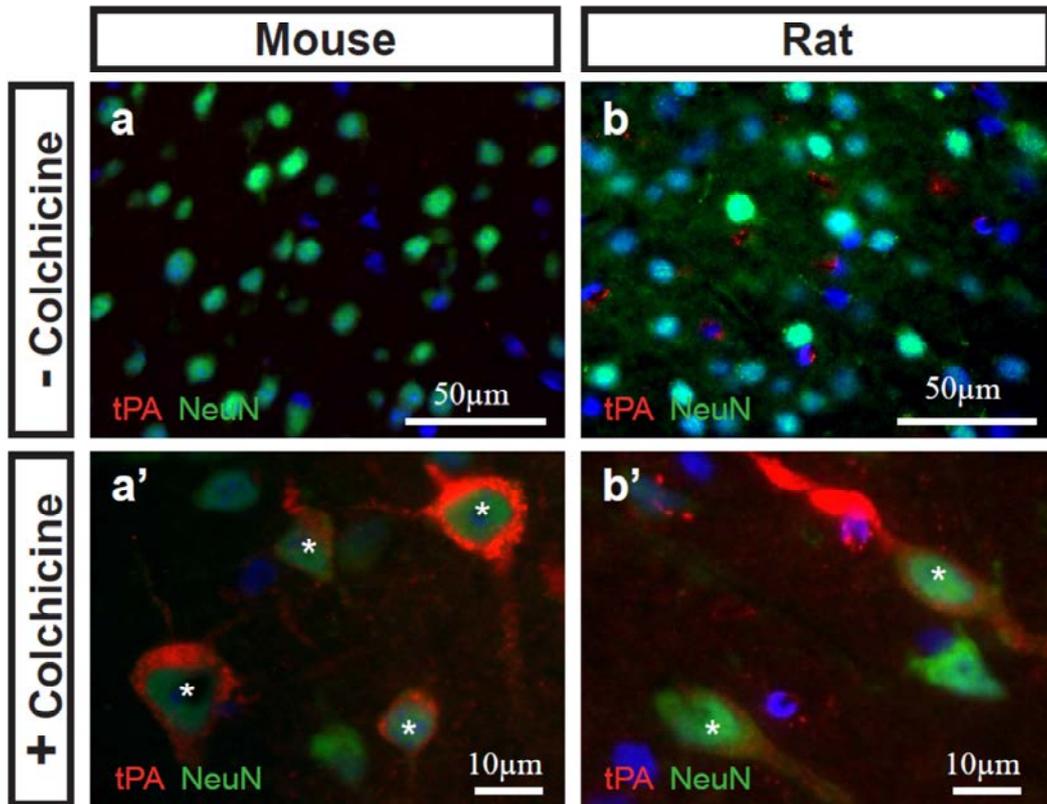


Figure 4: In vivo blockage of the axo-dendritic transport unmasks tPA positive cortical neurons in both mice and rats.

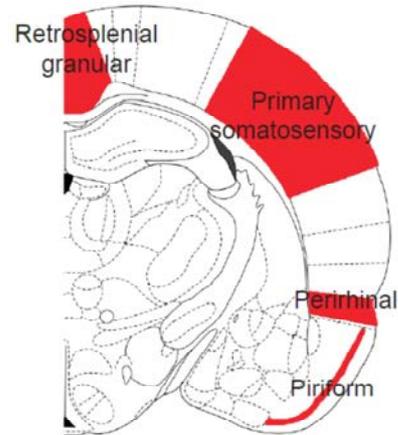
Double immunofluorescent staining with the tPA antibody (red) and NeuN antibody (green). No tPA-ir was detected in cortical neurons of untreated mice (a) and rats (b). In contrast, tPA-ir became positive in the soma of cortical neurons (stars) from colchicine treated mice (a') and rats (b'). Dapi (blue) was used to reveal nuclei.

+ Colchicine

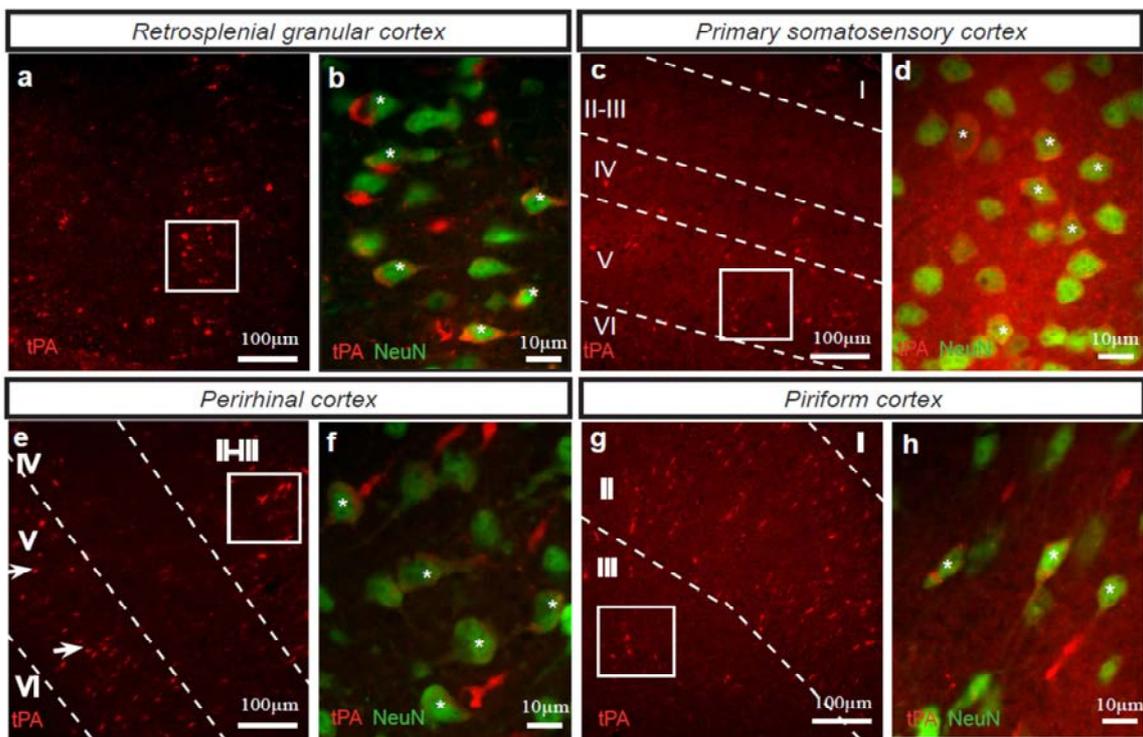
A

Cortical areas	mouse	rat
Retrosplenial	+	+
Somatosensory	+	+
Perirhinal and Entorhinal	+	+
Auditory	+	+
Temporal	+	+
Olfactif	+	+
Infralimbique	+	+
Piriform	+	+
Cingulate	+	+

B



C



D

Cortical areas	% of tPA-ergic neurons (total number of neurons counted)
Retrosplenial granular	12% (8648)
Primary somatosensory	10% (12015)
Perirhinal	14% (3511)
Piriform	14% (4600)

Figure 5: Distribution of tPA positive neurons in cortical areas.

A. Immunohistochemistry performed on cortical sections from colchicine treated mice and rats revealed tPA positive neurons in retrosplenial, somatosensory, perirhinal, ecto-rhinal, auditory, temporal, olfactory, infralimbic and cingulate cortices. B. Schematic representation of cortical areas. Localization of the retrosplenial granular, the primary somatosensory, the perirhinal and the piriform cortices in which we illustrated the distribution of tPA positive neurons (red). C. Distribution of tPA-positive neurons unmasked by colchicine treatment in 4 different cortical areas. Distribution of tPA-ir (red) was shown at low magnification (a, c, e, g) and high magnification (b, d, f, h). In retrosplenial granular cortex, tPA-ir was observed in neurons of layers II-III (a and b (stars)). In primary somatosensory cortex, tPA-ir was observed in layers II-III, V and VI (c and d (stars)). In perirhinal cortex tPA-ir was observed in layer II-III (e and f (stars)) and V (e (arrows)). In piriform cortex tPA-ir was observed in layers II-III (g and h (stars)) (These areas are localised in C.). NeuN (green) was used to reveal neuronal cell bodies (b,d,f,h). D. Percentage of tPA positive neurons in different cortical areas of colchicine-treated adult rats. 12% of neurons in the retrosplenial cortex express tPA (1037/8648 counted). 10% of neurons in the primary somatosensory cortex express tPA (1201/12015 counted). 14% of neurons in the perirhinal cortex express tPA (491/3511 counted). 14% of neurons in the piriform cortex express tPA (644/4600 counted).

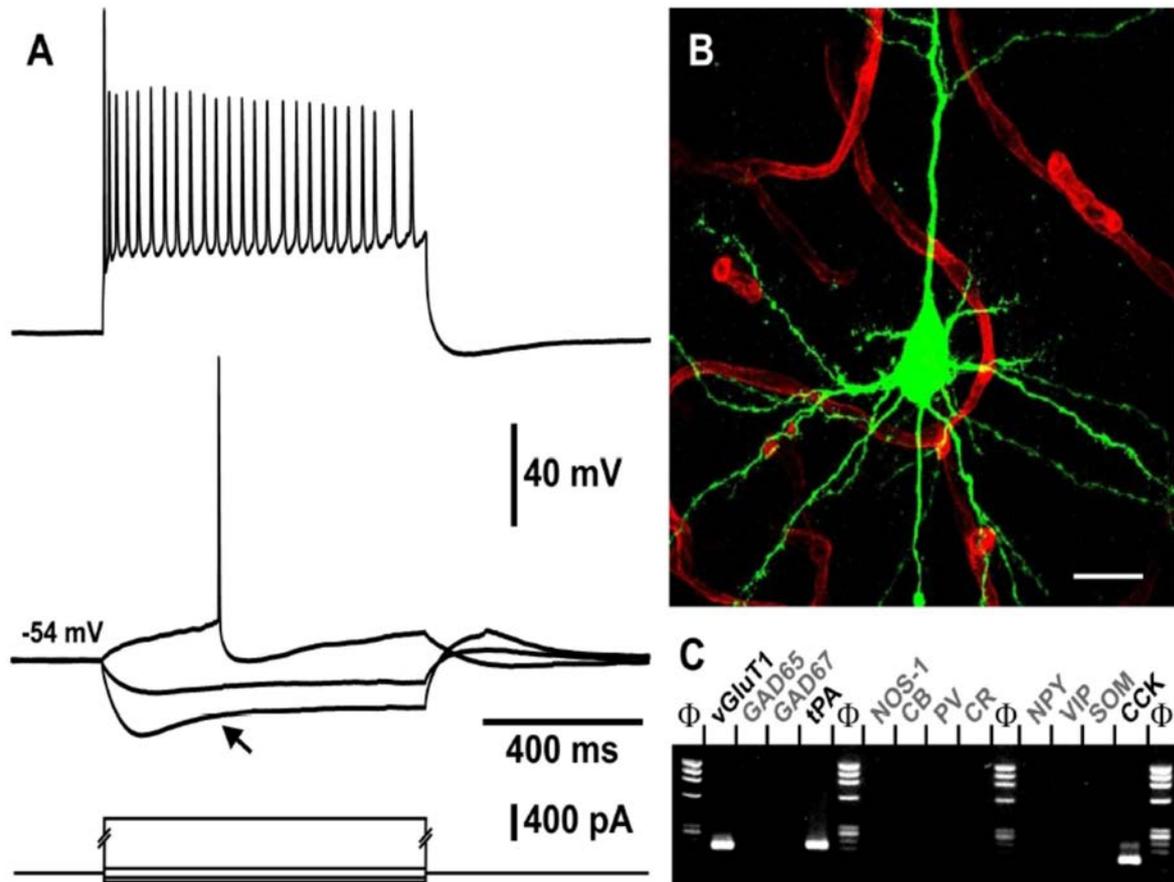


Figure 6: Electrophysiological, morphological and molecular characterization of tPA-expressing layer V pyramidal cell.

A. Voltage responses induced by injection of current pulses (bottom traces) of -100, -50, +20 and +500 pA. Note the pronounced voltage sag after the initial peak response to hyperpolarizing current pulses (middle traces, arrow). In response to just-above-threshold current pulse (+20 pA), this neuron fired a long duration action potential with a long lasting biphasic AHP (middle trace). Near saturation (+500 pA) this neuron showed the typical firing of a regular spiking neuron with marked frequency adaptation and amplitude accommodation of action potentials (upper trace). B. Confocal image of the recorded pyramidal cell shown in A (biocytin labelling; green) located in the vicinity of parenchymal capillaries (immuno detected for collagen IV; red). Note the pyramidal shaped soma with spiny dendrites (scale bar: $yy \mu\text{m}$). (C) scRT-mPCR analysis showing expression of tPA, Vglut1 (vesicular glutamate transporter 1) and CCK (cholecystokinin) mRNAs in this pyramidal cell.

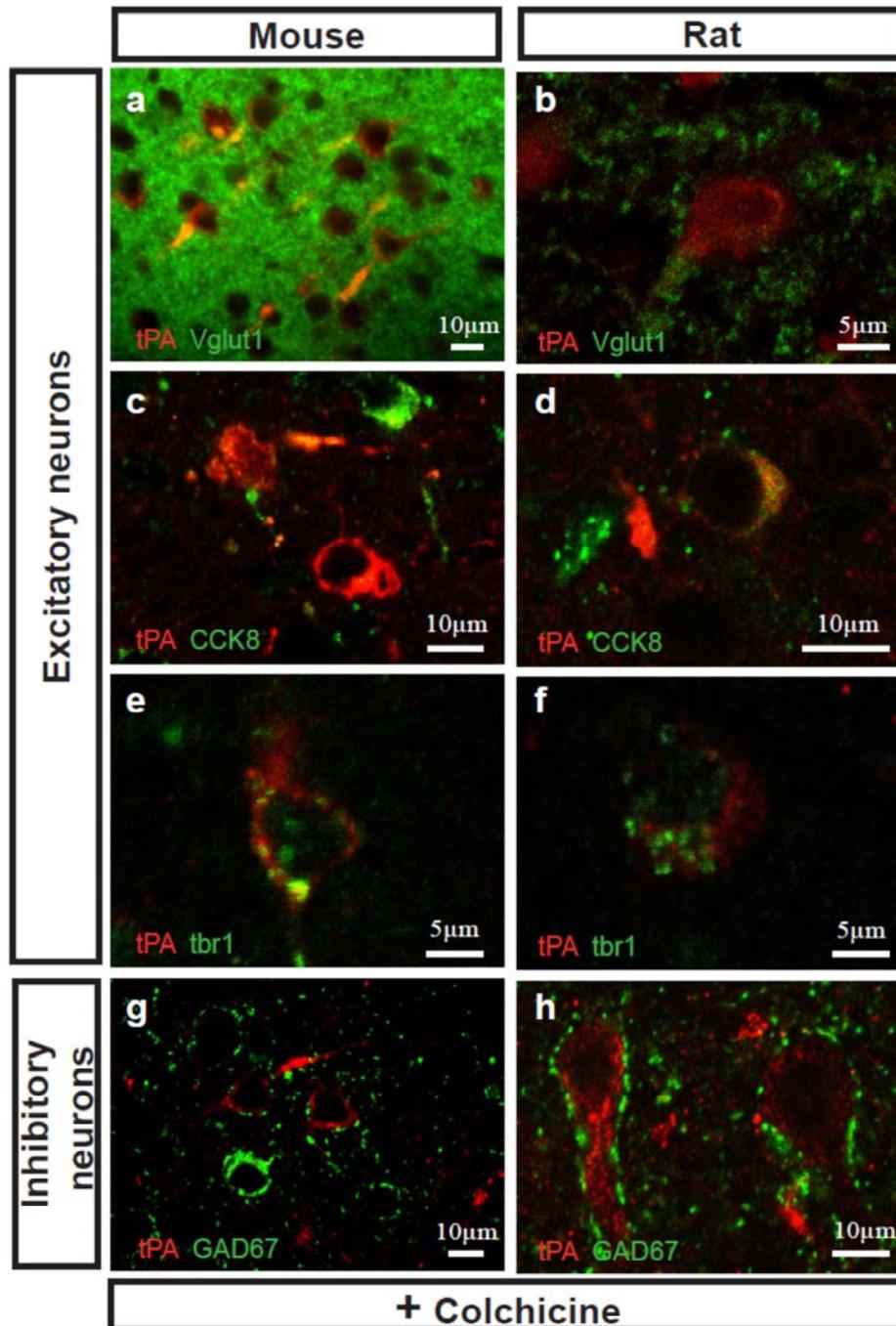


Figure 7: Apparent expression of tPA in glutamatergic neurons in mice and rats.

tPA-ir was observed in mice (a, c, e, g) and rats (b, d, f, h)) excitatory neurons. Double immunofluorescence stainings were performed using an antibody raised against tPA (red) and a set of antibodies characteristic of excitatory neurons [Vesicular glutamate transporter 1 antibody (Vglut 1 ; a and b ; in green), cholecystokinin antibody (CCK8 ; c and d ; in green) and T-box brain 1 antibody (tbr1 ; e and f ; in green)] or inhibitory neurons [GABA-synthesizing enzymes glutamic acid decarboxylase-67 (GAD67 ; g and h ; in green)]. In mice and rats, tPA-ir (arrows) was observed in excitatory: Vglut1 positive neurons (a and b), CCK8 positive neurons (c and d) and tbr1 positive neurons (e and f). tPA-ir was absent in inhibitory GAD67 positive neurons (g and h).

