



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Effet de la privation de glucose sur l'activité de la glutamine synthetase dans les cultures d'astrocytes

Roelandt, Cécile

*Award date:*  
1991

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## L'EFFET DE LA PRIVATION DE GLUCOSE SUR L'ACTIVITE DE LA GLUTAMINE SYNTHETASE DANS LES CULTURES D'ASTROCYTES

ROELANDT cécile

### Résumé

Plusieurs auteurs ont suggéré que des lésions comme celles liées à l'hypoglycémie provoquent des complications extraneuronales. Dans cette optique, la présente étude se propose d'examiner les effets de la privation de glucose dans les cultures d'astrocytes et plus spécialement au niveau de la glutamine synthétase.

Deux situations ont été étudiées. Premièrement, les astrocytes âgés de 14 jours ont été soumis à une privation de glucose. Deuxièmement, après un traitement au dB.cAMP 0,25mM pendant 72H, les cellules furent soumises à une privation de glucose.

Les cellules non traitées montrent une baisse d'activité de la GS de 24% dans le milieu DMEM et de 37% dans le milieu HBSS. Lorsque les cellules sont traitées au dB.cAMP, l'augmentation d'activité de la GS est de 248%. Tandis qu'une privation de glucose de 24H sur ces mêmes cellules provoque une baisse de 48%. Des expériences préliminaires indiquent que la diminution de l'activité de la GS n'est pas due aux variations de concentrations d'ATP et d'ADP.

Plusieurs auteurs suggèrent que l'inactivation de la GS serait due à des réactions d'oxydation catalysées par un métal. Ces réactions concerneraient la réduction du  $Fe^{+++}$  et la production d' $H_2O_2$ . Dans une autre approche, une réduction en ATP et une augmentation en ADP après 48H de privation de glucose pourraient affecter l'activité de la GS.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 1991

Promoteurs : C. De Schryver et J. Mertens-Strijthagen

## Liste des abréviations

a.a. = acides aminés

ADN = acide désoxyribonucléique

ADP = adénosine diphosphate

AMP = adénosine monophosphate

ATP = adénosine triphosphate

CP = créatine phosphate

DMEM = "Dulbecco's modified eagle's medium"

GABA = acide  $\gamma$  aminobutyrique

GFAP = glial fibrillary acidic protein

GS = glutamine synthétase

HBSS = Hanks' balanced salt solution

$\alpha$ -Kg =  $\alpha$ -kétoglutarate

mal = malate

mV = millivolt

$\mu$ M = micromole

nM = nanomole

NGF = nerve growth factor

OAA = acide oxaloacétique

PBS = phosphate buffered saline

suc = succinate

TCA = acide tricarboxylique

Que les premières lignes de ce mémoire soient mon meilleur ambassadeur pour adresser mes plus vifs remerciements à toutes les personnes, trop nombreuses pour être citées ici, qui m'ont aidée à l'élaboration et à la rédaction de cette étude.

Néanmoins, je désirerais exprimer ma plus profonde reconnaissance

à Monsieur, le Docteur C. De Schryver , promoteur de ce mémoire, qui m'a accueillie dans son département de physiologie-pharmacologie et qui m'a fait bénéficier de sa compétence;

à Madame J. Mertens, qui m'a aidée tout au long de l'année académique par ses nombreux conseils tant au point de vue des expériences que de la rédaction de ce mémoire ;

à Mademoiselle M. Raes pour les renseignements bibliographiques dont elle m'a fait profiter;

à Madame F. Rosier et Monsieur G. Baudoux, qui m'ont aidée dans la recherche des données et pour l'ambiance qu'ils créent au sein du groupe;

à Madame C.Daelman, pour m'avoir enseigné les rudiments de la mise en culture des cellules;

à Madame J.Lacremans, sans qui, je n'aurais pu aboutir dans ce travail;

à Monsieur R.Generet, pour son amabilité;

à Mademoiselle V. Spoo, pour l'exécution de la mise en page de ce travail;

à Claire, Emmanuel et Luc.

Introduction générale.

1

Première partie : approches théoriques.

2

Chapitre 1 : généralités sur les astrocytes.

2

1. Définitions : histologie de la névroglie.

2

1.1. La névroglie périphérique.

2

1.2. la névroglie des centres.

2

1.2.1. La névroglie épithéliale.

2

1.2.2. La névroglie interstitielle.

3

1.2.2.1. La magroglie.

3

1.2.2.1.1. Les astrocytes.

3

1.2.2.1.2. Les oligodendrocytes.

4

1.2.2.2. La microglie.

4

2. Origines embryologiques.

5

3. Mise en évidence des astrocytes.

6

4. Principaux rôles des astrocytes.

7

4.1. Régulation du microenvironnement du cerveau.

7

4.1.1. Maintien de la concentration  
extracellulaire en ion  $K^+$ .

7

4.1.1.1. La  $Na^+/K^+$  ATPase.

7

4.1.1.2. Le co-transport  $K^+/Cl^-$ .

8

4.1.1.3. Le "spatial buffering".

9

4.1.2. Maintien du pH dans le milieu  
extracellulaire.

10

4.2. Rôle dans le métabolisme de la choline.

10

4.3. Rôle dans le métabolisme des acides  
aminés neurotransmetteurs.

11

4.3.1. Circulation des acides aminés dans les  
neurones glutamatergiques.

12

4.3.2. Circulation des acides aminés dans les  
neurones gabaergiques.

12

4.3.3. Rôle dans le cycle des acides  
tricarboxyliques.

13

4.4. Réserve de glycogène

13

4.5. Induction de la barrière hémato-encéphalique

14

4.6. Tuteurs du développement

14

4.7. Rôle dans la cicatrisation des neurones.	15
4.8. Synthèse et libération des facteurs de croissance.	15
Chapitre 2 : utilisation des cultures d'astrocytes.	16
1. <u>Avantages et désavantages des cultures.</u>	16
2. <u>Principales différences in vitro.</u>	17
Chapitre 3 : l'hypoglycémie.	18
1. <u>Les astrocytes et les pathologies cérébrales.</u>	18
1.1. L'hypoglycémie et la fonction cérébrale.	19
1.1.1. Métabolisme énergétique.	19
1.1.2. Intermédiaires glycolytiques et du cycle de Krebs.	19
1.1.3. Acides aminés et dérivés.	19
1.1.4. Ammoniac.	21
1.1.5. Phospholipides, acides gras et protéines.	21
1.1.6. Ions.	22
2. <u>Localisation cellulaire et caractérisation de la GS.</u>	22
Deuxième partie : matériel et méthodes.	24
1. <u>Culture d'astrocytes.</u>	24
1.1. Comment obtenir des astrocytes.	24
1.1.1. Par séparation de la glie et des neurones sur des cerveaux de rats adultes.	24
1.1.2. Par la mise en culture de cellules provenant de rats d'un jour.	24
1.1.2.1. Préparation du matériel et des instruments utilisés.	24
1.1.2.2. Préparation des solutions.	25
1.1.2.2.1. Milieu de culture DMEM.	25
1.1.2.2.2. Solution HBSS.	25
1.1.2.2.3. Dibutyryl cAMP.	26
1.1.2.2.4. Bromo cAMP.	26
1.1.2.2.5. Acide butyrique.	26
1.1.2.2.6. Cycloheximine.	26
1.1.2.2.7. Cytosine arabinoside	26

1.1.2.3. Choix du tissu utilisé.	26
1.1.2.4. Mise en culture des cellules astrocytaires.	26
1.1.2.5. Comptage des cellules et ensemencement.	27
1.1.2.6. Changements de milieux de culture.	28
<b>2. <u>Caractérisation des astrocytes par marquage immunocytochimique à la GFAP.</u></b>	<b>29</b>
2.1. Introduction.	29
2.2. Matériel.	29
2.3. Technique d'immunofluorescence.	29
<b>3. <u>Dosage du glucose, du glycogène, du DNA, de l'ATP et de la créatine phosphate</u></b>	<b>31</b>
3.1. Dosage du glucose.	31
3.2. Dosage du glycogène.	32
3.2.1. Extraction du glycogène sur des astrocytes.	32
3.2.2. Hydrolyse du glycogène par l'amyloglucosidase.	32
3.2.3. Dosage du glucose.	32
3.3. Dosage fluorométrique du DNA avec le bisbenzimidazole.	33
3.3.1. Structure du bisbenzimidazole H33258 fluorochrome.	33
3.3.2. Mesure spectrofluorométrique.	33
3.3.3. Lavage des astrocytes et extraction du DNA.	34
3.3.4. Matériel.	34
3.3.5. Dosage fluorométrique du DNA.	34
3.4. Extraction et dosage de l'ATP et de la créatine phosphate.	35
3.4.1. Lavage des astrocytes et extraction de l'ATP.	35
3.4.2. Dosage de l'ATP et de la créatine phosphate par fluorescence.	35
3.4.2.1. Principe.	35
3.4.2.2. Dosage de l'ATP.	36
3.4.2.3. Dosage de la créatine phosphate.	37

4 <u>Mesures enzymatiques.</u>	38
4.1. Dosage de la glutamine synthétase.	38
4.1.1. Introduction.	38
4.1.2. Matériel.	38
4.1.3. Dosage de l'enzyme.	40
4.2. Dosage de la lactate déshydrogénase.	40
4.2.1. Introduction.	40
4.2.2. Matériel.	40
4.2.3. Dosage de l'enzyme.	40
4.3. Dosage des protéines.	41

Objectifs du mémoire	42
----------------------	----

Troisième partie : résultats et discussions.	43
----------------------------------------------	----

<u>1. Caractérisation morphologique et biochimique d'une culture cellulaire.</u>	43
----------------------------------------------------------------------------------	----

1.1. Evolution de la culture en fonction du temps.	43
1.1.1. Les protéines.	43
1.1.2. Le DNA.	43
1.1.3. La glutamine synthétase (GS).	44
1.2. Marquage à la GFAP .	45
1.3. Etat énergétique des astrocytes à maturité.	45
1.4. Caractérisation préliminaire de la cinétique de la GS.	46
1.4.1. Glutamine synthétase-glutamate.	46
1.4.2. Glutamine synthétase-hydroxylamine.	47
1.4.3. Glutamine synthétase-ATP.	48

<u>2. Effet de la privation de D-glucose.</u>	49
-----------------------------------------------	----

2.1. Effet de la privation de D-glucose sur la GS.	49
2.1.1. Activité de la GS en milieu DMEM.	49
2.1.2. Activité de la GS en milieu HBSS.	50
2.2. Effet de la privation de glucose sur l'état énergétique des astrocytes.	51
2.1.1. Dosage de l'ATP et de la CP dans un milieu DMEM.	51
2.1.2. Dosage de l'ATP et de la CP dans un milieu HBSS.	52
2.3. Effet de la privation de D-glucose sur le glycoène.	53
2.3.1. Dosage du glucose dans un milieu DMEM.	53
2.3.2. Dosage du glucose dans un milieu HBSS.	53
2.3.3. Dosage du glycoène dans un milieu DMEM.	54
2.4. Restauration de l'activité de la GS après privation de D-glucose.	54

2.5. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS.	57
2.5.1. Glutamine synthétase-glutamate.	57
2.5.2. Glutamine synthétase-hydroxylamine.	57
2.5.3. Glutamine synthétase-ATP.	58
<u>3. Induction de la différenciation cellulaire par le dBcAMP.</u>	<b>59</b>
3.1. Marquage au GFAP.	<b>59</b>
3.2. Etude de l'activité de la GS.	<b>59</b>
3.2.1. Variation de la concentration en dBcAMP.	<b>59</b>
3.2.2. Variation du temps de traitement au dBcAMP.	<b>60</b>
3.3. Etude de l'état énergétique des astrocytes.	<b>62</b>
3.3.1. Variation du temps d'incubation du dBcAMP.	<b>62</b>
3.4. Action de substances autres que le dBcAMP.	<b>63</b>
3.4.1. Induction de l'activité de la GS par le bromo- cAMP.	<b>63</b>
3.4.2. Induction de l'activité de la GS par le n- butyrate.	<b>64</b>
3.5. Action des inhibiteurs.	<b>64</b>
3.5.1. Action de la cytosine arabinoside.	<b>65</b>
3.5.2. Action de la cycloheximide.	<b>66</b>
3.6. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS.	<b>67</b>
3.6.1. Glutamine synthétase-glutamate.	<b>67</b>
3.6.2. Glutamine synthétase-hydroxylamine.	<b>67</b>
3.6.3. Glutamine synthétase-ATP.	<b>68</b>
<u>4. Privation de glucose après induction au dibutyrylcAMP.</u>	<b>69</b>
4.1. Effet de la privation du D-glucose après induction sur la GS.	<b>69</b>
4.1.1. Dosage de l'activité de la GS en milieu HBSS.	<b>69</b>
4.2. Effet de la privation de glucose après induction sur l'état énergétique des astrocytes.	<b>70</b>
4.2.1. Dosage de l'ATP et de la CP dans un milieu HBSS.	<b>70</b>
4.3. Caractérisation cinétique préliminaire.	<b>71</b>
4.3.1. Glutamine synthétase-glutamate.	<b>71</b>
4.3.2. Glutamine synthétase-hydroxylamine.	<b>71</b>
4.3.3. Glutamine synthétase-ATP.	<b>72</b>
discussions.	<b>74</b>
bibliographie	<b>78</b>

# INTRODUCTION GENERALE

Le système nerveux humain de part sa complexité physiologique, biochimique et anatomique est un sujet d'étude intéressant.

Depuis longtemps déjà, les scientifiques érigent de nombreuses expériences pour essayer d'approfondir les connaissances concernant les modes d'élaboration et d'action du système nerveux.

L'élucidation de ses mécanismes moléculaires est difficile suite à l'abondance de phénotypes cellulaires mais surtout suite aux interactions complexes entre les cellules (neurones, astrocytes) (HANSSON, 1988).

Des dysfonctionnements de ces interactions biochimiques mènent à des troubles pathologiques graves et à des dommages cellulaires irréversibles comme dans le cas de l'hypoglycémie. Cette dernière est la complication la plus commune du traitement à l'insuline des patients atteints de diabète sucré de type I.

Le cerveau, incapable de réaliser la néoglucogénèse, dépend d'un approvisionnement continu en glucose par la circulation et de réserves sous forme de glycogène (FACCI et al., 1990). Des problèmes dans l'apport du substrat peuvent mener au coma hypoglycémique et au pire à la mort de l'individu (SIESJO et AGARDH, 1983).

A ce stade, la découverte de nouvelles techniques de caractérisation et de culture des cellules a permis de mettre en évidence les rôles fondamentaux joués par les astrocytes dans le développement et les pathologies cérébrales telle que l'hypoglycémie (KIMELBERG et NORENBORG, 1989).

PREMIERE PARTIE

APPROCHES THEORIQUES

## CHAPITRE 1 GENERALITES SUR LES ASTROCYTES.

### 1. DEFINITIONS: HISTOLOGIE DE LA NEUROGLIE.

La névroglie est définie comme étant la partie non neuronale du cerveau. Ces cellules assurent vis-à-vis des neurones les mêmes fonctions que le tissu conjonctif envers les cellules épithéliales: soutien, nutrition, défense.

La glie fut longtemps considérée comme un milieu amorphe. Par la suite, le développement des méthodes histochimiques permirent de montrer que la glie était composée de types cellulaires distincts (KIMELBERG et NORENBURG, 1989):

- la névroglie périphérique

- la névroglie des centres

#### 1.1. La névroglie périphérique (BELLOT et LANGE, 1988):

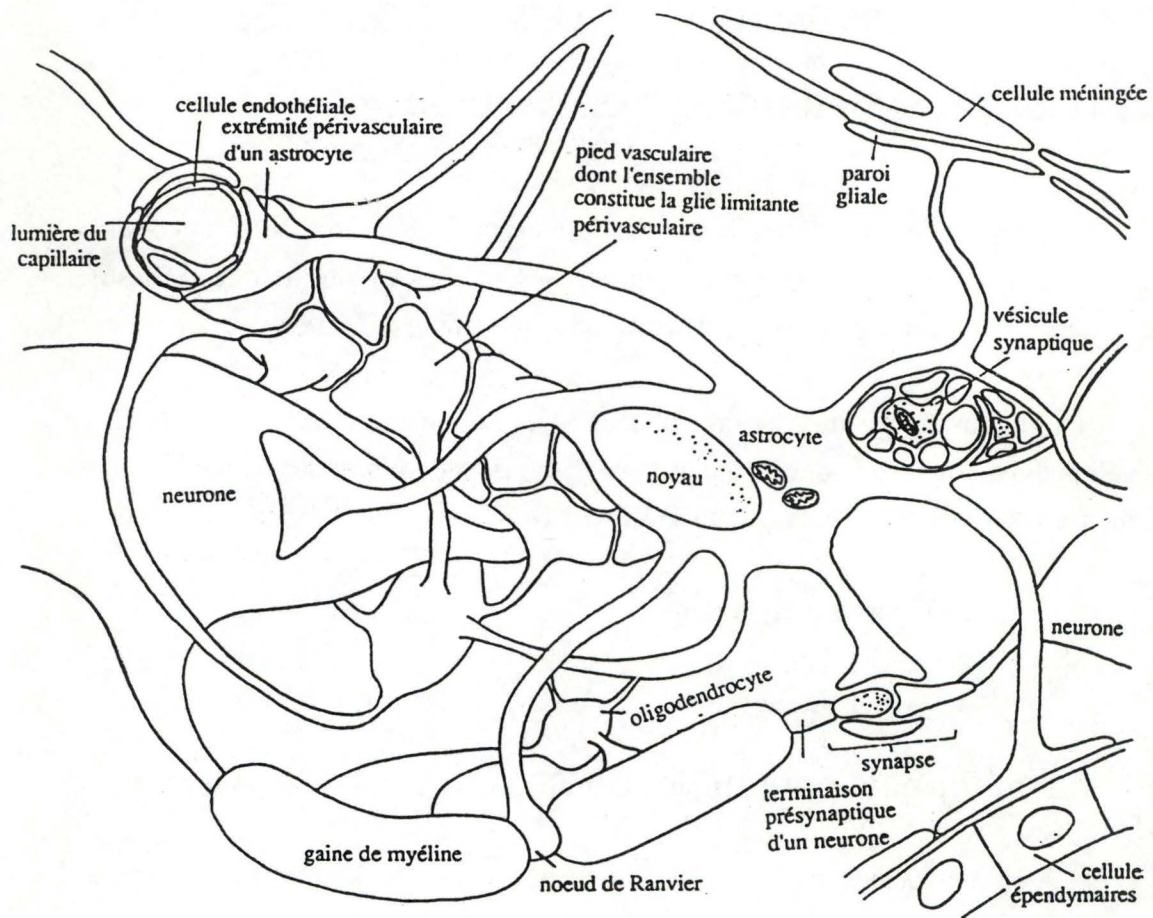
Elle est formée par les cellules de Schwann qui entourent les fibres nerveuses périphériques et les cellules satellites des cellules ganglionnaires.

#### 1.2. La névroglie des centres (BELLOT et LANGE, 1988):

##### 1.2.1. La névroglie épithéliale:

Dans certains cas, la névroglie s'agence en une assise de cellules juxtaposées à la manière d'un épithélium simple.

Nous avons ainsi les cellules de l'épendyme qui sont les cellules bordant les cavités internes du système nerveux central. Ces cellules jouent un rôle dans la résorption et la sécrétion des liquides cérébraux.



Et les cellules des plexus choroïdes qui participent à la production du liquide céphalo-rachidien.

#### 1.2.2. La névroglie interstitielle: (BELLOT et LANGE, 1988):

Elle désigne l'ensemble des cellules gliales contenues dans la substance grise et dans la substance blanche des centres nerveux. Elle est constituée de la macroglie et de la microglie.

##### 1.2.2.1. La macroglie:

Elle est d'origine ectodermique. Ses cellules présentent des caractéristiques communes avec les neurones. Elles possèdent un corps cellulaire muni de nombreux prolongements cytoplasmiques.

Cependant, elles se distinguent des neurones par leur fonction, l'existence d'un seul type de prolongements, l'absence de jonctions synaptiques et la possibilité de multiplication cellulaire, en particulier lors d'une lésion cellulaire (cicatrice gliale) (KIMELBERG et NORENBURG, 1989).

Parmi les cellules de la macroglie, nous trouvons les astrocytes protoplasmiques, les astrocytes fibreux et les oligodendrocytes.

##### 1.2.2.1.1. Les astrocytes:

Ils apparaissent comme des cellules étoilées munies de nombreux prolongements fins et ramifiés.

Les prolongements ont trois destinations possibles. Premièrement les cylindraxes et les neurones voisins. Deuxièmement, les capillaires sanguins où les astrocytes forment des pieds vasculaires. Et enfin, la surface externe du système nerveux central (fig.1) (KIMELBERG et NORENBURG, 1989)

Les astrocytes protoplasmiques sont localisés dans la substance grise (CAMBIER et PESSAC, 1989). Ils renferment un noyau clair, arrondi ou ovale. Les gliofilaments sont rares et disposés en faisceaux (RAFF et al., 1983).

Leurs prolongements courts et épais sont munis d'expansions secondaires, ce qui leur confère des contours très irréguliers (JUURLINK et HERTZ, 1985).

Les astrocytes fibreux, eux, s'observent surtout dans la substance blanche (CAMBIER et PESSAC, 1989). Leur noyau assez clair présente souvent une forme irrégulière et découpée (HANSSON, 1988). Les filaments gliaux sont très abondants aussi bien dans le corps cellulaire que dans les prolongements. Ces derniers sont fins et rectilignes, peu ramifiés, de contours plus réguliers que ceux des astrocytes protoplasmiques (RAFF et al., 1983).

#### 1.2.2.1.2. Les oligodendrocytes:

Quant aux oligodendrocytes, ce sont les cellules gliales les plus nombreuses. Elles sont de taille inférieure aux astrocytes (BOOHER et al., 1972). Dans la substance blanche, nous distinguons des oligodendrocytes interfasciculaires. Dans la substance grise, ils sont disposés autour des péricaryons. Ce sont les oligodendrocytes satellites.

#### 1.2.2.2. La microglie:

Elle est d'origine mésenchymateuse. Ses cellules auraient colonisé le système nerveux central durant la vie foetale ou la période néonatale. Les microgliocytes ont un rôle essentiellement de phagocytose. Ce sont les macrophages spécialisés du système nerveux.

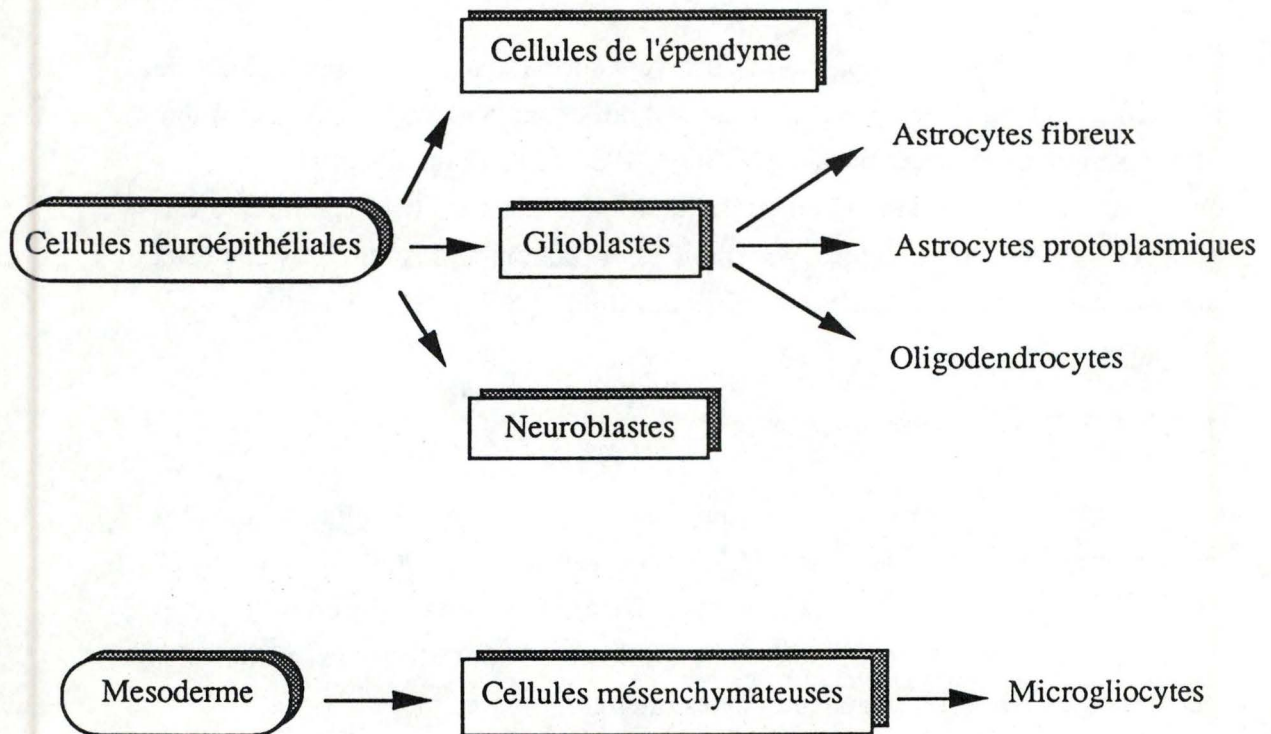


Figure 2: Origines embryologiques des cellules cérébrales

## 2. ORIGINES EMBRYOLOGIQUES.

Les cellules du cerveau ont surtout pour origine les cellules neuroépithéliales du tube neural (RAFF et al., 1983; HANSSON, 1988) mais également les cellules du mésoderme (fig. 2).

In vitro, les deux types d'astrocytes se développent à partir d'un progéniteur commun (FEDEROFF, 1980).

Cependant, l'environnement peut jouer un rôle dans la différenciation des cellules gliales. Ainsi, les cellules peuvent acquérir un phénotype mixte, ayant à la fois et les propriétés des astrocytes et celles des oligodendrocytes.

Ces observations suggèrent que les astrocytes et les oligodendrocytes se développent à partir de précurseurs communs, les glioblastes (RAFF et al., 1983) et montrent la plasticité des astrocytes en culture (JUURLINK et HERTZ, 1985; HANSSON, 1988).

## 3. MISE EN EVIDENCE DES ASTROCYTES

Les astrocytes peuvent être identifiés morphologiquement mais également grâce à des marqueurs macromoléculaires (HERTZ et al., 1985; HANSSON, 1988).

De nombreuses expériences ont montré que la glutamine synthétase, l'anhydrase carbonique, la protéine S-100 et la GFAP (glial fibrillary acidic protein) sont des protéines qui servent de marqueurs fonctionnels ou cellulaires (HERTZ et al., 1985; DE VELLIS et al., 1986).

La glutamine synthétase (GS) catalyse la réaction réversible qui forme la glutamine à partir de glutamate, d'ammoniac et d'ATP (MARTINEZ-HERNANDEZ, 1977; SWENNEBY et TORGNER, 1986; MURRAY et al., 1988).

Longtemps, la GS a été localisée exclusivement dans les astrocytes (BIGNAMI et al., 1972; NOREMBERG, 1979).

Mais récemment, des expériences immunocytochimiques ont révélé que les oligodendrocytes contiendraient également cette enzyme (CAMMER, 1990;1991).

L'anhydrase carbonique existe sous forme de deux isoenzymes. Ils catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone (DE VELLIS et al., 1986). La localisation de cette enzyme dans les astrocytes et les oligodendrocytes ou seulement dans les oligodendrocytes est encore discutée (JUURLINK et al., 1985).

La protéine S-100 est une protéine soluble, acide et dimérique. Elle est également un marqueur présent à la fois chez les astrocytes et les oligodendrocytes. Les neurones, eux aussi, en contiendraient une petite quantité (JUURLINK et al., 1985). Se fixant aux constituants de la membrane, elle facilite ainsi le transport des cations monovalents. Cependant, elle inhibe l'assemblage des microtubules du cerveau et provoque la dissociation de ceux-ci.

Tous ces rôles sont en rapport avec sa capacité de fixer le calcium et également le zinc (DE VELLIS et al., 1986).

Actuellement, la méthode de marquage des astrocytes la plus utilisée est la méthode immunocytochimique à la GFAP (GILDEN et al., 1976; MANTHORPE et al., 1979; HALLERMEYER et HAMPRECHT, 1984). Cette protéine découverte par BIGNAMI en 1972 représente un marqueur exclusivement présent dans les astrocytes (MANTHORPE et al., 1979; HANSSON, 1988). Elle est située dans le cytoplasme et forme avec d'autres constituants des filaments intermédiaires gliaux qui confèrent aux astrocytes leur forme caractéristique (GILDEN et al., 1976; KIMELBERG et NOREMBERG, 1989).

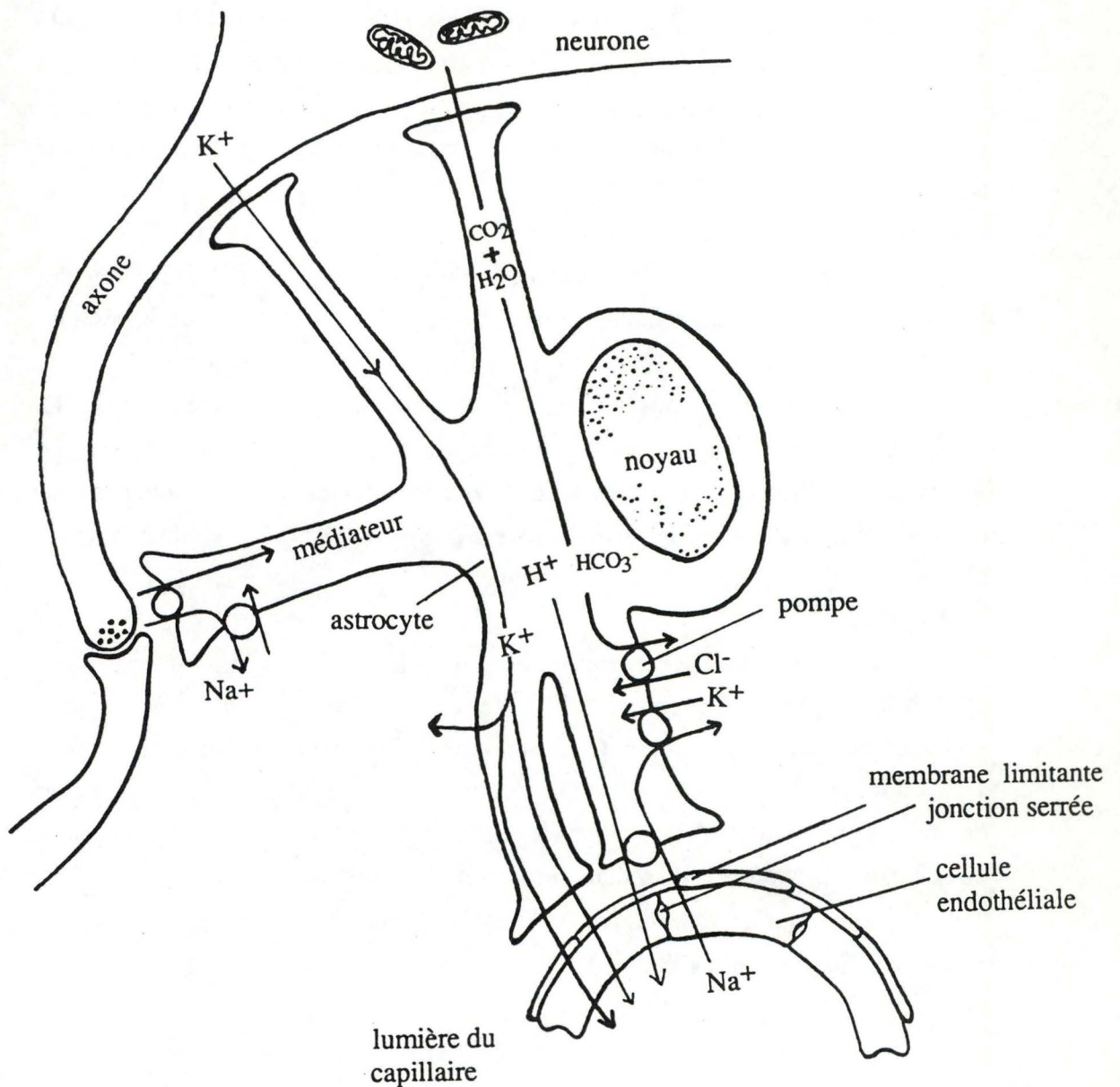


Figure 3: Illustration des systèmes de transport dans les astrocytes. Ces systèmes permettent d'échanger des substances tels les ions sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), bicarbonate ( $\text{HCO}_3^-$ ), chlorure ( $\text{Cl}^-$ ) et hydrogène ( $\text{H}^+$ ) avec les cellules notamment les neurones. Le dioxyde de carbone entre et sort librement des cellules (de KIMELBERG et NOREMBERG, 1989).