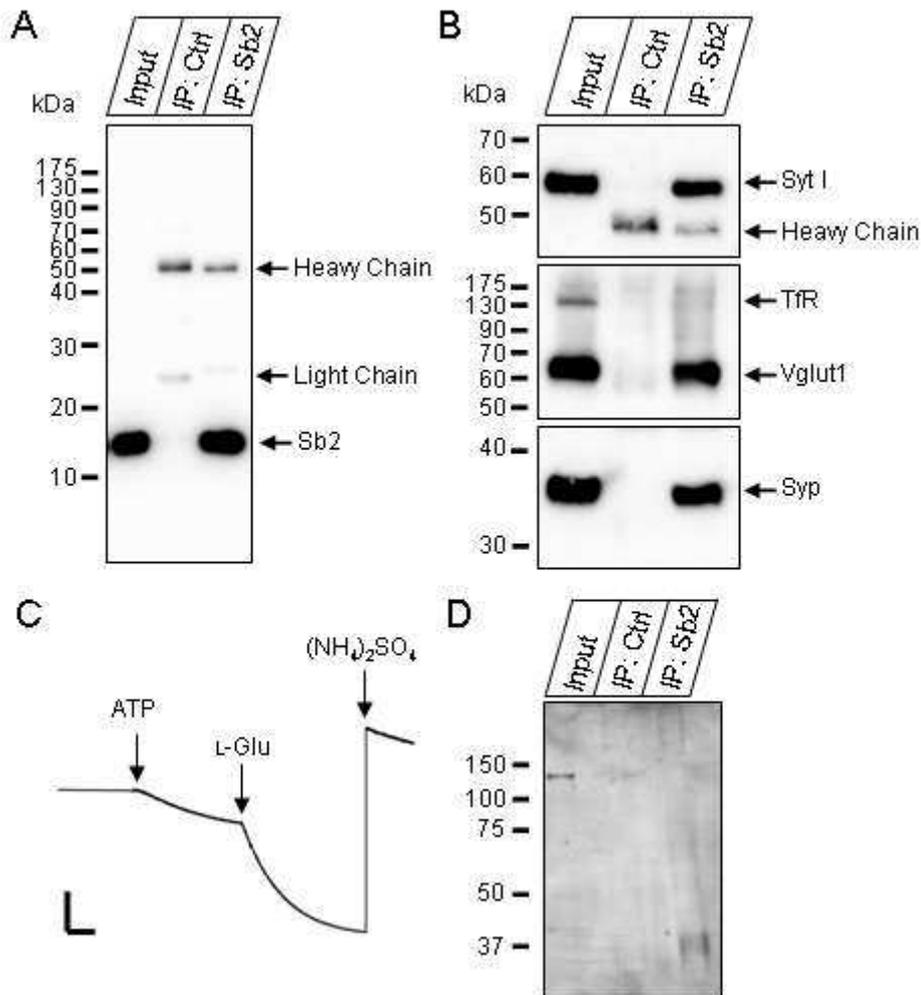


Figure 8: tPA was localized in synaptobrevin-2 synaptic vesicles.

A. Immuno-isolation of Sb2-containing vesicles. Input, starting material (brain supernatant); IP, bead-bound fraction; Ctrl, control performed with non-immune IgG. Equal proportion of each sample was loaded to allow direct comparison. Light and heavy chains correspond to light and heavy chains of the Sb2 antibody. B. Brain supernatant and bead-bound material were immunoblotted for synaptotagmin I (Syt I), transferrin receptor (TfR), Vglut1, synaptophysin (Syp). C. Photometric trace showing the acidification of SVs induced by glutamate (XX mM). Scale bar, XXX D. Brain supernatant and bead-bound material were immunoblotted for tPA. tPA are more present in Sb2 vesicles.

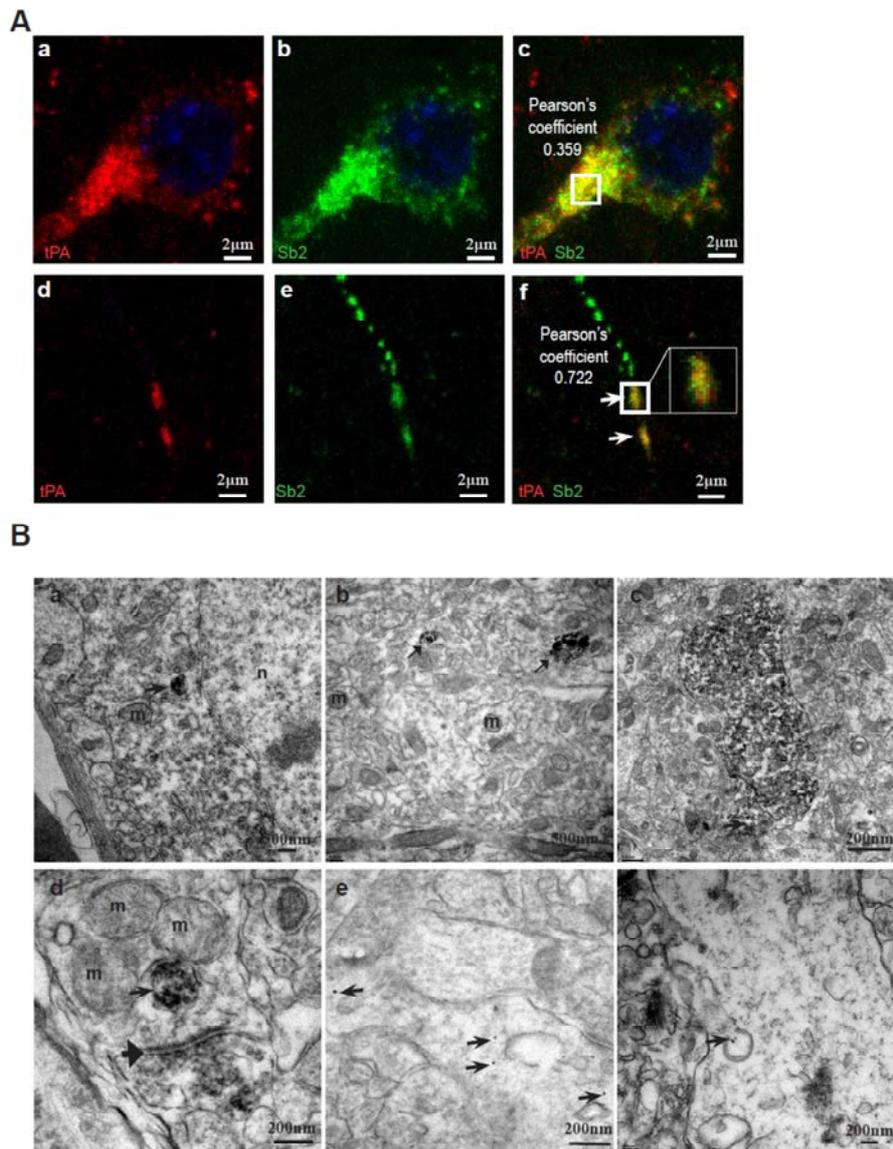


Figure 9: Subcellular localization of neuronal tPA

A. Subcellular localization of tPA-ir in cortical neurons of colchicine treated mice (a-e) and in a mossy fiber of untreated mice (f). Representative electron micrographs of tPA preembedding immunocytochemistry using the peroxidase (a-d) or immunogold methods (e and f) in cortical pericycarya (a), fibers (b, c, e and f) and synapses (d). a: Low magnification showing a neuronal somata with diffuse cytoplasmic DAB precipitates associated with a large vesicular organelle (arrow). b: Two immunoreactive nerve fibers illustrating tPA positive cortical neurons from colchicine treated animals (arrows). c: Typical immunoreactive swelling processes observed because of colchicine treatment showing numbers of positive cytoplasmic immunostainings and e: Cortical nerve fibers displaying 12nm gold particles not associated with particular organelle in cortical and hippocampal mossy fibers . n= nucleus ; m= mitochondria. B. Double immunofluorescent stainings revealed with an anti- tPA antibodies (Ba, c, d, f ; red) and an anti-synapobrevin-2 (Sb2) antibodies (Bb, c, e, f ; green). tPA-ir were closely associated with Sb2-ir in cortical neuronal cell bodies (c ; yellow) and corresponding fiber traks (f ; yellow). Colocalization of tPA-ir and Sb2-ir (yellow c and f) was confirmed by Pearson's coefficient, respectively 0.359 and 0.722.

Cell type	Mouse	Rat
Endothelial cells	+	+
Oligodendrocytes	+	+
Mast cells	+	+
Ependymocytes	+	+
Pericytes	-	-
Microglial cells	-	-
Astrocytes	-	-
Cortical neurons	-	-
Hippocampal neurons (mossy fiber)	+	-
Hippocampal neurons (cell body)	-	-

Table 3: Summary of the tPA-ir in CNS cells of mice and rats.

In both mice and rats, tPA-ir was observed in endothelial cells, oligodendrocytes, mast cells and ependymocytes. No tPA-ir was detected in pericytes, microglial cells, astrocytes, hippocampal and cortical neuronal cell bodies. tPA-ir was observed in the mossy fiber pathway of mice whereas no immunoreactivity was detected in the rat mossy fiber pathway.

BIBLIOGRAPHIE

Adhami, F. et al., 2008. Deleterious effects of plasminogen activators in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *The American journal of pathology*, 172(6), pp.1704–16.

ASTRUP, T. & STAGE, A., 1952. Isolation of a soluble fibrinolytic activator from animal tissue. *Nature*, 170(4335), p.929.

Baranes, D. et al., 1998. Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron*, 21, pp.813–825.

Baron, a et al., 2010. NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell death and differentiation*, 17(5), pp.860–71.

Benchenane, K. et al., 2005. Tissue-type plasminogen activator crosses the intact blood-brain barrier by low-density lipoprotein receptor-related protein-mediated transcytosis. *Circulation*, 111(17), pp.2241–9.

Bennur, S. et al., 2007. Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience*, 144(1), pp.8–16.

Bochet, P. et al., 1994. Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of a glutamate-gated channel. *Neuron*, 12(2), pp.383–388.

Bruno, M.A. & Cuello, A.C., 2006. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), pp.6735–40.

Bruno, M.A. & Cuello, A.C., 2012. Cortical peroxynitration of nerve growth factor in aged and cognitively impaired rats. *Neurobiology of aging*, 33(9), pp.1927–37.

Bukhari, N. et al., 2011. Axonal regrowth after spinal cord injury via chondroitinase and the tissue plasminogen activator (tPA)/plasmin system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(42), pp.14931–43.

Cassé, F. et al., 2012. Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(15), pp.5186–99.

Castorina, A. et al., 2013. Dopamine D3 receptor deletion increases tissue plasminogen activator (tPA) activity in prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 250, pp.546–56.

Cauli, B. et al., 1997. Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(10), pp.3894–906.

Centonze, D. et al., 2002. Tissue plasminogen activator is required for corticostriatal long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience*, 16(4), pp.713–721.

Cho, K.S. et al., 2013. Valproic acid induces astrocyte-dependent neurite outgrowth from cultured rat primary cortical neuron via modulation of tPA/PAI-1 activity. *Glia*, 61(5), pp.694–709.

Connors, B.W. & Gutnick, M.J., 1990. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends in neurosciences*, 13(3), pp.99–104.

Correa, F. et al., 2011. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *The Journal of experimental medicine*, 208(6), pp.1229–42.

Crippa, D. et al., 2006. Synaptobrevin2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *The Journal of physiology*, 570(Pt 3), pp.567–82.

Docagne, F. et al., 1999. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins/t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13(11), pp.1315–24.

Dostál, V. & Libusová, L., 2014. Microtubule drugs: action, selectivity, and resistance across the kingdoms of life. *Protoplasma*.

Echeverry, R. et al., 2010. Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *Neurology*, 120(6).

Edelmann, L. et al., 1995. Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *The EMBO journal*, 14(2), pp.224–31.

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Benchenane, K., Cacquevel, M., et al., 2004. Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*, 279(49), pp.50850–6.

Fernández-Monreal, M., López-Atalaya, J.P., Benchenane, K., Léveillé, F., et al., 2004. Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Molecular and cellular neurosciences*, 25(4), pp.594–601.

Gallopín, T. et al., 2006. Cortical sources of CRF, NKB, and CCK and their effects on pyramidal cells in the neocortex. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 16(10), pp.1440–52.

García-Rocha, M., Avila, J. & Armas-Portela, R., 1994. Tissue-type plasminogen activator (tPA) is the main plasminogen activator associated with isolated rat nerve growth cones. *Neuroscience Letters*, 180(2), pp.123–126.

Gorter, J.A. et al., 2007. Dynamic changes of proteases and protease inhibitors revealed by microarray analysis in CA3 and entorhinal cortex during epileptogenesis in the rat. *Epilepsia*, 48 Suppl 5, pp.53–64.

Gualandris, A. et al., 1996. Membrane Depolarization Induces Calcium-Dependent Tissue Plasminogen Activator Secretion of Tissue Plasminogen activator. *Journal of neuroscience*, 16(7), pp.2220–2225.

Herz, J. & Strickland, D.K., 2001. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *The Journal of clinical investigation*, 108(6), pp.779–84.

Hevner, R.F. et al., 2001. Tbr1 Regulates Differentiation of the Preplate and Layer 6. *Neuron*, 29(2), pp.353–366.

Hultman, K. et al., 2008. Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 6(10), pp.1796–803.

Jahn, R. & Fasshauer, D., 2012. Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), pp.201–7.

- Joo, S.H. et al., 2010. Regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by alpha-synuclein in rat primary glial cells. *Neuroscience letters*, 469(3), pp.352–6.
- Kalderon, N., Ahonen, K. & Fedoroff, S., 1990. Developmental transition in plasticity properties of differentiating astrocytes: age-related biochemical profile of plasminogen activators in astroglial cultures. *Glia*, 3(5), pp.413–26.
- Karagiannis, A. et al., 2009. Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(11), pp.3642–59.
- Kim, J.W. et al., 2011. Biphasic regulation of tissue plasminogen activator activity in ischemic rat brain and in cultured neural cells: essential role of astrocyte-derived plasminogen activator inhibitor-1. *Neurochemistry international*, 58(3), pp.423–33.
- Kose, N. et al., 2007. Regular Article Altered Expression of Basement Membrane-related Molecules in Rat Brain Pericyte , Endothelial , and Astrocyte Cell Lines after Transforming Growth Factor- b 1 Treatment. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 22(4), pp.255–266.
- Krystosek, A. & Seeds, N., 1981. Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science*, 213(September), pp.1532–1534.
- Lambolez, B. et al., 1992. AMPA receptor subunits expressed by single purkinje cells. *Neuron*, 9(2), pp.247–258.
- Ledesma, M.D. et al., 2003. Raft disorganization leads to reduced plasmin activity in Alzheimer's disease brains. *EMBO reports*, 4(12), pp.1190–6.
- Lee, H.-Y. et al., 2007. Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. *Journal of neurochemistry*, 101(5), pp.1236–47.
- Lemarchant, S. et al., 2014. tPA promotes ADAMTS-4-induced CSPG degradation, thereby enhancing neuroplasticity following spinal cord injury. *Neurobiology of disease*, 66C, pp.28–42.
- Levin, E.G., Santell, L. & Osborn, K.G., 1997. The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *Journal of cell science*, 110 (Pt 2), pp.139–48.
- Li, J. et al., 2013. Tissue plasminogen activator regulates Purkinje neuron development and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), pp.E2410–9.
- Lochner, J.E. et al., 2008. Efficient copackaging and cotransport yields postsynaptic colocalization of neuromodulators associated with synaptic plasticity. *Developmental neurobiology*, 68(10), pp.1243–56.

- Lochner, J.E. et al., 1998. Real-time imaging of the axonal transport of granules containing a tissue plasminogen activator/green fluorescent protein hybrid. *Molecular biology of the cell*, 9(9), pp.2463–76.
- Ludwig, R. et al., 1996. Metabolism of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide by cultivated neurons and glial cells. *Brain research. Molecular brain research*, 37(1-2), pp.181–91.
- Madani, R. et al., 1999. Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *The EMBO journal*, 18(11), pp.3007–12
- Martineau, M. et al., 2008. Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission. *Glia*, 56(12), pp.1271–84.
- Mascagni, F. & McDonald, A.J., 2003. Immunohistochemical characterization of cholecystokinin containing neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Research*, 976(2), pp.171–184.
- Mataga, N., Mizuguchi, Y. & Hensch, T.K., 2004. Experience-dependent pruning of dendritic spines in visual cortex by tissue plasminogen activator. *Neuron*, 44(6), pp.1031–41.
- Matys, T. & Strickland, S., 2003. Tissue plasminogen activator and NMDA receptor cleavage. *Nature medicine*, 9(4), pp.371–2; author reply 372–3.
- McCormick, D.A. et al., 1985. Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *Journal of neurophysiology*, 54(4), pp.782–806.
- Melchor, J.P., Pawlak, R. & Strickland, S., 2003. The tissue plasminogen activator-plasminogen proteolytic cascade accelerates amyloid-beta (A β) degradation and inhibits A β -induced neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(26), pp.8867–71.
- Melchor, J.P. & Strickland, S., 2005. Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Molecular Medicine*, pp.655–660.
- Müller, C.M. & Griesinger, C.B., 1998. Tissue plasminogen activator mediates reverse occlusion plasticity in visual cortex. *Nature neuroscience*, 1(1), pp.47–53.
- Nagai, N. et al., 1999. Neuronal degeneration and a decrease in laminin-like immunoreactivity is associated with elevated tissue-type plasminogen activator in the rat hippocampus after kainic acid injection. *Neuroscience Research*, 33(2), pp.147–154.
- Nicole, O. et al., 2001. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nature medicine*, 7(1), pp.59–64.
- Obiang, P. et al., 2012. GluN2D subunit-containing NMDA receptors control tissue plasminogen activator-mediated spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(37), pp.12726–34.

- Pang, P.T. et al., 2004. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5695), pp.487–91.
- Park, Y. & Kim, K.-T., 2009. Short-term plasticity of small synaptic vesicle (SSV) and large dense-core vesicle (LDCV) exocytosis. *Cellular signalling*, 21(10), pp.1465–70.
- Pawlak, R. et al., 2005. Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive functions in the mouse hippocampus. *Sciences-New York*, 102(50), pp.18201–18206.
- Pawlak, R. et al., 2003. Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior CA. *In Situ*, 6(2).
- Pittman, R.N., Ivins, J.K. & Buettner, H.M., 1989. Neuronal plasminogen activators: cell surface binding sites and involvement in neurite outgrowth. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 9(12), pp.4269–86.
- Polavarapu, R. et al., 2007. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood*, 109(8), pp.3270–8.
- Rijken, D.C. et al., 1979. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica et biophysica acta*, 580(1), pp.140–53.
- Rodier, M. et al., 2014. Exogenous t-PA Administration Increases Hippocampal Mature BDNF Levels. Plasmin- or NMDA-Dependent Mechanism? *PloS one*, 9(3), p.e92416.
- Roussel, B.D. et al., 2009. Age and albumin D site-binding protein control tissue plasminogen activator levels: neurotoxic impact. *Brain : a journal of neurology*, 132(Pt 8), pp.2219–30.
- Salles, F.J. & Strickland, S., 2002. Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(6), pp.2125–34.
- Samson, A.L. et al., 2008. Tissue-type plasminogen activator requires a co-receptor to enhance NMDA receptor function. *Journal of neurochemistry*, 107(4), pp.1091–101.
- Samson, A.L. & Medcalf, R.L., 2006. Tissue-Type Plasminogen Activator : Minireview A Multifaceted Modulator of Neurotransmission and Synaptic Plasticity. *Neuron*, pp.673–678.
- Schreiber, S.S. et al., 1998. Immunohistochemical localization of tissue plasminogen activator in vascular endothelium of stroke-prone regions of the rat brain. *Neurosurgery*, 43(4), pp.909–13.
- Seeds, N., Williams, B. & Bickford, P., 1995. Tissue plasminogen activator induction in Purkinje neurons after cerebellar motor learning. *Science*, 270(December), pp.1–3.
- Shin, C.Y., Kundel, M. & Wells, D.G., 2004. Rapid, activity-induced increase in tissue plasminogen activator is mediated by metabotropic glutamate receptor-dependent mRNA

translation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(42), pp.9425–33.

Siao, C.-J., Fernandez, S.R. & Tsirka, S.E., 2003. Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(8), pp.3234–42.

Siao, C.-J. & Tsirka, S.E., 2002. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(9), pp.3352–8.

Siconolfi, L.B. & Seeds, N.W., 2003. Mice lacking tissue plasminogen activator and urokinase plasminogen activator genes show attenuated matrix metalloproteases activity after sciatic nerve crush. *Journal of neuroscience research*, 74(3), pp.430–4

Sillaber, C. et al., 1999. The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(2), pp.1032–41.

Stanić, D. et al., 2011. Characterization of NPY Y2 receptor protein expression in the mouse brain. II. Coexistence with NPY, the Y1 receptor, and other neurotransmitter-related molecules. *The Journal of comparative neurology*, 519(7), pp.1219–57.

Tabengwa, E.M. et al., 2002. Alcohol-Induced Up-Regulation of Fibrinolytic Activity and Plasminogen Activators in Human Monocytes. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(8), pp.1121–1127.

Tanswell, P. et al., 1989. Pharmacokinetics and systemic effects of tissue-type plasminogen activator in normal subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 46(2), pp.155–62.

Teesalu, T., Kulla, A. & Simisker, A., 2004. Tissue plasminogen activator and neuroserpin are widely expressed in the human central nervous system. *THROMBOSIS AND*, pp.358–368.

Tobin, V. et al., 2012. Expression of exocytosis proteins in rat supraoptic nucleus neurones. *Journal of neuroendocrinology*, 24(4), pp.629–41.

Tsirka, S. & Gualandris, A., 1995. Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature Publishing Group*, pp.340–344.

Tsirka, S. & Rogove, A., 1997. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus.

Valent, P. et al., 2002. New aspects in thrombosis research: possible role of mast cells as profibrinolytic and antithrombotic cells. *Thrombosis and haemostasis*, 87(5), pp.786–90.

Wang, Y.F. et al., 1998. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nature medicine*, 4(2), pp.228–31.

- Ware, J., Dibenedetto, A. & Pittman, R., 1995. Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain. *Brain research bulletin*, 37(3), pp.275–281.
- Wu, F. et al., 2013. Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Molecular and cellular neurosciences*, 52, pp.9–19.
- Xin, H. et al., 2010. Increasing tPA activity in astrocytes induced by multipotent mesenchymal stromal cells facilitate neurite outgrowth after stroke in the mouse. *PLoS One*, 5(2).
- Yamamoto, C. et al., 2005. Selective promotion of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by activation of proteinase-activated receptor-1 in cultured human brain microvascular pericytes: comparison with endothelial cells. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 28(2), pp.208–11.
- Yepes, M. et al., 2009. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends in neurosciences*, 32(1), pp.48–55.
- Yepes, M. et al., 2003. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor – related protein. *Journal of Clinical Investigation*, 112(10), pp.1533–1540.
- Yepes, M. & Lawrence, D.A., 2004. Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? *Trends in cardiovascular medicine*, 14(5), pp.173–80.
- Zhang, C. et al., 2009. Microglial low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates the effect of tissue-type plasminogen activator on matrix metalloproteinase-9 activity in the ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(12), pp.1946–54.
- Zhang, X. et al., 2007. Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein mediate cerebral ischemia-induced nuclear factor-kappaB pathway activation. *The American journal of pathology*, 171(4), pp.1281–90.
- Zhuo, M. et al., 2000. Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20(2), pp.542–9.
- Zlokovic, B. V et al., 1995. Expression of tissue plasminogen activator in cerebral capillaries: possible fibrinolytic function of the blood-brain barrier. *Neurosurgery*, 37(5), pp.955–961.

Discussions

« Il faut prendre conscience de l'apport d'autrui, d'autant plus riche que la différence avec soi-même est plus grande »

Albert Jacquard

Eloge de la différence : la génétique et les hommes, 1981

L'ensemble des résultats présentés ici a permis d'éclaircir l'identité, la source et les cibles des prostanoïdes vasodilatateurs, de montrer l'importance du lactate comme source énergétique des neurones et de localiser le *tissue plasminogen activator* dans les neurones glutamatergiques du cortex. Cependant, l'ensemble de ces résultats doivent être remis dans un contexte plus global et donc plus complexe. La partie suivante fera état d'une mise en perspective de ces données avec la littérature actuelle.

A. Origines et cibles des prostanoïdes vasodilatateurs dans le néocortex de rongeurs

Les données de cet article ont pu confirmer que la COX-2 est essentielle dans les réponses vasculaires du cortex (Niwa et al., 2000;Lecrux et al., 2011). Nous avons pu identifier que les neurones pyramidaux expriment constitutivement la COX-2 et sont la source principale des prostanoïdes vasodilatateurs PGE₂ et, dans une moindre mesure, PGI₂. Nous avons aussi démontré le rôle primordial de la PGE₂ dans les vasodilatations via les récepteurs EP2 et EP4. De plus, la stimulation optogénétique des neurones pyramidaux nous a permis d'observer l'implication des neurones pyramidaux à COX-2 dans les réponses vasodilatatrices obtenues.

I. Origine cellulaire de la PGE₂ et de la PGI₂

Nos données ont montré une expression constitutive et majoritaire de la COX-2 dans une sous-population de neurones pyramidaux. La COX-2 est pratiquement absente des astrocytes (5%) et indétectable dans les vaisseaux, confirmant les données de la littérature (Yamagata et al., 1993;Breder et al., 1995;Kaufmann et al., 1996;Wang et al., 2005;Takano et al., 2006;Gordon et al., 2008;Cahoy et al., 2008;Lecrux et al., 2011). Concernant l'expression de la COX-1, nos observations ont confirmé une distribution homogène de cette isoforme des COXs dans les neurones et les astrocytes (Breder et al., 1995;Li et al., 1993;Takano et al., 2006;Gordon et al., 2008). De plus, cette enzyme est également présente au niveau de la microglie et des cellules endothéliales (Yermakova et al., 1999;Kis et al., 2003;Tang and Vanhoutte, 2008;Lecrux et al., 2011).

La forme microsomale de type 2 et la forme cytosolique de la PGES ont principalement été détectées dans les neurones, en accord avec différents auteurs (Sang et al., 2005;Cahoy et al., 2008;Chaudhry et al., 2010;Chaudhry and Dore, 2009). De plus, la PGIS est observée dans les astrocytes et les neurones mais dans des proportions faibles (Mehl et al., 1999;Cahoy et al., 2008). La localisation de la COX-2 dans les neurones pyramidaux ainsi que l'expression préférentielle d'isoformes de la PGES dans ces cellules suggèrent que la PGE₂ issue de l'activité de la COX-2 est le principal prostanoïde vasodilatateur produit par les neurones pyramidaux. De plus, l'expression de la COX-1 et des enzymes de la PGES dans les

astrocytes indiquent également que ces cellules sont capables de produire de la PGE₂ via l'activité de la COX-1 (Bishai and Coceani, 1992;Takano et al., 2006).

Les astrocytes sont capables de libérer des prostanoides vasodilatateurs par activation des récepteurs métabotropiques du glutamate et par augmentation de la concentration en calcium intracellulaire (Zonta et al., 2003;Takano et al., 2006;Gordon et al., 2008). Cependant, cette libération est dépendante de l'activité de la COX-1, mais pas de la COX-2. Au contraire, la stimulation sensorielle induit une réponse hyperémique uniquement par la voie COX-2 (Niwa et al., 2000;Niwa et al., 2001;Bakalova et al., 2002;Lecrux et al., 2011). Ces résultats suggèrent que les prostanoides issus des astrocytes ne sont pas impliqués dans les réponses vasculaires induites par stimulations sensorielles. Récemment, l'implication des récepteurs métabotropiques du glutamate a même été discutée (Calcinaghi et al., 2011;Sun et al., 2013;Nizar et al., 2013).

L'activation des récepteurs du NMDA est connue pour être impliquée dans les réponses vasculaires initiées par des stimulations sensorielles (Gsell et al., 2006;Lecrux et al., 2011). De plus, cette activation induit également une libération des prostanoides vasodilatateurs PGE₂ et PGI₂ (Lazarewicz and Salinska, 1995;Pepicelli et al., 2005). Nos données ont mis en évidence que les vasodilatations induites par le NMDA *in vitro* sont dépendantes de l'activité de la COX-2 mais sont indépendantes de la COX-1.

Il est intéressant de noter que le NMDA est aussi impliqué dans les vasodilatations dépendantes du NO (Fergus and Lee, 1997a;Rancillac et al., 2006). Cependant, dans le cortex cérébral l'inhibition de la NOS mais aussi de la GC soluble sensible au NO atténue la vasodilatation produite par la stimulation des vibrisses chez le rat. Cette atténuation est abolie en appliquant des donneurs de NO ou un analogue du GMPc. Lors d'une stimulation des vibrisses, le NO a une action de modulateur plutôt que de médiateur de la relaxation vasculaire, permettant la vasodilatation par d'autres médiateurs (Lindauer et al., 1999). De plus, le NO stimule l'activité de la COX-1 et de la COX-2 (Salvemini et al., 1993), argumentant en faveur d'une action permissive du NO dans le couplage neurovasculaire.

Nos résultats de stimulations optogénétiques de neurones pyramidaux *in vivo* confirment nos données sur l'implication de la COX-2 dans les réponses vasculaires engendrées par les cellules pyramidales. En effet, la photostimulation des neurones pyramidaux induit une réponse hyperémique dépendante de la COX-2. De plus, la photostimulation des neurones

pyramidaux exprimant la CaMKII α ¹⁰³ et co-exprimant la COX-2 (Kaufmann et al., 1996) provoque également une réponse hyperémique (Lee et al., 2010; Ji et al., 2012). Le maintien d'une réponse vasculaire en présence de bloquant des récepteurs ionotropiques du glutamate par photostimulation des neurones pyramidaux est un autre argument en faveur de la libération de prostanoïdes par ces cellules (Scott and Murphy, 2012).

II. Contribution relative des récepteurs aux prostanoïdes dans les réponses vasculaires

Nous avons pu montrer l'implication des récepteurs EP2 et EP4, autant *in vivo* qu'*in vitro*, dans les réponses neurovasculaires. Les réponses induites par stimulations sensorielles impliquent les récepteurs EP2 et EP4 tandis que les vasodilatations engendrées par l'application de NMDA sont altérées par l'antagonisme des récepteurs EP2, EP4 et IP. Ces résultats sont en accord avec la localisation de ces récepteurs dans les cellules musculaires lisses au niveau des vaisseaux cérébraux (Davis et al., 2004; Myren et al., 2010; Myren et al., 2011; Dabertrand et al., 2013).

L'implication des récepteurs EP2 et EP4 est confirmée par une étude récente montrant le recrutement des récepteurs EP4 dans des vasodilatations induites par le glutamate (Hall et al., 2014). La dilatation obtenue en présence de NMDA est diminuée par l'antagonisme de EP2 et EP4. Cependant, *in vivo*, on constate que l'antagonisme des récepteurs EP4 diminue la réponse vasculaire dans les dix premières secondes seulement. Ces données montrent donc que les récepteurs EP2 ont un effet vasodilatateur plus long que les récepteurs EP4. Ces résultats sont en accord avec une internalisation des récepteurs EP4 en réponse à l'application d'agoniste EP4 (Desai et al., 2000). Cela suggère que les récepteurs EP2 sont les récepteurs majoritairement activés pendant une réponse hyperémique soutenue.

Il est intéressant de noter que le bloquant du récepteur IP atténue la réponse vasodilatatrice induite par le NMDA mais n'a pas d'effet sur la réponse hyperémique engendrée par la stimulation sensorielle. Nos données ont montré que la réponse vasculaire observée *in vivo* et *in vitro* est majoritairement dû à l'activité COX-2. De ce fait, cela indique que la libération de PGI₂ provoquée par le NMDA (Lazarewicz and Salinska, 1995) est produite en tranches via COX-2. Cela confirme les résultats de la littérature qui montrent que la synthèse de PGI₂ se

¹⁰³ CaMKII : Calcium/calModulin-dependent protein Kinase II (Protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante)

fait préférentiellement via COX-2 (Ruan et al., 2011; Hetu and Riendeau, 2005). De plus, nos résultats montrent une expression de la PGIS dans certains neurones pyramidaux (Mehl et al., 1999; Siegle et al., 2000). Les différences observées entre les réponses vasculaires *in vivo* et *in vitro* sont probablement dues à une libération accrue de la PGI₂ par un recrutement plus important des récepteurs NMDA en tranches comparé à la stimulation sensorielle.

III. Implication des prostanoides dans les processus physiopathologiques

La COX-2 est connue pour être également inductible. A titre d'exemple, il y a une induction de l'expression de la COX-2 durant la plasticité synaptique, l'épilepsie, la dépression corticale, les accidents vasculaires cérébraux, les inflammations cérébrales ou encore dans la maladie d'Alzheimer (Yamagata et al., 1993; Hoozemans et al., 2001; Ikeda-Matsuo et al., 2006; Cui et al., 2008; Choi et al., 2009; Font-Nieves et al., 2012). Concernant la mPGES1, dont l'expression basale est faible, on retrouve également un taux d'expression induit plus important dans ces pathologies (Yamagata et al., 1993; Mancini et al., 2001; Ikeda-Matsuo et al., 2006; de Oliveira et al., 2008; Akitake et al., 2013). Ces augmentations d'expression entraînent des niveaux pathologiques de PGE₂ qui ont des conséquences sur la survie cellulaire, la formation d'œdème ou encore dans la neuroinflammation (Ikeda-Matsuo et al., 2006; Choi et al., 2009; Stark and Bazan, 2011).

Des variations dans le taux d'expression de la PGE₂ ont aussi un impact sur le couplage neurovasculaire. En effet, des concentrations élevées de PGE₂ peuvent provoquer des désensibilisations des récepteurs EP4 diminuant ainsi la réponse vasculaire (Desai et al., 2000). Ces hautes concentrations peuvent également inverser la polarité de la réponse à la PGE₂ en permettant un recrutement du récepteur vasoconstricteur EP1 de plus basse affinité que les récepteurs EP2 et EP4 (Boie et al., 1997; Dabertrand et al., 2013; Tang et al., 2008).

En considérant une implication potentielle de ces régulations pathologiques dans la maladie d'Alzheimer (Lacalle-Aurioles et al., 2014), des stratégies thérapeutiques visant à réduire l'activité de la mPGES1 (Akitake et al., 2013) ou encore celle du récepteur EP1 (Zhen et al., 2012) pourraient être envisagées afin de réduire l'inflammation et même diminuer les défauts du couplage neurovasculaire de cette pathologie.

B. Influence du lactate et des canaux K_{ATP} sur l'activité neuronale

Dans ce travail, nous avons pu mettre en évidence que l'apport énergétique, outre fournir l'énergie essentielle aux fonctions neuronales, va influencer l'activité neuronale. En effet, cette étude a montré que les canaux potassiques sensibles à l'ATP sont des senseurs du métabolisme intracellulaire. Leur présence dans les neurones leur confère une sensibilité aux substrats énergétiques et en particulier au lactate. De plus, nous avons pu observer que les neurones corticaux sont capables de métaboliser le lactate en pyruvate et que la formation d'ATP par les neurones est presque essentiellement produite par la phosphorylation oxydative.

I. Les canaux K_{ATP} dans la régulation de l'activité neuronale

Les approches combinées d'électrophysiologie, de pharmacologie, de génétique et de transcriptomique ont permis de mettre en évidence la présence de canaux potassiques sensibles à l'ATP. Un canal K_{ATP} est un hétéro-octamère constitué de 4 sous-unités K_{ir} 6.1 ou K_{ir} 6.2 qui forment le pore du canal K_{ATP} et de 4 sous-unités régulatrices, SUR1, 2A ou 2B, des récepteurs aux sulfonylurées.

L'utilisation des agents pharmacologiques activant ou bloquant ces canaux K_{ATP} a montré une modification importante de l'activité neuronale induite par leur modulation. En effet, les enregistrements électrophysiologiques en présence d'activateurs des K_{ATP} montrent des changements importants du potentiel de membrane et de l'excitabilité neuronale. De plus, l'utilisation d'activateurs sélectifs pour les sous-unités SUR1 et SUR2B (diazoxide) ou pour les sous-unités SUR2A et SUR2B (pinacidil) a permis de montrer que les canaux K_{ATP} des neurones sont constitués des sous-unités SUR1. Cela corrobore avec les données de la littérature qui montrent que la sous-unité SUR2A n'est pas exprimée dans le cortex cérébral (Isomoto et al., 1996), la sous-unité SUR2B étant essentiellement présente au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires (Suzuki et al., 2001). De plus, les résultats de l'étude de Cao et coll. montrent que les neurones semblent exprimer uniquement la sous-unité régulatrice SUR1 (Cao et al., 2009).

Il est intéressant de noter que la distribution des canaux K_{ATP} est ubiquitaire dans les neurones du cortex somatosensoriel, alors qu'on observe une plus forte densité de ces canaux dans certains types cellulaires de l'hippocampe (Zawar et al., 1999; Zawar and Neumcke, 2000). Nos observations pharmacologiques ont été confirmées par l'approche moléculaire. En effet, la majorité des canaux K_{ATP} des neurones sont constitués des sous-unités K_{ir} 6.2 et SUR1. Les sous-unités SUR2 n'ont jamais été détectées correspondant à l'absence d'effet du pinacidil.

L'approche génétique avec l'utilisation des lignées de souris sauvages et invalidées pour le gène K_{ir} 6.2 (Miki et al., 1998) a permis de démontrer la présence des canaux K_{ATP} fonctionnels dans les neurones corticaux de souris. L'absence de courants potassiques sortant lors de la déplétion rapide de l'ATP intracellulaire chez les souris K_{ir} 6.2^{-/-} confirme que K_{ir} 6.2 est la sous-unité majeure formant le pore des canaux K_{ATP} des neurones corticaux.

Les canaux K_{ATP} des neurones corticaux sont donc formés des sous-unités K_{ir} 6.2 et SUR1, ce qui constitue la combinaison la plus sensible aux variations du rapport ATP/ADP intracellulaire (Inagaki et al., 1995b; Isomoto et al., 1996; Inagaki et al., 1996; Yamada et al., 1997). C'est cette même composition en sous-unités qui contrôle la sensibilité au glucose extracellulaire dans les cellules β pancréatiques, ou encore les neurones à oréxine excités par le glucose ou le lactate extracellulaire (Inagaki et al., 1995b; Miki et al., 1998; Parsons and Hirasawa, 2010).

II. Le substrat énergétique et les neurones

Les données récoltées de RT-PCR sur cellule unique ont pu mettre en évidence l'expression du transporteur du glucose GluT3 ainsi que les transporteurs MCT1 et 2 des monocarboxylates. De plus, les ARNm de la LDH_A et de la LDH_B ont été fréquemment co-détectés dans les neurones. La LDH étant un homo- ou un hétérotetramère de ces deux sous-unités, ces observations suggèrent que les cinq isozymes différentes sont susceptibles de co-exister. Les neurones corticaux sont donc potentiellement capables d'oxyder le lactate en pyruvate et réciproquement (O'Brien et al., 2007). Toutefois les données de RT-PCR en multiplex sur cellule unique ne sont pas quantitatives, il est donc possible que l'une de ces deux sous-unités soit plus abondamment exprimée. Il a en effet été rapporté au niveau protéique que la LDH_B est plus abondante dans les neurones que dans les astrocytes (Bittar et al., 1996; O'Brien et al., 2007), suggérant que les neurones réalisent plutôt une oxydation du lactate en pyruvate que l'inverse (O'Brien et al., 2007).