## 4. PRINCIPAUX ROLES DES ASTROCYTES.

### 4.1. REGULATION DU MICROENVIRONNEMENT DU CERVEAU.

#### 4.1.1. MAINTIEN DE LA CONCENTRATION EXTRACELLULAIRE EN ION $K^+$

Dans le système nerveux central, l'ion  $K^+$  extracellulaire joue un rôle capital dans l'excitabilité par ses effets sur le potentiel membranaire et sur la libération de neurotransmetteurs (GRISAR, 1979; HANSSON, 1988).

Lorsqu'un neurone est au repos, la concentration en  $K^+$  extracellulaire est d'environ 5 mMolaire, alors que la concentration intracellulaire est aux alentours de 100 mMolaire. Lors d'une dépolarisation, la concentration en  $K^+$  extracellulaire augmente jusqu'à 10-20 mMolaire (KIMELBERG et al, 1978; GRISAR, 1979).

Pour retrouver un niveau normal, le cerveau a dû mettre au point des systèmes de repompage. Les astrocytes possèdent trois mécanismes pour échanger les ions:

- la  $Na^+/K^+$  ATPase
- le co-transport  $K^+/Cl^-$
- le mécanisme du "spatial buffering"

#### 4.1.1.1. Les $Na^+/K^+$ ATPases:

Les  $Na^+/K^+$  ATPases sont des enzymes de référence des membranes plasmiques. Elles transportent 3  $Na^+$  vers l'extérieur de la cellule et 2  $K^+$  vers l'intérieur en hydrolysant l'ATP en ADP et en phosphate inorganique (KIMELBERG et al., 1978) (fig.3).

Leur rôle principal est de maintenir l'homéostasie de l'eau et des électrolytes dans le cerveau (HARIK, 1986).

Les  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases sont inhibées spécifiquement par l'ouabaine (KIMELBERG et al, 1978; HARIK, 1986; BENJAMIN, 1987).

Les neurones possèdent également une  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase mais elle présente des propriétés différentes de celle des astrocytes. Ainsi, lors d'une dépolarisation, seules les pompes des astrocytes ont une activité significative contrairement aux  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases des neurones dont l'activité à des concentrations de  $\text{K}^+$  importantes reste identique à celle observée à 5 mMolaire (HENN et al., 1972; GRISAR, 1979; SCHOUSBOE et al; 1980).

Pour expliquer le phénomène, RANSOM et CARLINI (1986) ont d'abord pensé qu'il existait deux enzymes différentes. Actuellement, il semble que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase astrocytaire et la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase neuronale représentent un seul et même enzyme.

D'autre part, les différences d'activité observées seraient dues à l'environnement membranaire qui n'est pas le même dans les astrocytes et dans les neurones (la composition des lipides est différente) (KIMELBERG et NORENBURG, 1989; KANFER, 1986).

Les propriétés varient également en fonction de l'âge des cellules (NORENBURG et al., 1978). En effet, les pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases ne fonctionnent pas dans un tissu trop jeune. A cet âge, les prolongements axonaux, dendritiques et bien entendu les cellules astrocytaires sont en plein développement (SCHOUSBOE et al., 1980).

#### 4.1.1.2. Le co-transport $\text{K}^+/\text{Cl}^-$ :

En second lieu, nous allons décrire un autre moyen utilisé par les astrocytes pour participer au retrait du  $\text{K}^+$  extracellulaire, le co-transport  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (KIMELBERG et al., 1978) (fig.3).

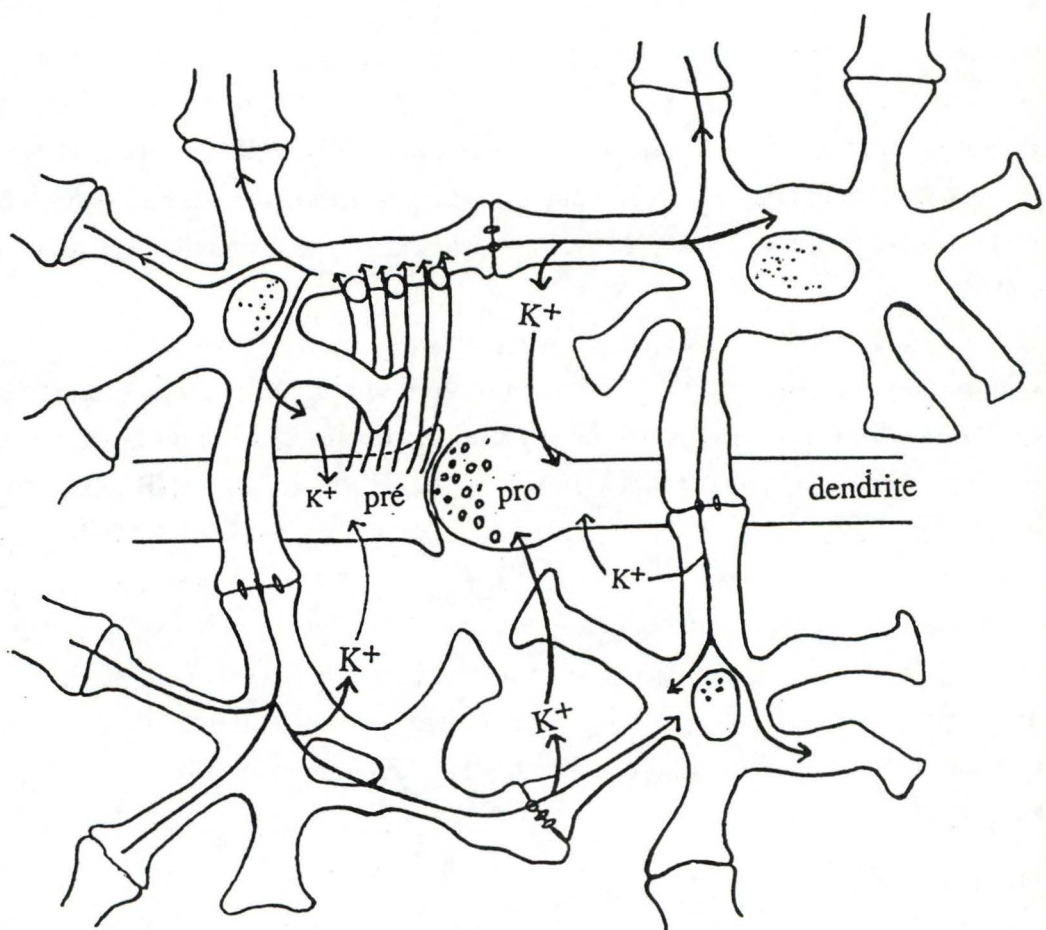


Figure 4: Illustration du "Spatial buffering". Les ions  $K^+$  libérés lors d'un potentiel d'action par une jonction présynaptique vont circuler à travers le réseau syncytial. Une fois libérés, les ions  $K^+$  seront repompés à travers la jonction postsynaptique d'un neurone.

In vivo, un tel système peut être testé en utilisant des bloqueurs spécifiques, tel que le furosémide qui est une substance employée comme diurétique et qui agit sur l'anse de Henle (RANSOM et CARLINI, 1986; GARAY, 1989).

L'entrée de  $K^+$  dans la cellule ne s'effectue que si l'ion  $K^+$  est accompagné de l'ion  $Cl^-$ . Le co-transport est couplé à une entrée d'eau (phénomène osmotique) (HARIK, 1986). Lors de pathologies, telles que l'hypoglycémie, l'anoxie, l'ischémie, l'eau rentre de manière anormale ce qui cause un gonflement astrocytaire (RANSOM et CARLINI, 1986; KIMELBERG et NORENBORG, 1989).

#### 4.1.1.3. Le "spatial buffering":

Un dernier mécanisme utilisé par les astrocytes est celui du "spatial buffering" (GRISAR; 1979).

Grâce à leurs prolongements protoplasmiques, les astrocytes forment un réseau syncytial où peut circuler facilement le  $K^+$  (HANSSON, 1988).

En 1969, ORKLAND a proposé l'existence d'un mécanisme connu maintenant sous le nom de "spatial buffering". Ce système repose sur deux caractéristiques des astrocytes: leur perméabilité importante au  $K^+$  et leur potentiel négatif variant très fort (de -60 mVolts à -90 mVolts) (GRISAR, 1979; HANSSON, 1988).

Nous allons maintenant détailler le mécanisme (fig. 4):

Lors d'une stimulation neuronale, l'ion  $K^+$  libéré dans l'espace extracellulaire est responsable d'une dépolarisation des cellules astrocytaires voisines.

Les astrocytes pompent activement le  $K^+$  grâce à la  $Na^+/K^+$  ATPase et grâce aussi aux systèmes de co-transport  $K^+/Cl^-$  (HENN et al., 1972; RANSOM et CARLINI, 1986).

Empruntant les jonctions serrées, les ions  $K^+$  atteignent rapidement en diffusant à travers le réseau syncitial le pôle de la dépolarisation. A ce niveau, des quantités importantes de  $K^+$  sont déversées dans le milieu extracellulaire grâce à des canaux situés dans la membrane.

Les ions  $K^+$  seront, ensuite, lentement repompés par les neurones (RANSOM et CARLINI, 1986; HANSSON, 1988).

#### 4.1.2. MAINTIEN DU PH DANS LE MILIEU EXTRACELLULAIRE .

D'autres systèmes de transport transmembranaire existent (RANSOM et CARLINI, 1986). Ainsi, nous avons les échanges  $Na^+/H^+$  et  $Cl^-/HCO_3^-$  qui jouent un rôle également dans le maintien du pH dans le milieu extracellulaire (KIMELBERG et NOREMBERG, 1989).

L'enzyme astrocytaire, l'anhydrase carbonique transforme le  $CO_2$  provenant des mitochondries contenues dans les neurones en  $H^+$  et en  $HCO_3^-$  (NOREMBERG, 1978). Elle participe donc activement à la régulation du pH. Les ions  $H^+$  formés seront échangés au niveau des capillaires contre des ions  $Na^+$  qui permettront d'alimenter la  $Na^+/K^+$  ATPase (fig.3).

Le maintien du pH extracellulaire est donc assuré par les astrocytes qui servent de moyen de transport pour les ions allant des neurones aux capillaires sanguins (RANSOM et CARLINI, 1986)

#### 4.2. ROLE DANS LE METABOLISME DE LA CHOLINE

La choline est le précurseur de la phosphatidylcholine qui intervient dans la composition lipidique des membranes et également le précurseur de l'acétylcholine, un neurotransmetteur excitateur.

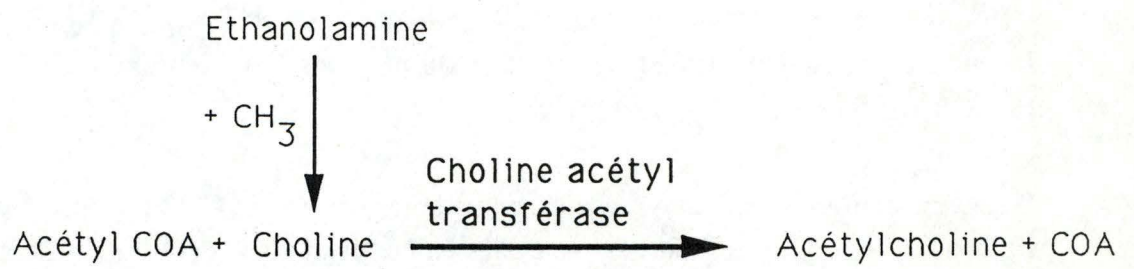


Figure 5: Réaction de formation de l'acétylcholine

Provenant de la circulation sanguine, la choline devrait passer la barrière hémato-encéphalique. Mais étant une substance hydrosoluble, elle est obligée de transiter dans les astrocytes avant d'atteindre les neurones (MASARELLI et al, 1986) (fig.5 ).

Le métabolisme de la choline s'explique comme suit:

La choline, aussi produite par la méthylation de l'éthanolamine, pénètre dans le cerveau via les pieds suceurs des astrocytes ou éventuellement , directement à travers l'espace extracellulaire. La choline est alors reprise par les astrocytes grâce à la pompe à  $\text{Na}^+$ . Dans le cytoplasme, la choline est métabolisée en phosphocholine et en phosphatidylcholine. En suivant le gradient de concentration du  $\text{K}^+$ , la choline peut quitter les astrocytes. Elle pénètre dans la partie présynaptique d'une terminaison nerveuse grâce à une pompe à  $\text{Na}^+$ . A l'intérieur, la choline est acétylée et se retrouve sous forme d'acétylcholine stockée dans des vésicules synaptiques. Lors d'une neurotransmission, l'acétylcholine est libérée et est hydrolysée en choline et acétate. La choline peut être repompée dans la jonction pré et postsynaptique grâce à une pompe à  $\text{Na}^+$ . Elle en ressort suivant le gradient de  $\text{K}^+$ .

Finalement, lorsque la concentration en choline dans le milieu extracellulaire devient trop importante, les astrocytes règlent celle-ci en servant de transit jusqu'aux capillaires sanguins.

#### 4.3. ROLE DANS LE METABOLISME DES ACIDES AMINES NEUROTRANSMETTEURS.

Il existe d'une part des neurotransmetteurs excitateurs (glutamate et aspartate) et d'autre part des neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA, glycine,  $\beta$ -alanine et taurine) (HERTZ, 1986).

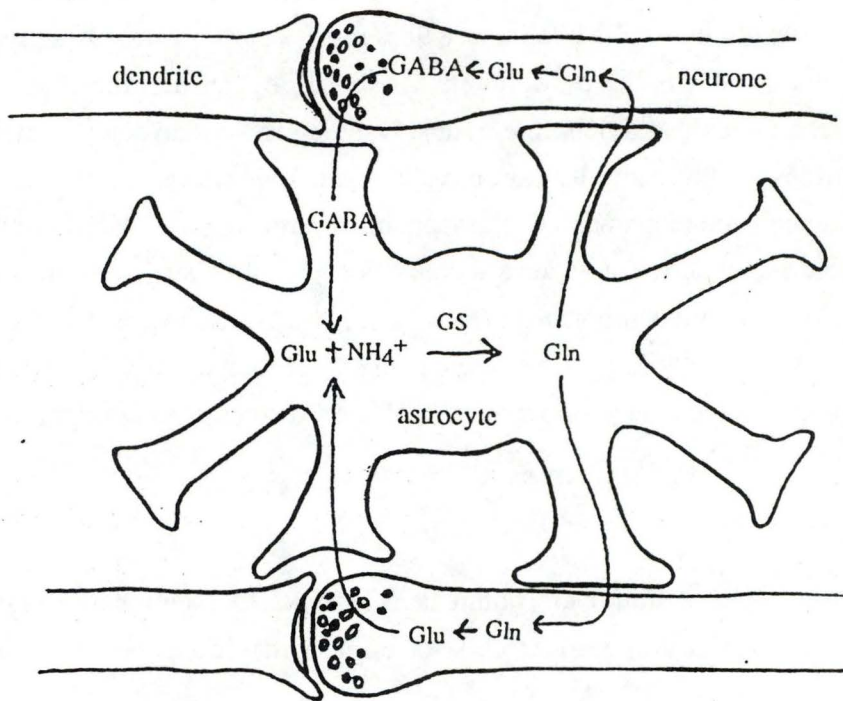


Figure 6: Le métabolisme des neuromédiateurs a lieu en partie dans les astrocytes. Le glutamate (Glu), et le GABA sont transformés en glutamine (Gln) par la glutamine synthétase (GS) des astrocytes. Cette réaction consomme des ions ammoniums ( $\text{NH}_4^+$ ) et limite la concentration cérébrale en cet ion toxique (d'après KIMELBERG et NORENBORG, 1989).

Les deux neurotransmetteurs les mieux connus dans le métabolisme astrocytaire sont le glutamate et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) (KIMELBERG et NOREMBERG, 1989).

#### 4.3.1. CIRCULATION DES ACIDES AMINES DANS LES NEURONES GLUTAMATERGIQUES.

Après libération des neuromédiateurs dans les jonctions synaptiques, ils sont captés par les astrocytes pour un recyclage par un système de co-transport avec un ion  $\text{Na}^+$  (BENJAMIN, 1987; DAGANI et ERECINSKA, 1987; KIMELBERG et NOREMBERG, 1989).

Dans les astrocytes, le glutamate est transformé en glutamine par la glutamine synthétase (GS) (NOREMBERG, 1979; HERTZ et al., 1985; YUDKOFF, 1988). La glutamine, nouvellement synthétisée, est larguée dans le milieu extracellulaire par les astrocytes fibreux (CAMBIER, 1989). Elle diffuse dans les neurones où elle servira à la formation de nouvelles molécules de neuromédiateurs (SCHOUSBOE et al., 1979; HERTZ et SCHOUSBOE, 1986) (fig. 6).

Ces réactions empêchent une accumulation toxique de neurotransmetteurs dans le milieu extracellulaire. De plus, elles consomment un certain nombre d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) et limitent donc l'effet néfaste de cet ion (NOREMBERG, 1979; KIMELBERG et NOREMBERG, 1989).

#### 4.3.2. CIRCULATION DES ACIDES AMINES DANS LES NEURONES GABAERGIQUES.

Dans le milieu extracellulaire, le GABA est repompé par les astrocytes. Par l'action de la GABA transaminase, il sera transformé en glutamate (HANSSON, 1988).

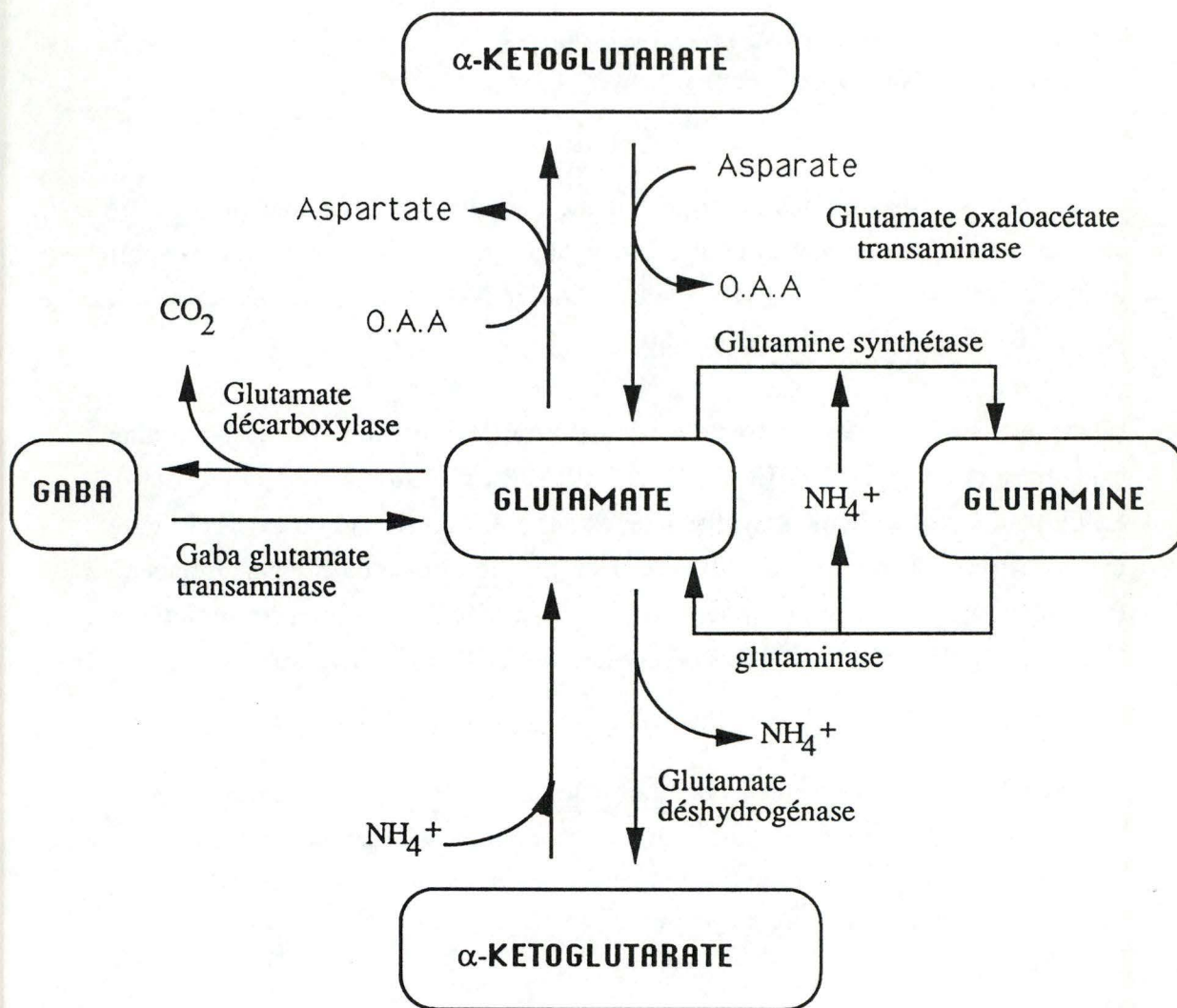


Figure 7: Activité des enzymes impliqués dans le métabolisme des acides aminés neurotransmetteurs des astrocytes

Le glutamate, ainsi recyclé, va poursuivre son trajet et se retrouver dans les neurones gabaérgiques sous forme de glutamine. Déaminée en glutamate, une phase de décarboxylation a lieu par la glutamate décarboxylase. Le produit final étant du GABA (HERTZ et SCHOUSBOE, 1986).

#### 4.3.3. ROLE DANS LE CYCLE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES.

C'est via l' $\alpha$ -kétoglutarate que le stock de GABA et de glutamate peut être réalisé (HERTZ et SCHOUSBOE, 1986). Ainsi à la fois, l'aspartate et le GABA entrent dans le cycle de krebs et via l'  $\alpha$ -kétoglutarate (  $\alpha$ -Kg) passent au glutamate qui sera converti en glutamine (HANSSON, 1988; YUDKOFF et al., 1988) (fig.7).

#### 4.4. RESERVES DE GLYCOGENE.

Le glycogène est un glucide complexe qui se retrouve sous forme de granules dans le cytoplasme (SENSENBRENNER et al., 1985).

Des études récentes suggèrent que les cellules gliales sont les principales mais non exclusives réserves de glycogène du cerveau (SWANSON et al., 1989).

Pour pourvoir à tous ses métabolismes oxydatifs dans des conditions normales, le cerveau effectue un turn-over de glucose assez rapide (LUST et al., 1975; HERTZ et SCHOUBOE, 1986).

Cependant dans les astrocytes, la concentration en glycogène reste constante tout en variant énormément d'un tissu à l'autre (NELSON et al., 1968).

La glycogénogénèse comme la glycogénolyse se déroule suite à l'action de neurotransmetteurs (adrénaline et glucagon).

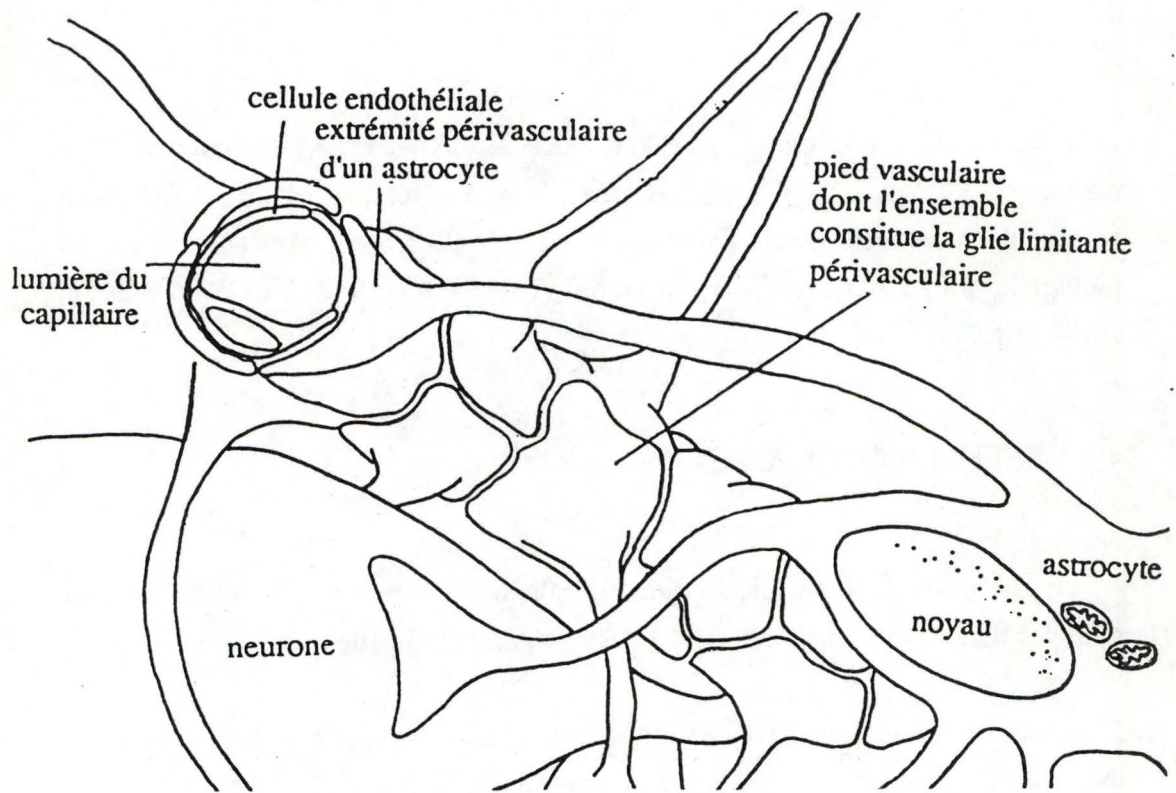


Figure 8: Intervention des astrocytes dans la formation de la barrière hémato-encéphalique.

L'énergie mobilisée dans ces réactions peut servir à d'autres fonctions cérébrales telles que le maintien des concentrations ioniques extracellulaires, le maintien de l'homéostasie, la capture de neurotransmetteurs et dans le métabolisme du glutamate (SWANSON et al., 1989).

#### 4.5. INDUCTION DE LA FORMATION DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

Lors du développement du cerveau, les astrocytes interviennent entre autre dans la formation de la barrière hémato-encéphalique située au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales qui entourent les capillaires (fig. 8).

Le rôle de cette barrière est de maintenir constant l'environnement chimique du cerveau (KIMELBERG et NORENBORG, 1989). Actuellement, SENSENBRENNER et al. (1985) pensent que les astrocytes stimulent la fonction des jonctions serrées et la production d'enzymes et protéines caractéristiques de la barrière hémato-encéphalique.

#### 4.6. TUTEURS DU DEVELOPPEMENT.

Au cours du développement embryonnaire, certains astrocytes forment un échafaudage qui guide la migration des neurones (KIMELBERG et NORENBORG, 1988). Des substances, telles que la laminine et la fibronectine qui forment avec d'autres constituants une matrice extracellulaire, favorisent et accélèrent spécifiquement la croissance des prolongements neuronaux (MANTHORPE et al., 1986; HANSSON, 1988).

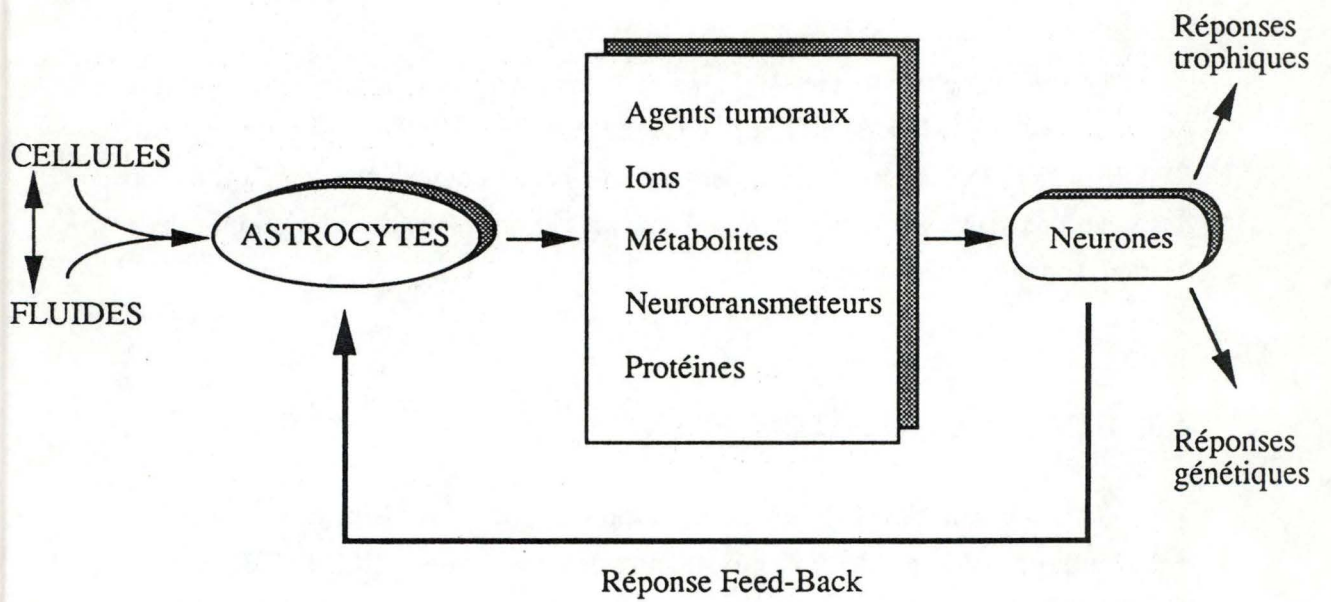


Figure 9: Illustration des contributions des astrocytes à la survie et à la croissance des neurones (par MANTHORPE *et al.*, 1986).