Les neurones ont donc la capacité de transporter et de métaboliser le glucose et les monocarboxylates. Cependant, les voies métaboliques utilisées par les neurones restent à étudier. En utilisant une approche physiologique par patch-clamp et une approche d'imagerie cellulaire, nous avons pu identifier la voie et le substrat métabolique préférentiel des neurones.

En effet, nous avons pu constater, en utilisant les K_{ATP} comme senseurs du rapport intracellulaire ATP/ADP, que les monocarboxylates étaient préférés au glucose. En effet, l'application de monocarboxylates, et notamment le lactate, exacerbe l'activité neuronale observée par enregistrement par patch-clamp (configuration patch perforé).

Nous avons observé par cette technique que le passage d'une concentration relativement importante de 10 mM de glucose à une concentration plus physiologique de 2,5 mM n'entraîne pas de changement de fréquence de décharge de PA. En revanche, l'ajout de lactate à une solution contenant 2,5 mM de glucose entraîne une augmentation de la fréquence de décharge de PA par fermeture de canaux K_{ATP} composés des sous-unités K_{ir} 6.2 et SUR1, qui sont hautement sensibles au blocage par l'ATP intracellulaire (Inagaki et al., 1995a).

Notre hypothèse concernant le mécanisme de cette sensibilité au lactate reprend l'idée, présente dans l'hypothèse de la navette lactate (Pellerin and Magistretti, 1994), d'une compartimentation du métabolisme du glucose entre les astrocytes et les neurones. La production énergétique des neurones ne se ferait pas directement à partir du glucose sanguin, mais plutôt indirectement par le biais des astrocytes via le métabolisme oxydatif du lactate. Le lactate produit et libéré à partir du glucose sanguin capté par les astrocytes serait transporté dans les neurones via les MCT1 ou 2. L'afflux important de lactate favoriserait son oxydation en pyruvate par les LDHs (Tholey et al., 1981; Bittar et al., 1996; Lovatt et al., 2007; O'Brien et al., 2007).

Nos données d'imagerie cellulaire ont pu montrer que le lactate est bien métabolisé dans les neurones. L'application de lactate dans le milieu extracellulaire provoque une augmentation de la fluorescence du NADH, correspondant à la transformation du lactate en pyruvate. Ce dernier serait alors utilisé dans les mitochondries par la phosphorylation oxydative entraînant ainsi une forte production d'ATP. C'est cette augmentation d'ATP qui entraînerait à terme la fermeture des canaux K_{ATP} membranaires et une dépolarisation des neurones. Nous avons pu mettre en évidence, en utilisant une sonde FRET d'ATP, que les neurones utilisent que très

peu leur métabolisme glycolytique pour produire de l'ATP mais beaucoup plus leur phosphorylation oxydative. En effet, le bloquant de la glycolyse n'a que très peu d'effet sur la variation de la concentration d'ATP intracellulaire alors que la présence d'un bloquant de la phosphorylation oxydative diminue fortement cette concentration d'ATP intracellulaire.

Nos résultats obtenus par nos approches pharmacologiques, biophysiques, moléculaires, génétiques et d'imageries appuient l'hypothèse selon laquelle le lactate serait un substrat énergétique majeur pour les neurones par rapport au glucose, en produisant leur énergie principalement par la phosphorylation oxydative (Bouzier-Sore et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006; Bouzier-Sore and Pellerin, 2013).

Dans le cerveau de mammifère, la concentration physiologique de glucose se situe entre 1 et 2,5 mM (Silver and Erecinska, 1994). Les concentrations de lactate dans le milieu extracellulaire sont évaluées entre 2 et 5 mM (Zilberter et al., 2010) et doublent consécutivement à une augmentation de l'activité neuronale (Hu and Wilson, 1997; Caesar et al., 2008). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la concentration en lactate ne sont pas connus. Celle-ci peut s'expliquer par une augmentation de la libération de lactate et/ou par une diminution de sa capture. Il est en outre difficile d'évaluer les changements de concentrations de manière localisée pouvant atteindre, dans un laps de temps très court, des valeurs élevées (Prichard et al., 1991; Frahm et al., 1996; Demestre et al., 1997; Mangia et al., 2007). Nos données montrant que les neurones corticaux sont excités par le lactate via son transport facilité, indiquent que les neurones corticaux sont capables de capter le lactate extracellulaire sur une large gamme de concentrations. Ces données suggèrent donc que la montée de lactate serait plutôt due à une augmentation de la libération de lactate, en accord avec les données récentes de la littérature (Rouach et al., 2008) qui viennent appuyer l'hypothèse de la navette lactate.

Des phénomènes physiologiques allant au-delà de la simple réponse à une augmentation de la demande énergétique pourraient très bien impliquer ce mécanisme de sensibilité au lactate des neurones corticaux. Une étude récente (Suzuki et al., 2011) a montré l'implication de la glycolyse astrocytaire et du lactate dans la potentialisation à long terme dépendante des récepteurs NMDA. Ces travaux montrent que l'inhibition de la glycolyse ou le blocage des transporteurs astrocytaires du lactate (MCT1 et 4) entraînent des déficits de potentialisation à long terme, dans les neurones CA1 de l'hippocampe, et d'apprentissage. Ces

déficits sont restaurés par un apport plus important de lactate mais pas par un apport de glucose.

De plus, une étude a pu mettre en évidence un rôle potentiel du lactate dans les réponses vasculaires (Gordon et al., 2008). En effet, le lactate pourrait avoir un effet sur la recapture de la PGE₂. Une accumulation de la PGE₂ dans l'espace extracellulaire mènerait à des vasodilatations et une diminution de la concentration en PGE₂ dans l'espace extracellulaire provoquerait des vasoconstrictions.

Des travaux ont pu mettre en évidence que le lactate pouvait traverser la barrière hémato-encéphalique par diffusion facilitée mais avec un taux de capture plus faible que celle du glucose (Pardridge and Oldendorf, 1977). Cependant, des travaux récents réalisés chez l'animal éveillé et chez l'être humain démontrent que la moyenne de capture du lactate dans le cerveau « au repos » est approximativement sept fois plus importante que les calculs précédents (Pardridge and Oldendorf, 1977), pouvant atteindre 50% du taux de capture du glucose (Hassel and Brathe, 2000;Knudsen et al., 1991). De plus, des données ont montré que le transport local de lactate est augmenté pendant une activation du cerveau, pouvant conduire à une augmentation de l'effet du lactate injecté (Lear and Kasliwal, 1991).

Des expériences réalisées sur l'être humain par TEP ont permis d'établir un lien entre l'augmentation du flux sanguin cérébral et la concentration en lactate dans le cerveau (Mintun et al., 2004). En effet, l'injection systémique de lactate augmente la réponse neurovasculaire durant une activation visuelle. Cependant, cette injection de lactate n'a pas d'effet en condition de « repos » ni sur le cerveau pris dans sa globalité. Cette augmentation du flux sanguin par l'injection de lactate corrèle avec l'augmentation du ratio lactate/pyruvate et du lactate du plasma.

Ces différentes données montrent donc que le lactate aurait un rôle important autant du point de vue de sa régulation de l'activité métabolique des neurones que sur les variations de flux sanguin. Une activité élevée de réseau neuronal, et en particulier des neurones pyramidaux, engendre une demande énergétique forte. Cette demande énergétique se traduit par une libération de PGE₂ par ces cellules induisant un apport adéquat en substrat énergétique et en dioxygène sanguin. L'apport énergétique peut donc se traduire par une capture accrue de glucose par les astrocytes. Ce glucose est alors transformé en lactate pour subvenir aux besoins énergétiques intenses des neurones pyramidaux en activité. De plus, cet apport en

lactate va exacerber l'activité des neurones pyramidaux permettant une libération accrue de PGE₂ nécessaire au maintien de l'apport énergétique.

Si l'activité neuronale se poursuit, une boucle d'approvisionnement en énergie pourrait donc être mise en place. Il y aurait intervention de la libération de PGE₂ suivi d'un apport énergétique optimal menant à la capture du glucose puis sa transformation en lactate par les astrocytes. Ce lactate serait ensuite utilisé comme substrat oxydant par les neurones pour leur métabolisme, induisant une potentialisation de leur activité via une activation de leurs canaux ATP.

De plus, le lactate pourrait être également apporté par le plasma sanguin, suggérant un rôle encore plus déterminant de cette source d'énergie dans le maintien d'une activité neuronale accrue. On pourrait également suggérer que l'activité physique accrue, produisant du lactate par un métabolisme anaérobie des muscles squelettiques, induirait un maintien des fonctions cérébrales impliqué dans l'activité physique réalisé par le sujet. De plus, par son action sur la régulation du flux sanguin, le lactate pourrait aussi intervenir, comme le suggère Aristote en son temps, dans un refroidissement du cerveau en induisant des vasodilatations. Cette hypothèse n'est pas forcément dénuée de sens quant on constate que l'organisme se protège du froid par des vasoconstrictions et du chaud par des vasodilatations des vaisseaux superficiels du corps.

C. Preuve de l'existence d'une sous-population de neurones pyramidaux exprimant le *tissue plasminogen activator* dans le néocortex de rongeurs

L'ensemble des résultats a permis de déterminer une origine neuronale glutamatergique du *tissue plasminogen activator*. En effet, en utilisant un bloquant du transport axodendritique, le tPA a été retrouvé dans le corps cellulaire des neurones pyramidaux par immunohistochimie. Il a été retrouvé dans une proportion de 10 à 15% dans les couches II, III, V et VI de plusieurs aires corticales incluant le cortex retrospinal granulaire, somatosensoriel primaire, perirhinal et piriforme. De plus, l'approche transcriptomique a mis en évidence une expression du tPA dans 10% des neurones glutamatergiques excitateurs et la microscopie électronique a décelé un stockage pré-synaptique du tPA dans des vésicules à cœur dense.

I. Le tPA est exprimé dans les neurones pyramidaux

Le tPA est connu pour jouer un rôle critique en tant que modulateur dans les processus physiologiques et pathologiques du système nerveux central. Cependant, de nombreuses études portent sur son mécanisme d'action et ses différentes fonctions mais sa distribution régionale, cellulaire et subcellulaire dans le cerveau reste encore faiblement documentée.

Cet article a permis de trouver, dans le cerveau adulte sain de souris et de rats, une immunoréactivité du tPA dans les cellules endothéliales, les oligodendrocytes, les mastocytes et les épendymocytes. Par contre, l'immunoréactivité du tPA est absente des astrocytes, de la microglie et des péricytes. Concernant la localisation du tPA dans les neurones, il est intéressant de noter des différences régionales : on retrouve le tPA dans le corps cellulaire de neurones de l'amygdale mais il est absent des corps cellulaires de neurones de l'hippocampe ou du cortex. Ces données semblent contredire la littérature qui attribue un rôle important du tPA endogène dans l'hippocampe (Echeverry et al., 2010; Nagai et al., 1999; Tsirka et al., 1997).

En bloquant le transport axodendritique avec un découplant des microtubules (colchicine), le tPA a été visualisé dans les corps cellulaires de neurones de l'hippocampe et du cortex. Cet effet est sélectif des neurones puisque l'immunoréactivité du tPA n'est pas modifiée dans les

autres types cellulaires. L'absence de détection du tPA en condition standard peut s'expliquer par une expression assez rare ou par un renouvellement trop rapide de la protéine.

Cette approche a permis de cartographier pour la première fois les neurones du cortex positif pour l'immonuréactivité du tPA. Précisément, le tPA a été décelé dans le CA1, CA2 et CA3 ainsi que dans le gyrus denté et dans la *fasciola cinereum* de l'hippocampe. Dans le cortex cérébral, les neurones tPAergiques sont retrouvés dans les cortex retrospinal granulaire, somatosensoriel primaire, perirhinal et piriforme. Cependant, la distribution de cette protéine est restreinte à un taux de 10 à 15% dans les neurones des couches II, III, V et VI. De plus, le tPA est aussi exprimé dans d'autres structures comme l'amygdale, la neurohypophyse ou le cingulum.

Ces données sont en accord avec les fonctions physiologiques associées au tPA dans le système nerveux central. En effet, le tPA aurait un rôle critique dans les processus d'apprentissages spatiaux et dans la mémoire, connus pour impliquer l'hippocampe et le cortex entorhinal (Madani et al., 1999;Gorter et al., 2007). Il aurait également un rôle dans le comportement d'anxiété impliquant l'amygdale (Pawlak et al., 2003;Bennur et al., 2007;Yepes and Lawrence, 2004). En condition pathologique, le tPA peut retarder la mort cellulaire des neurones hippocampiques à la suite d'une exposition au kaïnate (Tsirka et al., 1997;Siao et al., 2003;Nagai et al., 1999). Il aurait également un rôle dans l'épilepsie (Yepes et al., 2003;Tsirka et al., 1995) et dans la survie et la mort des neurones corticaux (Tsirka et al., 1997;Yepes et al., 2003).

Par les méthodes combinées de patch-clamp et d'une analyse transcriptomique sur des neurones corticaux, nous avons pu déterminer le phénotype des neurones exprimant le tPA. Les caractéristiques électrophysiologiques, morphologiques et moléculaires de ces neurones correspondent à celles des neurones glutamatergiques excitateurs. Ces neurones présentent un type de décharge RS (McCormick et al., 1985) incluant des PAs de durées relativement longues et une adaptation prononcée de leur fréquence de décharge de PA. De plus, la révélation du marquage à la biocytine permet d'observer des épines dendritiques sur les neurones enregistrés, une autre caractéristique des neurones glutamatergiques du cortex. Une étude immunohistologique complémentaire montre la présence de VGluT1 et de la CCK dans les neurones tPAergiques confirmant leur phénotype glutamatergique.

La nature excitatrice des neurones tPAergiques est en concordance avec la littérature. En effet, il a été reporté que le tPA aurait un lien avec la signalisation glutamatergique dépendante des récepteurs NMDA (Nicole et al., 2001;Baron et al., 2010;Park et al., 2008). Ses liens avec la potentialisation à long terme (Pang et al., 2004;Zhuo et al., 2000;Baranes et al., 1998;Madani et al., 1999), la plasticité synaptique (Yepes and Lawrence, 2004;Samson and Medcalf, 2006) la mort neuronale (Baron et al., 2010;Nagai et al., 1999) ou la survie cellulaire (Yepes and Lawrence, 2004;Wu et al., 2013;Echeverry et al., 2010) ont été décrits.

La localisation subcellulaire du tPA a été réalisée sur des tissus de rats ou de souris traités avec la colchicine par microscopie électronique. Cette méthode a permis d'observer la présence de vésicules à cœur dense contenant le tPA dans le corps cellulaire et les synapses des neurones. Le contenu de ces vésicules a été confirmé par immunoprécipitation de la synaptobrevine-2 par un anticorps spécifique.

Ces données immunologiques, électrophysiologiques et transcriptionnelles mettent en évidence l'existence d'une sous-population de neurones glutamatergiques excitateurs tPAergiques. Ces neurones présentent des vésicules à cœur dense contenant le tPA.

II. Le tPA dans la régulation du flux sanguin cérébral

L'observation du tPA dans les neurones glutamatergiques du cortex et son lien avec les récepteurs NMDA suggèrent une implication dans le couplage neurovasculaire. En effet, le tPA aurait un rôle dans la réponse vasculaire engendrée par l'activation neuronale (Park et al., 2008). Par contre, le tPA ne serait pas impliqué dans l'entrée de calcium par les récepteurs NMDA (Nicole et al., 2001). En effet, les courants calciques ne sont pas altérés chez des souris déficientes pour le gène du tPA (Park et al., 2008). Le tPA permet une synthèse de NO dépendante des récepteurs NMDA en influençant l'état de phosphorylation de la nNOS. Ce changement de phosphorylation augmenterait l'activité de l'enzyme.

Les récepteurs NMDA sont fonctionnellement et structurellement liés à la nNOS par les protéines PSD-95¹⁰⁴ (Christopherson et al., 1999;Bredt and Snyder, 1989). Cette association permet une augmentation de la phosphorylation de la nNOS après une activation des récepteurs NMDA (Park et al., 2008;Rameau et al., 2007). Cependant, en absence de tPA, cette phosphorylation est diminuée (Park et al., 2008). Le tPA est libéré dans l'espace

¹⁰⁴ PSD-95 : *PostSynaptic Density-95*

extracellulaire et peut agir directement sur les récepteurs NMDA (Nicole et al., 2001;Pawlak et al., 2005). Cette interaction module différentes phosphatases et kinases en aval qui régulent donc la phosphorylation de la nNOS (Rameau et al., 2007).

Les récepteurs NMDA sont essentiels pour les fonctions cérébrales, et le NO joue un rôle dans les voies de signalisation de ces récepteurs (Mungrue and Bredt, 2004;Pacher et al., 2007;Park et al., 2008). De plus, le tPA, le NO et les récepteurs NMDA sont impliqués dans des processus comme la plasticité synaptique (Pang et al., 2004;Huang et al., 1996) mais également dans l'hyperémie fonctionnelle (Park et al., 2008). Son implication dans le couplage neurovasculaire suggère qu'un déficit en tPA pourrait contribuer aux pathologies comme l'ischémie ou la maladie d'Alzheimer (Iadecola, 2004).

Le tPA, par la régulation de la synthèse de NO associée à l'activation des récepteurs NMDA, serait crucial autant dans les processus de régulation du flux sanguin et d'activité neuronale que dans les dysfonctionnements cérébraux associés aux pathologies cérébrales.

Conclusion

« Ce qui ne me tue pas me fortifie »

Friedrich Nietzsche

Le crépuscule des idoles ou comment on philosophe avec un marteau, 1888

La réponse hémodynamique localisée est observée par l'activation du réseau de neurones à la suite d'une stimulation sensorielle (Cox et al., 1993). Cette réponse vasculaire, appelée hyperémie fonctionnelle, est un processus très complexe qui consiste en une augmentation du débit sanguin dans la zone neuronale activée suivi par une hypoperfusion périphérique (Devor et al., 2007). Cette hypoperfusion est appelée désactivation fonctionnelle mais ses mécanismes cellulaires et moléculaires restent indéterminés.