#### 4.7. ROLE DANS LA CICATRISATION DES NEURONES.

Nous pouvons envisager l'hypothèse que les astrocytes favorisent la restauration des connexions nerveuses après des lésions (KIMELBERG et NORENBURG, 1989). Cette fonction serait due à la libération de diverses substances qui stimulent la croissance des cellules nerveuses (SENSENBRENNER et al., 1985). Ces substances trophiques furent isolées et caractérisées (SENSENBRENNER et al., 1985).

L'AGF, le facteur de croissance astroglial, et le GMF, le facteur de maturation de la glie ont été partiellement purifiés à partir de cerveaux de cochons et de bovins et identifiés par LIM en 1979 et SENSENBRENNER et al. en 1985.

Le GGF, le facteur de croissance gliale, extrait des glandes pituitaires et du cerveau bovin, stimulerait la prolifération des cellules de Schwann, la multiplication et la maturation des astrocytes.

Finalement, le PDGF (platelet derived growth factor) qui est un facteur méiotique pour les fibroblastes induit la prolifération des cellules gliales.

#### 4.8. SYNTHÈSE ET LIBÉRATION DES FACTEURS DE CROISSANCE

Durant l'ontogénèse du cerveau, les cellules neuronales passent par différents stades de prolifération, migration, aggrégation, et maturation. La régulation de tous ces processus est influencée par différents facteurs environnementaux tels que les hormones, les facteurs trophiques et humoraux (fig.9) (SENSENBRENNER et al., 1985).

Actuellement, il est confirmé que le NGF (nerve growth factor) est synthétisé et libéré par les astrocytes. Ce facteur de croissance des nerfs stimule les neurones tout entier et favorise la croissance des axones (SENSENBRENNER et al., 1985; KIMELBERG et NORENBURG, 1989).

## CHAPITRE 2 UTILISATION DES CULTURES D'ASTROCYTES

Le travail sur astrocytes peut s'effectuer sur des cellules isolées à partir de cerveaux de rats adultes ou sur des cellules en culture de rats d'un jour.

### 1. Avantages et désavantages des cultures

Un premier avantage que nous pouvons citer au sujet des cultures cellulaires est de ne concerner qu'un ensemble restreint de types cellulaires. Ainsi, les cultures nous permettent de choisir la source de tissu appropriée, l'espèce et l'âge du donneur (HANSSON, 1988).

L'avantage majeur, cependant, est le contrôle précis de l'environnement physico-chimique (pH, température, pression osmotique, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>,...) (FRESHNEY, 1983).

De plus les cultures peuvent être directement exposées à des agents (ions, hormones, inhibiteurs et médicaments) à une concentration plus faible et définie. Le réactif agit immédiatement sur la cellule sans être contrecarré par les autres tissus ou par des barrières semi-perméables (HANSSON, 1988). Les caractéristiques de la culture peuvent donc être observées sur plusieurs générations.

Cependant des critiques peuvent être élevées contre les techniques de culture cellulaire comme modèles d'études de la régulation, de l'interaction des cellules.

Signalons aussi que les cultures doivent être pratiquées sous des conditions aseptiques rigoureuses car les cellules animales se développent beaucoup plus lentement que les contaminants (bactéries, levures,...) (FRESHNEY, 1983).

En outre, les cellules provenant d'un animal n'existent pas en tant qu'isolées mais vivent dans un environnement complexe composé de plasma sanguin ou de fluide interstitiel.

Dans les cultures, nous nous retrouvons dans un milieu artificiel où relativement peu de tissu est produit malgré la dépense d'efforts et de matériel. Les cultures coûtent 10 fois plus cher que l'utilisation directe d'animaux (FRESHNEY, 1983).

## 2. PRINCIPALES DIFFERENCES IN VITRO

La plupart des différences observées dans le comportement cellulaire chez les cellules en culture et leurs contreparties in vivo proviennent du fait qu'elles se trouvent dans un milieu artificiel (HANSSON, 1988). En culture, les astrocytes n'ont de contacts qu'avec d'autres astrocytes. Tous les rapports entre neurones et astrocytes sont inexistantes (JUURLINK et HERTZ, 1985). L'environnement de la culture perd ainsi plusieurs composants concernés dans la régulation homéostatique in vivo, principalement ceux des systèmes nerveux et endocriniens (HANSSON, 1988). Sans ces contrôles, le métabolisme cellulaire peut être plus constant in vitro qu'in vivo, mais ne peut être véritablement représentatif du tissu d'où les cellules proviennent.

Nous devons insister sur le fait que beaucoup de fonctions spécialisées sont exprimées dans les cultures. Elles sont plus faciles à produire mais elles sont plus difficilement intégrables dans le domaine in vivo.

## CHAPITRE 3 L'HYPOGLYCEMIE

### **1. Les astrocytes et les pathologies cérébrales**

Aujourd'hui, il est clair que les astrocytes tout en réglant l'homéostasie provoquent aussi, lors de dérèglements, des dommages dans l'organisme et cela lorsque des dysfonctionnements métaboliques se présentent (FACCI et al., 1990).

Dès lors, des hypothèses ont été émises afin de comprendre les fonctions remplies par les astrocytes dans les pathologies cérébrales telles que la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson, l'anoxie,...

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au problème de l'hypoglycémie.

Un nombre important de changements neurochimiques sont observés dans le métabolisme cérébral.

Ainsi de nombreuses recherches ont démontré que l'hypoglycémie affectait au niveau tissulaire les concentrations du glycogène, du lactate, du pyruvate et des acides aminés (SIESJO, 1983).

Des déplétions en glutamate, glutamine, alanine et GABA ont été signalées (KAUPPINEN et al., 1988).

Des accumulations d'aspartate et d'ammoniac sont observées ainsi qu'une modification au niveau des membranes (BAUDOUX et al., 1987; KAUPPINEN et al., 1988) et plus précisément au niveau des phospholipides (SIESJO, 1983).

Déjà au laboratoire, des recherches avaient démontré que les mitochondries chez des rats placés en hypoglycémie sévère avaient une apparence contractée. Cela semblait indiquer que les densités croissantes observées lorsque les mitochondries sont placées dans un gradient de sucrose sont en rapport avec un accroissement de la perméabilité membranaire au sucrose (BAUDOUX et al., 1987).

Nous allons détailler ci-dessous ces différents points.

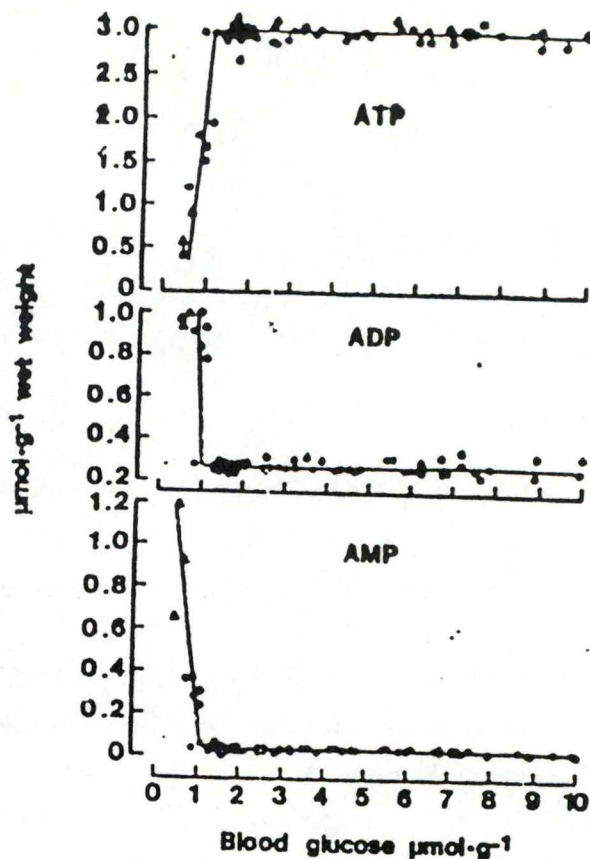


Figure 10: Relation entre les concentrations sanguines en glucose et les concentrations tissulaires en ATP, ADP et AMP durant une hypoglycémie.

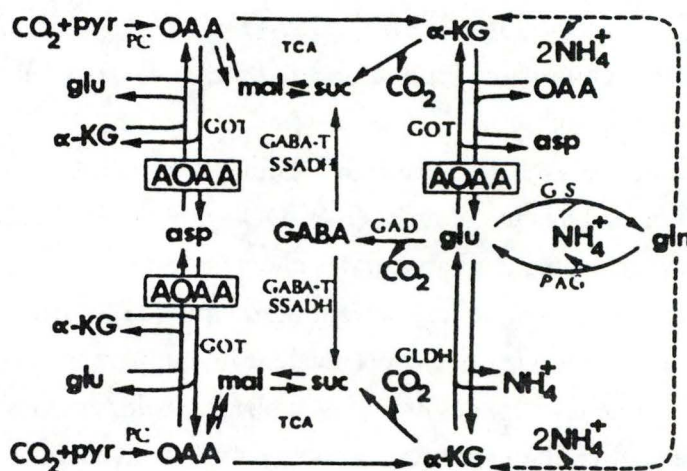


Figure 11: schéma des interconversions métaboliques entre le glutamate (glu), la glutamine (gln), l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), l'acide tricarboxylique (TCA). Les constituants du cycle sont le succinate (suc.), le malate (mal.), l'oxaloacétate (OAA), l'aspartate (asp.), le dioxyde de Carbone ( $\text{CO}_2$ ) et l'ammoniaque ( $\text{NH}_4^+$ ). La plupart des enzymes catalysant ces réactions sont aussi indiqués: glutamine synthétase (GS), glutaminase (PAG), glutamate déshydrogénase (GDH), glutamate oxaloacétate transaminase (GOT), glutamate décarboxylase (GAD), GABA-transaminase (GABA-T), succinique semialdéhyde deshydrogénase (SSADH) et la pyruvate carboxylase (PC) (de HERTZ et SCHOUSBOE, 1986).

## 1.1. L'HYPOGLYCEMIE ET LA FONCTION CEREBRALE

### 1.1.1. METABOLISME ENERGETIQUE

Lors de dosages des composés hautement énergétiques chez des animaux hypoglycémisés, une diminution en ATP et C.P. est observée. Tandis qu'une augmentation de leurs produits d'hydrolyse (ADP, AMP et créatine) se produit lorsque toute activité électrique cesse (fig.10) (AUER et al., 1986; BAUDOUX et al., 1988; KAUPPINEN et al., 1988).

### 1.1.2. INTERMEDIAIRES GLYCOLYTIQUES ET DU CYCLE DE KREBS

Les symptômes observés lors d'une hypoglycémie (sommolence, lassitude, stupeur, convulsions et coma) sont à mettre en rapport avec la concentration en glucose.

Tant que cette concentration intracellulaire en glucose n'égale pas la valeur 0, les concentrations en glycogène et en glucose 6-phosphate sont stables (SIESJO, 1983).

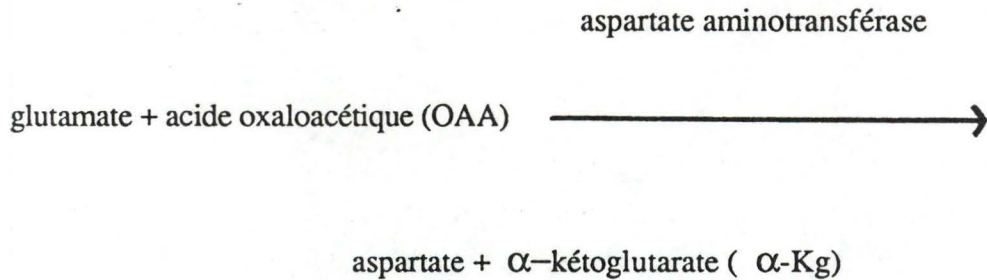
La concentration en lactate, elle, est réduite de 30% par rapport à la valeur normale. Tandis que la concentration en pyruvate est d'environ 25% par rapport au contrôle (CUMMINS, 1983).

Suite à cela, une déplétion des intermédiaires du cycle de Krebs est observée causant des changements dans le métabolisme des acides aminés (fig.11).

### 1.1.3. ACIDES AMINES ET DERIVES

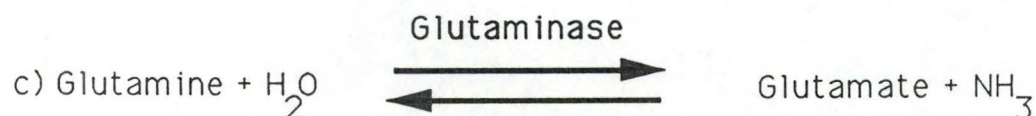
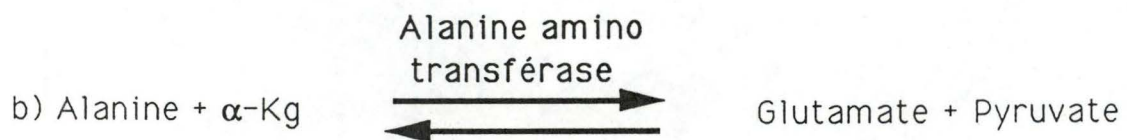
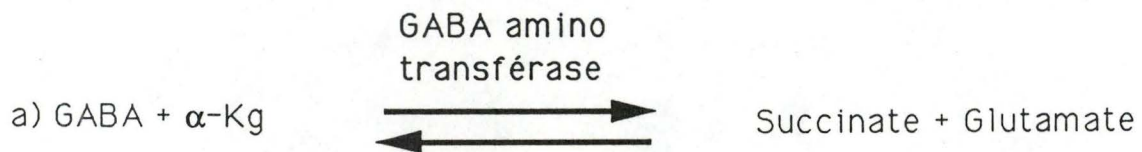
L'hypoglycémie profonde affecte le métabolisme des acides aminés en mobilisant les squelettes carbonés par des réactions de transamination et de déamination (SIESJO, 1983).

L'aspartate aminotransférase catalyse la principale réaction de transamination.



Si le glutamate est ainsi utilisé, nous pouvons comprendre pourquoi une accumulation d'aspartate et une diminution des composés glutamine et glutamate se produisent (KAUPPINEN et al., 1988).

Lors d'une hypoglycémie, d'autres réactions ont lieu. Elles ont pour but de régénérer le glutamate consommé.



Le glutamate, rapellons-le, est un neurotransmetteur excitateur du système nerveux central (SIESJO, 1981).

Ces réactions diminuent donc considérablement le taux de concentration tissulaire en GABA, en glutamine et en alanine.

Au vu de ces données, il n'y a plus de doute concernant l'utilisation des métabolites glycolytiques, des intermédiaires du cycle de Krebs et des acides aminés comme carburants énergétiques dans les cellules souffrant d'hypoglycémie (FACCI et al., 1990).

#### 1.1.4. AMMONIAC

Le mécanisme principal qui permet d'éviter une accumulation d'ammoniac, produit toxique pour le cerveau, est réalisé au niveau des astrocytes par la glutamine synthétase (GS) (réaction inverse de c.).

Par contre la réaction favorisant l'accumulation d'ammoniac est médiée par la glutaminase.

Or dans l'hypoglycémie, la production ammoniacale est augmentée (SIESJO, 1983). Et à partir d'une certaine concentration de  $\text{NH}_3$ , il se produit des effets délétères sur l'état fonctionnel des cellules (RUSSEL, 1973).

#### 1.1.5. PHOSPHOLIPIDES, ACIDES GRAS ET PROTEINES

L'hydrolyse des phospholipides (10%) a lieu au niveau des membranes cellulaires. Les produits de dégradation, acides gras et lysophospholipides, sont des produits toxiques en grande concentration pour les astrocytes (SIESJO, 1981; BENJAMIN, 1987).

Quant à la synthèse protéique, processus consommant de l'énergie, elle devient défectueuse suite à la réduction des substrats hautement énergétiques (ATP et C.P.) (De VELLIS, 1986).

### 1.1.6. IONS

Une autre conséquence de la déplétion des réserves énergétiques est une diminution de l'activité des  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPases et des autres systèmes de repompage des ions (DAGANI, 1987; KAUPPINEN, 1988). Les cellules gliales vont alors accumuler les ions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ . Et par osmose, les astrocytes vont se remplir d'eau. Ce gonflement cellulaire caractérise certaines maladies métaboliques du cerveau (KIMELBERG et NORENBORG, 1989).

## 2. LOCALISATION CELLULAIRE ET CARACTERISATION DE LA GS.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la déamination du glutamate conduit à l'accumulation d'ammoniac (SIESJO, 1983). Cette réaction s'observe lors d'expériences d'hypoglycémie réalisées in vivo et suggère une modification d'activité d'une enzyme importante, marqueur des astrocytes: la glutamine synthétase (GS).

Largement répandue chez différentes espèces animales et végétales, la GS a été purifiée et caractérisée dans différents organes chez les mammifères, notamment dans le foie, le cerveau, le coeur (HALLERMEY et HAMPRECHT, 1984).

Au niveau du cerveau, l'enzyme joue un rôle important dans la détoxification de l'ammoniac (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1977; BENJAMIN, 1987; NORNBORG, 1989). En effet, la molécule de  $\text{NH}_3$  étant une puissante neurotoxine, sa capture est essentielle au niveau du système nerveux central. D'après SVENNEBY et TORGNER (1986), la GS serait apparemment la seule enzyme impliquée dans la synthèse de glutamine.

La glutamine synthétisée sert de précurseur pour certains neuromédiateurs synaptiques tels que l'acide glutamique (excitateur) et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou GABA (inhibiteur) (NORENBORG, 1979).

De plus, en transformant (ou non) le glutamate, la glutamine synthétase du cerveau peut influencer les concentrations de cet acide aminé neurotransmetteur et provoquer certains phénomènes physiologiques comme les crises de convulsion après injection de L-méthionine S-sulfoximine (MSO), un inhibiteur de la glutamine synthétase (SVENNEBY et al., 1986).

La glutamine synthétase catalyse la formation de glutamine par amidation du glutamate. Cette réaction réversible nécessite la présence d'un cation divalent ( $Mg^{++}$  ou  $Mn^{++}$ ) ainsi qu'un apport d'énergie libre sous forme d'ATP (SVENNEBY et al., 1986; MURRAY, 1988). L'activité de la GS peut être influencée par le transport d'ions qui consomme également de l'ATP et qui fournit à l'intérieur des astrocytes des ions mimant le rôle des cations divalents (BENJAMIN, 1987).

En ce qui concerne la localisation de l'enzyme, les avis divergent.

NORENBERG et MARTINEZ-HERNANDEZ (1979) localisent exclusivement l'enzyme dans les cellules gliales et plus précisément au niveau des astrocytes. Cependant, HAMBERGER a également localisé cette enzyme dans les corps neuronaux et les synaptosomes (BENJAMIN, 1987).

Actuellement, des expériences immunocytochimiques ont révélé que la GS n'était plus le marqueur exclusif des astrocytes mais était trouvé dans les oligodendrocytes (CAMMER, 1990; TANSEY, 1991).

Au niveau subcellulaire, en se référant aux travaux antérieurs, il ressort que deux localisations apparaissent prédominantes: d'une part la fraction microsomiale, d'autre part le cytoplasme (MARTINEZ-HERNANDEZ et al., 1977; BENJAMIN, 1987).

Au vu des différents résultats, nous pouvons dire que le problème de la localisation subcellulaire et cellulaire de l'enzyme n'est pas encore résolu.

C'est pourquoi dans la présente où nous voulions caractériser la culture d'astrocytes, il nous a semblé intéressant de considérer l'activité de la GS dans une situation pathologique précise: la privation de glucose.

DEUXIEME PARTIE

SUJETS, MATERIEL  
ET METHODE

## 1.CULTURE D'ASTROCYTES

### 1.1. COMMENT OBTENIR DES ASTROCYTES?

#### 1.1.1. Par séparation de la glie et des neurones sur des cerveaux de rats adultes.

Les astrocytes et neurones sont isolés d'après la méthode modifiée de FAROOQ et NORTON (1978).

Après décapitation, le cerveau est prélevé, débarrassé du cervelet et des bulbes olfactifs. Les petits vaisseaux sanguins sont éliminés et le cerveau est découpé en petits morceaux.

Pour obtenir une désagrégation du tissu suffisante, après incubation des morceaux dans la trypsine, ils subissent des aspirations successives à travers quatre tamis de nylon. Les cellules cérébrales sont ensuite déposées sur un gradient de densité.

Par centrifugations successives, nous obtenons deux fractions cellulaires, l'une neuronale, l'autre astrocytaire. Les deux fractions ainsi obtenues sont resuspendues dans du saccharose pour les essais enzymatiques et immunohistochimiques.

Cette méthode a l'avantage de donner des astrocytes issus directement de leur milieu naturel. La technique a cependant le désavantage de malmenier les astrocytes qui perdent sans doute certaines propriétés caractéristiques.

#### 1.1.2. Par la mise en culture de cellules provenant de rats d'un jour.

##### 1.1.2.1. Préparation du matériel et des instruments utilisés.

Le travail s'effectue avec des instruments stérilisés sous une hotte à flux laminaire.

### 1.1.2.2. Préparation des solutions.

#### 1.1.2.2.1. Milieu de culture DMEM (Dubelcco's modified eagle's medium)

Milieu de Eagle modifié de Dubelcco; SIGMA.

A ajouter pour un litre :

L-glutamine	584.00 mg/l
rouge phénol	15.00 mg/l
NaHCO <sub>3</sub>	3700.00 mg/l
Hepes	6000.00 mg/l
D-glucose	4500.00 mg/l

Ajuster à pH 7,3-7,4.

Osmolarité : 340 mosm.

Filtrer avec un filtre de pores de 22 µ.

Porter à 37°C.

Avant d'ensemencer les boîtes :

Désactiver à 55°C pendant 30 minutes le sérum de veau foetal.

Ajouter ce sérum à 20% de la concentration finale (GIBCO).

#### 1.1.2.2.2. Solution HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)

Solution saline de Hanks ; SIGMA

Solution à réhydrater. Ajouter pour un litre :

NaHCO <sub>3</sub>	3000.00 mg/l
D-glucose (5mM)	1000.00 mg/l
Rouge phénol	17.00 mg/l
Hepes (20mM)	4768.00 mg/l

Ajuster le pH à 7,4

Filtrer avec un filtre de 0,22 µ

#### 1.1.2.2.3. Dibutyryl cAMP (dBcAMP)

Pour promouvoir une différenciation morphologique des astrocytes, le dibutyryl cAMP est ajouté à la concentration de 0,25mM dans le milieu de culture (10ml/boîte).

#### 1.1.2.2.4. Bromo cAMP (8-Br-cAMP)

Ajouté à la même concentration que le dBcAMP (0,25mM) dans le milieu de culture, le 8-Br-cAMP produit un effet similaire au dBcAMP.

#### 1.1.2.2.5. Acide butyrique (n-butyrate)

Produit d'hydrolyse du dBcAMP, l'acide butyrique est testé sur les cultures d'astrocytes à la concentration de 0,25mM.

#### 1.1.2.2.6. Cycloheximide.

Inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide est ajouté au milieu de culture à la concentration de 10µg/ml.

#### 1.1.2.2.7. Cytosine arabinoside.

Inhibiteur de la prolifération cellulaire, la cytosine arabinoside est additionné au milieu de culture à la concentration de 10 µM.

#### 1.1.2.3. Choix du tissu utilisé.

La source appropriée de tissu est le néopalium de l'hémisphère cérébral de rats SPRAGUE-DAWLEY nouveaux-nés de moins de 24 heures; c'est-à-dire, la zone subventriculaire contenant les précurseurs astrocytaires hautement prolifératoires et le cortex où les astroblastes sont déjà en division. (HERTZ et JUURLINK; 1985).

#### 1.1.2.4. Mise en culture des cellules astrocytaires.

D'après la méthode modifiée de Cole et de Vellis (1989).

Après stérilisation superficielle des animaux, le cerveau est prélevé sans le cervelet : cet organe est débarrassé des méninges et des vaisseaux sanguins.

Les cerveaux sont ensuite nettoyés avec deux pinces courbes. Nous enlevons non seulement les vaisseaux sanguins et les bulbes olfactifs mais également les formations de l'hippocampe et les méninges.

Le tissu est déposé dans un berlin de 100 ml contenant du milieu DMEM en absence de sérum de veau fœtal.

Dans un tube Falcon, les fragments sont ensuite dissociés.

Nous laissons décanter et plaçons le surnageant dans un deuxième tube à centrifuger. Le culot est resuspendu dans du DMEM et est redissocié. Le surnageant est ajouté au premier. Les morceaux non dissociés sont laissés de côté. Les surnageants sont centrifugés à 25°C à 1100 rpm pendant 10 minutes dans la centrifugeuse DAMON/IEC (rotor 253).

Après centrifugation, le surnageant est éliminé et remplacé par du milieu DMEM sans sérum de veau fœtal. Les cellules sont de nouveau homogénéisées à l'aide d'une pipette de 10 ml montée sur aspiration. Une nouvelle centrifugation a lieu à 1100 rpm pendant 10 minutes dans la DAMON/IEC (rotor 253). Cette étape est répétée une seconde fois. A la dernière centrifugation, le culot est resuspendu dans 30 ml de milieu DMEM.

L'ensemble est filtré sur deux filtres nitex croisés de 80 m placés sur un berlin de 100 ml contenant un agitateur.

Ce procédé filtre les vaisseaux sanguins et les agrégats cellulaires ne laissant qu'une suspension enrichie en cellules précurseurs d'astrocytes.

#### 1.1.2.5. Comptage des cellules et ensemencement.

Le volume exact de la préparation est déterminé.

Une cellule de Bürker permet de compter les cellules.

La formule utilisée pour connaître le nombre de cellules dans le volume trouvé est la suivante :

$$\frac{N \times \text{Dilution} \times 1000}{S \times H \times \text{nombre de carrés}} = \text{nombre de cellules/cm}^2$$

où -N est le nombre de cellules comptées  
dans 10 petits carrés.

-S est la surface d'un petit carré = 0,0025 mm<sup>2</sup>.

-H est la hauteur d'un petit carré = 0,1 mm.

Le nombre de cellules totales étant trouvé en multipliant le nombre de cellules/cm<sup>2</sup> par le volume trouvé.

Sur une boîte de pétri de 54 cm<sup>2</sup>, nous ensemençons 20 10<sup>6</sup> cellules.

Nous diluons le volume de préparation trouvé avec un volume adéquat de milieu DMEM contenant 20 % de sérum de veau foetal.

Après avoirensemencé les boîtes (10 ml/boîte), elles sont incubées à 37°C dans un mélange de 95/5% (V/V) d'air atmosphérique et de CO<sub>2</sub> avec une humidité relative de 90%.

#### 1.1.2.6. Changements de milieux de culture.

Durant la période de croissance des cellules, le milieu nutritionnel est changé (10 ml/boîte) le troisième jour, puis 2 fois par semaine. Le pH indicateur est maintenu entre 6,9 et 7,3.

Au quinzième jour, les cultures sont traitées au dibutyryl cAMP qui induit une différenciation morphologique des astrocytes (différentes concentrations seront testées ainsi que différents temps). D'autres produits seront utilisés comme le bromo cAMP et l'acide butyrique.

Nous envisagerons aussi de tester l'effet de l'HBSS sur nos cultures, ainsi que leurs réactions à différents inhibiteurs comme la cycloheximide et la cytosine arabinoside.

Programme de l'immunocytochimie :

PREPARATION DES CELLULES.



Fixation avec du paraformaldéhyde 4%.



Perméabilisation des membranes avec méthanol à  
- 20°C.



Incubation avec un antisérum anti-GFAP.



Incubation avec les anticorps conjugués à la  
fluorescéine.



Microscopie en fluorescence.

## 2 CARACTERISATION DES ASTROCYTES PAR MARQUAGE IMMUNOCYTOCHIMIQUE.

### 2.1. Introduction.

La technique d'immunofluorescence indirecte a été utilisée pour caractériser les astrocytes (GILDEN *et al*; 1972).

Elle consiste en l'incubation des cellules dans un antisérum contenant les immunoglobulines anti-GFA protein, c'est-à-dire un anticorps spécifiquement dirigé contre une protéine (GFAP) localisée au niveau des gliofilaments des astrocytes (BIGNAMI *et al*; 1972).

L'incubation avec un second antisérum couplé à la fluorescéine permet la visualisation des cellules marquées en fluorescence.

### 2.2. Matériel.

Les anticorps utilisés sont d'une part des immunoglobulines de lapin dirigées contre la GFAP de bovin et d'autre part, des anticorps de souris conjugués à la fluorescéine et dirigés contre les immunoglobulines de lapin (DAKOPATTE a/S, DANMARK).

La solution de fixation est formée de paraformaldéhyde 4% (poids/vol) dissoute dans du tampon phosphate 0,1M pH 7,5. Quelques gouttes de NaOH 1N sont nécessaires pour la dissolution.

### 2.3. Technique d'immunofluorescence.

Le milieu de culture éliminé, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS (NaCl 0,9% et tampon phosphate 8mM pH 7,4).

Ensuite, les cellules sont traitées avec une solution de paraformaldéhyde (4%) pendant 20 minutes pour fixer les cellules. L'opération se passe à température ambiante. Il convient de faire la fixation le jour de l'immunofluorescence.

L'opération suivante consiste à perméabiliser les membranes des astrocytes avec du méthanol à -20°C pendant 10 minutes.

Après 3 lavages au PBS, la suite des opérations se déroule à l'obscurité dans une chambre humide.

Les cellules sont incubées avec une dilution de l'antisérum anti-GFA 1:200 dans du PBS pendant 1H à 37°C.

Le contrôle est réalisé en remplaçant l'échantillon par du sérum de lapin non immunisé, ce test est négatif.

Après 3 lavages au PBS, on ajoute le second antisérum, les IgG de souris anti-lapin marqués à la fluorescéine (dilution 1:100 dans du PBS). L'incubation dure 1H30 à 37°C.

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois au PBS.

Le montage entre lame et lamelle se fait en mettant une goutte de PBS-glycérol (1 part/9 parts; pH 9) sur la boîte de culture.

L'observation des cellules est réalisée à l'aide d'un microscope à fluorescence DIALUX 22 Leitz, R.F.A.

### 3. DOSAGE DU GLUCOSE, DU GLYCOGENE, DU DNA, DE L'ATP, ET DE LA CREATINE PHOSPHATE .

Afin de contrôler les effets de la privation de glucose dans les cultures, nous avons dosé le glucose dans les surnageants et le glycogène dans les astrocytes.