Du point de vue métabolique, cette activation neuronale se traduit par une augmentation transitoire de l'apport en substrats énergétiques (Voutsinos-Porche et al., 2003), et notamment en lactate (Hu and Wilson, 1997). Les mécanismes responsables de cette augmentation de l'apport énergétique restent encore largement débattus tant au niveau du couplage neurovasculaire (Niwa et al., 2000; Yang et al., 2000; Cauli et al., 2004; Niessing et al., 2005; Rancillac et al., 2006; Zonta et al., 2003; Mulligan and Macvicar, 2004; Filosa et al., 2006; Takano et al., 2006; Gordon et al., 2008; Girouard et al., 2010) que du couplage neurométabolique (Pellerin and Magistretti, 1994; Voutsinos-Porche et al., 2003; Rouach et al., 2008; Mangia et al., 2007). Ils sont néanmoins sous le contrôle de l'activité neuronale qui conduit notamment à la libération de glutamate et de K^+ , tous deux capables de stimuler les différents candidats cellulaires du couplage neurovasculaire et neurométabolique.

Les différentes données que nous avons pu obtenir montrent une très grande complexité dans les processus qui régissent autant le flux sanguin que l'apport énergétique. En effet, concernant le couplage neurovasculaire du néocortex, nos données ont pu mettre en évidence une implication de la PGE_2 dans les vasodilatations. Cependant, le blocage total de la réponse vasodilatatrice n'est jamais observé, suggérant l'implication de plusieurs classes de molécules dans l'établissement de la variation du débit sanguin (Lecrux et al., 2011; Niwa et al., 2000; Niwa et al., 2001; Cauli and Hamel, 2010; Leithner et al., 2010).

L'intime relation entre le couplage neurovasculaire et neurométabolique suggère une interconnexion forte entre les processus métaboliques et vasculaires. En effet, des hypothèses peuvent être étayées sur la base qu'une demande en énergie nécessite un apport plus important en dioxygène et en glucose sanguin et donc implique une réponse vasculaire adaptée. On peut noter notamment l'hypothèse de Gordon et coll. qui stipule un potentiel rôle régulateur du lactate sur la concentration extracellulaire en PGE_2 vasodilatateur en fonction de la production de lactate par les astrocytes (Gordon et al., 2008). Cependant, cette hypothèse repose sur une libération de la PGE_2 par les astrocytes et ne prend pas en compte le potentiel

de production et de libération des prostanoides vasodilatateurs par les neurones. Or, nous avons pu montrer que les neurones, et en particulier les neurones pyramidaux, sont capables de produire et de libérer ces prostanoides.

En prenant en considération que c'est l'activité neuronale qui conditionne la demande énergétique, on peut émettre l'hypothèse d'un contrôle de l'apport énergétique initié par la libération de PGE₂ par les neurones pyramidaux via l'activité de la COX-2. Cette libération induit donc une réponse vasculaire permettant un apport en glucose et en dioxygène adéquat aux fonctions cérébrales. Selon nos observations et l'hypothèse de la navette lactate, le glucose est ensuite métabolisé en lactate pour être utilisé par les neurones. Ces neurones utilisent la phosphorylation oxydative permettant la formation d'ATP et conduisant à maintenir une activité neuronale performante. Un apport accru en lactate permettrait, via une modulation des canaux K_{ATP}, de maintenir l'activité des neurones pyramidaux élevée. La réponse hyperémique serait donc maintenue par un niveau plus important de PGE₂ issu des neurones pyramidaux.

Il est à noter aussi que de nombreuses molécules sont capables d'interagir directement ou indirectement sur l'établissement des réponses vasculaires (**Figure 65**). Notamment, le rôle du NO reste débattu dans la littérature. En effet, en fonction de sa concentration, le NO pourrait polariser la réponse vasculaire vers des vasoconstrictions ou vers des vasodilatations (Metea and Newman, 2006; Hirase, 2005; Rancillac et al., 2006; Straub and Nelson, 2007; Duchemin et al., 2012). De plus, dans le cortex somatosensoriel, Lindauer et coll. ont discuté d'un rôle permissif du NO dans l'établissement de la réponse vasculaire (Lindauer et al., 1999). Le tPA pourrait également intervenir dans les réponses vasculaires impliquant le NO. En effet, ce dernier aurait une implication dans la phosphorylation de la nNOS. Il pourrait donc potentialiser l'activité de la nNOS et de ce fait, induire une potentialisation des réponses vasculaires par le NO (Park et al., 2008).

Toutes ces interactions et ces différents agents vasoactifs suggèrent une étroite interaction permettant une régulation optimale du couplage neurométabolique et neurovasculaire. Cependant, il reste encore de nombreuses interrogations quant aux origines cellulaires, moléculaires et à la nature de tous les agents vasoactifs impliqués dans ces réponses vasculaires, autant du point de vue de l'hyperémie fonctionnelle que de la désactivation fonctionnelle.

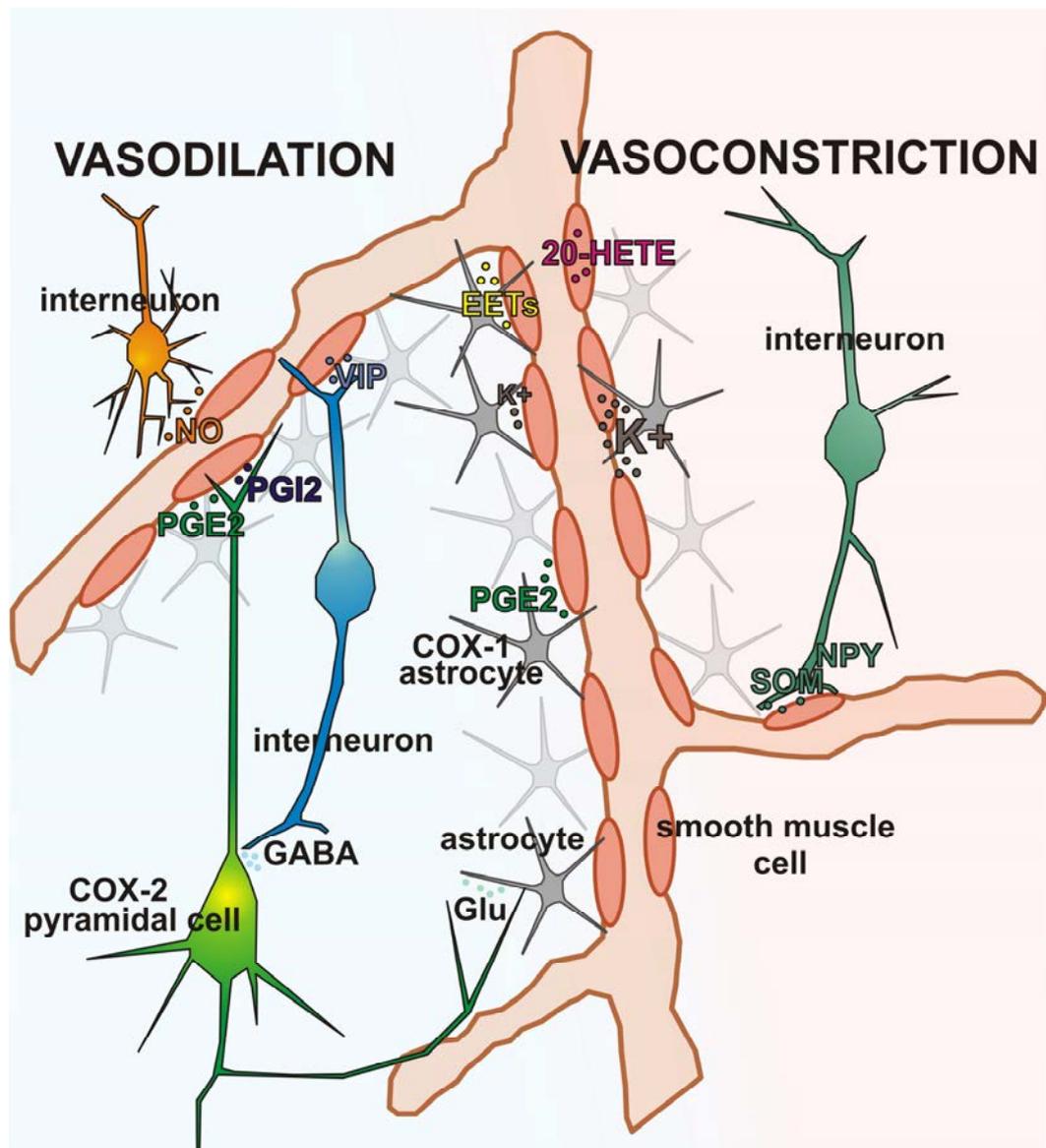


Figure64. Schéma récapitulatif des différents acteurs cellulaires et moléculaires définis du couplage neurovasculaire

De nombreux messagers vasoactifs sont impliqués dans le couplage neurovasculaire. De plus, l'origine cellulaire de ces molécules peut également être multiple. On peut voir à gauche du schéma les molécules vasodilatrices et leur origine cellulaire. Les neurones pyramidaux possédant la COX-2 sont capables de synthétiser les prostanoides vasodilatateurs PGE₂ et PGI₂. La PGE₂ peut également être synthétisée par les astrocytes via l'activité de la COX-1. Les astrocytes, après une activation de leurs récepteurs glutamatergiques par exemple, sont capables de synthétiser plusieurs agents vasodilatateurs. En plus de la PGE₂, les astrocytes peuvent libérer des EETs ou du potassium. Cependant, ce dernier a une action vasodilatatrice uniquement pour des concentrations basses (< 20 mM). On peut noter également la libération de peptides vasodilatateurs NO et VIP par les interneurons. À droite du schéma, on note les molécules vasoconstrictrices et leur origine cellulaire. On note que le 20-HETE est synthétisé par les cellules musculaires lisses. L'effet vasoconstricteur du potassium libéré par les astrocytes est obtenu pour des concentrations élevées (>20 mM). Il existe également des interneurons qui libèrent les peptides vasoconstricteurs SOM et NPY.

Bibliographie

Abounader R, Elhousseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic D, Quirion R, Hamel E (1999) Expression of neuropeptide Y receptors mRNA and protein in human brain vessels and cerebromicrovascular cells in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:155-163.

Abounader R, Hamel E (1997) Associations between neuropeptide Y nerve terminals and intraparenchymal microvessels in rat and human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 388:444-453.

Akata T (2007) Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth* 21:220-231.

Akgoren N, Dalgaard P, Lauritzen M (1996) Cerebral blood flow increases evoked by electrical stimulation of rat cerebellar cortex: relation to excitatory synaptic activity and nitric oxide synthesis. *Brain Res* 710:204-214.

Akgoren N, Fabricius M, Lauritzen M (1994) Importance of nitric oxide for local increases of blood flow in rat cerebellar cortex during electrical stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5903-5907.

Akitake Y, Nakatani Y, Kamei D, Hosokawa M, Akatsu H, Uematsu S, Akira S, Kudo I, Hara S, Takahashi M (2013) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is induced in alzheimer's disease and its deletion mitigates alzheimer's disease-like pathology in a mouse model. *J Neurosci Res* 91:909-919.

Alkayed NJ, Narayanan J, Gebremedhin D, Medhora M, Roman RJ, Harder DR (1996) Molecular characterization of an

arachidonic acid epoxygenase in rat brain astrocytes. *Stroke* 27:971-979.

Allaman I, Lengacher S, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) A2B receptor activation promotes glycogen synthesis in astrocytes through modulation of gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C696-C704.

Aller CB, Ehmman S, Gilman-Sachs A, Snyder AK (1997) Flow cytometric analysis of glucose transport by rat brain cells
1. *Cytometry* 27:262-268.

Aoki K, Matsuda M (2009) Visualization of small GTPase activity with fluorescence resonance energy transfer-based biosensors. *Nat Protoc* 4:1623-1631.

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.

Armstead WM, Cines DB, Al-Roof HA (2004) Altered NO function contributes to impairment of uPA and tPA cerebrovasodilation after brain injury. *J Neurotrauma* 21:1204-1211.

Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura S, Sumii T, Mori T, Qiu J, min-Hanjani S, Huang PL, Liao JK, Lo EH, Moskowitz MA (2005) Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:722-729.

Ascoli GA, et al. (2008) Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci* 9:557-568.

Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468:232-243.

Ayata C, Ma J, Meng W, Huang P, Moskowitz MA (1996) L-NA-sensitive rCBF augmentation during vibrissal stimulation in type III nitric oxide synthase mutant mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:539-541.

Bakalova R, Matsuura T, Kanno I (2002) The cyclooxygenase inhibitors indomethacin and Rofecoxib reduce regional cerebral blood flow evoked by somatosensory stimulation in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 227:465-473.

Bao L, Kopp J, Zhang X, Xu ZQ, Zhang LF, Wong H, Walsh J, Hokfelt T (1997) Localization of neuropeptide Y Y1 receptors in cerebral blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12661-12666.

Baranes D, Lederfein D, Huang YY, Chen M, Bailey CH, Kandel ER (1998) Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21:813-825.

Baron A, Montagne A, Casse F, Launay S, Maubert E, Ali C, Vivien D (2010) NR2D-containing NMDA receptors mediate tissue plasminogen activator-promoted neuronal excitotoxicity. *Cell Death Differ* 17:860-871.

Barros LF (2013) Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci* 36:396-404.

Baughman RW, Gilbert CD (1981) Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters in the visual cortex. *J Neurosci* 1:427-439.

^aBear MF, Connors BW, Paradisio MA, « Anatomie du système nerveux », dans :

Bear MF, Connors BW, Paradisio MA (dir.) *Neurosciences, à la découverte du cerveau*, Paris, Pradel, 2001 [3ème édition] pp. 152-185.

^bBear MF, Connors BW, Paradisio MA « Appendix : An illustrated guide to human neuroanatomy », dans : Bear MF, Connors BW, Paradisio MA (dir.) *Neurosciences, exploring the brain*, Lippincott Williams & Wilkins, 2007 [3ème édition] pp 167-248.

^cBear MF, Connors BW, Paradisio MA, « Rythmes du cerveau », dans : Bear MF, Connors BW, Paradisio MA (dir.) *Neurosciences, à la découverte du cerveau*, Paris, Pradel, 2001 [3ème édition] pp. 456-484.

Beierlein M, Gibson JR, Connors BW (2000) A network of electrically coupled interneurons drives synchronized inhibition in neocortex. *Nat Neurosci* 3:904-910.

Bennur S, Shankaranarayana Rao BS, Pawlak R, Strickland S, McEwen BS, Chattarji S (2007) Stress-induced spine loss in the medial amygdala is mediated by tissue-plasminogen activator. *Neuroscience* 144:8-16.

Berthet C, Lei H, Thevenet J, Gruetter R, Magistretti PJ, Hirt L (2009) Neuroprotective role of lactate after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1780-1789.

Bertini G, Peng ZC, Bentivoglio M (1996) The chemical heterogeneity of cortical interneurons: nitric oxide synthase vs. calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the rat. *Brain Res Bull* 39:261-266.

Bhardwaj A, Northington FJ, Carhuapoma JR, Falck JR, Harder DR, Traystman RJ, Koehler RC (2000) P-450 epoxygenase and NO synthase inhibitors reduce cerebral blood flow response to N-methyl-D-

aspartate. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H1616-H1624.

Bishai I, Coceani F (1992) Eicosanoid formation in the rat cerebral cortex. Contribution of neurons and glia. *Mol Chem Neuropathol* 17:219-238.

Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ (1996) Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1079-1089.

Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Moldenhauer H, San MA, Gutierrez R, Zambrano M, Barros LF (2011) Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K⁺ and a delayed and persistent effect of glutamate. *J Neurosci* 31:4709-4713.

Blanco VM, Stern JE, Filosa JA (2008) Tone-dependent vascular responses to astrocyte-derived signals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2855-H2863.

Bliss TM, Ip M, Cheng E, Minami M, Pellerin L, Magistretti P, Sapolsky RM (2004) Dual-gene, dual-cell type therapy against an excitotoxic insult by bolstering neuroenergetics. *J Neurosci* 24:6202-6208.

Boas DA, Dale AM, Franceschini MA (2004) Diffuse optical imaging of brain activation: approaches to optimizing image sensitivity, resolution, and accuracy. *Neuroimage* 23 Suppl 1:S275-S288.

Boie Y, Stocco R, Sawyer N, Slipetz DM, Ungrin MD, Neuschafer-Rube F, Puschel GP, Metters KM, Abramovitz M (1997) Molecular cloning and characterization of the four rat prostaglandin E2 prostanoid receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 340:227-241.

Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8:136-142.

Bouzier-Sore AK, Pellerin L (2013) Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. *Front Cell Neurosci* 7:179.

Bouzier-Sore AK, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi JM, Pellerin L (2006) Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *Eur J Neurosci* 24:1687-1694.

Bouzier-Sore AK, Voisin P, Canioni P, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1298-1306.

Breder CD, Dewitt D, Kraig RP (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 355:296-315.

Bredt DS, Snyder SH (1989) Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9030-9033.

Broer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J Neurochem* 77:705-719.

Caesar K, Hashemi P, Douhou A, Bonvento G, Boutelle MG, Walls AB, Lauritzen M (2008) Glutamate receptor-dependent increments in lactate, glucose and oxygen metabolism evoked in rat cerebellum in vivo
1. *J Physiol* 586:1337-1349.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes,

neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci* 28:264-278.

Calcinaghi N, Jolivet R, Wyss MT, Ametamey SM, Gasparini F, Buck A, Weber B (2011) Metabotropic glutamate receptor mGluR5 is not involved in the early hemodynamic response. *J Cereb Blood Flow Metab* 31.

Cameron HA, McKay RD (1999) Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2:894-897.

Campbell WB, Fleming I (2010) Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflugers Arch* 459:881-895.

Cao R, Higashikubo BT, Cardin J, Knoblich U, Ramos R, Nelson MT, Moore CI, Brumberg JC (2009) Pinacidil induces vascular dilation and hyperemia in vivo and does not impact biophysical properties of neurons and astrocytes in vitro. *Cleve Clin J Med* 76 Suppl 2:S80-S85.

Carmignoto G, Gomez-Gonzalo M (2010) The contribution of astrocyte signalling to neurovascular coupling. *Brain Res Rev* 63:138-148.

Casse F, Bardou I, Danglot L, Briens A, Montagne A, Parcq J, Alahari A, Galli T, Vivien D, Docagne F (2012) Glutamate controls tPA recycling by astrocytes, which in turn influences glutamatergic signals. *J Neurosci* 32:5186-5199.

Cauli B, Audinat E, Lambolez B, Angulo MC, Ropert N, Tsuzuki K, Hestrin S, Rossier J (1997) Molecular and physiological diversity of cortical nonpyramidal cells. *J Neurosci* 17:3894-3906.

Cauli B, Hamel E (2010) Revisiting the role of neurons in neurovascular coupling. *Front Neuroenergetics* 2:9.

Cauli B, Porter JT, Tsuzuki K, Lambolez B, Rossier J, Quenet B, Audinat E (2000) Classification of fusiform neocortical interneurons based on unsupervised clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6144-6149.

Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E (2004) Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 24:8940-8949.

Centonze D, Napolitano M, Saulle E, Gubellini P, Picconi B, Martorana A, Pisani A, Gulino A, Bernardi G, Calabresi P (2002) Tissue plasminogen activator is required for corticostriatal long-term potentiation. *Eur J Neurosci* 16:713-721.

Cerdan S, Rodrigues TB, Sierra A, Benito M, Fonseca LL, Fonseca CP, Garcia-Martin ML (2006) The redox switch/redox coupling hypothesis. *Neurochem Int* 48:523-530.

Chance B, COHEN P, JOBSIS F, SCHOENER B (1962) Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 137:499-508.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13926-13931.

Chaudhry U, Zhuang H, Dore S (2010) Microsomal prostaglandin E synthase-2: cellular distribution and expression in Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 223:359-365.

- Chaudhry UA, Dore S (2009) Cytosolic prostaglandin E synthase: expression patterns in control and Alzheimer's disease brains. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 24:46-51.
- Chedotal A, Cozzari C, Faure MP, Hartman BK, Hamel E (1994a) Distinct choline acetyltransferase (ChAT) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) bipolar neurons project to local blood vessels in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 646:181-193.
- Chedotal A, Umbriaco D, Descarries L, Hartman BK, Hamel E (1994b) Light and electron microscopic immunocytochemical analysis of the neurovascular relationships of choline acetyltransferase and vasoactive intestinal polypeptide nerve terminals in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 343:57-71.
- Choi HB, Gordon GR, Zhou N, Tai C, Rungta RL, Martinez J, Milner TA, Ryu JK, McLarnon JG, Tresguerres M, Levin LR, Buck J, Macvicar BA (2012) Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron* 75:1094-1104.
- Choi SH, Aid S, Bosetti F (2009) The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci* 30:174-181.
- Cholet N, Bonvento G, Seylaz J (1996) Effect of neuronal NO synthase inhibition on the cerebral vasodilatory response to somatosensory stimulation. *Brain Res* 708:197-200.
- Cholet N, Pellerin L, Welker E, Lacombe P, Seylaz J, Magistretti P, Bonvento G (2001) Local injection of antisense oligonucleotides targeted to the glial glutamate transporter GLAST decreases the metabolic response to somatosensory activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:404-412.
- Cholet N, Seylaz J, Lacombe P, Bonvento G (1997) Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:1191-1201.
- Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Brecht DS (1999) PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 274:27467-27473.
- Chuquet J, Quilichini P, Nimchinsky EA, Buzsaki G (2010) Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J Neurosci* 30:15298-15303.
- Cipolla MJ, Lessov N, Clark WM, Haley EC, Jr. (2000) Postischemic attenuation of cerebral artery reactivity is increased in the presence of tissue plasminogen activator. *Stroke* 31:940-945.
- Cohen Z, Ehret M, Maitre M, Hamel E (1995) Ultrastructural analysis of tryptophan hydroxylase immunoreactive nerve terminals in the rat cerebral cortex and hippocampus: their associations with local blood vessels. *Neuroscience* 66:555-569.
- Connors BW, Gutnick MJ (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci* 13:99-104.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, Hernangomez M, Montagne A, Liot G, Guaza C, Maubert E, Ali C, Vivien D, Docagne F (2011) Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med* 208:1229-1242.

- Cox SB, Woolsey TA, Rovainen CM (1993) Localized dynamic changes in cortical blood flow with whisker stimulation corresponds to matched vascular and neuronal architecture of rat barrels. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:899-913.
- Crippa MP (2007) Urokinase-type plasminogen activator. *Int J Biochem Cell Biol* 39:690-694.
- Cui Y, Kataoka Y, Inui T, Mochizuki T, Onoe H, Matsumura K, Urade Y, Yamada H, Watanabe Y (2008) Up-regulated neuronal COX-2 expression after cortical spreading depression is involved in non-REM sleep induction in rats. *J Neurosci Res* 86:929-936.
- Dabertrand F, Hannah RM, Pearson JM, Hill-Eubanks DC, Brayden JE, Nelson MT (2013) Prostaglandin E(2), a postulated astrocyte-derived neurovascular coupling agent, constricts rather than dilates parenchymal arterioles. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Davis RJ, Murdoch CE, Ali M, Purbrick S, Ravid R, Baxter GS, Tilford N, Sheldrick RL, Clark KL, Coleman RA (2004) EP4 prostanoid receptor-mediated vasodilatation of human middle cerebral arteries. *Br J Pharmacol* 141:580-585.
- de Oliveira AC, Candelario-Jalil E, Bhatia HS, Lieb K, Hull M, Fiebich BL (2008) Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. *Glia* 56:844-855.
- DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol* 39:563-607.
- Demestre M, Boutelle M, Fillenz M (1997) Stimulated release of lactate in freely moving rats is dependent on the uptake of glutamate
1. *J Physiol* 499 (Pt 3):825-832.
- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990) Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248:73-76.
- Desai S, April H, Nwaneshiudu C, Ashby B (2000) Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration. *Mol Pharmacol* 58:1279-1286.
- Devor A, Tian P, Nishimura N, Teng IC, Hillman EM, Narayanan SN, Ulbert I, Boas DA, Kleinfeld D, Dale AM (2007) Suppressed neuronal activity and concurrent arteriolar vasoconstriction may explain negative blood oxygenation level-dependent signal. *J Neurosci* 27:4452-4459.
- Dienel GA, Cruz NF (2004) Nutrition during brain activation: does cell-to-cell lactate shuttling contribute significantly to sweet and sour food for thought? *Neurochem Int* 45:321-351.
- Dirnagl U, Lindauer U, Villringer A (1993) Role of nitric oxide in the coupling of cerebral blood flow to neuronal activation in rats. *Neurosci Lett* 149:43-46.
- Dirnagl U, Niwa K, Lindauer U, Villringer A (1994) Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am J Physiol* 267:H296-H301.
- Doty HU, Zieglgansberger W (1998) Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared

videomicroscopy. *Histochem J* 30:141-152.

Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B (1993) Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623:208-214.

Drobac E, Tricoire L, Chaffotte AF, Guiot E, Lambolez B (2010) Calcium imaging in single neurons from brain slices using bioluminescent reporters. *J Neurosci Res* 88:695-711.

Duchemin S, Boily M, Sadekova N, Girouard H (2012) The complex contribution of NOS interneurons in the physiology of cerebrovascular regulation. *Front Neural Circuits* 6:51.

Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA (2001) Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:195-201.

Dunn KM, Hill-Eubanks DC, Liedtke WB, Nelson MT (2013) TRPV4 channels stimulate Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular coupling responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6157-6162.

Dunn KM, Nelson MT (2010) Potassium channels and neurovascular coupling. *Circ J* 74:608-616.

Dunn KM, Renic M, Flasch AK, Harder DR, Falck J, Roman RJ (2008) Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H2455-H2465.

Earley S, Heppner TJ, Nelson MT, Brayden JE (2005) TRPV4 forms a novel Ca^{2+} signaling complex with ryanodine receptors and BKCa channels. *Circ Res* 97:1270-1279.

Echeverry R, Wu J, Haile WB, Guzman J, Yepes M (2010) Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* 120:2194-2205.

Eckenstein F, Baughman RW (1984) Two types of cholinergic innervation in cortex, one co-localized with vasoactive intestinal polypeptide. *Nature* 309:153-155.

Eckert R, « Circulation » dans : Eckert R, Randall D, Burggren W, French K (dir.), *Physiologie animale*, Paris-Bruxelles, De Boeck Université, 1999 [4ème édition] pp 467-516.

Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B, Takahashi T (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch* 414:600-612.

Erlichman JS, Hewitt A, Damon TL, Hart M, Kurasz J, Li A, Leiter JC (2008) Inhibition of monocarboxylate transporter 2 in the retrotrapezoid nucleus in rats: a test of the astrocyte-neuron lactate-shuttle hypothesis. *J Neurosci* 28:4888-4896.

Estrada C, DeFelipe J (1998) Nitric oxide-producing neurons in the neocortex: morphological and functional relationship with intraparenchymal microvasculature. *Cereb Cortex* 8:193-203.

Estrada C, Mengual E, Gonzalez C (1993) Local NADPH-diaphorase neurons innervate pial arteries and lie close or project to intracerebral blood vessels: a possible role for nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:978-984.

Fahrenkrug J, Hannibal J, Tams J, Georg B (2000) Immunohistochemical localization of the VIP1 receptor (VPAC1R) in rat cerebral blood vessels: relation to PACAP

- and VIP containing nerves. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1205-1214.
- Faraci FM, Breese KR (1993) Nitric oxide mediates vasodilatation in response to activation of N-methyl-D-aspartate receptors in brain. *Circ Res* 72:476-480.
- Faraci FM, Heistad DD (1990) Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res* 66:8-17.
- Fergus A, Lee KS (1997b) Regulation of cerebral microvessels by glutamatergic mechanisms. *Brain Res* 754:35-45.
- Fergus A, Lee KS (1997a) GABAergic regulation of cerebral microvascular tone in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:992-1003.
- Fernandez-Monreal M, Lopez-Atalaya JP, Benchenane K, Leveille F, Cacquevel M, Plawinski L, MacKenzie ET, Bu G, Buisson A, Vivien D (2004) Is tissue-type plasminogen activator a neuromodulator? *Mol Cell Neurosci* 25:594-601.
- Fields RD, Burnstock G (2006) Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7:423-436.
- Filosa JA, Blanco VM (2007) Neurovascular coupling in the mammalian brain. *Exp Physiol* 92:641-646.
- Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, Meredith AL, Wilkerson MK, Aldrich RW, Nelson MT (2006) Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci* 9:1397-1403.
- Font-Nieves M, Sans-Fons MG, Gorina R, Bonfill-Teixidor E, Salas-Perdomo A, Marquez-Kisinousky L, Santalucia T, Planas AM (2012) Induction of COX-2 enzyme and down-regulation of COX-1 expression by lipopolysaccharide (LPS) control prostaglandin E2 production in astrocytes. *J Biol Chem* 287:6454-6468.
- Fox PT, Raichle ME (1986) Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory stimulation in human subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:1140-1144.
- Frahm J, Kruger G, Merboldt KD, Kleinschmidt A (1996) Dynamic uncoupling and recoupling of perfusion and oxidative metabolism during focal brain activation in man. *Magn Reson Med* 35:143-148.
- Franceschini MA, Boas DA (2004) Noninvasive measurement of neuronal activity with near-infrared optical imaging. *Neuroimage* 21:372-386.
- Franceschini MA, Toronov V, Filiaci M, Gratton E, Fantini S (2000) On-line optical imaging of the human brain with 160-ms temporal resolution. *Opt Express* 6:49-57.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 294:1871-1875.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.
- Gabbott PL, Somogyi P (1986) Quantitative distribution of GABA-immunoreactive neurons in the visual cortex (area 17) of the cat. *Exp Brain Res* 61:323-331.
- Galarreta M, Erdelyi F, Szabo G, Hestrin S (2004) Electrical coupling among irregular-spiking GABAergic interneurons expressing cannabinoid receptors. *J Neurosci* 24:9770-9778.
- Gallopain T, Luppi PH, Cauli B, Urade Y, Rossier J, Hayaishi O, Lambolez B, Fort P (2005) The endogenous somnogen adenosine excites a subset of sleep-promoting neurons via A2A receptors in

the ventrolateral preoptic nucleus. *Neuroscience* 134:1377-1390.

Gebremedhin D, Lange AR, Lowry TF, Taheri MR, Birks EK, Hudetz AG, Narayanan J, Falck JR, Okamoto H, Roman RJ, Nithipatikom K, Campbell WB, Harder DR (2000) Production of 20-HETE and its role in autoregulation of cerebral blood flow. *Circ Res* 87:60-65.

Gebremedhin D, Ma YH, Falck JR, Roman RJ, VanRollins M, Harder DR (1992) Mechanism of action of cerebral epoxyeicosatrienoic acids on cerebral arterial smooth muscle
1. *Am J Physiol* 263:H519-H525.

Giaume C, Koulakoff A, Roux L, Holcman D, Rouach N (2010) Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions. *Nat Rev Neurosci* 11:87-99.

Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330:841-845.

Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT (2010) Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3811-3816.

Gopinath SP, Robertson CS, Grossman RG, Chance B (1993) Near-infrared spectroscopic localization of intracranial hematomas. *J Neurosurg* 79:43-47.

Gordon GR, Choi HB, Rungta RL, Ellis-Davies GC, Macvicar BA (2008) Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* 456:745-749.

Gorter JA, Van Vliet EA, Rauwerda H, Breit T, Stad R, van SL, Vreugdenhil E, Redeker S, Hendriksen E, Aronica E, Lopes da Silva FH, Wadman WJ (2007) Dynamic changes of proteases and protease inhibitors revealed by microarray analysis in CA3 and entorhinal cortex during epileptogenesis in the rat. *Epilepsia* 48 Suppl 5:53-64.

Gotoh J, Kuang TY, Nakao Y, Cohen DM, Melzer P, Itoh Y, Pak H, Pettigrew K, Sokoloff L (2001) Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H821-H829.

Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN (1986) Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324:361-364.

Groves JT, Wang CC (2000) Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:687-695.

Gsell W, Burke M, Wiedermann D, Bonvento G, Silva AC, Dauphin F, Buhrle C, Hoehn M, Schwindt W (2006) Differential effects of NMDA and AMPA glutamate receptors on functional magnetic resonance imaging signals and evoked neuronal activity during forepaw stimulation of the rat. *J Neurosci* 26:8409-8416.

Gurden H, Uchida N, Mainen ZF (2006) Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* 52:335-345.

Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA (2006) Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96:834-845.

- Hall CN, Reynell C, Gesslein B, Hamilton NB, Mishra A, Sutherland BA, O'Farrell FM, Buchan AM, Lauritzen M, Attwell D (2014) Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508:55-60.
- HAMBERGER A, HYDEN H (1963) Inverse enzymatic changes in neurons and glia during increased function and hypoxia. *J Cell Biol* 16:521-525.
- Hamel E (2006) Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* (1985) 100:1059-1064.
- Harder DR, Alkayed NJ, Lange AR, Gebremedhin D, Roman RJ (1998) Functional hyperemia in the brain: hypothesis for astrocyte-derived vasodilator metabolites. *Stroke* 29:229-234.
- Harper AM, MacKenzie ET (1977) Effects of 5-hydroxytryptamine on pial arteriolar calibre in anaesthetized cats. *J Physiol* 271:735-746.
- Hashimoto T, Hussien R, Cho HS, Kaufer D, Brooks GA (2008) Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles 1. *PLoS One* 3:e2915.
- Hassel B, Brathe A (2000) Cerebral metabolism of lactate in vivo: evidence for neuronal pyruvate carboxylation. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:327-336.
- Hendry SH, Jones EG, Beinfeld MC (1983) Cholecystinin-immunoreactive neurons in rat and monkey cerebral cortex make symmetric synapses and have intimate associations with blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2400-2404.
- Herard AS, Dubois A, Escartin C, Tanaka K, Delzescaux T, Hantraye P, Bonvento G (2005) Decreased metabolic response to visual stimulation in the superior colliculus of mice lacking the glial glutamate transporter GLT-1. *Eur J Neurosci* 22:1807-1811.
- Hetu PO, Riendeau D (2005) Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. *Biochem J* 391:561-566.
- Hill DK, Keynes RD (1949) Opacity changes in stimulated nerve. *J Physiol* 108:278-281.
- Hirase H (2005) A multi-photon window onto neuronal-glia-vascular communication. *Trends Neurosci* 28:217-219.
- Hof PR, Pascale E, Magistretti PJ (1988) K⁺ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca²⁺-dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 8:1922-1928.
- Hoffmeyer HW, Enager P, Thomsen KJ, Lauritzen MJ (2007) Nonlinear neurovascular coupling in rat sensory cortex by activation of transcallosal fibers. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:575-587.
- Hoozemans JJ, Rozemuller AJ, Janssen I, De Groot CJ, Veerhuis R, Eikelenboom P (2001) Cyclooxygenase expression in microglia and neurons in Alzheimer's disease and control brain. *Acta Neuropathol* 101:2-8.
- Horn R, Marty A (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol* 92:145-159.
- Hoshi Y, Mizukami S, Tamura M (1994) Dynamic features of hemodynamic and metabolic changes in the human brain during all-night sleep as revealed by near-infrared spectroscopy. *Brain Res* 652:257-262.

- Hoshi Y, Tamura M (1997) Fluctuations in the cerebral oxygenation state during the resting period in functional mapping studies of the human brain. *Med Biol Eng Comput* 35:328-330.
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C (2008) Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci* 28:5207-5217.
- Houser CR, Hendry SH, Jones EG, Vaughn JE (1983) Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensory-motor cortex. *J Neurocytol* 12:617-638.
- Hu Y, Wilson GS (1997) A temporary local energy pool coupled to neuronal activity: fluctuations of extracellular lactate levels in rat brain monitored with rapid-response enzyme-based sensor 1. *J Neurochem* 69:1484-1490.
- Huang YY, Bach ME, Lipp HP, Zhuo M, Wolfer DP, Hawkins RD, Schoonjans L, Kandel ER, Godfraind JM, Mulligan R, Collen D, Carmeliet P (1996) Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8699-8704.
- Hultman K, Tjarnlund-Wolf A, Fish RJ, Wilhelmsson U, Rydenhag B, Pekny M, Kruthof EK, Jern C (2008) Retinoids and activation of PKC induce tissue-type plasminogen activator expression and storage in human astrocytes. *J Thromb Haemost* 6:1796-1803.
- HYDEN H (1959) Quantitative assay of compounds in isolated, fresh nerve cells and glial cells from control and stimulated animals. *Nature* 184:433-435.
- HYDEN H, Rapallino MV, Cupello A (2000) Unraveling of important neurobiological mechanisms by the use of pure, fully differentiated neurons obtained from adult animals. *Prog Neurobiol* 60:471-499.
- Iadecola C (2004) Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:347-360.
- Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369-1376.
- Ikeda-Matsuo Y, Ota A, Fukada T, Uematsu S, Akira S, Sasaki Y (2006) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a critical factor of stroke-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:11790-11795.
- Iloff JJ, D'Ambrosio R, Ngai AC, Winn HR (2003) Adenosine receptors mediate glutamate-evoked arteriolar dilation in the rat cerebral cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1631-H1637.
- Imig JD, Simpkins AN, Renic M, Harder DR (2011) Cytochrome P450 eicosanoids and cerebral vascular function. *Expert Rev Mol Med* 13:e7.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, guilar-Bryan L, Seino S, Bryan J (1995a) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270:1166-1170.
- Inagaki N, Gono T, Clement JP, Wang CZ, guilar-Bryan L, Bryan J, Seino S (1996) A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K⁺ channels. *Neuron* 16:1011-1017.
- Inagaki N, Inazawa J, Seino S (1995b) cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of the human

ATP-sensitive potassium channel, uKATP-1, gene (KCNJ8). *Genomics* 30:102-104.

Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y (1996) A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *J Biol Chem* 271:24321-24324.

Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, Sokoloff L (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4879-4884.

Ivanov A, Mukhtarov M, Bregestovski P, Zilberter Y (2011) Lactate Effectively Covers Energy Demands during Neuronal Network Activity in Neonatal Hippocampal Slices. *Front Neuroenergetics* 3:2.