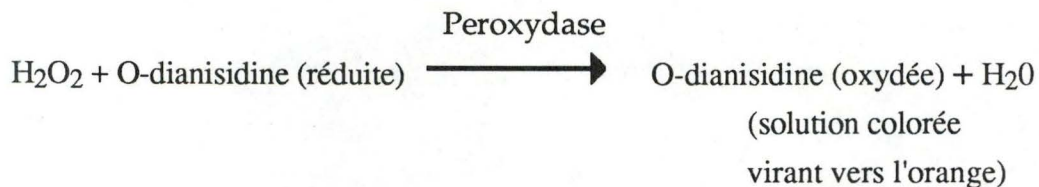
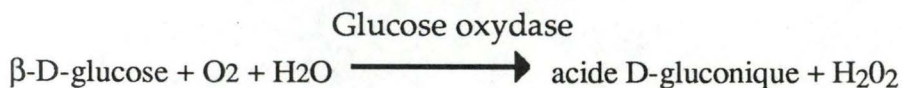
Le DNA, un indicateur de la division cellulaire est dosé par fluorimétrie pour caractériser les cellules astrocytaires.

Et enfin, pour vérifier si le métabolisme énergétique des cellules astrocytaires était entamé lors du traitement, nous avons quantifié le taux d'ATP et de créatine phosphate.

#### 3.1. Dosage du glucose

Nous employons la méthode de détermination par la glucose oxydase et la peroxydase de BERGMAYER et BERNT (1974).

Elle est basée sur la réaction suivante :



Dans ce cas, le donneur d'hydrogène est l'O-dianisidine qui se colore spécifiquement indiquant la quantité de glucose oxydé.

Une unité de glucose oxydase peut oxyder une micromole de  $\beta$ -D-glucose en acide D-gluconique et en  $\text{H}_2\text{O}_2$  par minute à un pH de 5,1 à 35°C.

Le dosage s'effectue sur des concentrations de surnageants variant de 50  $\mu\text{l}$  à 200  $\mu\text{l}$ . Une quantité d'eau adéquate est ajoutée afin d'assurer un volume relatif de 400  $\mu\text{l}$ .

La réaction est déclenchée par l'addition de 600  $\mu\text{l}$  de la mixture contenant l'O-dianisidine (0,075 mg/ml), la glucose oxydase (0,6 mg/ml) et la peroxydase (0,05 mg/ml).

Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la lecture s'effectue au colorimètre à 450 nm.

Lors du dosage, il sera fait appel à l'utilisation d'un standard interne de glucose de concentration connue (10 µg = 10 µM).

## **3.2. DOSAGE DU GLYCOGENE.**

### **3.2.1. EXTRACTION DU GLYCOGENE SUR DES ASTROCYTES**

Après élimination du milieu de culture, le tapis d'astrocytes est lavé 3 fois avec du NaCl 0,9%. Les cellules sont grattées prudemment et déposées dans un potter. Le tout est homogénéisé dans 4,5 ml de NaCl 0,9%.

Un dosage des protéines via la méthode de Miller s'effectuera sur 0,5 ml de l'homogénat.

Le surnageant est placé dans un petit corex et neutralisé avec 1 ml de KOH 5N. L'extraction alcaline du glycogène a lieu à chaud (ébullition pendant 15 minutes). Après acidification partielle du milieu avec 4 ml d'HAc 1,5N (pH=5,2), une centrifugation dans un rotor JA 13 à 10500 rpm pendant 20 minutes a lieu. Dans un grand corex, on place 8 ml du surnageant.

Une précipitation du glycogène est réalisée à l'aide de 16 ml d'éthanol-LiBr 0,3% glacé. L'ensemble est centrifugé dans un rotor JA 13 à 10 000 rpm pendant 1 H 30. Ce temps écoulé, on prélève prudemment avec une ampoule à décanter le surnageant. Le précipité de glycogène est lavé avec 2 ml d'eau et 4 ml d'éthanol-LiBr 0,3%. Une nouvelle centrifugation dans le rotor JA 13 à 10 500 rpm pendant 1 H a lieu.

La solubilisation du précipité de glycogène se fait dans du tampon acétate (2 ml) 0,1M pH 4,9.

### **3.2.2. HYDROLYSE DU GLYCOGENE PAR L'AMYLOGLUCOSIDASE**

Différents volumes d'échantillons sont incubés avec du tampon acétate 0,1M pH 4,9 et de l'amyloglucosidase pendant 1 H à 37°. L'hydrolyse du glycogène en glucose est réalisée par l'amyloglucosidase.

### **3.2.3. DOSAGE DU GLUCOSE**

Le dosage du glucose s'effectue selon la méthode décrite au point 3.1.

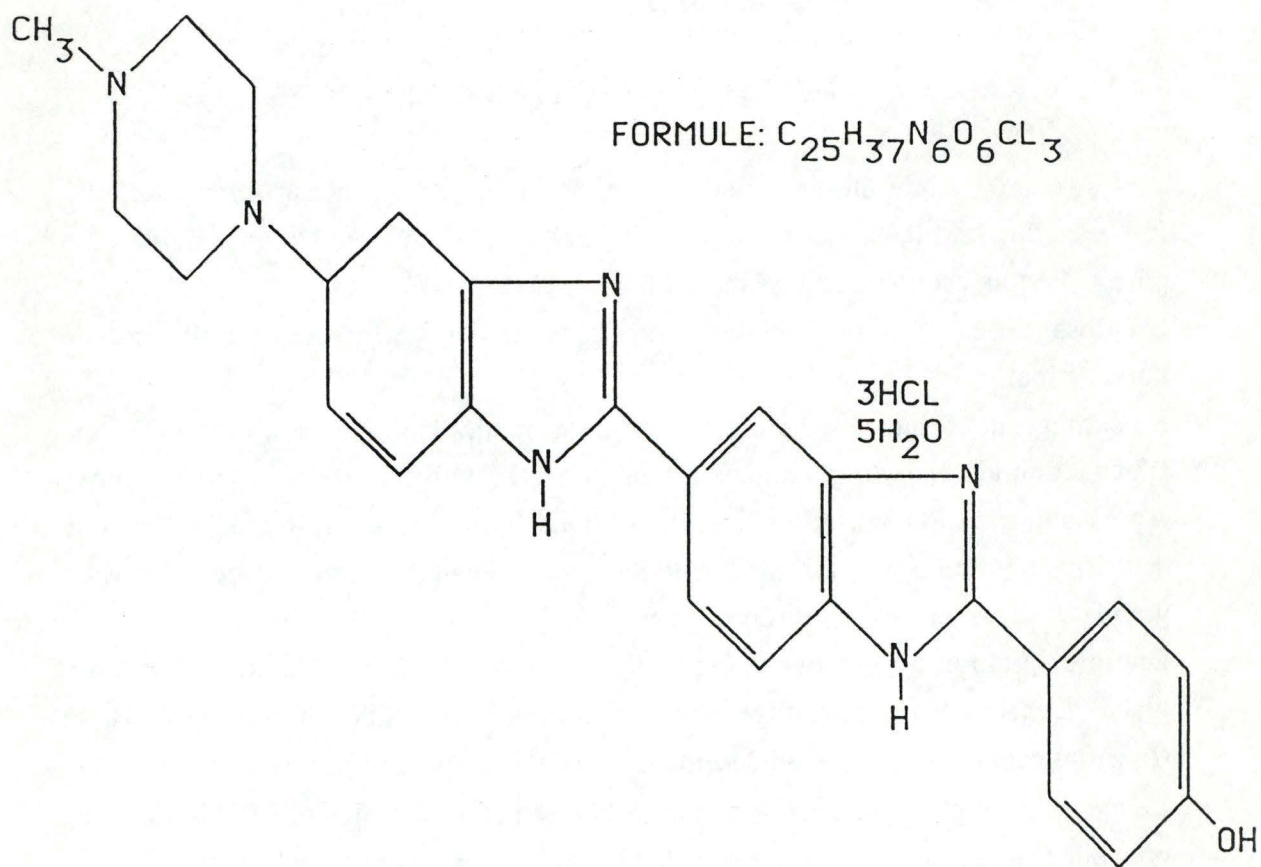
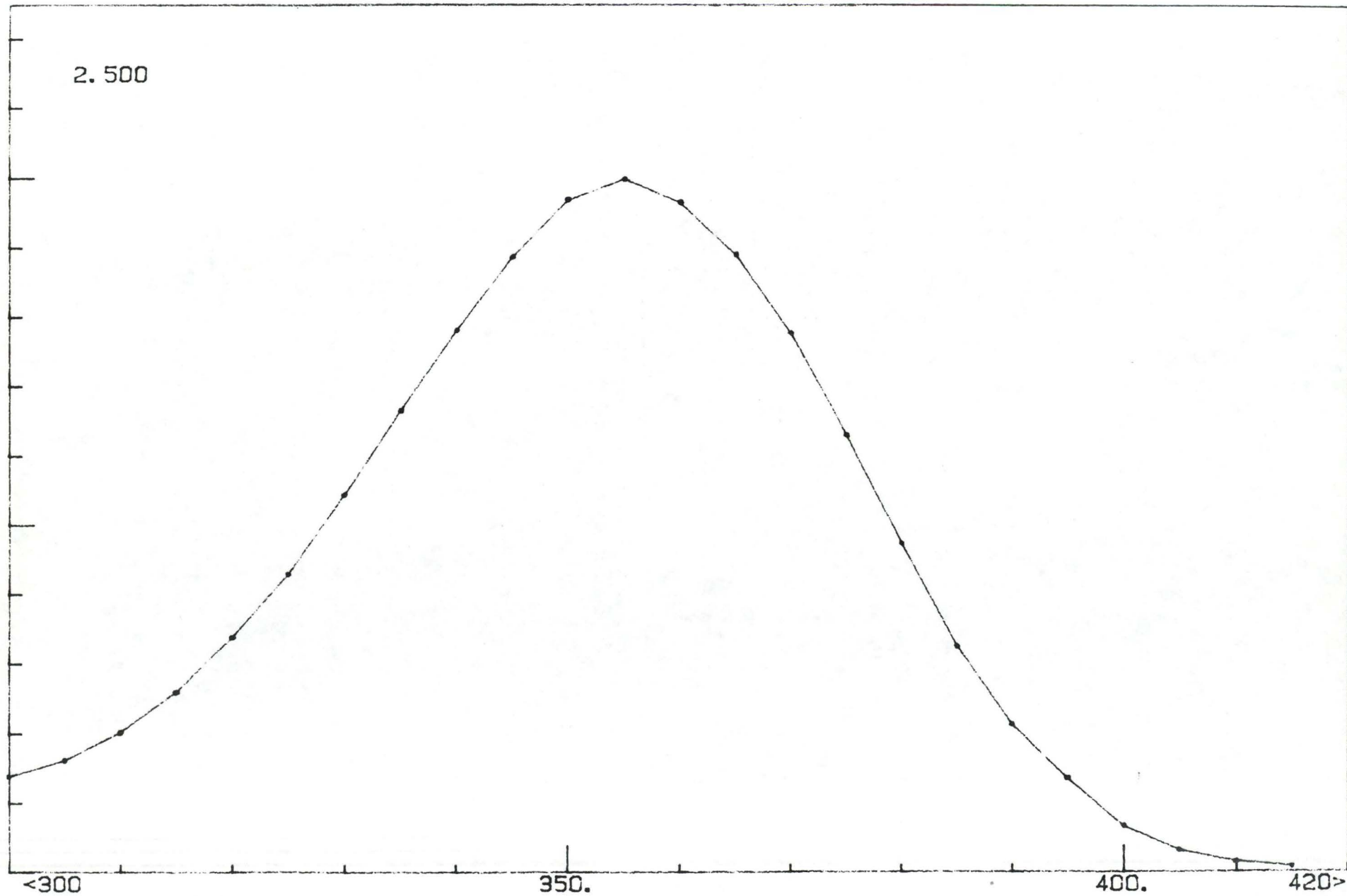


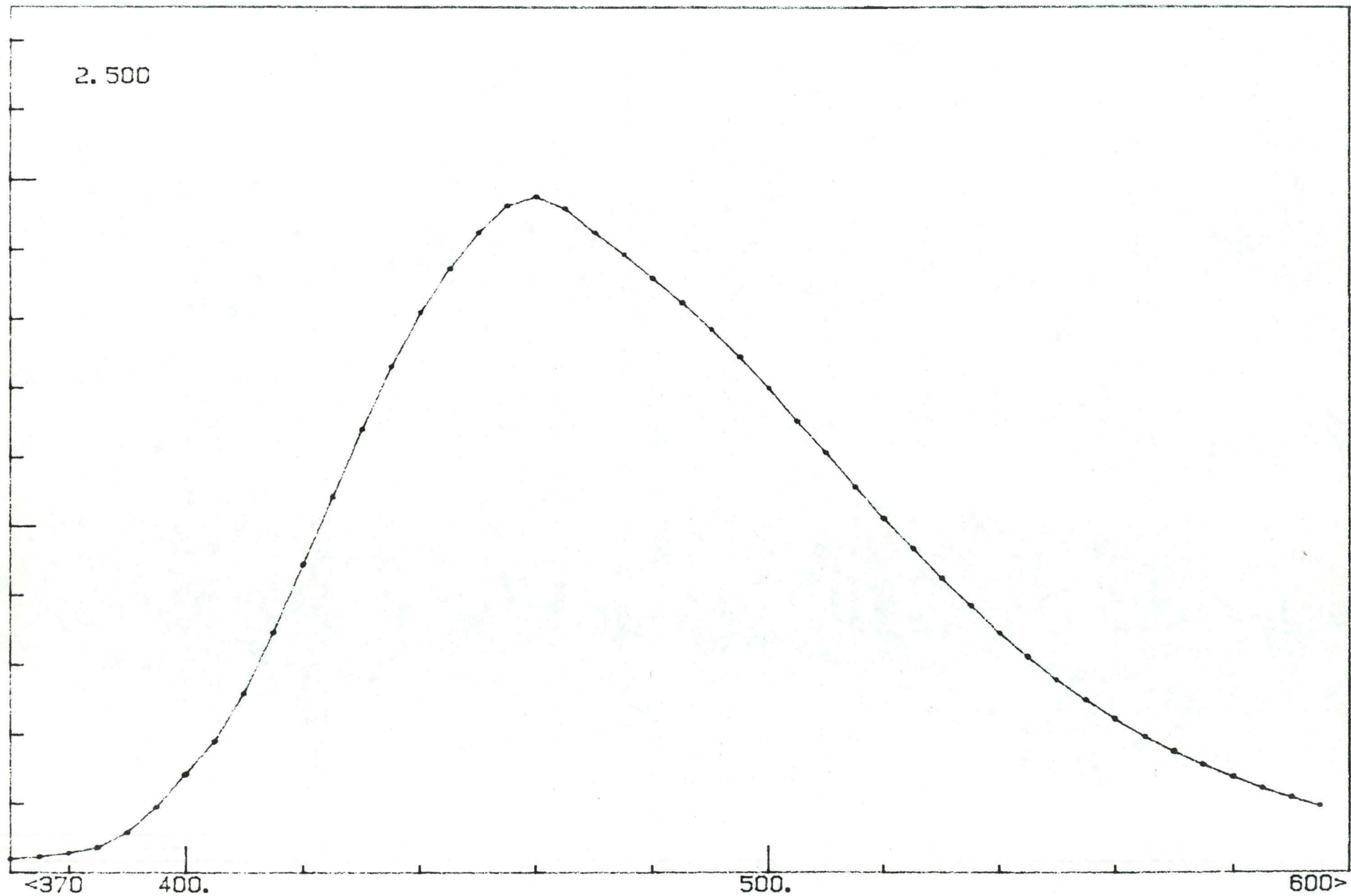
Figure 12: Formule du Bisbenzimidazole H 33258.

2.500



Excitation wavelength scan ---Tics every 50/10 nm

2.500



Emission wavelength scan ---Tics every 100/20 nm

### 3.3. Dosage fluorométrique du DNA avec le bisbenzimidazole.

La mesure du DNA dans les cultures d'astrocytes est réalisée par spectrofluorométrie d'après la méthode décrite par C. LABARCA et K. PAIGEN (1980).

Elle est basée sur la fluorescence du bisbenzimidazole (HOECHST 33258) introduit dans le cytoplasme des astrocytes et ayant une forte affinité pour les structures du DNA.

#### 3.3.1. Structure du bisbenzimidazole H 33258 fluorochrome.

Le bisbenzimidazole H 33258 est utilisé comme fluorochrome pour les chromosomes. Cette propriété de fluorescence est attribuée à sa capacité de s'attaquer aux structures de DNA (fig.12).

Le bisbenzimidazole H 33258 par un changement d'intensité de fluorescence indique la concentration en DNA présente dans le milieu.

#### 3.3.2. Mesure spectrofluorimétrique.

Le système spectrofluorimétrique est équipé de deux monochromateurs. La source lumineuse est une lampe à xénon qui émet un spectre continu de 2000 à 8000 Å°.

La lumière qui passe par le premier monochromateur (excitation) est dispersée et produit une radiation monochromatique qui excite l'échantillon; ce dernier est alors source lumineuse pour le second monochromateur (émission) .La fluorescence de l'échantillon est alors amplifiée et enregistrée.

La fluorescence du bisbenzimidazole H 33258 a été mesurée avec un spectrofluorimètre SLM Aminco SPF 500 C. Les monochromateurs sont réglés sur 350 nm pour l'excitation et 458 nm pour l'émission.

Les mesures se font à 30°C grâce à un bain thermostaté relié au spectrofluorimètre. Les fentes utilisées pour l'excitation et l'émission sont respectivement 7,5 et 2,5 nm.

### 3.3.3. Lavage des astrocytes et extraction du DNA.

Après avoir éliminé le milieu, les astrocytes sont lavés deux ou trois fois avec du PBS froid versé prudemment sur le bord de la plaque. Avec un volume défini d'H<sub>2</sub>O (2 à 3 ml pour 2 boîtes), les astrocytes sont grattés et repris à l'aide d'une pipette pasteur.

Le tout est placé dans un dounce tight et homogénéisé une centaine de fois.

Le dosage du DNA peut alors être effectué.

### 3.3.4. Matériel.

Le bisbenzimidazole H 33258 et le DNA (calf thymus) utilisé comme standard proviennent de chez SIGMA CHEMICAL Co (U.S.A.).

Tous les réactifs courants sont de qualité pro-analyse et proviennent de chez MERCK (R.F.A.).

### 3.3.5. Dosage fluorimétrique du DNA.

Au milieu réactionnel de 1 ml contenant :

-du tampon phosphate de Na	80 mM pH 7,5
-de l'EDTA (Na <sup>+</sup> )	3,2 mM pH 7,5
-du NaCl	3,2 M

on ajoute :

- l'échantillon à doser
- de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de manière à obtenir un volume final de 1,6 ml dans la cuvette de quartz.

On démarre la réaction à 30°C en plaçant le bisbenzimidazole (0,5 µg/ml).

On lit la fluorescence de l'échantillon.

Ensuite, on ajoute le standard interne en DNA (2 µg).

On lit la fluorescence de l'échantillon additionnée à la fluorescence du standard.

Le blanc de la sonde est obtenu en remplaçant l'échantillon par de l'eau.

La concentration en DNA de l'échantillon se détermine comme suit :

$$\frac{(\text{lecture éch. - blanc}) \times \text{conc. standard en DNA}}{(\text{lecture}(\text{éch} + \text{standard}) - \text{lecture éch}) \times \text{volume éch}} = \mu\text{gDNA/ml échantillon}$$

### **3.4. Extraction et dosage de l'ATP et de la créatine phosphate.**

#### **3.4.1. Lavage des astrocytes et extraction de l'ATP.**

Après élimination du milieu de culture, le tapis d'astrocytes est lavé deux fois avec du NaCl 0,9%. Directement, l'ATP et la créatine phosphate sont extraits avec 5 ml (pour 2 à 5 plaques) d'une solution glacée d'acide perchlorique 0,9 M-EDTA 2 mM. Les cellules sont grattées prudemment et déposées dans un potter. Le tout est homogénéisé une dizaine de fois et centrifugé dans un rotor JS 13 à 10000 rpm pendant 10 minutes dans la centrifugeuse Beckman JA 21.

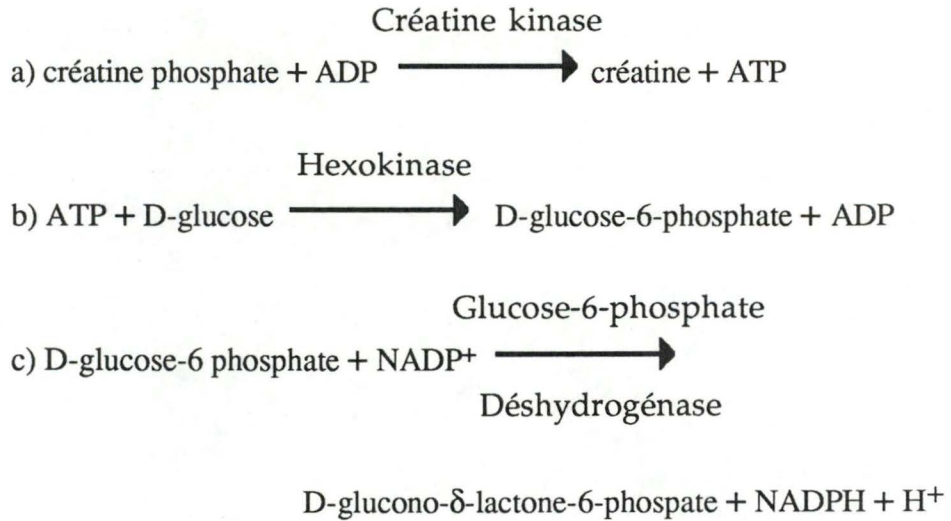
Les différentes opérations s'effectuent à froid (0 à 4°C).

Le surnageant est prélevé et neutralisé lentement à l'aide de KOH 2N. Le pH final de la solution se situe entre 7 et 7,9. Le précipité de perchlorate de potassium est éliminé par centrifugation à la microfuge pendant 15 secondes. Le surnageant peut être stocké à -80°C au superfreezer. Quant au culot, il est resuspendu dans un volume de NaOH 1N (1,5 ml). Le tout est homogénéisé doucement pendant une heure. Sur cette partie s'effectuera un dosage des protéines via la méthode de Miller.

#### **3.4.2. Dosage de l'ATP et de la créatine phosphate par fluorescence.**

##### **3.4.2.1. Principe.**

L'excitation se fait à 340 nm et l'émission à 465 nm. La température optimale est de 30°C. Elle est atteinte grâce à un bain thermostaté relié au spectrofluorimètre. Suite à la réaction décrite ci-dessous, il y a formation de NADPH. Le NADPH a des propriétés de fluorescence. En fonction de la quantité de lumière émise par le NADPH, nous déterminerons la quantité de créatine phosphate.



L'ADP est phosphorylé en ATP par la présence de la créatine phosphate suivant l'action de la créatine kinase (a).

L'ADP doit être légèrement en excès pour déplacer la réaction vers la droite.

L'ATP est alors utilisé pour phosphoryler le D-glucose via l'action de l'hexokinase en D-glucose-6-phosphate (b), elle-même déshydrogénée en D-glucono- $\delta$ -lactone-6-phosphate en présence de NADP<sup>+</sup> (c).

L'augmentation en NADPH mesurée par le changement d'absorbance à 340 nm est proportionnelle à la quantité de créatine phosphate.

La détermination de la concentration en créatine phosphate peut dès lors être combinée à la détermination de la concentration en ATP.

#### 3.4.2.2. Dosage de l'ATP.

Au milieu réactionnel de 0,7 ml contenant :

-du tampon imidazole-acide acétique	35 mM pH 7,4
-de l'EDTA	6 mM pH 7
-de l'acétate de magnésium	18 mM

on ajoute :

-l'échantillon à doser	
-le NADP <sup>+</sup>	0,065 mM
-le glucose	5 mM
-l'hexokinase	0,3 unités

-la glucose-6-phosphate- déshydrogénase

10 unités

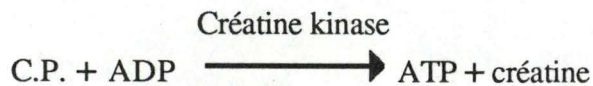
Le tout est porté à un volume final de 2 ml avec de l'eau. On démarre la lecture qui se fait à 30°C. Lorsque la réaction est stabilisée, le standard interne en ATP (0,5 µM) est ajouté.

Par le calcul effectué à partir du standard interne, nous pouvons déterminer la concentration en ATP présente dans l'échantillon.

### 3.4.2.3. Dosage de la créatine phosphate.

Pour le dosage de la créatine phosphate, nous ajoutons une fois l' ATP du milieu complètement consommé :

-de l'ADP	22 µM
-de la créatine kinase	12,5 unités



On démarre la lecture et ainsi on lit la concentration en créatine phosphate.

Lorsque la lecture est stabilisée, on introduit un standard interne de créatine phosphate 0,5 µM.

Pour les calculs, nous procédons comme dans le cas du standard interne d'ATP.

## 4.MESURES ENZYMATIQUES

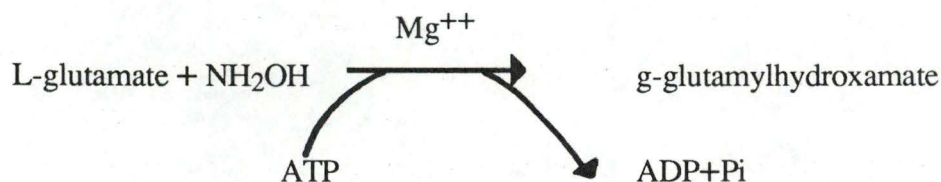
Lorsqu'on caractérise la composition cellulaire d'une culture, il est essentiel d'identifier les cellules par des marqueurs spécifiques (HANSSON; 1988).

### 4.1. Dosage de la glutamine synthétase.

#### 4.1.1. Introduction.

La mesure de l'activité de la glutamine synthétase a été réalisée en appliquant le principe de la technique de l'essai colorimétrique d'après les méthodes de PAMILJANS et coll. (1962) et de BERL (1966).

Cette mesure est basée sur la réaction suivante :



#### 4.1.2. Matériel.

Le L-glutamate, l'hydroxylamine, l'ATP ainsi que la pyruvate kinase proviennent de chez SIGMA CHEMICAL CO (U.S.A.).

Le phosphoénolpyruvate vient de chez BOEHRINGER (W. GERMANY).

Le chlorure de Fer ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) a été obtenu auprès de l'U.C.B. (BELGIQUE). Tous les réactifs courants sont de qualité pro-analyse et proviennent de chez Merck (R.F.A.).

#### 4.1.3. Dosage de l'enzyme :

Le mélange réactionnel est composé de tampon imidazole-HCl 50 mM (pH 6,45), de L-glutamate 50 mM et de  $\text{MgCl}_2$  50 mM. Ce mélange peut se conserver plusieurs jours au frigo.

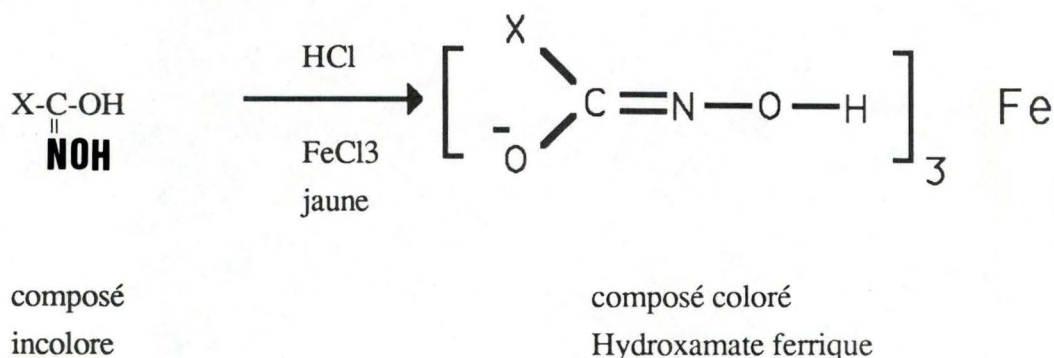
A cette mixture, s'ajoutent de l'ATP 10 mM, du  $\text{NH}_2\text{OH}$  100 mM et un système régénérant l'ATP (phosphoénol-pyruvate 10 mM et pyruvate kinase 30 unités).

Après préincubation du milieu à  $37^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes, l'enzyme est ajouté (240  $\mu\text{l}$ ). Le volume total du test est de 600  $\mu\text{l}$ .

L'incubation se fait à  $37^\circ\text{C}$  pendant 60 minutes.

La réaction est stoppée après une heure par addition d'une solution renfermant du  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  7,5% poids/volume dans de l'acide trichloroacétique 8% et dans de l' $\text{HCl}$  0,5 N.

L'acide trichloroacétique précipite les protéines. L' $\text{HCl}$  stabilise le  $\text{FeCl}_3$  qui a tendance en présence d' $\text{H}_2\text{O}$  à s'oxyder. Il se forme un produit de réaction coloré brun-jaune ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) dû à la formation d'un complexe Fer-Hydroxamate :



Après avoir éliminé les protéines précipitées par centrifugation (2000 rpm pendant 10 minutes), on détermine les densités optiques des solutions à 540 nm au spectrophotomètre GILFORD.

Le blanc est obtenu en ajoutant l'enzyme en fin de réaction..

L'étalon (1 micromole d'acide glutamique 8 monohydroxamate = 0,162 mg) est ajouté en même temps que l'enzyme et dans les mêmes proportions (240  $\mu\text{l}$ ).

Le blanc "blanc" est déterminé en ajoutant 240  $\mu\text{l}$  d'eau à la place de l'enzyme.

L'activité de l'enzyme se détermine comme suit :

$$\begin{aligned}
 & \text{(Lecture éch.-blanc éch)} \times [\text{enzyme}] \times \text{dilution} = \mu\text{GS/ml/H} \\
 & \text{(lecture étalon-blanc "blanc")} \times 0,240
 \end{aligned}$$

L'activité spécifique est obtenue en divisant l'activité par la concentration en protéines.

## **4.2. DOSAGE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE.**

### **4.2.1. Introduction.**

La lactate déshydrogénase existe sous la forme de 5 isoenzymes. Elle est contenue dans le cytosol et elle catalyse la dernière étape de la glycolyse, c'est-à-dire la réduction du pyruvate en lactate (JOHNSON, 1969).

La réaction est la suivante :



où  $\text{NAD}^+$  et  $\text{NADH}$  représentent respectivement les formes oxydée et réduite du nicotinamide adénine dinucléotide.

Cette enzyme est dosée en suivant la diminution d'absorbance à 340 nm en fonction du temps. Diminution causée par l'oxydation du  $\text{NADH}$ .

### **4.2.2. Matériel**

Le pyruvate de sodium, le  $\beta$ -nicotinamide adénine ( $\beta$ -DPNH) proviennent de chez SIGMA CHEMICAL CO (U.S.A.). Tous les réactifs courants sont de qualité pro-analyse et proviennent de chez Merck (R.F.A.).

### **4.2.3. Dosage de l'enzyme.**

Pour une mixture de 200 ml, le pyruvate de sodium 0,33 mM (13,78 mg) qui est utilisé comme substrat est dissout dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 (20 ml) et du saccharose 1 M (64 ml). La solution peut se conserver au frigo.

A 1 ml de cette mixture, on ajoute dans la cuvette 0,33 ml d'enzyme correctement dilué dans du PBS (NaCl 0,9% et tampon phosphate 8 mM pH 7,4).

On déclenche la réaction en ajoutant 0,1 ml de DPNH solubilisé dans du tampon phosphate 0,05 M pH 7,4 (11 mg pour 5 ml de tampon).

La lecture de l'activité se fait au spectrophotomètre GILFORD à 340 nm.

La pente de la droite est directement proportionnelle à la concentration en enzyme.

L'activité totale est obtenue en ajoutant dans la cuvette du triton X-100 20% (15 mM).

### **4.3. Dosage des protéines.**

Les protéines ont été dosées suivant la méthode de Miller (Miller, G.L.; 1959).

La sérum albumine bovine a été utilisée comme standard (0,4 mg/ml).

Après dénaturation des protéines par NaOH, les groupements tyrosine et tryptophane libérés réagissent avec le Folin Ciocalteu pour donner un composé de coloration bleue. Cette réaction est catalysée en plaçant les tubes 10 minutes dans un bain thermostaté à 50°C.

Le dosage s'effectue sur 0,2 ml d'enzyme correctement dilué dans l'eau.

Le blanc est obtenu en remplaçant l'enzyme par 0,2 ml d'eau.

L'étalon, quant à lui, s'obtient en ajoutant 0,2 ml de solution standard.

La densité optique est suivie à 660 nm au spectrophotomètre GILFORD

## OBJECTIFS DU MEMOIRE

Dans une première étape, nous allons nous intéresser à la mise au point et à la caractérisation d'une culture d'astrocytes.

Ensuite, nous étudierons les effets de la privation du glucose sur les activités enzymatiques et les métabolites, plus particulièrement sur la glutamine synthétase, marqueur astrocytaire.

Nous analyserons également le cas où les cultures sont induites au db.cAMP.

Enfin, nous envisagerons des expériences qui permettront de juger quant à la réversibilité des dommages causés par la privation de glucose.

# TROISIEME PARTIE

## RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE D'UNE CULTURE CELLULAIRE.
2. EFFET DE LA PRIVATION DE GLUCOSE SUR LES CELLULES ASTROCYTAIRES.
3. INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE PAR LE DB cAMP.
4. PRIVATION DE GLUCOSE APRES INDUCTION DES ASTROCYTES AU DB cAMP.

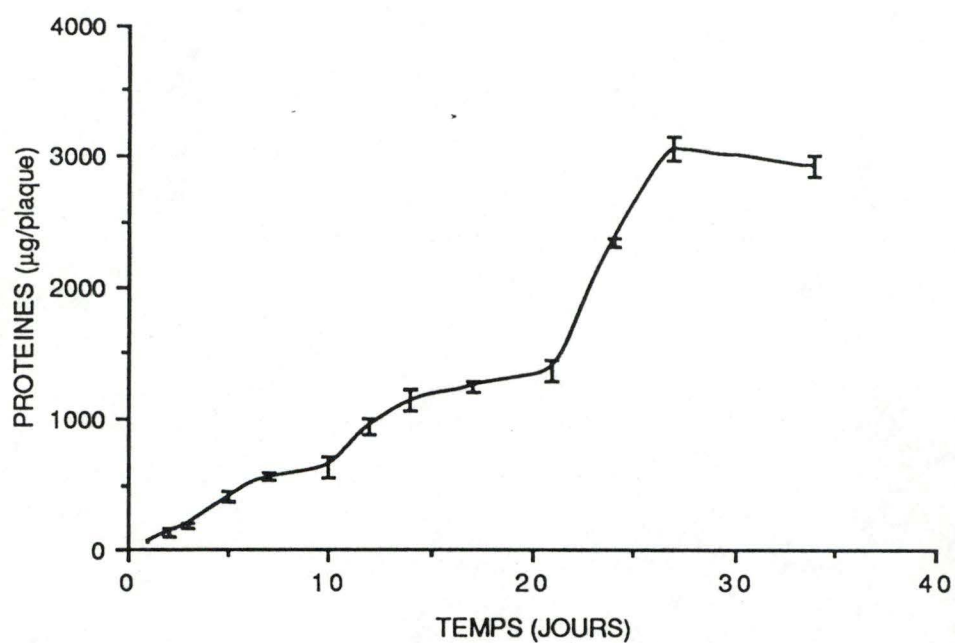


Figure 1: Evolution dans le temps (en jours) de la concentration en protéines (en µg/plaque) dans les cultures d'astrocytes.

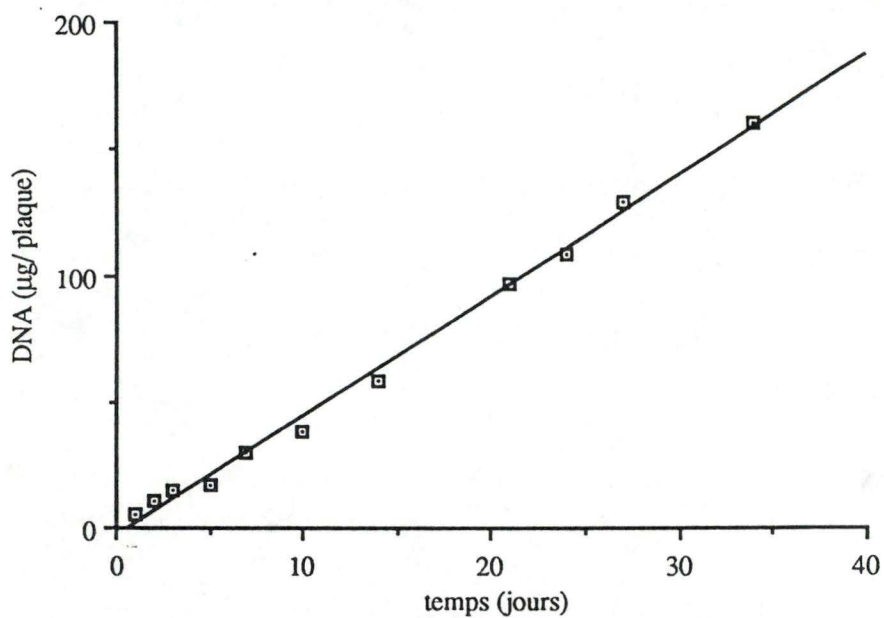


Figure 2: Evolution dans le temps (en jours) de la concentration en DNA (µg/ plaque) dans les cultures d'astrocytes.

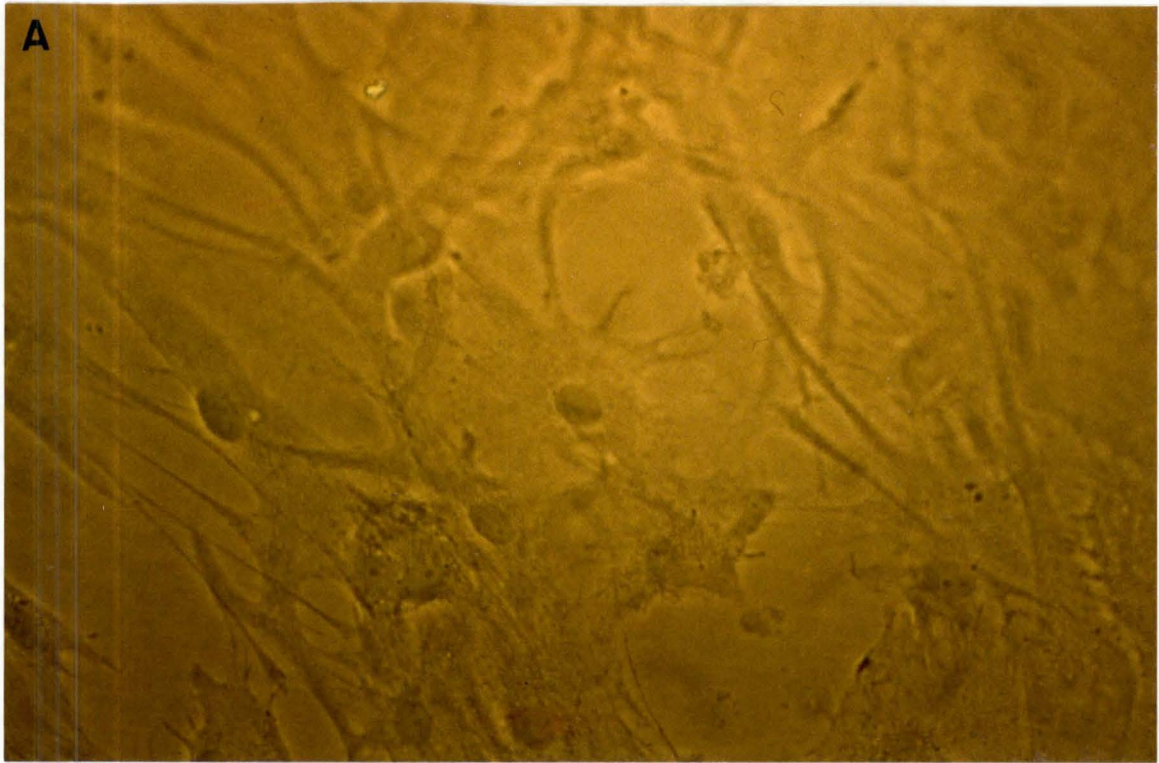


Photo A: Tapis d'astrocytes à confluence. (1066 jours).

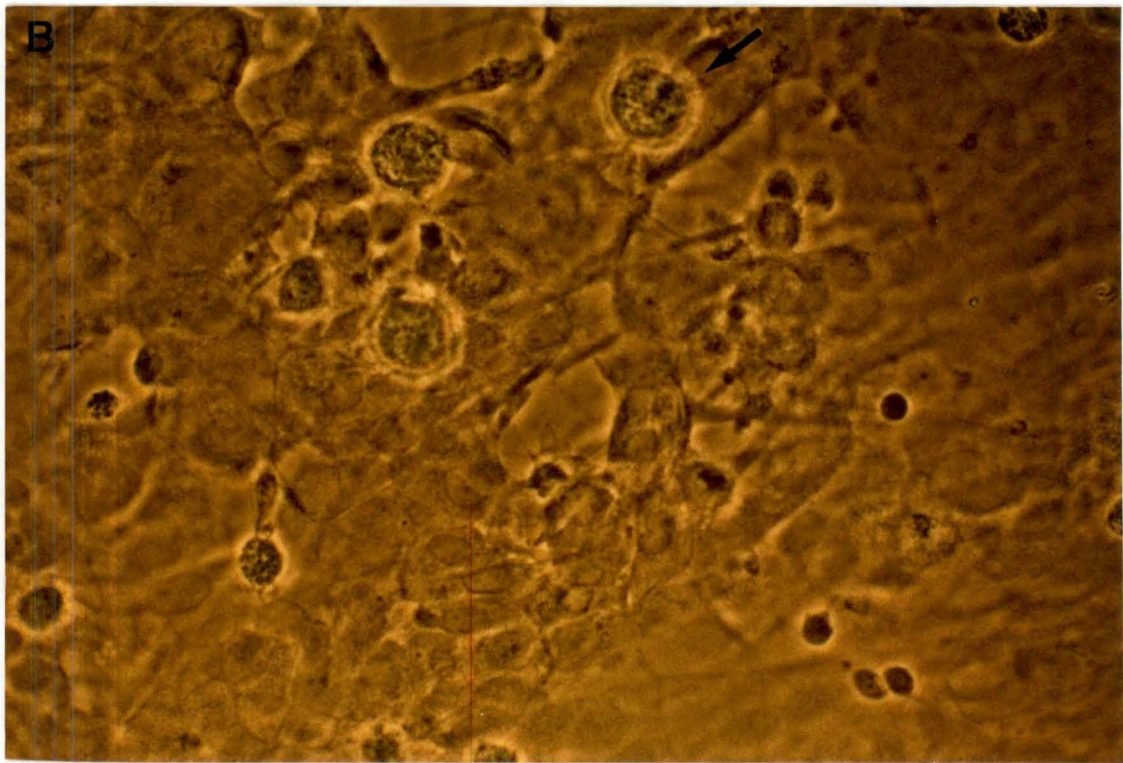
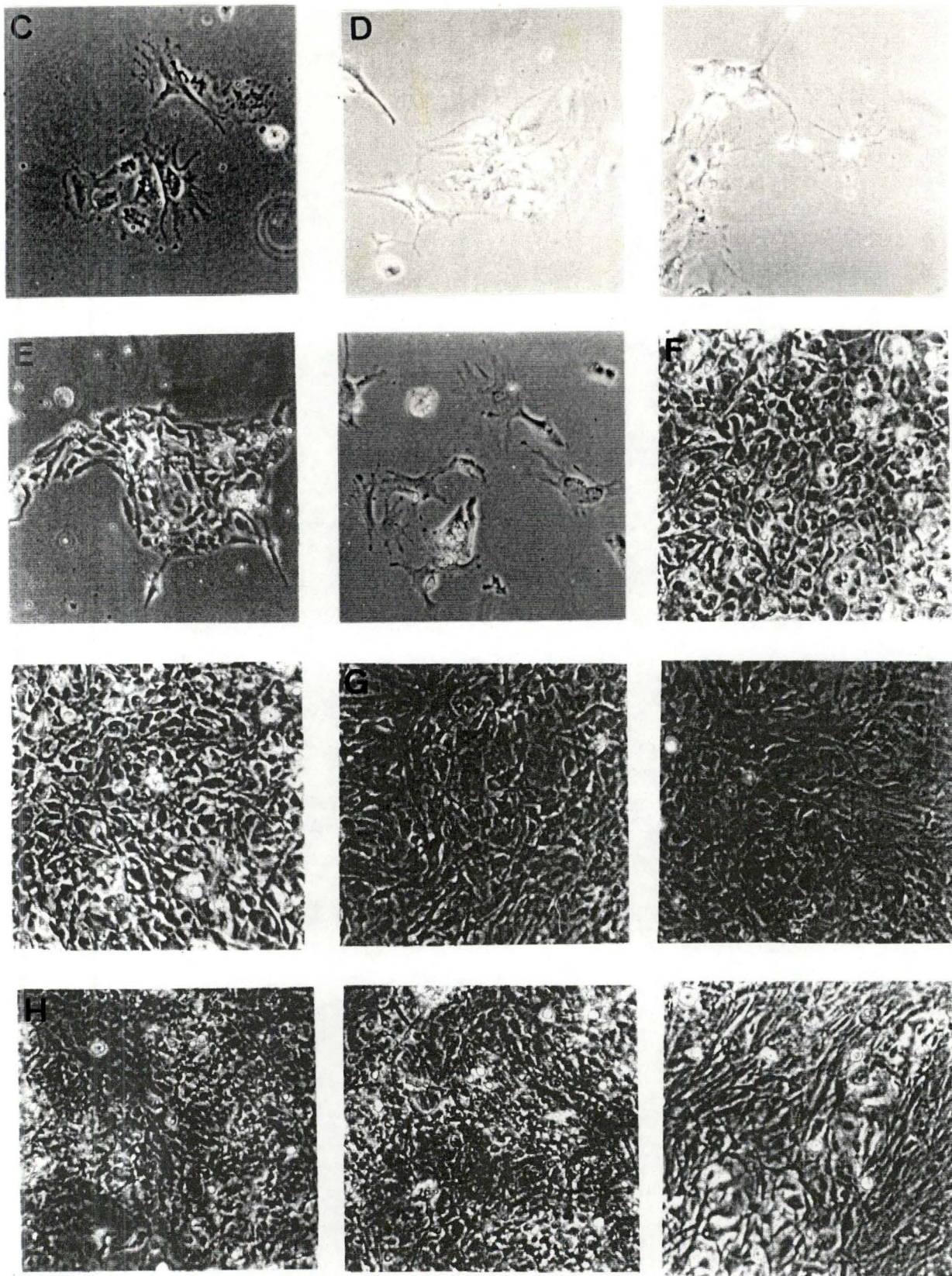


Photo B: Symptômes de dégénérescence qui apparaissent (astrocytes de 36 jours).



Ce groupe de 12 photos prises au même grossissement (360 fois) illustre l'évolution dans le temps en taille et en forme des astrocytes de cerveaux de rats:

- en C: astrocytes de 3 jours
- en D: astrocytes de 5 jours
- en E: astrocytes de 10 jours
- en F: astrocytes de 17 jours
- en G: astrocytes de 20 jours
- en H: astrocytes de 35 jours

En débutant notre étude, il nous a semblé important de caractériser le développement d'une culture d'astrocytes au cours du temps.

1. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE  
D'UNE CULTURE CELLULAIRE.

### **1.1. Evolution de la culture en fonction du temps.**

#### **1.1.1. LES PROTEINES.**

En suivant l'évolution de la culture jour après jour, nous avons pu tracer une courbe de l'évolution des protéines (**fig. 1**).

L'analyse de ce graphique nous montre que passée la période de latence, les cellules prolifèrent rapidement la première semaine. Le taux de protéine va passer de 59,53 µg/plaque à 561,25 µg/plaque.

Après 2 semaines, le tapis est à confluence (**photo A**).

La quantité de protéines va encore augmenter jusqu' à environ 4 semaines (3052,57 µg/plaque).

Par la suite des symptômes de dégénérescence peuvent apparaître (**photo B**).

Une évolution morphologique des astrocytes est résumée par les photos **C-D-E-F-G-H**.

#### **1.1.2. LE DNA.**

Le DNA, ou acide désoxyribonucléique est considéré comme un indicateur de la division cellulaire (SENSENBRENNER *et al*, 1980).

Pour s'assurer que la culture évolue normalement, nous avons dosé le DNA sur des astrocytes d'âge différent (**fig. 2**).

Nous observons que le contenu en DNA augmente de façon linéaire pendant toute la période suivie. SENSENBRENNER *et al*, en 1980, obtenaient déjà ce résultat.

Ces données indiquent que des divisions cellulaires ont lieu durant l'entièreté de la croissance cellulaire.

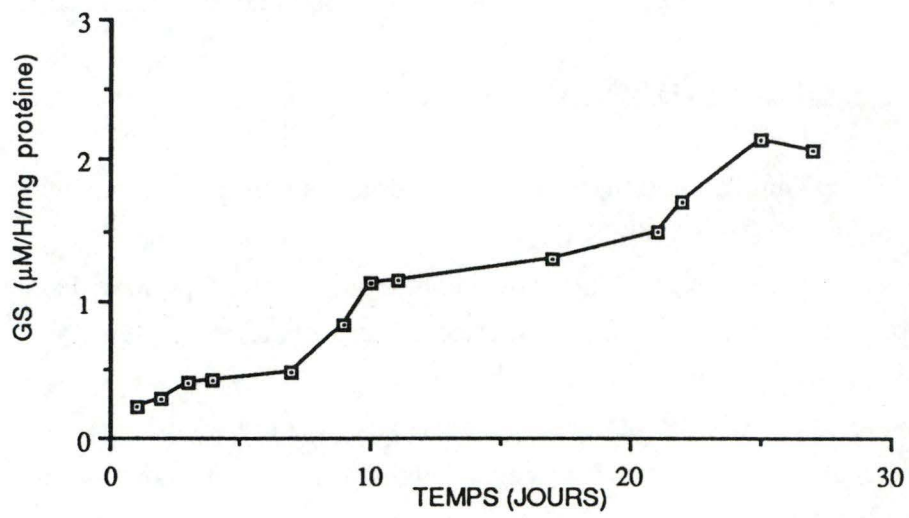


Figure 3: Evolution dans le temps (en jours) de l'activité de l'enzyme astrocytaire, la GS (en  $\mu\text{M}/\text{H}/\text{mg}$  de protéine).

De plus, nous pouvons dire que des divisions cellulaires se produisent chez les cellules astrocytaires et cela même lorsque la phase de croissance dans la quantité de protéines est terminée.

### 1.1.3. LA GLUTAMINE SYNTHETASE (GS).

Au début de la culture, l'identification morphologique des cellules astrocytaires peut poser des problèmes. C'est pourquoi des marqueurs macromoléculaires peuvent être utilisés pour caractériser une culture d'astrocytes.

La glutamine synthétase (GS) est un de ces marqueurs. Présent principalement chez les astrocytes, il témoigne de la présence de ce type de cellules dans une culture (NORENBERG, 1979; HERTZ, 1985; SVENNEBY et TORGNER, 1986).

Nous avons étudié son évolution au cours du temps (**fig. 3**). L'activité de la GS est exprimée en  $\mu\text{Mole/h/mg}$  protéine.

Durant les deux premières semaines, une augmentation nette de l'activité est observée. De  $0,23 \mu\text{Mole/h/mg}$  protéine, elle passe à 17 jours à  $1,30 \mu\text{Mole}$  de GS/h/mg protéine. Cette évolution de la GS est en rapport avec la croissance des protéines et celle du DNA.

Une augmentation se dessine encore jusqu'au 25<sup>ème</sup> jour ( $2,14 \mu\text{Moles}$  de GS/h/mg protéine).

Toutes ces observations sont en accord avec celles de HERTZ (1985). Ainsi si nous comparons la courbe de l'activité de la GS obtenue et celle de l'équipe de HERTZ, il ressort que le taux d'activité de la GS monte très vite entre la première et la deuxième semaine comme sur notre courbe. Et cette augmentation reprend également à partir de 21 jours dans les résultats de HERTZ.

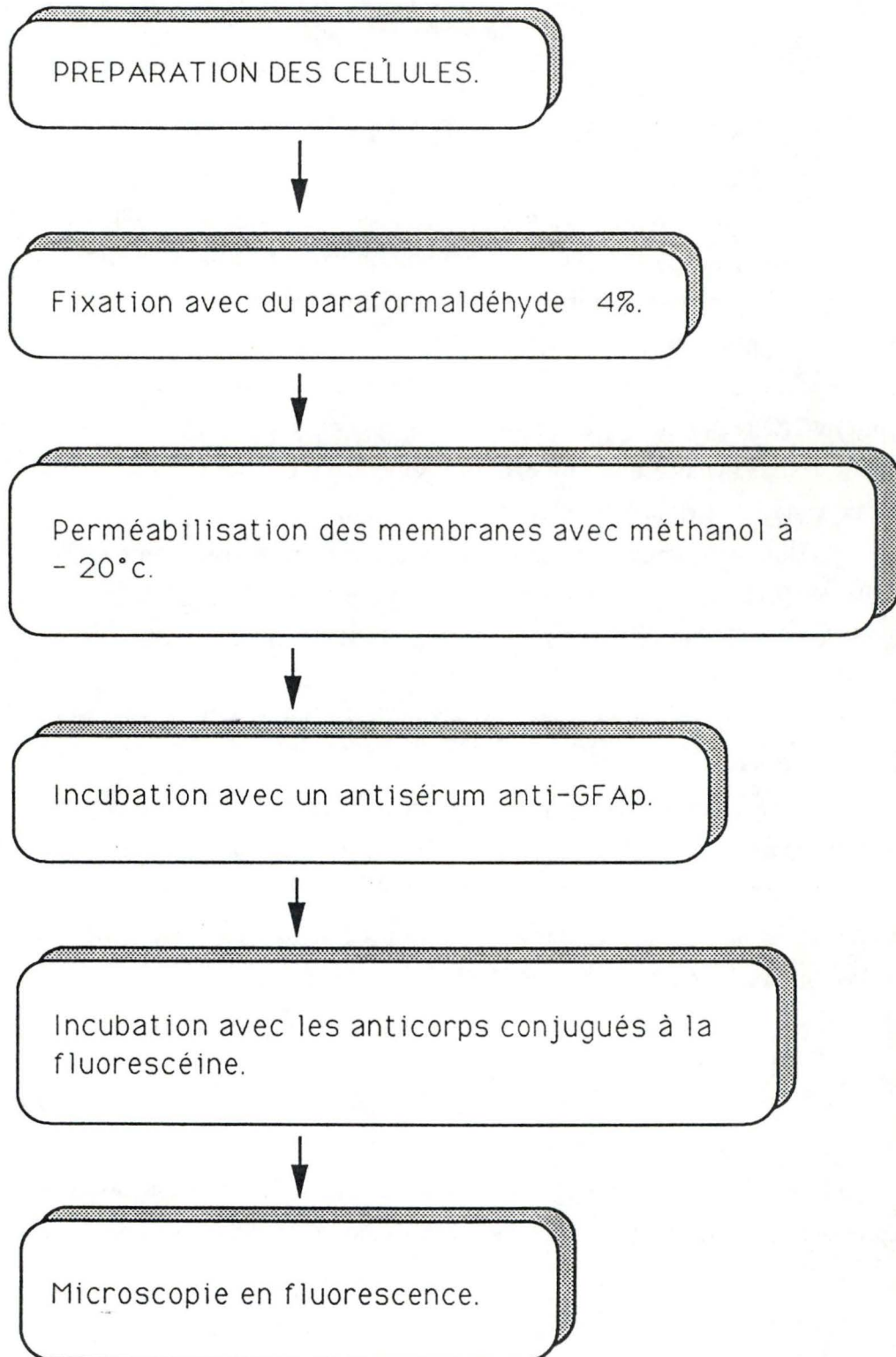
### Conclusion

Après analyse du contenu en protéines, en DNA et en GS des cellules astrogliales en culture provenant des hémisphères cérébraux de rats d'un jour, il nous a semblé opportun de choisir un âge adéquat pour l'étude des fonctions astrocytaires. Et plus précisément pour l'étude des fonctions métaboliques et des fonctions biochimiques (GS).

L'âge envisagé était de 17 jours, âge où les cellules sont à confluence.

Dans les expériences et dans la mesure du possible, nous avons utilisé des cellules astrocytaires âgées de 17 à 23 jours.

Programme de l'immunocytochimie :



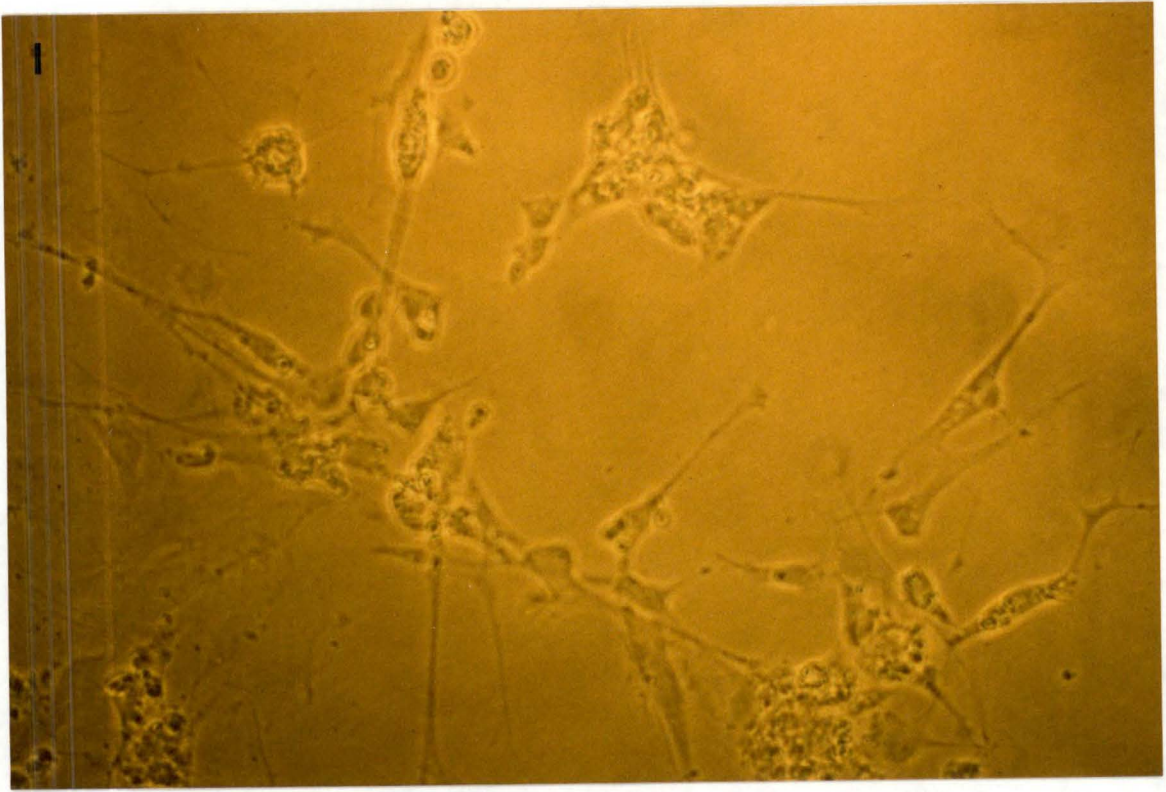


Photo I: photo en contraste de phase d'astrocytes de 7 jours (grossissement 1064 fois).

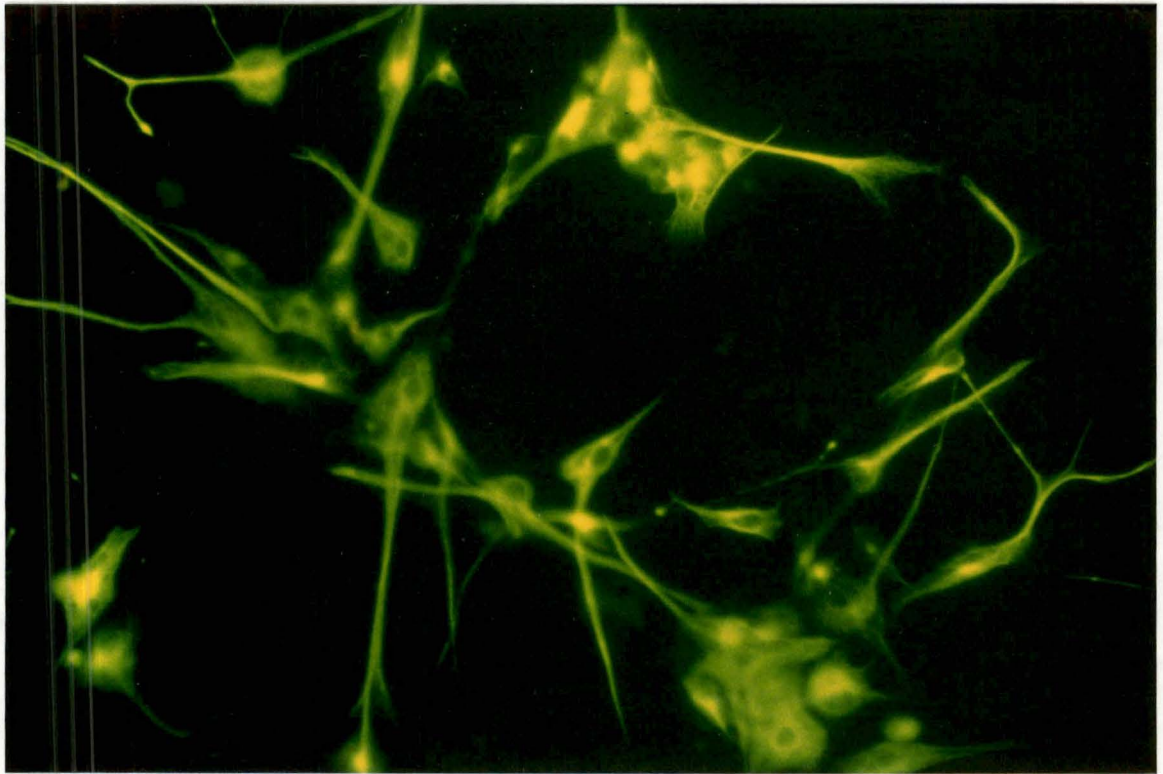


Photo J: Marquage au GFAP du même champ (même grossissement).