Ji L, Zhou J, Zafar R, Kantorovich S, Jiang R, Carney PR, Jiang H (2012) Cortical neurovascular coupling driven by stimulation of channelrhodopsin-2. *PLoS One* 7:e46607.

Jimenez AI, Castro E, Mirabet M, Franco R, Delicado EG, Miras-Portugal MT (1999) Potentiation of ATP calcium responses by A2B receptor stimulation and other signals coupled to Gs proteins in type-1 cerebellar astrocytes. *Glia* 26:119-128.

Jobsis FF (1977) Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198:1264-1267.

John SA, Ottolia M, Weiss JN, Ribalet B (2008) Dynamic modulation of intracellular glucose imaged in single cells using a FRET-based glucose nanosensor. *Pflugers Arch* 456:307-322.

Jones EG, « History of cortical cytology », dans : Peters A & Jones EG (dir.) *Cerebral Cortex, Volume 1: Cellular components of the cerebral cortex*, New York & London, Plenum Press 1984 Chapitre 1: pp 1-34.

Jones EG (1970) On the mode of entry of blood vessels into the cerebral cortex. *J Anat* 106:507-520.

Joo SH, Kwon KJ, Kim JW, Kim JW, Hasan MR, Lee HJ, Han SH, Shin CY (2010) Regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue plasminogen activator activity by alpha-synuclein in rat primary glial cells. *Neurosci Lett* 469:352-356.

Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23:1-10.

Kanai Y (1997) Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr Opin Cell Biol* 9:565-572.

Karagiannis A, Gallopin T, David C, Battaglia D, Geoffroy H, Rossier J, Hillman EM, Staiger JF, Cauli B (2009) Classification of NPY-expressing neocortical interneurons. *J Neurosci* 29:3642-3659.

Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science* 305:99-103.

Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2317-2321.

- Kawaguchi Y (1995) Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J Neurosci* 15:2638-2655.
- Kawaguchi Y (1993) Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 69:416-431.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1996) Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16:2701-2715.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1993) Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol* 70:387-396.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7:476-486.
- Keller A (2013) Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. *Swiss Med Wkly* 143:w13892.
- Kettenmann H, Verkhratsky A (2011) [Neuroglia--living nerve glue]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79:588-597.
- Kis B, Snipes JA, Isse T, Nagy K, Busija DW (2003) Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1287-1292.
- Knot HJ, Nelson MT (1998) Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol* 508 (Pt 1):199-209.
- Knot HJ, Zimmermann PA, Nelson MT (1996) Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J Physiol* 492 (Pt 2):419-430.
- Knudsen GM, Paulson OB, Hertz MM (1991) Kinetic analysis of the human blood-brain barrier transport of lactate and its influence by hypercapnia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:581-586.
- Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR (2006) Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol* (1985) 100:307-317.
- Koehler RC, Roman RJ, Harder DR (2009) Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci* 32:160-169.
- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045-1056.
- Kowianski P, Lietzau G, Steliga A, Waskow M, Morys J (2013) The astrocytic contribution to neurovascular coupling - Still more questions than answers? *Neurosci Res*.
- Krimer LS, Muly EC, III, Williams GV, Goldman-Rakic PS (1998) Dopaminergic regulation of cerebral cortical microcirculation. *Nat Neurosci* 1:286-289.
- Kubota Y, Kawaguchi Y (1997) Two distinct subgroups of cholecystokinin-immunoreactive cortical interneurons. *Brain Res* 752:175-183.
- Lacalle-Aurioles M, Mateos-Perez JM, Guzman-De-Villoria JA, Olazaran J, Cruz-Orduna I, eman-Gomez Y, Martino ME, Desco M (2014) Cerebral blood flow is an earlier indicator of perfusion abnormalities

- than cerebral blood volume in Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 34:654-659.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9:247-258.
- Lane RD, Waldstein SR, Chesney MA, Jennings JR, Lovallo WR, Kozel PJ, Rose RM, Drossman DA, Schneiderman N, Thayer JF, Cameron OG (2009) The rebirth of neuroscience in psychosomatic medicine, Part I: historical context, methods, and relevant basic science. *Psychosom Med* 71:117-134.
- Lazarewicz JW, Salinska E (1995) N-methyl-D-aspartate-evoked release of cyclo-oxygenase products in rabbit hippocampus: an in vivo microdialysis study. *J Neurosci Res* 40:660-666.
- Lear JL, Kasliwal RK (1991) Autoradiographic measurement of cerebral lactate transport rate constants in normal and activated conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:576-580.
- Lecrux C, Toussay X, Kocharyan A, Fernandes P, Neupane S, Levesque M, Plaisier F, Shmuel A, Cauli B, Hamel E (2011) Pyramidal neurons are "neurogenic hubs" in the neurovascular coupling response to whisker stimulation. *J Neurosci* 31:9836-9847.
- Lee JH, Durand R, Gradinaru V, Zhang F, Goshen I, Kim DS, Fenno LE, Ramakrishnan C, Deisseroth K (2010) Global and local fMRI signals driven by neurons defined optogenetically by type and wiring. *Nature* 465:788-792.
- Leithner C, Royl G, Offenhauser N, Fuchtemeier M, Kohl-Bareis M, Villringer A, Dirnagl U, Lindauer U (2010) Pharmacological uncoupling of activation induced increases in CBF and CMRO₂. *J Cereb Blood Flow Metab* 30:311-322.
- Lent R, Azevedo FA, Andrade-Moraes CH, Pinto AV (2012) How many neurons do you have? Some dogmas of quantitative neuroscience under revision. *Eur J Neurosci* 35:1-9.
- Levin EG, del Zoppo GJ (1994) Localization of tissue plasminogen activator in the endothelium of a limited number of vessels. *Am J Pathol* 144:855-861.
- Levin EG, Santell L, Osborn KG (1997) The expression of endothelial tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 110 (Pt 2):139-148.
- Li SR, Wu KK, Anggard E, Ferns G (1993) Localization of prostaglandin G/H synthase gene expression in rat brain by in situ hybridization. *Biol Signals* 2:77-83.
- Lincoln J (1995) Innervation of cerebral arteries by nerves containing 5-hydroxytryptamine and noradrenaline. *Pharmacol Ther* 68:473-501.
- Lindauer U, Megow D, Matsuda H, Dirnagl U (1999) Nitric oxide: a modulator, but not a mediator, of neurovascular coupling in rat somatosensory cortex. *Am J Physiol* 277:H799-H811.
- Liss B, Haeckel O, Wildmann J, Miki T, Seino S, Roeper J (2005) K-ATP channels promote the differential degeneration of dopaminergic midbrain neurons. *Nat Neurosci* 8:1742-1751.
- Liu X, Li C, Falck JR, Roman RJ, Harder DR, Koehler RC (2008) Interaction of nitric oxide, 20-HETE, and EETs during functional hyperemia in whisker barrel cortex. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H619-H631.

- Lochner JE, Honigman LS, Grant WF, Gessford SK, Hansen AB, Silverman MA, Scalettar BA (2006) Activity-dependent release of tissue plasminogen activator from the dendritic spines of hippocampal neurons revealed by live-cell imaging. *J Neurobiol* 66:564-577.
- Logothetis NK (2002) The neural basis of the blood-oxygen-level-dependent functional magnetic resonance imaging signal. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357:1003-1037.
- Long JB, Rigamonti DD, Dosaka K, Kraimer JM, Martinez-Arizala A (1992) Somatostatin causes vasoconstriction, reduces blood flow and increases vascular permeability in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther* 260:1425-1432.
- Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH, Han X, Takano T, Wang S, Sim FJ, Goldman SA, Nedergaard M (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci* 27:12255-12266.
- Ludwig R, Feindt J, Lucius R, Petersen A, Mentlein R (1996) Metabolism of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide by cultivated neurons and glial cells. *Brain Res Mol Brain Res* 37:181-191.
- Ma J, Ayata C, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA (1996) Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression. *Am J Physiol* 270:H1085-H1090.
- Madani R, Hulo S, Toni N, Madani H, Steimer T, Muller D, Vassalli JD (1999) Enhanced hippocampal long-term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J* 18:3007-3012.
- Magistretti PJ (1990) VIP neurons in the cerebral cortex. *Trends Pharmacol Sci* 11:250-254.
- Magistretti PJ, Morrison JH, Shoemaker WJ, Sapin V, Bloom FE (1981) Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: a possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:6535-6539.
- Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1155-1163.
- Magistretti PJ, Sorg O, Yu N, Martin JL, Pellerin L (1993) Neurotransmitters regulate energy metabolism in astrocytes: implications for the metabolic trafficking between neural cells. *Dev Neurosci* 15:306-312.
- Maher F, Vannucci S, Takeda J, Simpson IA (1992) Expression of mouse-GLUT3 and human-GLUT3 glucose transporter proteins in brain
1. *Biochem Biophys Res Commun* 182:703-711.
- Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D (2001) Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 276:4469-4475.
- Mangia S, Tkac I, Logothetis NK, Gruetter R, Van de Moortele PF, Ugurbil K (2007) Dynamics of lactate concentration and blood oxygen level-dependent effect in the human visual cortex during repeated identical stimuli
1. *J Neurosci Res* 85:3340-3346.

- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5:793-807.
- Martin C, Houitte D, Guillermier M, Petit F, Bonvento G, Gurden H (2012) Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. *Front Neural Circuits* 6:1.
- Martin JL, Feinstein DL, Yu N, Sorg O, Rossier C, Magistretti PJ (1992) VIP receptor subtypes in mouse cerebral cortex: evidence for a differential localization in astrocytes, microvessels and synaptosomal membranes. *Brain Res* 587:1-12.
- Martineau M, Galli T, Baux G, Mothet JP (2008) Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission. *Glia* 56:1271-1284.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.
- Mataga N, Nagai N, Hensch TK (2002) Permissive proteolytic activity for visual cortical plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:7717-7721.
- Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP (2010) The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58:1094-1103.
- McCormick DA, Connors BW, Lighthall JW, Prince DA (1985) Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J Neurophysiol* 54:782-806.
- McEwen BS, Reagan LP (2004) Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur J Pharmacol* 490:13-24.
- McILWAIN H (1953) Substances which support respiration and metabolic response to electrical impulses in human cerebral tissues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 16:257-266.
- McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR (1996) Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem* 66:386-393.
- Mehl M, Bidmon HJ, Hilbig H, Zilles K, Dringen R, Ullrich V (1999) Prostacyclin synthase is localized in rat, bovine and human neuronal brain cells. *Neurosci Lett* 271:187-190.
- Metea MR, Kofuji P, Newman EA (2007) Neurovascular coupling is not mediated by potassium siphoning from glial cells. *J Neurosci* 27:2468-2471.
- Metea MR, Newman EA (2006) Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26:2862-2870.
- Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S (1998) Defective insulin secretion and enhanced insulin action in KATP channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10402-10406.
- Mintun MA, Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME (2004) Increased lactate/pyruvate ratio augments blood flow in physiologically activated human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:659-664.
- Mishra A, O'Farrell FM, Reynell C, Hamilton NB, Hall CN, Attwell D (2014) Imaging pericytes and capillary diameter in brain slices and isolated retinae. *Nat Protoc* 9:323-336.

- Mize RR, Banfro FT, Scheiner CA (1996) Pre- and postnatal expression of amino acid neurotransmitters, calcium binding proteins, and nitric oxide synthase in the developing superior colliculus. *Prog Brain Res* 108:313-332.
- Moreau C, Prost AL, Derand R, Vivaudou M (2005) SUR, ABC proteins targeted by KATP channel openers. *J Mol Cell Cardiol* 38:951-963.
- Mosso, A., 1880. Sulla circolazione del cervello dell'uomo. *Atti R. Accad. Lincei* 5, 237–358.
- Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J Neurophysiol* 20:408-434.
- Mountcastle VB (1997) The columnar organization of the neocortex. *Brain* 120 (Pt 4):701-722.
- Mulligan SJ, Macvicar BA (2004) Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199.
- Mungrue IN, Brecht DS (2004) nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *J Cell Sci* 117:2627-2629.
- Myren M, Baun M, Ploug KB, Jansen-Olesen I, Olesen J, Gupta S (2010) Functional and molecular characterization of prostaglandin E2 dilatory receptors in the rat craniovascular system in relevance to migraine. *Cephalalgia* 30:1110-1122.
- Myren M, Olesen J, Gupta S (2011) Pharmacological and expression profile of the prostaglandin I(2) receptor in the rat craniovascular system. *Vascul Pharmacol* 55:50-58.
- Nagai N, Urano T, Endo A, Takahashi H, Takada Y, Takada A (1999) Neuronal degeneration and a decrease in laminin-like immunoreactivity is associated with elevated tissue-type plasminogen activator in the rat hippocampus after kainic acid injection. *Neurosci Res* 33:147-154.
- Narumiya S, FitzGerald GA (2001) Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108:25-30.
- Nassar T, Akkawi S, Shina A, Haj-Yehia A, Bdeir K, Tarshis M, Heyman SN, Higazi AA (2004) In vitro and in vivo effects of tPA and PAI-1 on blood vessel tone. *Blood* 103:897-902.
- Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB (1990) Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol* 259:C3-18.
- Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 268:C799-C822.
- Ngai AC, Coyne EF, Meno JR, West GA, Winn HR (2001) Receptor subtypes mediating adenosine-induced dilation of cerebral arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280:H2329-H2335.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A (2001) The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 7:59-64.
- Niessing J, Ebisch B, Schmidt KE, Niessing M, Singer W, Galuske RA (2005) Hemodynamic signals correlate tightly with synchronized gamma oscillations. *Science* 309:948-951.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Kerr JN, Helmchen F (2004) Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat Methods* 1:31-37.

- Niwa K, Araki E, Morham SG, Ross ME, Iadecola C (2000) Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. *J Neurosci* 20:763-770.
- Niwa K, Haensel C, Ross ME, Iadecola C (2001) Cyclooxygenase-1 participates in selected vasodilator responses of the cerebral circulation. *Circ Res* 88:600-608.
- Nizar K, et al. (2013) In vivo Stimulus-Induced Vasodilation Occurs without IP3 Receptor Activation and May Precede Astrocytic Calcium Increase. *J Neurosci* 33:8411-8422.
- O'Brien J, Kla KM, Hopkins IB, Malecki EA, McKenna MC (2007) Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem Res* 32:597-607.
- Obrig H, Hirth C, Junge-Hulsing JG, Doge C, Wolf T, Dirnagl U, Villringer A (1996) Cerebral oxygenation changes in response to motor stimulation. *J Appl Physiol* (1985) 81:1174-1183.
- Ogawa S, Lee TM, Kay AR, Tank DW (1990) Brain magnetic resonance imaging with contrast dependent on blood oxygenation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9868-9872.
- Ohata H, Cao S, Koehler RC (2006) Contribution of adenosine A2A and A2B receptors and heme oxygenase to AMPA-induced dilation of pial arterioles in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R728-R735.
- Orbach HS, Cohen LB, Grinvald A (1985) Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J Neurosci* 5:1886-1895.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung WH, Hempstead BL, Lu B (2004) Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306:487-491.
- Papadopoulos GC, Parnavelas JG, Cavanagh ME (1987) Extensive co-existence of neuropeptides in the rat visual cortex. *Brain Res* 420:95-99.
- Pardridge WM, Oldendorf WH (1977) Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 28:5-12.
- Park L, Gallo EF, Anrather J, Wang G, Norris EH, Paul J, Strickland S, Iadecola C (2008) Key role of tissue plasminogen activator in neurovascular coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:1073-1078.
- Parsons MP, Hirasawa M (2010) ATP-sensitive potassium channel-mediated lactate effect on orexin neurons: implications for brain energetics during arousal. *J Neurosci* 30:8061-8070.
- Paspalas CD, Papadopoulos GC (1996) Ultrastructural relationships between noradrenergic nerve fibers and non-neuronal elements in the rat cerebral cortex. *Glia* 17:133-146.
- Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B, Strickland S (2003) Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6:168-174.
- Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S (2005) Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA

- receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:443-448.
- Peakman MC, Hill SJ (1994) Adenosine A2B-receptor-mediated cyclic AMP accumulation in primary rat astrocytes. *Br J Pharmacol* 111:191-198.
- Pellerin L (2003) Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. *Neurochem Int* 43:331-338.
- Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap AP, Pierre K (2005) Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *J Neurosci Res* 79:55-64.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10625-10629.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2012) Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1152-1166.
- Peng X, Carhuapoma JR, Bhardwaj A, Alkayed NJ, Falck JR, Harder DR, Traystman RJ, Koehler RC (2002) Suppression of cortical functional hyperemia to vibrissal stimulation in the rat by epoxygenase inhibitors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H2029-H2037.
- Peng X, Zhang C, Alkayed NJ, Harder DR, Koehler RC (2004) Dependency of cortical functional hyperemia to forepaw stimulation on epoxygenase and nitric oxide synthase activities in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:509-517.
- Pepicelli O, Fedele E, Berardi M, Raiteri M, Levi G, Greco A, jnone-Cat MA, Minghetti L (2005) Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat hippocampus. *J Neurochem* 93:1561-1567.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443:700-704.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Peters A, Harriman KM (1988) Enigmatic bipolar cell of rat visual cortex. *J Comp Neurol* 267:409-432.
- Petzold GC, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN (2008) Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 58:897-910.
- Pham-Dinh D, « Les cellules gliales » dans : Tritsch D, Chesnoy-Marchais D, Feltz A (dir.), *Physiologie du neurone*, Paris, Doin éditeurs, 1998 [2ème édition], pp 31-90.
- Phelps ME (2000) Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9226-9233.
- Phillips SJ, Whisnant JP (1992) Hypertension and the brain. The National High Blood Pressure Education Program. *Arch Intern Med* 152:938-945.
- Pierre K, Pellerin L (2005) Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function 1. *J Neurochem* 94:1-14.
- Pilitsis JG, Kimelberg HK (1998) Adenosine receptor mediated stimulation of intracellular calcium in acutely isolated astrocytes. *Brain Res* 798:294-303.