## **1.2. Marquage à la GFAP.**

La GFAP (Gial Fibrillary Acidic Protéin) est le marqueur le plus couramment utilisé pour évaluer la proportion de cellules astrocytaires en culture.

La méthode immunocytochimique est décrite ci contre.

A 7 jours, une comparaison peut être faite entre une photo en contraste de phase (I) et la photo du même champ après marquage au GFAP (J). On peut constater ainsi que presque toutes les cellules sont marquées et sont donc de type astrocytaire.

Notons qu'à 20 jours, l'enchevêtrement des prolongements est tel que la fluorescence est trop importante pour faire la distinction entre les différentes cellules astrocytaires.

Cette augmentation de fluorescence est dépendante de l'augmentation des filaments gliaux.

D'autre part, une tentative de marquage des neurones a été réalisée au laboratoire. Pour se faire, des anticorps dirigés contre les neurofilaments neuronaux ont été employés (STERN *et al*, 1983).

Les résultats tendent à exclure la contamination par ces cellules d'une culture d'astrocytes de 14 jours.

En 1985, HERTZ avait également exclu la présence de marqueurs neuronaux dans ses cultures. Il semblerait cependant que les principaux contaminants des cultures d'astrocytes soient des oligodendrocytes (JUURLINCK et HERTZ, 1985). A l'aide de la "myeline basic protein" (HARTMAN *et al*, 1982), un marquage des oligodendrocytes a été fait au laboratoire. Peu d'oligodendrocytes sont présents dans la culture ce qui semble conforme aux résultats de KIM (STERN *et al*, 1983).

## **1.3. Etat énergétique des astrocytes à maturité.**

Afin d'assurer leurs fonctions métaboliques, les astrocytes ont besoin d'énergie sous forme entre autre d'ATP et de créatine phosphate (C.P.) (SIESJO, 1983).

Les expériences de dosage avaient pour but d'estimer l'état énergétique dans lequel les astrocytes se trouvaient lorsqu'ils étaient à confluence.

Tableau 1. Concentrations en ATP et en C.P. des astrocytes dans un milieu DMEM.

n	[ATP] en nmoles/mg protéine	[C.P.] en nmoles/mg protéine
7	48,19 ± 3,70	34,81 ± 4,82

Conclusion:

Le but des différents dosages de métabolites hautement énergétiques sera de montrer comment in vitro les astrocytes sont sensibles à différents traitements telle que la privation de glucose.

**1.4. Caractérisation préliminaire de la cinétique de la Glutamine synthétase.**

La réaction de synthèse catalysée par la glutamine synthétase nécessite la présence de 2 substrats (le L-glutamate et l'hydroxylamine pouvant se substituer à l' $\text{NH}_3$ ) et d'un co-facteur (l'ATP) (SVENNEBY et TORGNER, 1986).

Le mécanisme cinétique comprendrait deux étapes avec tout d'abord formation d'un intermédiaire actif, le  $\gamma$ -glutamyl phosphate suivie de l'attaque nucléophile par l'hydroxylamine et de la production de l' $\gamma$ -glutamyl-hydroxamate d'ATP et de phosphate inorganique (ENHENFIELD et al, 1963).

Pour la caractérisation préliminaire de la cinétique de la GS, nous avons fait varier la concentration d'un substrat pour des concentrations fixes des deux autres substrats.

Les constantes cinétiques ( $K_m$  apparent et  $V_{max}$ ) sont ensuite déterminées en utilisant le programme de ENZFITTER distribué par ELSEVIER-BIOSOFT. Les constantes sont calculées par itérations successives à partir de la courbe de Michaelis-Menten.

**1.4.1. GLUTAMINE SYNTHETASE-GLUTAMATE**

Dans ces expériences, nous avons fait varier la concentration en L-glutamate de 0,66 à 60 mM.

Le  $K_m$  apparent (mM) et la  $V_{max}$  ( $\mu\text{M}/\text{h}/\text{ml}$ ) ont été déterminés en utilisant le programme de ENZFITTER.

Dans le tableau ci-dessous sont représentées les valeurs de  $K_m$  apparent et de  $V_{max}$  apparent pour des astrocytes en présence de glucose.

Tableau 2. Caractérisation cinétique de la GS pour des astrocytes placés dans un milieu avec glucose.

Traitement	GLUTAMINE	
	KM apparent	Vmax apparent
Avec glucose	2,46	4,78

#### 1.4.2. GLUTAMINE SYNTHETASE - HYDROXYLAMINE.

Dans ce cas, nous avons fait varier la concentration d'hydroxylamine de 1 à 100 mM en gardant les concentrations de L-glutamate (50 mM) et d'ATP (10 mM) fixes (tableau 3).

Tableau 3. Valeurs de  $K_M$  apparent et de  $V_{max}$  apparent pour des astrocytes placés dans un milieu avec glucose.

Traitement	HYDROXYLAMINE	
	KM apparent	Vmax apparent
Avec glucose	19,86	4,88

### 1.4.3. GLUTAMINE SYNTHETASE - ATP.

Le  $K_M$  apparent et le  $V_{max}$  apparent sont déterminés sur des astrocytes en présence de glucose, pour des concentrations en ATP variant de 0,5 à 20 mM.

Pour cette expérience, les concentrations en L-glutamate et en hydroxylamine sont constantes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4. Valeurs de  $K_M$  et de  $V_{max}$  apparents pour des astrocytes placés dans un milieu avec glucose.

Traitement	ATP	
	$K_M$ apparent	$V_{max}$ apparent
Avec glucose	1,24	5,33

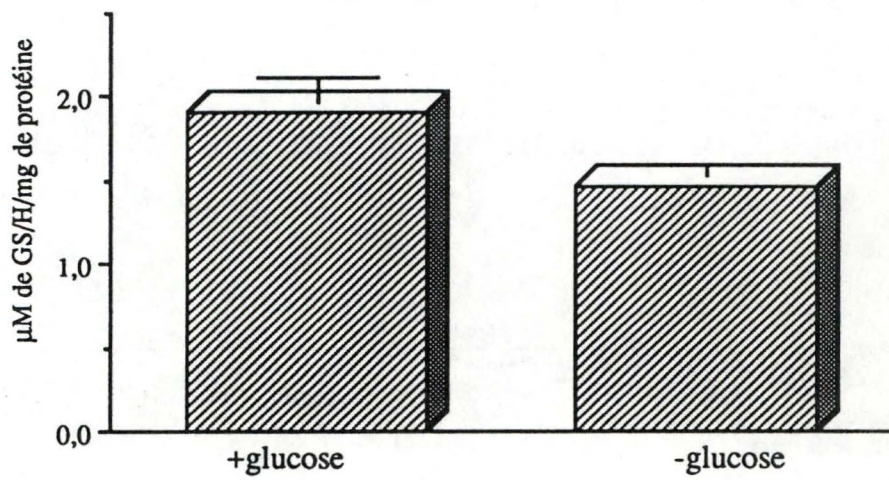


Figure 4: Activité de la GS (en  $\mu\text{Moles}/\text{H}/\text{mg}$  de protéine) pour des astrocytes incubés dans un milieu DMEM pendant 24 heures en présence de glucose ( $n=6$ ) et privé de glucose ( $n=6$ ).

2. EFFET DE LA PRIVATION DE D-GLUCOSE.
----------------------------------------

## 2.1. EFFET DE LA PRIVATION DE D-GLUCOSE SUR LA GS.

### 2.1.1. ACTIVITE DE LA GS EN MILIEU DMEM.

La figure 4 illustre les résultats obtenus dans le cas de l'activité de la GS pour des cultures contrôles (n = 6) maintenues dans un milieu DMEM en absence de sérum de veau foetal inactivé et pour des cultures (n = 6) soumises à une privation de glucose dans un milieu DMEM en absence de sérum de veau foetal et cela pendant 24 heures.

Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{Mole/h/mg}$  protéine.

Si nous observons la moyenne pour les astrocytes contrôles ( $1,91 \pm 0,14 \mu\text{M/h/mg}$  protéine) et la valeur obtenue pour les astrocytes soumis à une privation en glucose ( $1,46 \pm 0,07 \mu\text{M/h/mg}$  protéine), nous concluons qu'il y a une diminution du taux de GS de 24%.

Il nous a également semblé important de contrôler l'état des cellules qui ont été soumises à une privation de glucose de 24H. Pour ce faire, l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) a été mesurée sur un homogénat de cellules et sur le surnageant. La libération de LDH par rapport à l'activité totale de l'enzyme peut être considérée comme une mesure de l'intégrité des astrocytes (CALLAHAN *et al*, 1990). Si l'on compare le pourcentage de libération dans les cultures contrôles et les cultures mises en privation de glucose, on peut constater que cette privation de glucose n'entame en rien l'état d'intégrité des cellules.

Tableau 5. Pourcentage de libération de LDH dans des cultures contrôles et des cultures mises en privation de glucose dans un milieu DMEM.

% de LDH libérée dans les cultures contrôles	% de LDH libérée dans les cultures sans glucose
11,81 ± 2,48	10,95 ± 2,02

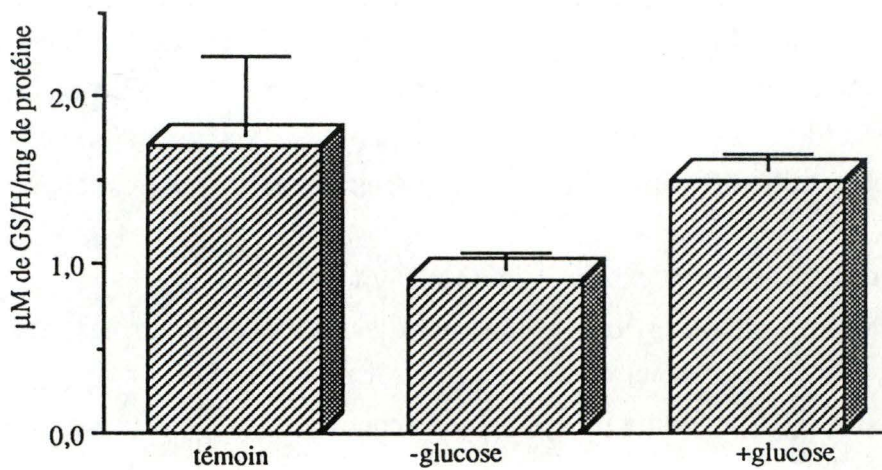


Figure5: Activité de la GS (en  $\mu$ Moles/H/mg de protéine) pour des astrocytes incubés dans un milieu HBSS pendant 24 heures en présence de glucose (n=8) et privé de glucose (n=5). Le témoin (n=2) est incubé dans un milieu DMEM pendant 24 heures.

Le temps de privation de glucose a été prolongé jusqu'à 48 heures. Le pourcentage de libération de la LDH, après 48 heures tend à augmenter (24,89%), ce qui montre un début de détérioration des cellules dans du DMEM privé de glucose.

### 2.1.2. ACTIVITÉ DE LA GS EN MILIEU HBSS.

Dans une deuxième étape, nous avons étudié l'activité de la GS pour des astrocytes placés en milieu "HBSS", c'est-à-dire dépourvu d'acides aminés mais contenant essentiellement des sels. Dans un des cas, du glucose est présent dans le milieu.

Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$  de protéine; n représente le nombre d'expériences (**fig. 5**).

Si nous observons la moyenne pour les cultures incubées en milieu HBSS sans glucose ( $0,90 \pm 0,09 \mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$  protéine) et les moyennes pour les astrocytes placés dans de l'HBSS avec glucose ( $1,50 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$  protéine), nous pouvons dire qu'il y a une diminution de la GS de 40% dans le milieu utilisé. Dans ces conditions, la privation de glucose ne semble pas délétère pour les cellules puisque le pourcentage de LDH libérée dans le surnageant est de 16,16 alors que dans les cellules contrôles, il est de 5,85.

Notons qu'une comparaison a été faite sur une même culture entre cellules maintenues au glucose dans un milieu riche en éléments nutritifs c'est-à-dire le DMEM et cellules maintenues pendant 24 heures dans un milieu ne contenant que des sels (HBSS) et du glucose. Aucune différence significative ne semble se produire au niveau de l'activité de la GS.

D'autre part, que la concentration de glucose soit de 5, 10, 22 mM dans le milieu HBSS, l'activité spécifique de la GS reste la même (MERTENS et al., non publié).

### Conclusion

En état de privation de glucose, nous pouvons affirmer que l'activité de la GS est diminuée. Ce résultat est encore plus marqué lorsque les astrocytes sont incubés en milieu ne contenant pas d'éventuels substrats comme la L-glutamine.

Dès lors, une hypothèse peut être envisagée : il se pourrait que le glutamate soit employé à d'autres fins que comme substrat pour la glutamine synthétase.

SIESJO (1983) a suggéré que le glutamate était utilisé comme substrat dans une réaction de transamination qui forme l' $\alpha$ -kétoglutarate. Celui-ci sera métabolisé par la suite dans le cycle de l'acide tricarboxylique.

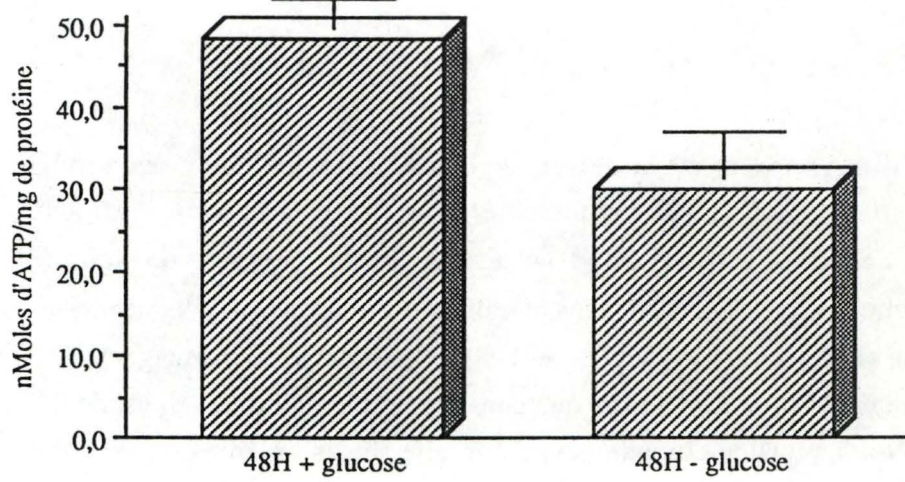


Figure 6: Concentration en ATP (en nMoles/ mg de protéine) après incubation des astrocytes dans un milieu DMEM pendant 48 heures avec du glucose (n=7) et privé de glucose (n=5).

## 2.2. EFFET DE LA PRIVATION DE D-GLUCOSE SUR L'ÉTAT ÉNERGÉTIQUE DES ASTROCYTES.

### 2.2.1. DOSAGE DE L'ATP ET DE LA C.P. DANS UN MILIEU DMEM.

Les résultats sont exprimés en nmoles/mg protéine et n représente le nombre d'expériences réalisées.

*Tableau 6. Concentrations en ATP et C.P. après incubation des astrocytes dans un milieu DMEM avec glucose (48H) et dans un milieu DMEM sans glucose (1H-24H-48H).*

n	Traitement	[ATP] en nmoles/mg de protéine	[C.P.] en nmoles/mg de protéine
7	Contrôle	48,19 ± 3,70	34,81 ± 4,82
5	1H sans glucose	49,98 ± 6,76	32,47 ± 2,05
4	24H sans glucose	54,97 ± 4,67	22,85 ± 4,26
4	48H sans glucose	30,24 ± 5,33	47,35 ± 5,71

Il ressort de ce tableau que les manipulations effectuées au cours de l'incubation font qu'elles provoquent une baisse du taux d'ATP de 40%, mais seulement après 48H de traitement au DMEM en absence de glucose (**fig. 6**) ( $P < 0,05$ ).

BAUDOUX *et al* (1988) avait déjà démontré la sensibilité des astrocytes au niveau énergétique en cas de privation de glucose. Cette diminution d'ATP s'accompagnant d'une augmentation parallèle de son produit d'hydrolyse, l'ADP. Signalons que dans leurs expériences, les astrocytes étaient isolés par séparation de la glie et des neurones sur des cerveaux de rats adultes.

Tandis que KAUPPINEN (1988), par ses expériences sur des astrocytes en culture depuis 4 semaines et incubés soit en absence de substrat, soit en présence de 10 mM de glucose pendant 20 minutes, obtient une déplétion de 83% en ATP.

Dans notre cas, nous ne signalons une déplétion d'ATP de 40% que vers 48 heures.

Au sein du laboratoire, une expérience a été réalisée suivant les mêmes modalités que celles suivies par KAUPPINEN sur des astrocytes de 33 jours. Ce résultat ne montre pas une déplétion d'ATP comparé au contrôle.

Notons enfin, que pour la créatine phosphate, les valeurs obtenues ne sont pas significativement différentes d'un point de vue statistique.

### 2.2.2. DOSAGE DE L'ATP ET DE LA C.P. DANS UN MILIEU HBSS.

Le tableau 7 nous donne les taux d'ATP et de C.P. lorsque les astrocytes sont incubés en milieu HBSS en absence ou en présence de glucose pendant 24 heures.

Tableau 7. Concentrations en nmoles d'ATP et C.P./mg protéine des astrocytes incubés dans un milieu HBSS avec glucose (5 mM) et sans glucose pendant 24 heures.

n	Traitement	[ATP] en nmoles/mg protéine	[C.P.] en nmoles/mg protéine
2	Avec glucose	29,34	40,90
2	Sans glucose	35,13	31,00

Nous ne décelons aucune différence au niveau de l'ATP mais des expériences complémentaires seraient certainement nécessaires.

Il est important de rappeler que la déplétion d'ATP ne s'observait qu'après 48H dans le milieu DMEM. Dans ce cas, nous avons laissé incuber nos cellules pendant 24 heures. Le milieu HBSS étant un milieu exempt d'acides aminés et contenant une grande quantité des sels, ce milieu est délétère pour les astrocytes passé cette période de 24 heures. Nous ne pouvons donc inclure des résultats après cette période. En effet après 48 heures de présence dans un milieu HBSS avec du glucose 5 mM, il y a une libération de 59,34% de LDH dans le surnageant.

## 2.3. EFFET DE LA PRIVATION DE D-GLUCOSE SUR LE GLYCOGENE.

### 2.3.1. DOSAGE DU GLUCOSE DANS UN MILIEU DMEM.

Il a été démontré que la concentration en glucose du milieu de culture régule le niveau de glycogène contenu dans le cytoplasme des astrocytes (CUMMINS *et al*, 1983).

C'est ainsi que nous avons essayé de réaliser une estimation de la quantité de glucose ingérée par les astrocytes. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 8 et sont exprimés en pourcentage de consommation de glucose du milieu.

*Tableau 8. Pourcentage de glucose consommé dans le milieu de culture en 24H.*

Age des cellules	Pourcentage de glucose
7 jours	8,17%
14 jours	54,69%
21 jours	52,89%

LUST *et al* (1975) ont mis en évidence qu'un apport continu en glucose est nécessaire pour le fonctionnement normal des astrocytes.

Nous remarquons également que le pourcentage de glucose ingéré par les astrocytes augmente au cours du vieillissement de la culture. Cela semble être dû au nombre de cellules qui devient de plus en plus élevé au cours du temps.

Ces résultats concordent avec les expériences de SWANSON *et al.*, 1989.

### 2.3.2. DOSAGE DU GLUCOSE DANS UN MILIEU HBSS.

Nous avons réalisé les expériences suivantes : nous avons calculé la consommation en glucose dans le milieu de culture lorsque les astrocytes étaient incubés dans un milieu HBSS avec glucose .

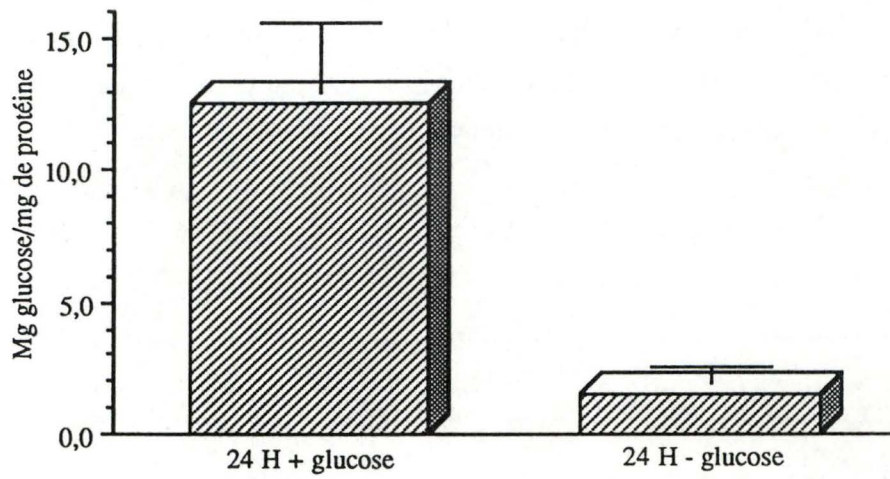


Figure 7: Concentration en glycogène (en mg de glucose/ mg de protéine) dans un milieu DMEM avec glucose (n=6) et privé de glucose (n=6) pendant 24 heures.

Nous avons ensuite évalué le pourcentage de glucose ingéré par les astrocytes après 24H dans le milieu dépourvu d'éléments nutritifs (tableau 9).

Tableau 9. Concentration en glucose dans le milieu de culture et estimation de la quantité de glucose ingérée par les astrocytes exprimée en pourcentage de la concentration initiale en glucose.

	5 mM glucose	10 mM glucose
Traitement	Pourcentage	Pourcentage
24 heures HBSS	64,18%	57,61%

### 2.3.3. DOSAGE DU GLYCOGENE DANS UN MILIEU DMEM.

La figure 7 représente la concentration en glycogène exprimée en mg de glucose/mg de protéine dans un milieu DMEM avec et sans glucose pendant 24 heures.

Nous pouvons affirmer, au vu de ce résultat, que lorsque la concentration en glucose devient critique, le glycogène est utilisé comme source de carbone dans le métabolisme astrocytaire. Le fait avait déjà été reporté dans les travaux de CUMMINS *et al* (1983).

Il est important de souligner que la déplétion est considérable et exprimée en pourcent, elle vaut 90%. Un test statistique nous révèle que c'est significatif à 99% ( $p < 0,01$ ).

### 2.4. RESTAURATION DE L'ACTIVITÉ DE LA GS APRES PRIVATION DE D-GLUCOSE.

Au vu des résultats obtenus précédemment lors de la privation de glucose, nous avons voulu réaliser des expériences permettant d'établir la possibilité, pour les astrocytes maintenus 24 heures dans un milieu HBSS en présence ou en absence de glucose et 24 heures dans un milieu DMEM sans sérum de veau foetal inactivé, de voir une restauration de leur marqueur macromoléculaire, la GS.

Pour cela, nous sommes donc passés à des expériences de récupération.

La première expérience consiste à placer les cultures, qui sont restées 24 heures dans un milieu DMEM en absence de sérum de veau foetal; dans un milieu DMEM en présence de sérum de veau foetal.

Les résultats sont exprimés en  $\mu$ moles de GS/h/mg de protéine, n représente le nombre d'expériences.

*Tableau 10. Restauration de l'activité de la GS ( $\mu$ mole/h/mg protéine) dans des astrocytes incubés à 37°C dans un milieu DMEM en présence de sérum de veau foetal après privation de glucose.*

24H dans DMEM en absence de sérum en présence de glucose, + 24H dans DMEM avec sérum.	24H dans DMEM en absence de sérum et de glucose + 24H dans DMEM avec sérum
1,37 $\pm$ 0,28 (n = 3)	1,40 $\pm$ 0,22 (n = 3)

La baisse de 24% précédemment observée dans les cultures avec milieu DMEM, sans sérum de veau foetal et privées de glucose n'apparaît plus. La récupération est complète.

La deuxième expérience consiste à placer les astrocytes qui ont été incubés dans de l'HBSS 24 heures en présence de glucose et en privation de glucose, avec du glucose et du sérum de veau foetal dans du DMEM.

Rappelons que la présence des cellules dans un milieu HBSS pendant 48 heures est délétère pour celles-ci. C'est pourquoi la tentative de restauration de GS s'est faite dans le milieu DMEM.

Les résultats sont exprimés dans le tableau 11.

*Tableau 11. Restauration de l'activité de la GS ( $\mu$ Mole/h/mg protéine) dans des astrocytes incubés à 37°C dans un milieu DMEM en présence de glucose et de sérum de veau foetal après privation de glucose dans le HBSS.*

24H HBSS sans glucose + 24H dans DMEM avec glucose et sérum	24H HBSS avec glucose + 24H DMEM avec glucose et sérum
1,06	1,12

La récupération d'activité de la GS est de 94% dans cette expérience. Il semble donc que la perte d'activité de la GS soit un phénomène complètement réversible après 24 heures.

Cependant, des expériences supplémentaires pourraient être réalisées. Mais dans ce protocole ci, le changement de milieu pour la récupération pourrait être criticable.

Nous constatons à partir de ces deux types d'expériences que le fait d'ajouter du milieu DMEM et du sérum de veau foetal provoque un retour à la normale de l'activité de la GS.

Une hypothèse peut être émise en disant que les éléments nutritifs apportés par le milieu et le sérum permettent aux astrocytes de régénérer le taux d'activité de leur marqueur.

Dans les années précédentes, il a été démontré que le sérum influençait la croissance des cultures et par ce fait leur métabolisme biochimique (SENSENBRENNER *et al*, 1986).

Ainsi le sérum de veau foetal contiendrait un certain nombre de facteurs de croissance et d'hormones qui induiraient la croissance des astrocytes (HAMPRECHT, 1986).

En guise de conclusion concernant ces expériences de restauration de l'activité de la GS, nous pouvons dire que ces dommages causés par une privation de glucose sont réversibles *in vitro* endéans un laps de temps assez court (24 heures).

## 2.5. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS.

### 2.5.1. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - GLUTAMATE.

Les concentrations d'ATP et d'hydroxylamine sont constantes. Tandis que nous faisons varier la concentration en L-glutamate de 0,66 à 60 mM.

Le  $K_M$  apparent (mM) ainsi que la  $V_{max}$  apparent ( $\mu\text{mole GS/h/ml}$ ) ont été calculés par ordinateur suivant le programme de ENZFITTER (tableau 12)

Tableau 12. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS pour des astrocytes privés de glucose.

Traitement	L-glutamate	
	$K_M$ apparent	$V_{max}$ apparent
Privation de glucose	1,89	2,55

### 2.5.2. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - HYDROXYLAMINE.

La concentration d'hydroxylamine varie de 8 à 150 mM. Les concentrations en glutamate (50 mM) et en ATP (10 mM) sont maintenues constantes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS pour des astrocytes incubés en absence de glucose.

Traitement	Hydroxylamine	
	KM apparent	Vmax apparent
Privation de glucose	16,24	1,33

### 2.5.3. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - ATP.

Dans cette expérience, les concentrations en L-glutamate (50 mM) et en hydroxylamine (100 mM) sont fixes.

La concentration en ATP varie de 0,5 à 20 mM (tableau 14).

Tableau 14. KM et Vmax apparents pour des astrocytes soumis à une privation de glucose.

Traitement	ATP	
	KM apparent	Vmax apparent
Privation de glucose.	0,98	2,26

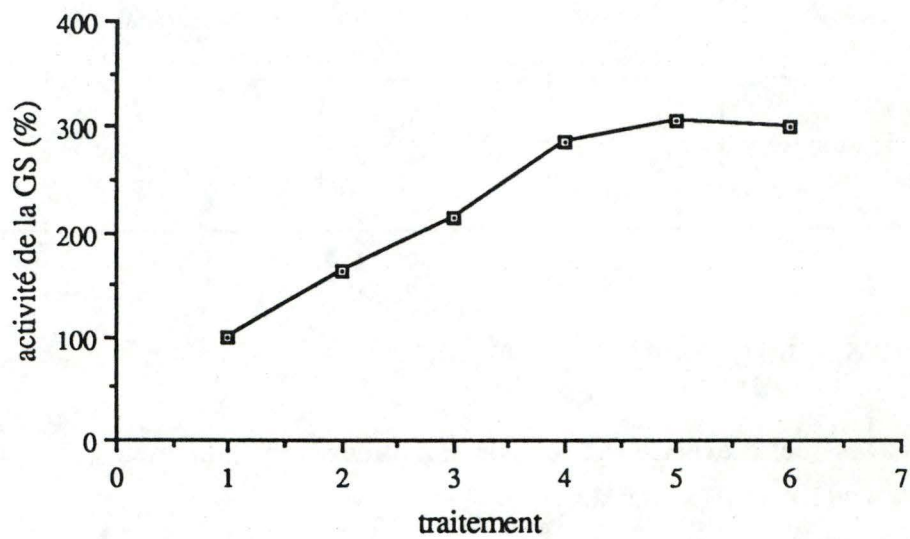


Figure 8: Activité de la GS (en%) en fonction de la concentration en dB cAMP

En 1: concentration du témoin

2: 0,00025 mM

3: 0,0025 mM

4: 0,025 mM

5: 0,25 mM

6: 2,5 mM

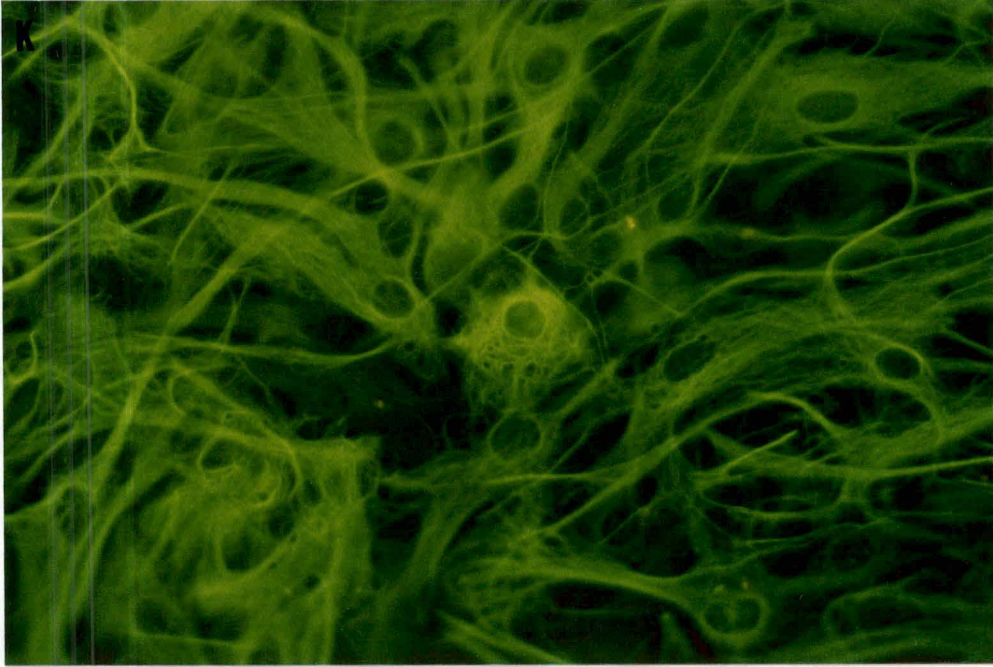
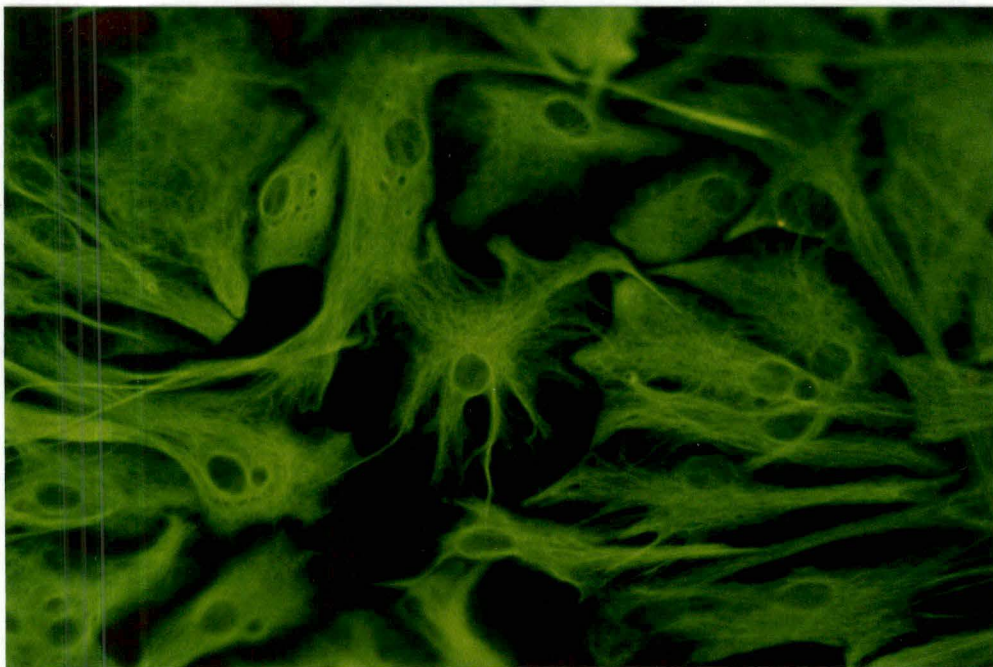


Photo K: Marquage à la GFAP réalisé sur des astrocytes de 12 jours traités au DB cAMP. (27 juin).

**L**



### 3. INDUCTION DE LA DIFFERENCIATION CELLULAIRE PAR LE DIBUTYRYL cyclicAMP

Après deux semaines de développement, les astrocytes sont traités au dBcAMP pour promouvoir une différenciation morphologique (SENSENBRENNER *et al*, 1980; BROWNING et NICKLAS, 1982; JUURLINK et HERTZ, 1985).

L'addition de dBcAMP dans le milieu de culture mène à des changements morphologiques prononcés, les astrocytes traités ressemblent alors à des astrocytes matures trouvés *in situ* (SENSENBRENNER *et al*, 1980; JUURLINK et HERTZ, 1985).

#### 3.1. MARQUAGE À LA GFAP.

Après 24 heures de traitement au dB cAMP 0,25 mM, toutes les cellules apparaissent allongées. Les corps cellulaires sont petits et les prolongements très longs et fins.

Dans ces prolongements, de nombreux filaments gliaux sont visibles par marquage à la GFAP (photos K et L).

Plusieurs auteurs avaient déjà démontré que sous l'effet du dB cAMP, une accumulation de filaments gliaux se produisait (SENSENBRENNER *et al*, 1980).

Les astrocytes ressemblent à des formes matures trouvées *in situ* (JUURLINK et HERTZ, 1985).

Ce même aspect s'observe à 36 jours cependant à cet âge, les cellules commencent à dégénérer (photo **B**).

#### 3.2. Etude de l'activité de la GS.

##### 3.2.1. VARIATION DE LA CONCENTRATION EN DB cAMP.

Comme le dB cAMP semblait produire un effet de maturation au niveau des astrocytes, nous nous sommes demandé si le dB cAMP n'agirait pas au niveau de l'activité du marqueur enzymatique astrocytaire. Nous avons ainsi soumis nos cellules à ces concentrations croissantes de dB cAMP (de 0,00025 mM à 2,5 mM) pendant 72 heures et nous avons dosé l'activité de la GS (fig. 8)

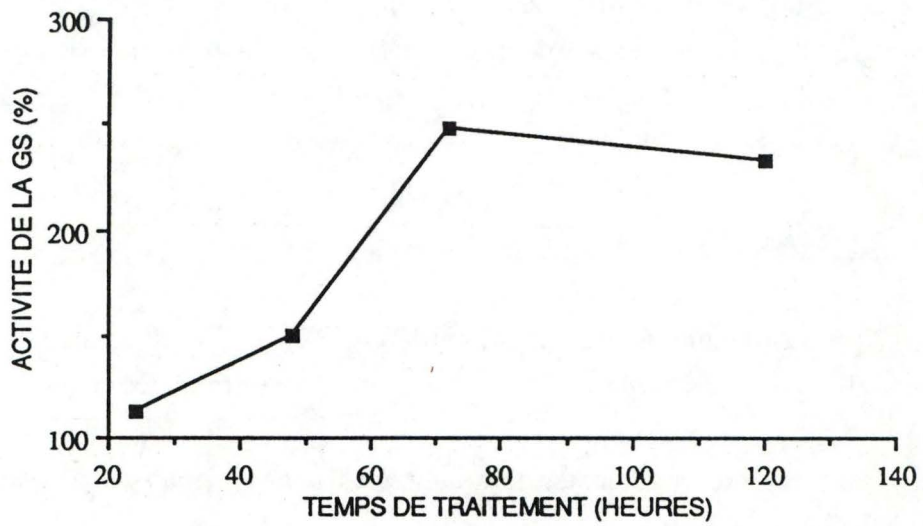
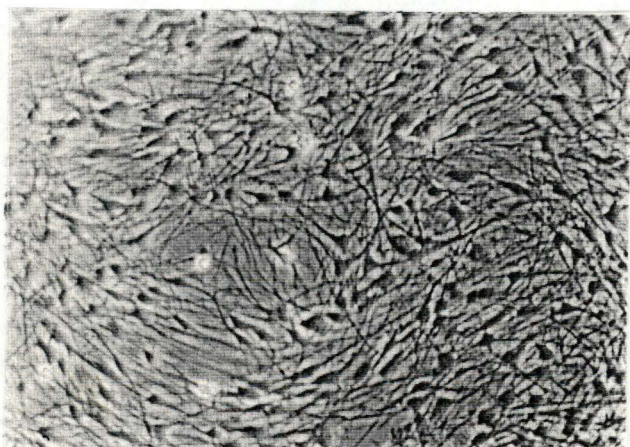
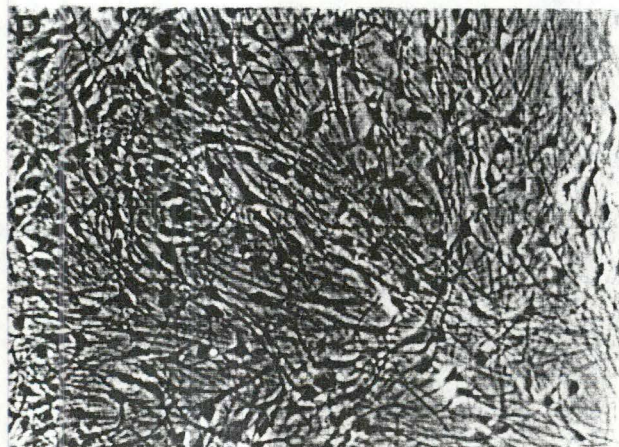
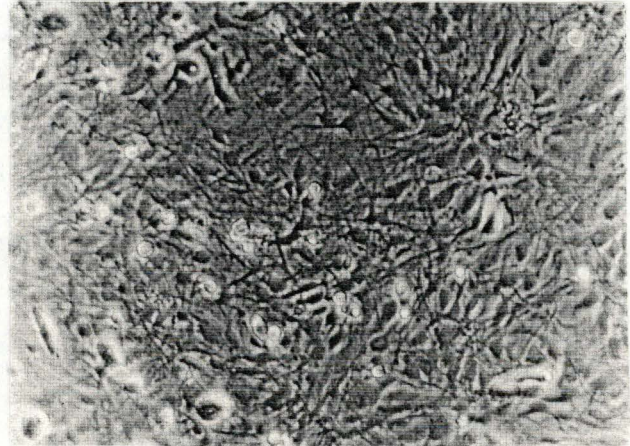
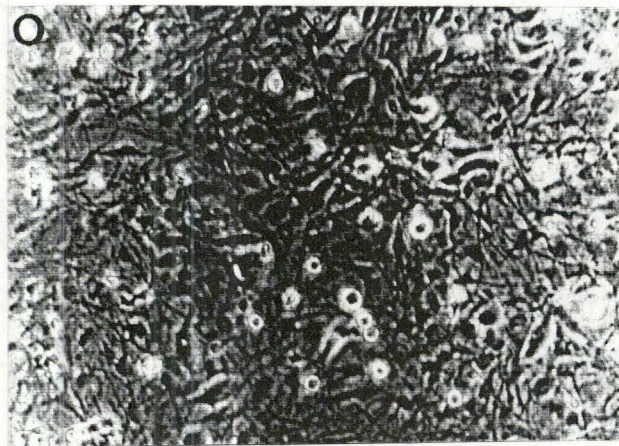
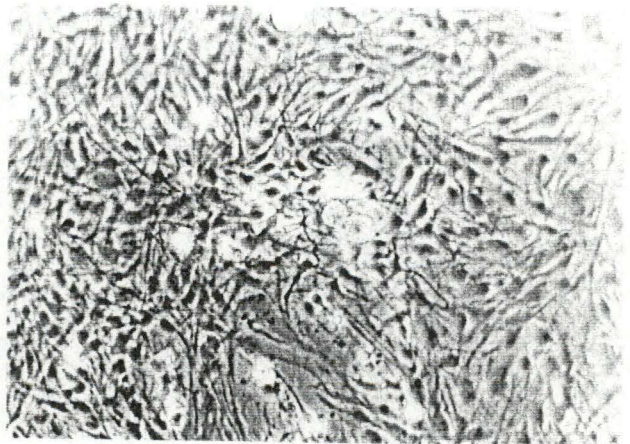
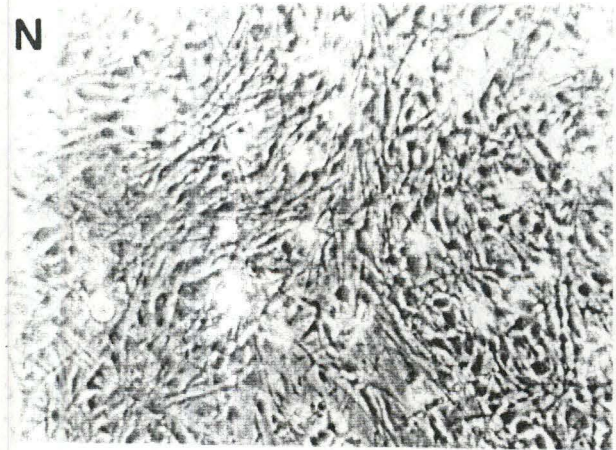
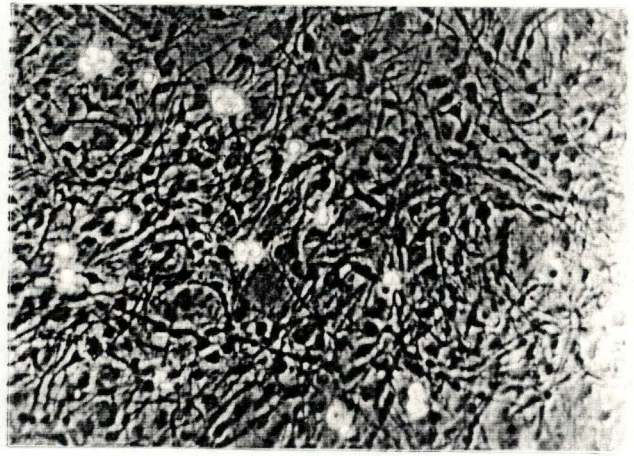
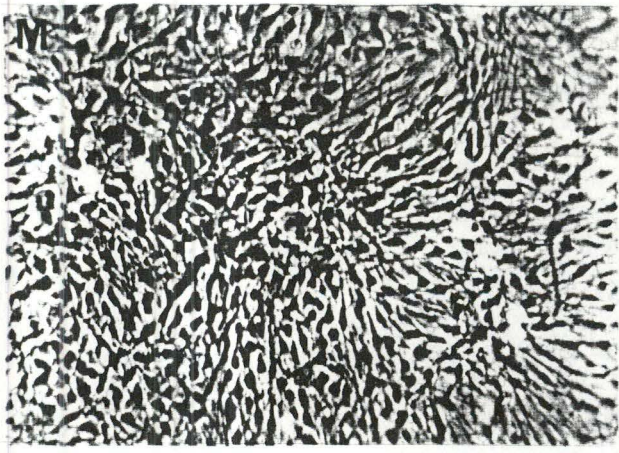
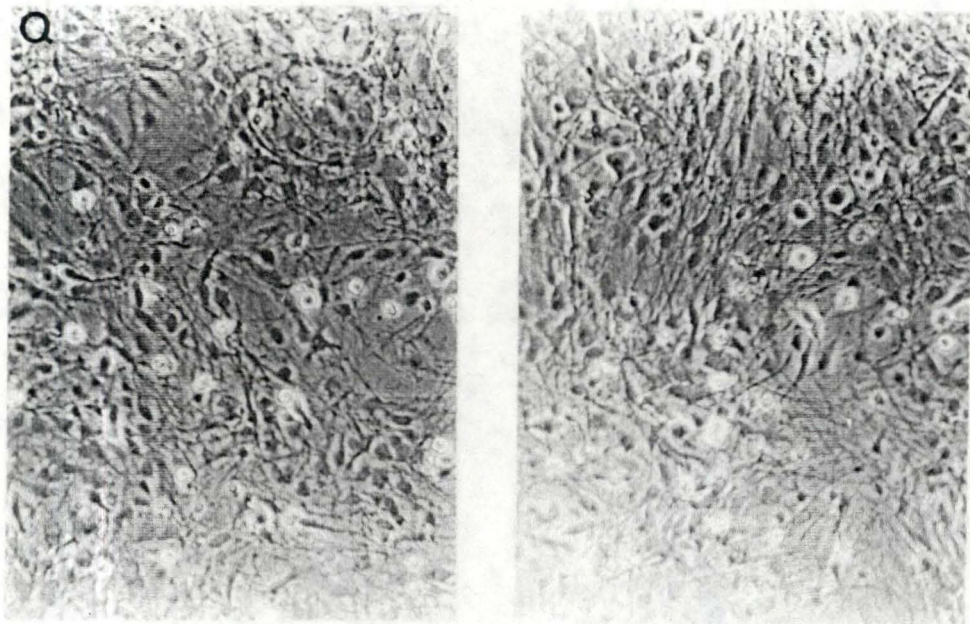


Figure 9: Activité de la GS (en %) en fonction du temps de traitement au dB cAMP (0,25 mM). Les différents temps d'incubation expérimentés sont 24H, 48H, 72H et 120H.



Ce groupe de 8 photos prises au même grossissement (360 fois) illustre la morphologie des astrocytes lors d'un traitement au DB cAMP à différents temps d'incubation

en M: 24H  
en N: 48H  
en O: 72H  
en P: 120H.



Photos Q: changements morphologiques induits par un traitement au dB cAMP 0,25 mM pendant 72 heures.

Au vu des résultats, nous avons mis en évidence que des concentrations faibles en dB cAMP (0,00025 mM) n'induisent pas beaucoup la GS.

Tandis que des concentrations de dB cAMP de l'ordre de 0,025; 0,25 et 2,5 mM provoquent une augmentation nette de la GS.

L'activité de la GS à 21 jours vaut 1,49  $\mu$ M GS/h/mg protéine, si nous la comparons à l'activité de la GS lorsque les astrocytes sont traités pendant 72 heures au dB cAMP 0,25 mM ( $4,55 \pm 0,35$   $\mu$ M de GS/h/mg protéine), nous avons une augmentation d'un facteur de 3.

### Conclusion

Etant donné qu'il nous fallait choisir une concentration donnée de dB cAMP pour la suite des expériences. La valeur de 0,25 mM semblait convenir au vu du graphe de l'activité de la GS en fonction de la concentration en dB cAMP. A cette concentration, l'augmentation de la GS est la plus importante ( $4,55 \pm 0,35$   $\mu$ M GS/h/mg protéine).

Cette valeur de 0,25 mM est en fait la concentration la plus souvent retrouvée dans la littérature (SCHOUSBOE *et al*, 1980).

L'aspect morphologique (photo Q) étant celui d'astrocytes matures.

En 1982, BROWNING et NICKLAS réalisant des expériences sur des gliomes C6 avaient mis en évidence que la concentration en cAMP nécessaire pour produire une induction des enzymes dans les cellules animales est de 1 mM. Cette concentration quatre fois plus importante que dans le cas du dB cAMP est due à la faible perméabilité des membranes des astrocytes aux nucléotides (AMPc).

Le dibutyryl rend l'AMPc plus liposoluble et permet donc un passage facilité au travers de la membrane cellulaire des astrocytes.

### 3.2.2. VARIATION DU TEMPS DE TRAITEMENT AU DB cAMP.

Nous avons placé nos cellules dans un milieu contenant du dB cAMP 0,25 mM et nous les avons laissé incuber à 37°C pendant différents temps. Le test de la GS fut réalisé comme décrit précédemment (PHOTOS M.-N.O.-P).

Le temps nécessaire pour obtenir un effet du dB cAMP sur la GS a été examiné entre 24H et 120H (fig. 9).

Il ressort de ce graphe que l'activité de la GS est quasi inchangée après 24H de traitement (112,67%).

Signalons que le contrôle est considéré comme étant égal à 100%.

Entre 24H et 48H, une augmentation d'activité s'observe, elle vaut (37,33%). Mais, c'est à 72H que l'augmentation d'activité est la plus importante (148%).

Par la suite, elle semble un peu diminuer (135,8%), en restant cependant toujours supérieure au contrôle.

Si on compare l'activité spécifique de la LDH dans les cultures contrôles et les cultures induites 72H au dB cAMP (0,25 mM), nous pouvons en déduire que le traitement au dB cAMP ne modifie pas l'activité de cet enzyme dans les cultures.

Tableau 14. Activité spécifique de la LDH dans les cultures contrôles et des cultures induites au dB cAMP dans un milieu DMEM.

Activité spécifique de la LDH dans les cultures contrôles (μMole/min/mg protéine).	Activité spécifique de la LDH dans les cultures induites au dB cAMP (μMole/min/mg protéine)
1,01 ± 0,90	0,95 ± 0,10

### Conclusion

L'augmentation de l'activité de la glutamine synthétase se ferait par le biais du nucléotide cyclique.

Le mécanisme suivant lequel l'AMP cyclique agit n'a pas encore été établi.

Notons que cette induction de l'activité de la GS par le dB cAMP a déjà été décrit pour des gliomes C<sub>6</sub> (BROWNING et NICKLAS, 1982), pour certaines lignées de cellules provenant de poumons de hamster chinois (TI EMEIER et MILMAN, 1972).

Mais il est important de souligner que cette induction par le dB cAMP n'est pas un fait relaté par tout le monde. Ainsi SCHOUSBOE *et al* (1980) prétendaient que l'activité de la GS n'est pas induite par le dB cAMP.

Dans certains types cellulaires comme les astrocytes de cerveaux de souris (JUURLINCK *et al*, 1981), il y a diminution de l'activité après traitement au dB cAMP.

JUURLINK et HERTZ (1985), quant à eux, spécifiaient que le dB cAMP pouvait avoir des effets dramatiques sur la morphologie astrogliale. Et que dans les cultures d'astrocytes de poulet, aucune stimulation de la GS n'est observée en présence de dB cAMP.

Toutefois qu'il s'agisse de diminution ou d'augmentation d'activité induite par le cAMP aucun mécanisme n'a été retenu de façon certaine dans ces études.

Notons que certains auteurs ont décrit une augmentation d'activité d'autres enzymes que la GS par le biais du dibutyryl cAMP par exemple pour la 5' nucléotidase dans les cultures de cellules gliales.

Dans les cellules gliales C6 parallèlement à une augmentation d'activité de la GS, la LDH augmente aussi après induction du dB cAMP (BROWNING et NICKLAS, 1982). Cela n'est pas le cas pour les astrocytes de cerveaux de rat. Cet auteur (BROWNING) suggère d'ailleurs que l'induction de GS et de LDH se ferait par des mécanismes différents.

### **3.3. Etude de l'état énergétique des astrocytes.**

#### **3.3.1. VARIATION DU TEMPS D'INCUBATION DU DB cAMP.**

Les résultats sont exprimés en nmoles/h/mg protéine et n représente le nombre d'expériences réalisées.

*Tableau 15. Concentrations en nmoles d'ATP et de CP/mg protéine lorsque les astrocytes sont incubés pendant 24, 48 et 72 heures dans un milieu contenant du dB cAMP.*

n	Traitement	[ATP] en nmoles/mg protéine	[C.P.] en nmoles/mg protéine
3	Témoin	37,28 ± 3,27	43,96 ± 2,10
4	24 heures	32,78 ± 1,53	37,60 ± 0,36
4	48 heures	32,20 ± 0,87	41,36 ± 3,81
4	72 heures	36,23 ± 1,10	49,68 ± 4,26

Le dibutyryl cAMP ne semble pas affecter les concentrations des deux métabolites énergétiques envisagés et cela même après trois jours de traitement.

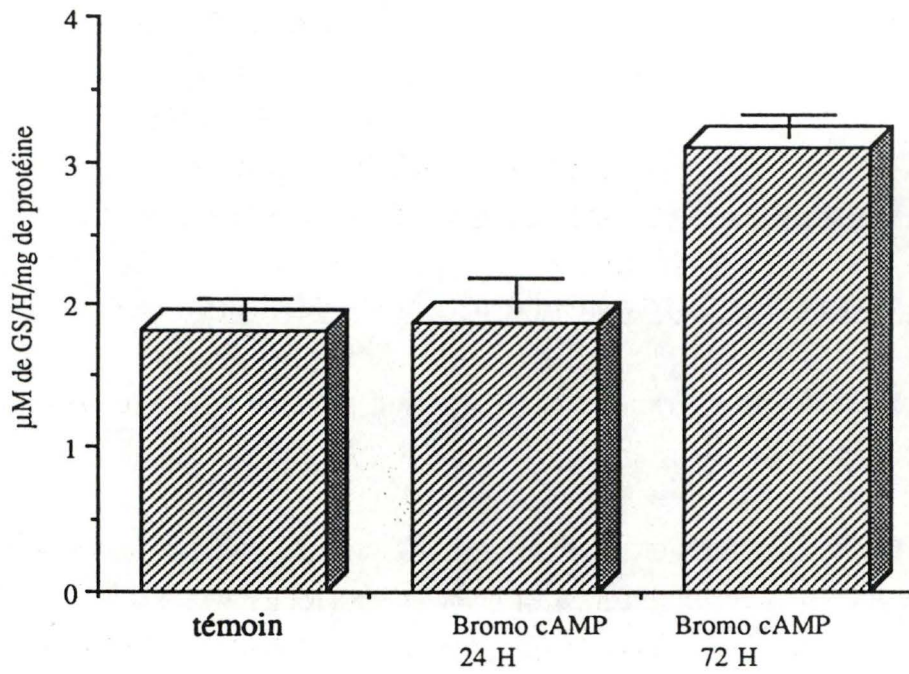


Figure 10: Activité de la GS (en  $\mu\text{moles}/\text{H}/\text{mg}$  de protéine) après traitement des astrocytes au Bromo cAMP 24 heures ( $n=6$ ) et 72 heures ( $n=3$ ). Le témoin ( $n=5$ ) est incubé dans un milieu DMEM pendant 24 heures.

Il est intéressant de noter que lorsqu'un traitement plus long est envisagé, des effets délétères sur la morphologie cellulaire apparaissent (JUURLINK et HERTZ, 1985).

SCHOUSBOE *et al* (1980) observaient qu'une augmentation dans l'activité de la lactate déshydrogénase se produisait lorsque les cellules étaient exposées au dB cAMP pendant 21 jours. L'enrichissement du milieu en LDH indiquait que les cellules avaient été endommagées à long terme.

### **3.4. Action de substances autres que le dB cAMP.**

#### **3.4.1. INDUCTION DE L'ACTIVITE DE LA GS PAR LE BROMO CAMP.**

Après avoir testé le dB cAMP sur les astrocytes, nous avons voulu savoir si l'utilisation d'une autre substance contenant de l'AMPc induisait aussi une augmentation d'activité de la GS (MAX *et al*, 1990).

Comme pour le dB cAMP, le bromo cAMP a été utilisé à la concentration de 0,25 mM. De nouveau, deux temps de traitement ont été expérimentés (24 heures et 72 heures) sur une culture de 21 jours.

Les résultats sont représentés à la figure 10.

Une augmentation de l'activité de la GS ne se marque pas après le premier jour de traitement ( $1,88 + 0,23 \mu\text{m GS/h/mg}$  protéine).

Notons que la culture témoin a une activité de  $1,83 + 0,14 \mu\text{m GS/h/mg}$  protéine. Cette induction par le 8 bromo cAMP s'observe après 72 heures de traitement ( $3,11 + 0,14 \mu\text{m GS/h/mg}$  protéine).

En pourcentage par rapport à la culture contrôle (100%), le 8 bromo cAMP induit une augmentation d'activité de 69,94% pour 148% lorsque les cellules sont traitées au dB cAMP pendant 72 heures.

Ces faits avaient déjà été mentionnés par MAX *et al*, 1990. BROWNING et NICKLAS (1982), quant à eux, disaient que le 8 Bromo cAMP produisait un effet similaire à celui causé sur la GS par le dB cAMP.

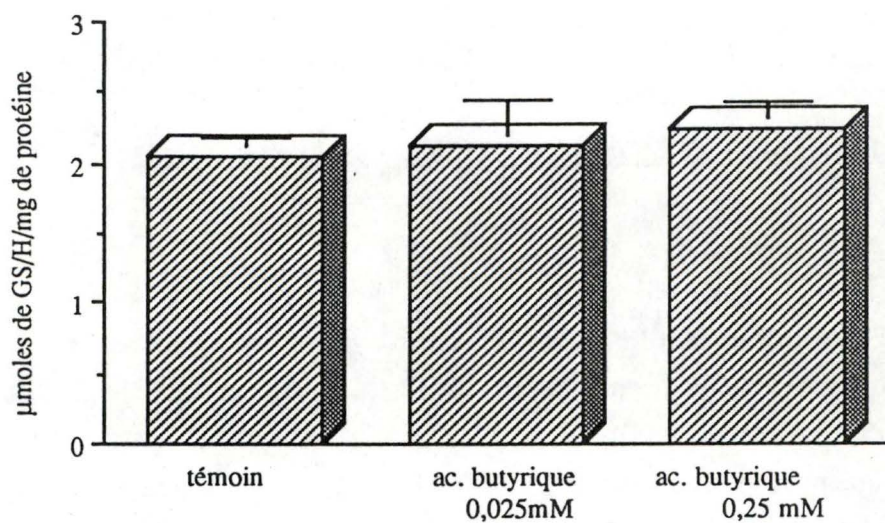


Figure 11: Activité de la GS(en  $\mu\text{Moles/H/ mg}$  de protéine) après traitement à l'acide butyrique pendant 24 heures à la concentration de 0,025 mM (n=4) et de 0,25 mM (n=3). Le témoin (n=3) est incubé dans un milieu DMEM pendant 24 heures.

### 3.4.2. INDUCTION DE L'ACTIVITÉ DE LA GS PAR LE N-BUTYRATE.

Dans notre étude, nous avons étudié les effets du dB cAMP, du 8 bromo cAMP mais nous avons voulu aussi connaître l'effet des dérivés de l'acide butyrique sur les cultures d'astrocytes.

Le n-butyrate a donc été utilisé à deux concentrations différentes 0,025 mM et 0,25 mM;

Le temps d'incubation a été fixé à 72 heures.

Les résultats sont présentés à la figure 11.

Il ressort de ce graphique qu'après 72 heures, le n-butyrate n'induit pas (de façon considérable) l'activité de la GS.

Avec la concentration 0,025 mM, l'activité de la GS est de  $2,12 \pm 0,12$   $\mu\text{M/h/mg}$  protéine pour un témoin de  $2,06 \pm 0,04$   $\mu\text{M/h/mg}$  protéine. Tandis qu'à 0,25 mM, l'activité de la GS est de  $2,24 \pm 0,25$   $\mu\text{M/h/mg}$  protéine. Notons que WEINGARTEN *et al* (1981) ont rapporté une augmentation d'activité de GS avec des concentrations plus importantes de butyrate.

#### Conclusion

Au vu de ces histogrammes, nous pouvons envisager l'hypothèse que l'augmentation de l'activité de la GS serait à mettre en relation avec l'action de l'AMPc.

Rappelons que le rôle du dibutyryl est de permettre un passage facilité aux nucléotides phosphatés (AMPc) au travers des membranes astrocytaires.

Actuellement, aucune expérience n'a encore pu montrer le mécanisme en jeu dans la réaction de stimulation de l'enzyme astrocytaire (MAX *et al*, 1990).

### 3.5. Action des inhibiteurs.

Deux substances inhibitrices ont été étudiées en vue de voir leur action sur l'activité de l'enzyme astrocytaire (GS).

La première substance est la cytosine arabinoside. C'est un inhibiteur de la prolifération cellulaire (WU *et al*, 1988). Nous avons étudié son action dans un milieu sans dibutyryl cAMP et avec dibutyryl cAMP. La substance (10  $\mu\text{m}$ ) est ajoutée en même temps que la solution de dibutyryl cAMP (0,25 mM) pendant 72 heures.