- Porras OH, Loaiza A, Barros LF (2004) Glutamate mediates acute glucose transport inhibition in hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:9669-9673.
- Porras OH, Ruminot I, Loaiza A, Barros LF (2008) Na(+)-Ca(2+) cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. *Glia* 56:59-68.
- Porter JT, Cauli B, Staiger JF, Lambolez B, Rossier J, Audinat E (1998) Properties of bipolar VIPergic interneurons and their excitation by pyramidal neurons in the rat neocortex. *Eur J Neurosci* 10:3617-3628.
- Povysheva NV, Zaitsev AV, Kroner S, Krimer OA, Rotaru DC, Gonzalez-Burgos G, Lewis DA, Krimer LS (2007) Electrophysiological differences between neurogliaform cells from monkey and rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 97:1030-1039.
- Prichard J, Rothman D, Novotny E, Petroff O, Kuwabara T, Avison M, Howseman A, Hanstock C, Shulman R (1991) Lactate rise detected by ¹H NMR in human visual cortex during physiologic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5829-5831.
- Puetz S, Lubomirov LT, Pfitzer G (2009) Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. *Physiology (Bethesda)* 24:342-356.
- Purves D, « Studying the Nervous Systems of Humans and Other Animals », dans : Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO & Williams SM (dir.), *Neuroscience*, Sunderland, Sinauer Associates Inc, 2004 [3^{ème} edition] pp 1-31.
- Raichle ME, Mintun MA (2006) Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci* 29:449-476.
- Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, Titcombe RF, Misra C, Khatri L, Getzoff ED, Ziff EB (2007) Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci* 27:3445-3455.
- Ramirez BG, Rodrigues TB, Violante IR, Cruz F, Fonseca LL, Ballesteros P, Castro MM, Garcia-Martin ML, Cerdan S (2007) Kinetic properties of the redox switch/redox coupling mechanism as determined in primary cultures of cortical neurons and astrocytes from rat brain. *J Neurosci Res* 85:3244-3253.
- Ramon y Cajal S « General structure of the cerebral cortex », dans: Ramon y Cajal S (dir.) *Histology of the Nervous System*, Volume II, New York-Oxford, Oxford University Press, 1995 [édition traduite en français de l'espagnol « Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados » par Azoulay L puis en anglais par Swanson N & Swanson LW]
- Rancillac A, Rossier J, Guille M, Tong XK, Geoffroy H, Amatore C, Arbault S, Hamel E, Cauli B (2006) Glutamatergic Control of Microvascular Tone by Distinct GABA Neurons in the Cerebellum. *J Neurosci* 26:6997-7006.
- Raoult E, Benard M, Komuro H, Lebon A, Vivien D, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D, Galas L (2014) Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum. *J Neurochem*.
- Ritter MR, Banin E, Moreno SK, Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander M (2006) Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 116:3266-3276.

- Riva C, Ross B, Benedek GB (1972) Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol* 11:936-944.
- Roman RJ (2002) P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol Rev* 82:131-185.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322:1551-1555.
- Roy CS, Sherrington CS (1890) On the Regulation of the Blood-supply of the Brain. *J Physiol* 11:85-158.
- Ruan CH, So SP, Ruan KH (2011) Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease. *Life Sci* 88:24-30.
- Rubart M, Patlak JB, Nelson MT (1996) Ca²⁺ currents in cerebral artery smooth muscle cells of rat at physiological Ca²⁺ concentrations. *J Gen Physiol* 107:459-472.
- Rzagalinski BA, Willoughby KA, Hoffman SW, Falck JR, Ellis EF (1999) Calcium influx factor, further evidence it is 5, 6-epoxyeicosatrienoic acid. *J Biol Chem* 274:175-182.
- Sagher O, Zhang XQ, Szeto W, Thai QA, Jin Y, Kassell NF, Lee KS (1993) Live computerized videomicroscopy of cerebral microvessels in brain slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:676-682.
- Salles FJ, Strickland S (2002) Localization and regulation of the tissue plasminogen activator-plasmin system in the hippocampus. *J Neurosci* 22:2125-2134.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P (1993) Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7240-7244.
- Salzberg BM, Davila HV, Cohen LB (1973) Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature* 246:508-509.
- Samson AL, Medcalf RL (2006) Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. *Neuron* 50:673-678.
- Sandor P (1999) Nervous control of the cerebrovascular system: doubts and facts. *Neurochem Int* 35:237-259.
- Sang N, Zhang J, Marcheselli V, Bazan NG, Chen C (2005) Postsynaptically synthesized prostaglandin E₂ (PGE₂) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE₂ EP₂ receptor. *J Neurosci* 25:9858-9870.
- Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science* 284:1845-1848.
- Schreiber SS, Tan Z, Sun N, Wang L, Zlokovic BV (1998) Immunohistochemical localization of tissue plasminogen activator in vascular endothelium of stroke-prone regions of the rat brain. *Neurosurgery* 43:909-913.
- Schridde U, Khubchandani M, Motelow JE, Sanganahalli BG, Hyder F, Blumenfeld H (2008) Negative BOLD with large increases in neuronal activity. *Cereb Cortex* 18:1814-1827.
- Schummers J, Yu H, Sur M (2008) Tuned responses of astrocytes and their influence

on hemodynamic signals in the visual cortex. *Science* 320:1638-1643.

Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM (1997) Brain lactate is an obligatory aerobic energy substrate for functional recovery after hypoxia: further in vitro validation. *J Neurochem* 69:423-426.

Scott NA, Murphy TH (2012) Hemodynamic Responses Evoked by Neuronal Stimulation via Channelrhodopsin-2 Can Be Independent of Intracortical Glutamatergic Synaptic Transmission. *PLoS One* 7:e29859.

Serebryakov V, Zakharenko S, Snetkov V, Takeda K (1994) Effects of prostaglandins E1 and E2 on cultured smooth muscle cells and strips of rat aorta. *Prostaglandins* 47:353-365.

Shi J, Wang Q, Johansson JU, Liang X, Woodling NS, Priyam P, Loui TM, Merchant M, Breyer RM, Montine TJ, Andreasson K (2012) Inflammatory prostaglandin E2 signaling in a mouse model of Alzheimer disease. *Ann Neurol* 72:788-798.

Shin HK, Shin YW, Hong KW (2000) Role of adenosine A(2B) receptors in vasodilation of rat pial artery and cerebral blood flow autoregulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H339-H344.

Shivachar AC, Willoughby KA, Ellis EF (1995) Effect of protein kinase C modulators on 14,15-epoxyeicosatrienoic acid incorporation into astroglial phospholipids
1. *J Neurochem* 65:338-346.

Siao CJ, Fernandez SR, Tsirka SE (2003) Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci* 23:3234-3242.

Siegle I, Klein T, Zou MH, Fritz P, Komhoff M (2000) Distribution and cellular localization of prostacyclin synthase in human brain. *J Histochem Cytochem* 48:631-641.

Sillaber C, Baghestanian M, Bevec D, Willheim M, Agis H, Kapiotis S, Fureder W, Bankl HC, Kiener HP, Speiser W, Binder BR, Lechner K, Valent P (1999) The mast cell as site of tissue-type plasminogen activator expression and fibrinolysis. *J Immunol* 162:1032-1041.

Silver IA, Erecinska M (1994) Extracellular glucose concentration in mammalian brain: continuous monitoring of changes during increased neuronal activity and upon limitation in oxygen supply in normo-, hypo-, and hyperglycemic animals
1. *J Neurosci* 14:5068-5076.

Simon A, Olah S, Molnar G, Szabadics J, Tamas G (2005) Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *J Neurosci* 25:6278-6285.

Sloper JJ, Hiorns RW, Powell TP (1979) A qualitative and quantitative electron microscopic study of the neurons in the primate motor and somatic sensory cortices. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 285:141-171.

Snyder SH (1992) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257:494-496.

Somogyi P, Tamas G, Lujan R, Buhl EH (1998) Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res Brain Res Rev* 26:113-135.

Spector AA (2009) Arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway. *J Lipid Res* 50 Suppl:S52-S56.

- Spruston N (2008) Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat Rev Neurosci* 9:206-221.
- Stark DT, Bazan NG (2011) Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors differentially modulate neuronal cyclooxygenase-2 function, lipid peroxidation, and neuroprotection. *J Neurosci* 31:13710-13721.
- Stefanovic B, Schwandt W, Hoehn M, Silva AC (2007) Functional uncoupling of hemodynamic from neuronal response by inhibition of neuronal nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:741-754.
- Stepnoski RA, LaPorta A, Raccuia-Behling F, Blonder GE, Slusher RE, Kleinfeld D (1991) Noninvasive detection of changes in membrane potential in cultured neurons by light scattering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:9382-9386.
- Straub SV, Bonev AD, Wilkerson MK, Nelson MT (2006) Dynamic inositol trisphosphate-mediated calcium signals within astrocytic endfeet underlie vasodilation of cerebral arterioles. *J Gen Physiol* 128:659-669.
- Straub SV, Nelson MT (2007) Astrocytic calcium signaling: the information currency coupling neuronal activity to the cerebral microcirculation. *Trends Cardiovasc Med* 17:183-190.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflugers Arch* 423:511-518.
- Sun W, McConnell E, Pare JF, Xu Q, Chen M, Peng W, Lovatt D, Han X, Smith Y, Nedergaard M (2013) Glutamate-dependent neuroglial calcium signaling differs between young and adult brain. *Science* 339:197-200.
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation
1. *Cell* 144:810-823.
- Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E, Nakaya H (2001) Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res* 88:570-577.
- Suzuki N, Hardebo JE (1993) The cerebrovascular parasympathetic innervation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 5:33-46.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9:260-267.
- Talman WT, Nitschke DD (2007) Neuronal nitric oxide mediates cerebral vasodilatation during acute hypertension. *Brain Res* 1139:126-132.
- Tamas G, Lorincz A, Simon A, Szabadics J (2003) Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science* 299:1902-1905.
- Tang EH, Jensen BL, Skott O, Leung GP, Feletou M, Man RY, Vanhoutte PM (2008) The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E₂ in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 78:130-138.
- Tang EH, Vanhoutte PM (2008) Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. *Physiol Genomics* 32:409-418.

- Tang F, Lane S, Korsak A, Paton JF, Gourine AV, Kasparov S, Teschemacher AG (2014) Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat Commun* 5:3284.
- Tanswell P, Seifried E, Su PC, Feuerer W, Rijken DC (1989) Pharmacokinetics and systemic effects of tissue-type plasminogen activator in normal subjects. *Clin Pharmacol Ther* 46:155-162.
- Tasaki I, Watanabe A, Sandlin R, Carnay L (1968) Changes in fluorescence, turbidity, and birefringence associated with nerve excitation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61:883-888.
- Tatu L, Moulin T, Bogousslavsky J, Duvernoy H (1998) Arterial territories of the human brain: cerebral hemispheres. *Neurology* 50:1699-1708.
- Tholey G, Roth-Schechter BF, Mandel P (1981) Activity and isoenzyme pattern of lactate dehydrogenase in neurons and astroblasts cultured from brains of chick embryos. *J Neurochem* 36:77-81.
- Thomson AM, Bannister AP (2003) Interlaminar connections in the neocortex. *Cereb Cortex* 13:5-14.
- Tsirka SE, Gualandris A, Amaral DG, Strickland S (1995) Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator. *Nature* 377:340-344.
- Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland S (1997) An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 17:543-552.
- Tuor UI (1992) Acute hypertension and sympathetic stimulation: local heterogeneous changes in cerebral blood flow. *Am J Physiol* 263:H511-H518.
- Tuor UI, Kelly PA, Edvinsson L, McCulloch J (1990) Neuropeptide Y and the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:591-601.
- Valent P, Baghestanian M, Bankl HC, Sillaber C, Sperr WR, Wojta J, Binder BR, Lechner K (2002) New aspects in thrombosis research: possible role of mast cells as profibrinolytic and antithrombotic cells. *Thromb Haemost* 87:786-790.
- Vaucher E, Hamel E (1995) Cholinergic basal forebrain neurons project to cortical microvessels in the rat: electron microscopic study with anterogradely transported *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin and choline acetyltransferase immunocytochemistry. *J Neurosci* 15:7427-7441.
- Viollet C, Lanneau C, Faivre-Bauman A, Zhang J, Djordjijevic D, Loudes C, Gardette R, Kordon C, Epelbaum J (1997) Distinct patterns of expression and physiological effects of sst1 and sst2 receptor subtypes in mouse hypothalamic neurons and astrocytes in culture. *J Neurochem* 68:2273-2280.
- Vlassenko AG, Rundle MM, Raichle ME, Mintun MA (2006) Regulation of blood flow in activated human brain by cytosolic NADH/NAD⁺ ratio. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:1964-1969.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton JY, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.
- Waeber C, Moskowitz MA (2005) Migraine as an inflammatory disorder. *Neurology* 64:S9-15.
- Waite PME & Tracey DJ « Trigeminal Sensory System » dans Paxinos G (dir.)

- The rat nervous system, London, London Academic Press, 1995 pp. 705-724.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291-300.
- Walz W, Mukerji S (1988) Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia* 1:366-370.
- Wang F, Smith NA, Xu Q, Fujita T, Baba A, Matsuda T, Takano T, Bekar L, Nedergaard M (2012) Astrocytes modulate neural network activity by Ca²⁺-dependent uptake of extracellular K⁺. *Sci Signal* 5:ra26.
- Wang H, Hitron IM, Iadecola C, Pickel VM (2005) Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 15:1250-1260.
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H (2004) Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561:65-90.
- Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA (1998) Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice. *Nat Med* 4:228-231.
- Ware JH, Dibenedetto AJ, Pittman RN (1995) Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain. *Brain Res Bull* 37:275-281.
- Williamson DH, Lund P, Krebs HA (1967) The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. *Biochem J* 103:514-527.
- Willis T. *Cerebi Anatome, cui accessit nervorum, descriptio et usus.* Flesher J. 1664.
- Woodward DF, Jones RL, Narumiya S (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol Rev* 63:471-538.
- Wu DM, Kawamura H, Sakagami K, Kobayashi M, Puro DG (2003) Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H2083-H2090.
- Wu F, Echeverry R, Wu J, An J, Haile WB, Cooper DS, Catano M, Yepes M (2013) Tissue-type plasminogen activator protects neurons from excitotoxin-induced cell death via activation of the ERK1/2-CREB-ATF3 signaling pathway. *Mol Cell Neurosci* 52:9-19.
- Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B (2011) In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *J Neurosci* 31:7477-7485.
- Yaksh TL, Wang JY, Go VL (1987) Cortical vasodilatation produced by vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and by physiological stimuli in the cat. *J Cereb Blood Flow Metab* 7:315-326.
- Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y (1997) Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive K⁺ channel. *J Physiol* 499 (Pt 3):715-720.
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386.

- Yang G, Huard JM, Beitz AJ, Ross ME, Iadecola C (2000) Stellate neurons mediate functional hyperemia in the cerebellar molecular layer. *J Neurosci* 20:6968-6973.
- Yang G, Zhang Y, Ross ME, Iadecola C (2003) Attenuation of activity-induced increases in cerebellar blood flow in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:H298-H304.
- Yepes M, Lawrence DA (2004) Tissue-type plasminogen activator and neuroserpin: a well-balanced act in the nervous system? *Trends Cardiovasc Med* 14:173-180.
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA (2003) Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest* 112:1533-1540.
- Yermakova AV, Rollins J, Callahan LM, Rogers J, O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-1 in human Alzheimer and control brain: quantitative analysis of expression by microglia and CA3 hippocampal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:1135-1146.
- Zawar C, Neumcke B (2000) Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Pflugers Arch* 439:256-262.
- Zawar C, Plant TD, Schirra C, Konnerth A, Neumcke B (1999) Cell-type specific expression of ATP-sensitive potassium channels in the rat hippocampus. *J Physiol* 514 (Pt 2):327-341.
- Zhang F, Xu S, Iadecola C (1995) Role of nitric oxide and acetylcholine in neocortical hyperemia elicited by basal forebrain stimulation: evidence for an involvement of endothelial nitric oxide. *Neuroscience* 69:1195-1204.
- Zhen G, Kim YT, Li RC, Yocum J, Kapoor N, Langer J, Dobrowolski P, Maruyama T, Narumiya S, Dore S (2012) PGE2 EP1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33:2215-2219.
- Zhou M, Schools GP, Kimelberg HK (2006) Development of GLAST(+) astrocytes and NG2(+) glia in rat hippocampus CA1: mature astrocytes are electrophysiologically passive. *J Neurophysiol* 95:134-143.
- Zhuo M, Holtzman DM, Li Y, Osaka H, DeMaro J, Jacquin M, Bu G (2000) Role of tissue plasminogen activator receptor LRP in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 20:542-549.
- Zilberter Y, Zilberter T, Bregestovski P (2010) Neuronal activity in vitro and the in vivo reality: the role of energy homeostasis 1. *Trends Pharmacol Sci* 31:394-401.
- Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.
- Zlokovic BV, Wang L, Sun N, Haffke S, Verrall S, Seeds NW, Fisher MJ, Schreiber SS (1995) Expression of tissue plasminogen activator in cerebral capillaries: possible fibrinolytic function of the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 37:955-961.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

Résumé :

Le couplage étroit entre l'activité neuronale et l'augmentation du flux sanguin, appelé couplage neurovasculaire, est essentiel aux fonctions cérébrales. Ce processus est par ailleurs à la base de l'imagerie médicale cérébrale non invasive largement utilisée pour déterminer l'activité neuronale chez l'individu sain ou malade. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires de ce couplage restent encore débattus. La compréhension de ce processus permettra non seulement une interprétation plus fine des signaux d'imagerie cérébrale mais également un meilleur diagnostic des maladies neurologiques.

De nombreux messagers vasoactifs sont impliqués dans le couplage neurovasculaire du cortex cérébral. Les prostanoïdes, notamment libérés lors de l'activation des récepteurs NMDA, sont responsables de près de la moitié de l'augmentation de flux sanguin cérébral induite par des stimulations sensorielles. Cependant, l'origine cellulaire, moléculaire, la nature ainsi que les cibles de ces messagers lipidiques restent incertaines.

La prostaglandine E₂ (PGE₂) et la prostacycline (PGI₂) sont les deux principaux prostanoïdes vasodilatateurs du cortex cérébral. Ils sont produits à partir d'enzymes limitantes, les cyclo-oxygénases de type 1 ou 2 (COX-1 ou COX-2) et d'enzymes terminales spécifiques. J'ai montré, sur tranches de cortex cérébral de rats, que les vasodilatations induites par le NMDA dépendaient de la COX-2 mais pas de la COX-1. Ces réponses nécessitent également l'activation des récepteurs EP2 et EP4 de la PGE₂ et IP de la PGI₂. De plus, *in vivo*, l'augmentation de flux évoquée par la stimulation des vibrisses est également atténuée par les antagonistes des récepteurs EP2 et EP4. Ces données *in vitro* et *in vivo* montrent donc l'implication de la PGE₂ et de ses récepteurs dans ces réponses vasodilatatrices.

La caractérisation des cellules productrices de prostanoïdes vasodilatateurs montre que les neurones pyramidaux sont les principales cellules du cortex cérébral équipées pour la biosynthèse de la PGE₂ et, dans une moindre mesure, de la PGI₂. Un tiers d'entre elles co-expriment notamment la COX-2 et une enzyme terminale de synthèse de la PGE₂. De plus, nos données *in vivo* ont montré que la stimulation optogénétique des neurones pyramidaux corticaux induit une réponse neurovasculaire dépendante de l'activité de la COX-2.

L'ensemble de ces travaux démontre que les neurones pyramidaux sont capables, via l'activité de la COX-2 et la libération de la PGE₂, d'agir sur les récepteurs vasodilatateurs EP2 et EP4. Ces neurones pyramidaux jouent donc un rôle clé dans le couplage neurovasculaire cortical.

Mots clés : [Couplage neurovasculaire, Prostanoïde, COX-2, Cortex, Neurone pyramidal, Couplage neurométabolique]

Intitulé et adresse du laboratoire :

Laboratoire Neurosciences Paris Seine CNRS UMR 8246, Inserm U 1130, UPMC UM CR18
Université Pierre et Marie Curie, 9 quai saint Bernard, 75005, Paris