La deuxième substance est le cycloheximide. C'est un inhibiteur de la synthèse de protéine (BROWNING et NICKLAS, 1982; WU *et al*, 1988).

Les modalités d'expériences sont les mêmes que pour la cytosine arabinoside. La concentration de cycloheximide utilisée est de 10  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.5.1. ACTION DE LA CYTOSINE ARABINOSIDE.

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

*Tableau 16. Effet de la cytosine arabinoside sur la concentration en protéine et sur l'activité de la GS pour des astrocytes de 17 jours stimulés ou non dans du dibutryl cAMP pendant 72 heures.*

Jours	n	Traitement	[protéine] en mg/plaque	[GS] en $\mu\text{m/h/mg}$ protéine
17	4	Contrôle	$1,53 \pm 0,14$	$1,36 \pm 0,17$
17	2	Cytosine arabinoside	1,13	1,42
17	9	dB cAMP	$1,08 \pm 0,10$	$4,05 \pm 0,59$
17	3	dBcAMP + cytosine arabinoside	$1,05 \pm 0,19$	$1,79 \pm 0,37$

Un premier jugement permet de dire que la cytosine arabinoside ne semble pas influencer l'activité de la GS, ni la concentration en protéines. En fait WU *et al* (1988) avaient déjà publié des résultats analogues et avaient démontré que la GS n'est pas modifiée par la cytosine arabinoside dans des co-cultures d'astrocytes de cerveau de rat et de neurones d'embryon de poulet.

Cependant, quand nous comparons le contrôle dB cAMP ( $4,05 \pm 0,59$   $\mu\text{m/h/mg}$  protéine) et les astrocytes incubés dans du dB cAMP additionné de cytosine arabinoside ( $1,79 \pm 0,37$ ), il y a une diminution nette de 66% de l'activité de la GS.

Cela pourrait indiquer que la substance inhibitrice empêcherait le dibutryl cAMP d'agir. A notre connaissance, aucun auteur ne relate ce fait.

### 3.5.2. ACTION DE LA CYCLOHEXIMIDE.

Les résultats obtenus en soumettant les astrocytes au cycloheximide (10 µg/ml) et au dibutyryl cAMP (0,25 mM) enrichi de la substance inhibitrice sont présentés dans le tableau 17.

*Tableau 17. Effet du cycloheximide sur la concentration en protéine et sur l'activité de la GS pour des astrocytes de 21 jours stimulés ou non au dB cAMP 72 heures.*

Jours	n	Traitement	[protéine] en mg/plaque	[GS] en µM/h/mg protéine
21	5	Contrôle	1,66 ± 0,09	1,95 ± 0,12
21	3	cycloheximide	0,41 ± 0,01	0,33 ± 0,11
21	3	dB cAMP	1,05 ± 0,02	4,93 ± 0,08
21	3	dBcAMP + cycloheximide	0,36 ± 0,09	0,67 ± 0,20

Il ressort nettement de ce tableau que l'activité de la GS est inhibée par la cycloheximide. En comparant, le contrôle (1,95 ± 0,12 µM/h/mg protéine) et les astrocytes traités au cycloheximide (0,33 µM/h/mg protéine), l'activité de la GS est diminuée de 83%.

Cette diminution s'observe également au niveau de la concentration en protéines qui chute de 75%. L'inhibition de la synthèse protéique par le cycloheximide a donc bien eu lieu.

Quant aux astrocytes traités au dB cAMP, la baisse d'activité de l'enzyme astrocytaire est encore plus considérable (87%). L'inhibition de la synthèse protéique s'observe également dans ces conditions (68%).

#### Conclusion

Dans les deux cas, l'effet du dB cAMP sur l'activité de la GS est perdu.

L'hypothèse suggérée serait que l'effet du dBcAMP serait dû à l'action de nouvelles synthèses enzymatiques dans les cellules induites au dB cAMP (BROWNING et NICKLAS, 1982).

### 3.6. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS.

De nouveau, nous procédons de la même manière que lors des précédentes recherches.

Le  $K_M$  (mM) et les  $V_{max}$  ( $\mu\text{M GS/h/ml}$ ) apparents sont calculés d'après le programme ENZFITTER.

#### 3.6.1. GLUTAMINE SYNTHETASE - L-GLUTAMATE.

Les concentrations d'hydroxylamine et d'ATP sont maintenues constantes.

La variation de la concentration en L-glutamate s'échelonne de 0,66 à 60 mM (tableau 18).

Tableau 18. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS d'astrocytes induits au dB cAMP (0,25 mM) pendant 72 heures.

Traitement	L-glutamate	
	KM apparent	Vmax apparent
72H dB cAMP avec glucose	3,62	17,22

#### 3.6.2. GLUTAMINE SYNTHETASE - HYDROXYLAMINE.

Les concentrations de L-glutamate et d'ATP sont fixes. Nous faisons varier la concentration en hydroxylamine de 1 mM à 100 mM.

Les  $K_M$  et  $V_{max}$  apparents sont calculés à partir de la courbe de Michaelis-Mentem obtenue (Tableau 19).

Tableau 19. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS d'astrocytes induits au dB cAMP (0,25 mM) pendant 72 heures.

Traitement	Hydroxylamine	
	KM apparent	Vmax apparent
72H dB cAMP avec glucose	47,28	19,76

### 3.6.3. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - ATP.

Tout en gardant les concentrations de L-glutamate (50 mM) et d'hydroxylamine (100 mM) fixes, nous faisons varier la quantité d'ATP de 0,5 à 20 mM.

Le KM (mM) apparent et le Vmax ( $\mu\text{M GS/h/ml}$ ) nous sont donnés dans le tableau 20.

Tableau 20. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS d'astrocytes induits au dB cAMP (0,25 mM) pendant 72 heures.

Traitement	ATP	
	KM apparent	Vmax apparent
72H dB cAMP avec glucose	0,70	15,89

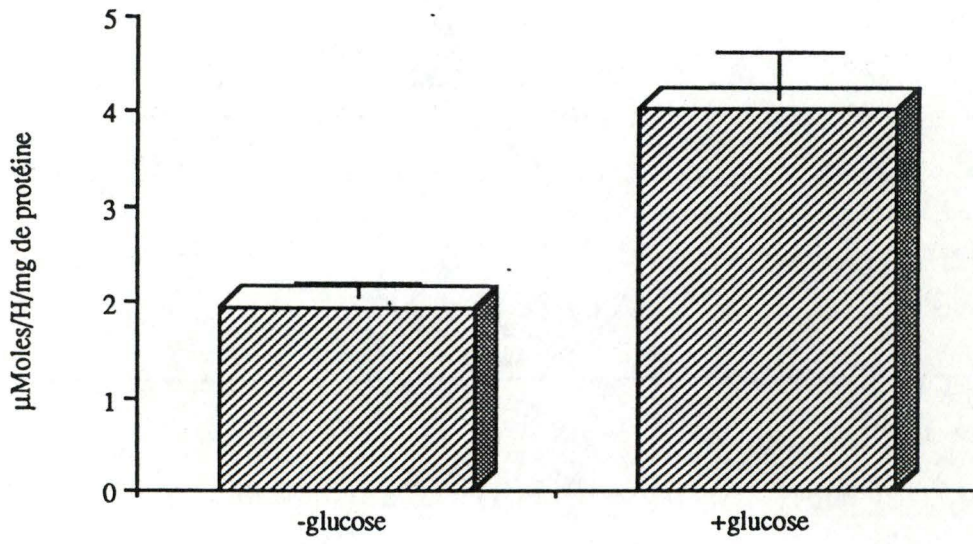


Figure 12: Activité de la GS (en  $\mu\text{Moles/H/mg}$  de protéine) après traitement au dibutyryl cAMP (0,25mM) pendant 72 heures et après 24 heures dans un milieu HBSS avec glucose (n=10) et sans glucose (n=7).

4. Privation de D-glucose après induction au dibutyryl cAMP.

**4.1. Effet de la privation du D-glucose après induction sur la GS.**

4.1.1. DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA GS EN MILIEU HBSS.

Après avoir traité les astrocytes au dB cAMP 0,25 mM pendant 72 heures, ils sont placés 24 heures dans un milieu pauvre en acides aminés mais riche en sels.

Le milieu HBSS est dans un cas exempt de glucose et dans un autre cas enrichi en glucose.

Les résultats sont présentés à la figure 12.

L'induction d'activité de l'enzyme astrocytaire par le dB cAMP se manifeste encore lorsque les astrocytes sont placés 24 heures dans le milieu HBSS avec glucose ( $4,04 \pm 0,46 \mu\text{M/h/mg}$  protéine).

Tandis qu'une diminution d'activité de 53% par rapport à la moyenne observée pour les astrocytes dans un milieu HBSS privé de glucose, est trouvée lorsque les cellules sont traitées 24 heures à l'HBSS sans glucose ( $1,94 \pm 0,16 \mu\text{M GS/h/mg}$  protéine) ( $p < 0,01$ ).

Si on compare le pourcentage de libération de LDH dans les cultures contrôles (5,11%) et le pourcentage dans les cultures traitées au dB cAMP mises en privation de glucose (9,04%), nous pouvons dire que cette privation n'entame en rien l'intégrité des cellules (tableau 21). Ceci avait déjà été mis en évidence lorsque les cellules n'étaient pas traitées au dB cAMP.

Tableau 21. Pourcentage de libération de LDH dans des cultures contrôles et des cultures mises en privation de glucose (24H) dans un milieu HBSS après avoir été induites 72 heures au dB cAMP (0,25 mM).

% de LDH libérée dans les cultures contrôles	% de LDH libérée dans les cultures induites au dB cAMP et placées dans un milieu HBSS sans glucose
5,11±2,01	9,04±1,91

### Conclusion

Les constatations énumérées auparavant sur la privation de glucose pour des cellules non traitées au dB cAMP se révèlent être aussi critiques dans ce cas.

L'hypothèse envisagée à ce niveau est toujours de rigueur. Le substrat de la GS (glutamate) pourrait servir pour former de l' $\alpha$ -kétoglutarate dans une réaction de transamination (SIESJO, 1983).

Qu'en est-il des composés hautement énergétiques?

## **4.2. Effet de la privation de glucose après induction sur l'état énergétique des astrocytes.**

### 4.2.1. DOSAGE DE L'ATP ET DE LA C.P. DANS UN MILIEU HBSS.

Le tableau 22 contient les résultats en ATP et en C.P. obtenus lorsque les astrocytes après avoir été incubés 72H dans un milieu avec dB cAMP, sont placés dans un milieu riche en sels et cela pendant 24 heures.

Ce milieu HBSS est soit exempt de glucose soit enrichi en glucose à la concentration de 5 mM.

Tableau 22. Concentrations en nmoles d'ATP et de C.P./mg protéine des astrocytes incubés après traitement au dB cAMP, dans un milieu HBSS avec glucose (5 mM) et sans glucose pendant 24 heures.

n	Traitement	[protéine] en mg/plaque	[GS] en $\mu\text{M}/\text{h}/\text{mg}$ protéine
6	Avec glucose (5mM)	$38,99 \pm 2,65$	$50,43 \pm 4,64$
7	Sans glucose	$33,72 \pm 2,41$	$41,93 \pm 4,03$

Ces résultats semblent de nouveau reproduire les observations faites lorsque les cellules ne sont pas induites au dB cAMP.

Les valeurs obtenues aussi bien pour l'ATP que pour la C.P. ne sont pas significativement différentes.

### 4.3. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS.

#### 4.3.1. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - L-GLUTAMATE.

Les concentrations de L-glutamate varie de 0,66 à 60 mM.

Le KM (mM) et le Vmax ( $\mu\text{MGS/h/ml}$ ) apparents sont calculés par le programme ENZFITTER suivant la courbe de Michaelis-Menten (Tableau 23).

*Tableau 23. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS d'astrocytes induits au dB cAMP 72 heures (0,25 mM) et soumis à une privation de glucose.*

Traitement	L-glutamate	
	KM apparent	Vmax apparent
72H dB cAMP avec privation glucose	2,90	6,80

#### 4.3.2. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - HYDROXYLAMINE.

Le KM apparent et le Vmax apparent ont été déterminés pour des concentrations de  $\text{NH}_2\text{OH}$  variant de 2 à 100 mM (tableau 24).

Les autres concentrations sont constantes.

Tableau 24. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS d'astrocytes induits au dB cAMP 72 heures (0,25 mM) et soumis à une privation de glucose.

Traitement	Hydroxylamine	
	KM apparent	Vmax apparent
72H dB cAMP avec privation glucose	35,75	8,03

#### 4.3.3. GLUTAMINE SYNTHÉTASE - ATP.

La quantité d'hydroxylamine (100 mM) et de L-glutamate (50 mM) est constante.

Nous avons fait varier la concentration en ATP de 0,5 à 20 mM (tableau 25).

Tableau 25. Caractérisation cinétique préliminaire de la GS d'astrocytes induits au dB cAMP 72 heures (0,25 mM) et soumis à une privation de glucose.

Traitement	ATP	
	KM apparent	Vmax apparent
72H dB cAMP avec privation glucose	1,36	6,49

### Conclusion

Pour achever le point concernant la caractérisation cinétique préliminaire de la GS, nous reprenons ici les différentes situations envisagées pour le substrat glutamate.

Tableau 26: Caractérisation cinétique préliminaire de la Gs pour le glutamate dans les différentes situations.

TRAITEMENT	GLUTAMATE	
	Km apparent	Vmax apparent
GLUCOSE	2.46	4.78
PRIVATION	1.89	2.55
DB cAMP avec GLUCOSE	3.62	17.22
DB cAMP sans glucose	2.9	6.8

Au vu de ces résultats, nous pouvons dire que ce sont les Vmax apparents qui sont modifiés dans la cinétique préliminaire de l'activité de la GS pour des astrocytes privés de glucose ainsi que des astrocytes traités au DB cAMP en privation de glucose.

En fait ce qui est modifié, c'est la vitesse de fixation du substrat vis-à-vis des récepteurs de l'enzyme. Celle-ci semble être moins importante lorsque les cellules sont placées dans un milieu sans substrat glucosidique.

# CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de ce travail, il convient de remettre en mémoire la démarche suivie tout au long de cette étude et d'estimer l'impact des résultats sur les hypothèses envisagées.

Depuis longtemps, les mécanismes intervenant dans la production de lésions comme celles liées à l'hypoglycémie sont des sujets d'étude intéressants.

Dans cette optique, nous avons voulu approfondir les connaissances concernant la privation de glucose dans les cultures d'astrocytes et plus spécialement au niveau de l'activité de l'enzyme, la glutamine synthétase (GS).

Ce travail se place donc dans le cadre général d'une étude de l'hypoglycémie hyperinsulinique. En 1988, BAUDOUX et al ont mis en évidence dans le cerveau de rat maintenu en hypoglycémie pendant 3 heures une déplétion de l'ATP et de la C.P. cérébral ainsi qu'un épuisement de 90% des réserves de glycogène.

Au niveau cellulaire, l'ATP est également déprimé dans les synaptosomes isolés à partir de ces cerveaux.

Il est également bien connu que le coma hypoglycémique s'accompagne de production d'ammoniac et d'une baisse de la concentration en glutamate et en glutamine.

Les astrocytes apparaissent de plus en plus comme étant des éléments essentiels pour la survie des neurones. Ce sont eux qui maintiennent l'homéostasie cérébrale. Ils moduleraient l'excitation neuronale par neutralisation du glutamate et repompage du  $K^+$  accumulé pendant la dépolarisation des neurones (PEARCE et al., 1986).

Etant donné que les astrocytes ont une position stratégique dans le cerveau avec leurs prolongements qui sont en relation étroite avec les vaisseaux sanguins et d'autres régions synaptiques (KIMELBERG et NORENBURG, 1989), il nous a semblé opportun d'utiliser ceux-ci comme modèle d'étude.

De plus, peu de recherches ont été menées pour caractériser les effets de la privation de glucose au niveau astrocytaire (KAUPPINEN et al., 1988).

Dès lors, nous avons établi un modèle d'astrocytes mis en culture à partir de cerveaux de jeunes rats d'un jour. Nous avons déterminé le moment où il y avait confluence et choisi de mener certaines expériences de privation de glucose à ce moment là. D'autre part, il semblait intéressant de reproduire les caractéristiques des astrocytes à maturité tant au point de vue morphologique que biochimique (SCHOUSBOE et al., 1980).

Pour induire cette maturité, le dibutyryl cAMP a été utilisé. Dans les conditions de traitement choisi (HERTZ et al., 1985), il se produit une induction de la différenciation avec formation de prolongements des astrocytes de même type que dans les astrocytes adultes.

Dans le cadre de la privation de glucose, une enzyme caractéristique et marqueur des astrocytes, la GS, qui intervient dans la détoxification ammoniacale du système nerveux et dans la formation de précurseurs neuromédiateurs de la transmission nerveuse, a fait l'objet principal de notre étude.

La GS est une enzyme capitale avec la glutamate décarboxylase et la glutaminase dans la régulation des niveaux du glutamate et de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique. La perte d'activité de la GS pouvant mener à des accumulations toxiques de glutamate (OLIVER et al., 1990). Ainsi lors d'hypoglycémie, une production ammoniacale accrue a lieu avec une diminution des métabolites hautement énergétiques (ATP et C.P.) (AGHARD et al., 1978). L'ATP étant un activateur de la GS, son activité s'en trouve modifiée. Surtout que le produit d'hydrolyse de l'ATP, l'ADP est l'inhibiteur le plus important de la GS (ELLIOT, 1951).

Il semblait donc tout indiqué de voir si une privation de glucose n'entame pas l'activité de la GS. Les astrocytes en culture offrent une résistance remarquable à une courte période de privation de glucose.

Une heure de privation de glucose n'entame ni les réserves énergétiques (ATP et C.P.), ni l'activité de la G.S.(MERTENS et al., non publié). PASSONEAU et al.(1978), avaient déjà observé cette insensibilité remarquable des cellules du cerveau à un manqué de glucose, du moins en ce qui concerne les cellules C<sub>6</sub> gliales.

Durant la période d'hypoglycémie, se termine l'utilisation de glucose, pendant que l'oxydation d'autres substrats que les hydrates de carbone s'accroît (PAUWELS, 1984).

Ces observations rejoignent d'ailleurs celles faites sur le cerveau intact (SIESJO et AGHARD, 1983). Ces résultats sont comparables à ceux d'une hypoglycémie légère alors que la situation se présente tout autrement dans le coma hypoglycémique (BACHELARD et COX, 1982).

Dès que la privation de glucose se poursuit durant 24 heures, il se produit une baisse d'activité de la GS, un épuisement des réserves de glycogène mais un maintien des réserves énergétiques sous forme d'ATP et de C.P. Des expériences préliminaires faites au laboratoire ont montré que l'ADP ne se trouvait pas en concentration accrue lors d'une privation de glucose. Il faut souligner que cette baisse d'activité de la GS dans les cellules stimulées est complètement réversible.

Dans une revue concernant le métabolisme et le rôle du glutamate dans le cerveau de mammifère, ERECINSKA et SILVER (1990) suggèrent qu'il pourrait se produire une inhibition de l'activité de la GS à un stade peu avancé de l'hypoglycémie. Toujours selon ces auteurs, cette inhibition serait à mettre en rapport avec une chute d'ATP et une augmentation de l'ADP.

Or la diminution de l'activité de la GS que nous obtenons s'exprime avant d'avoir une diminution en ATP après 48 heures de traitement.

En conclusion, l'hypothèse émise par ERECINSKA et SILVER (1990), si elle peut éventuellement s'appliquer à la privation de glucose de 48 heures, ne peut expliquer la déplétion de GS après seulement 24 heures de privation de glucose.

Dans de très récentes expériences, OLIVER et al. (1990) ont montré que dans l'ischémie qui s'accompagne de la production de radicaux libres, il semble clair que la GS est inactivée par une réaction d'oxydation catalysée par un métal. Ces réactions concernent la réduction de  $Fe^{+++}$  et la production de  $H_2O_2$  avec oxydation d'un ou plusieurs résidus acides aminés. Il y aurait une liaison d'un  $Fe^{++}$  au niveau du site à cation divalent de l'enzyme qui s'établirait. Le  $Fe^{++}$  interagirait avec  $H_2O_2$  pour produire un oxygène activé qui n'a pas encore été identifié. Celui-ci provoquerait une oxydation d'un ou plusieurs acides aminés.

SVENNEBY et TORGNER (1986) avaient déjà démontré que la GS a des sites séparés de fixation pour le glutamate, l'ATP et l'ammoniac.

La liaison de l'ammoniac étant dépendante de celle du glutamate. Un cation divalent ( $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ , ou  $Co^{++}$ ) est nécessaire pour l'activité de l'enzyme.

Le cation  $Fe^{++}$  impliqué dans la réaction décrite par OLIVER et al. mime donc l'effet du cation divalent ( $Mg^{++}$ ) indispensable dans l'activité de la GS dans les cultures d'astrocytes (SVENNEBY et al., 1986; MURRAY, 1988).

De plus SIESJO en 1981 signalait que l'hypoglycémie s'accompagne tout comme dans le cas de l'ischémie d'une production de radicaux libres. Ce qui impliquerait l'hypothèse d'un oxygène activé ( $O^{\cdot-}$ ) par réaction d'un  $H_2O_2$  ou d'un  $O_2$  avec certains initiateurs tels que le  $Fe^{++}$ , l'acide ascorbique ou le glutathion.

Cependant ces résultats n'excluent pas d'autres possibilités afin d'expliquer les mécanismes impliqués dans les dommages cellulaires.

Au terme des analyses, il faut attirer notre attention sur le fait que toute conclusion à partir de l'activité de la GS doit être évaluée avec circonspection, quant à son implication sur les effets métaboliques.

En effet à l'heure actuelle, nous ne connaissons ni l'activité de la GS in situ, ni les pools de substrats qui pourraient intervenir dans la synthèse de la glutamine.

Une des perspectives à moyen terme du présent travail serait de voir si dans notre modèle, lorsqu'une privation de glucose est réalisée, une accumulation de  $NH_3$  ne se produit pas. Il serait intéressant de mettre au point une technique permettant de tester la présence de radicaux libres ainsi que de doser la production de  $H_2O_2$  lorsqu'une peroxydation lipidique induite par le manque de glucose dans le métabolisme astrocytaire se présente.

Une autre perspective serait, pour mieux intégrer ces données enzymatiques dans le cadre général de ce travail, de passer à une analyse de l'évolution de l'activité de la GS "in vivo" lors du coma hypoglycémique.

A long terme, d'autres données biochimiques et métaboliques seront également nécessaires pour pouvoir cerner les mécanismes impliqués dans la privation de glucose et dans les complications liées à l'hypoglycémie.

# Bibliographie

ALEXANDER RUSSEL, M. D. (1973) The implications of hyperammonia in rare and common disorders including migraine, the mount sinai journal of medicine, 40: 609-630.

AUER, R.N., M.D., Ph.D. (1986) Progress review: hypoglycemic brain damage, stroke, 4:699-705.

BACHELARD, H.S., COX, D.W.G. (1982) in Energy transduction and neurotransmission (G. BENZI, A.M. GUIFUDDA STELLA, H.S. BACHELARD et A. AGNOLI) MENARINI, MILANO, 59-69.

BAUDOUX, G., MERTENS, J., DE SCHRYVER, C. (1987) Brain mitochondria in severe hypoglycaemic rats, archives internationales de physiologie et de biochimie, 95 (5).

BAUDOUX, G., MERTENS, J., DE SCHRYVER, C. (1988) The effect of glucose deprivation on the ATP content of synaptosomes and the astrocytes, archives internationales de physiologie et de biochimie, 97(2).

BELLOT, J., LANGE, F. (1988) Histologie fonctionnelle, 2<sup>nd</sup> ed., medsi/ Mc Graw-Hill, Paris.

BENJAMIN, A.M. (1987) Influence of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Ca<sup>++</sup> on glutamine synthesis and distribution in rat brain cortex slices: a possible linkage of glutamine synthetase with cerebral transport processes and energetics in the astrocytes, journal of neurochemistry, 48: 1157-1164.

BERGMEYER, H.U., BERNT, E. (1974) Methods of enzymatic analysis, 2<sup>nd</sup> English ed., vol.3, Academic Press, New-York, 1205-1212.

BERL, S. (1966) Glutamine synthetase: determination of its distribution in brain during development, biochemistry, 5, 916-922.

BIGNAMI, A.M. , ENG, L. F. , DAHL, D. , UYEDA, C.D. (1972) Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence, *brain research*, 43: 49-435.

BOOHER, J., SENSENBRENNER, M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and brain in flask cultures, *neurobiology*, 2: 97-105.

BROWNING, E.T., NICKLAS, W.J.(1982) Induction of glutamine synthetase by dibutyryl cyclic AMP in C-6 glioma cells, *journal of neurochemistry*, 2: 336-341.

CALLAHAN, D.J. , ENGLE, M.J. , VOLPE, J.J. (1990) Hypoxic injury to developing glial cells: protective effect of high glucose, *pediatric research*, 27: 186-190.

CAMBIER, D., PESSAC,B.(1989) Spontaneous glutamate release by a "fibrous"-like cerebellar astroglial cell clone, *journal of neurochemistry*, 53: 551-555.

CAMMER, W.(1990) Glutamine synthetase in the central nervous system is not confined to astrocytes, *journal of neuroimmunology*, 26: 173-178.

CUMMINS, C. J., LUST, D.W., PASSONNEAU, J.V.(1983) Regulation of glycogen metabolism in primary and transformed astrocytes in vitro, *journal of neurochemistry*, 40: 128-136.

COLE, R. , dE VELLIS, J. (1989) Preparation of astrocyte and oligodendrocyte cultures from primary rat glial cultures, a dissection and tissue culture, *manual of the nervous system*, 26: 121-133.

DAGANI, F. , ERECINSKA, M. (1987) Relationships among ATP synthesis, K<sup>+</sup> gradients, and neurotransmitter amino acid levels in isolated rat brain synaptosomes, *journal of neurochemistry*, 49: 1229-1240.

DE VELLIS, J., WU, D.K., KUMAR, S.(1986) Enzyme induction and regulation of protein synthesis, in *biochemistry, physiology and pharmacology of astrocytes*, ed. by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 209-237.

EHRENFIELD, E., MARBLE, S.J., MEISTER, A.(1963) Enzymatic synthesis of  $\gamma$ -glutamylhydroxamic acid from glutamic acid and hydroxylamine, the journal of biological chemistry, 238: 3711-3716.

ERECINSKA, M., SILVER, I.A. (1990) Metabolism and role of glutamate in mammalian brain, progress in Neurobiology, 35: 245-296.

FACCI, L., LEON, A., SKAPER, S.D. (1990) Hypoglycemic neurotoxicity in vitro, neuroscience, 37: 709-716.

FAROOQ, M., NORTON, W.T. (1978) A modified procedure for isolation of astrocyte and neurone enriched fractions from rat brain, journal of neurochemistry, 31: 887-894.

FEDEROFF, S., DOERING, L.C.L.(1980) Colony culture of neural cells as a method for the study of cell lineages in the developing CNS: the astrocyte cell lineage, current topics in development biology , 16: 283-304.

FRESHNEY, R.I. (1983) Culture of animal cells, a manual of basic technique, Alan R. Liss, New-York.

GILDEN, D. H. , WROBLEWSKA, Z. , ENG, L. F. , RORKE, L. B. (1976) Human brain in tissue culture, journal of the neurological sciences, 29: 177-184.

GRISAR, T. (1979) L'astroglie dans les mécanismes de régulation des ions K<sup>+</sup> au sein des espaces extracellulaires du système nerveux central, LIEGE.

HALLERMAYER, K., HAMPRECHT, B.(1984) Cellular heterogeneity in primary cultures of brain cells revealed by immunocytochemical localization of glutamine synthetase, brain research, 295: 1-11

HANSSON, E. (1988) Astroglia from defined brain regions as studied with primary cultures, progress in neurobiology, 30: 369-397.

HARIK, S.I. (1986) Blood brain barrier sodium/potassium pump: modulation by the central noradrenergic innervation, proc. natl. acad. sci. , U.S.A. , 83: 4067-4070.

HARTMAN, B.K., AGRAWAL, H.C., AGRAWAL, D. ,KALMBACH, S. (1982) Development and maturation of central nervous system myelin: comparison of immunohistochemical localization of proteolipid protein and basic protein in myelin and oligodendrocytes, *proc.natl.acad.sci. ,U.S.A. ,* 79: 4217-4220.

HENN, F.A. , HALJAMAE, H. , HAMBERGER, A. (1972) Glial cell function: active control of extracellular K<sup>+</sup> concentration, *brain research*, 43: 437-443.

HERTZ, L. , JUURLINCK, B.H.J. , SZUCHET, S. (1985) Cell cultures, in handbook of neurochemistry, ed. lythia A. , plenum press, NEW-YORK, 23: 603-624.

HERTZ, L. , SCHOUSBOE, A. (1986) Role of astrocytes in compartmentation of amino acid and energy metabolism, in *biochemistry, physiology and pharmacology of astrocytes*, ed. by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 179-208.

HOSLI, E. , HOSLI, L. , SCHOUSBOE, A. (1986) Amino acid uptake, in *biochemistry, physiology and pharmacology of astrocytes*, ed. by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 133-153.

JOHNSON, G. S. , FRIEDMAN, R. M. , PASTAN, I. (1971) Restoration of several morphological characteristics of normal fibroblasts in sarcoma cells treated with adenosine 3'-5' cyclic monophosphate and its derivatives, *proceedings of the national academy of sciences*, 168: 425-429.

JUURLINCK, B.H.J., SCHOUSBOE, A., JORGENSEN, O.S., HERTZ, L. (1981) Induction of hydrocortisone of GS in mouse primary astrocyte cultures, *journal of neurochemistry*, 36: 136-142.

JUURLINCK, B.H.J. , HERTZ, L. (1985) Plasticity of astrocytes in primary cultures: an experimental tool and a reason for methodological caution, *dev. neurosciences*, 7: 263-275.

KANFER, J.N. (1986) Astrocytic lipids and their metabolism, in biochemistry, physiology and pharmacology of astrocytes, ed. by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 252-273.

KAUPPINEN, R.A., ENKVIST, K., HOLOPAINEN, I., AKERMAN, K.E.O. (1988) Glucose deprivation depolarizes plasma membrane of cultured astrocytes and collapses transmembrane potassium and glutamate gradients, *neurosciences*, 26: 283-289.

KHELIL, M. , ROLLAND, B. , FAGES, C. , TARDY, M. (1990) Glutamine synthetase modulation in astrocyte cultures of different mouse brain areas, *glial*, 3: 75-80.

KIM,S.V., STERN, J., KIM, M.W., PLEASURE, D.E. (1983) Culture of purified rat astrocytes in serum-free medium supplemented with mitogen, *brain research*,274: 78-86.

KIMELBERG, H.K. , NAMURI, S. , BOURKE, R.S. (1978) Enzymatic and morphological properties of primary rat brain astrocyte cultures and enzyme development in vivo, *brain research*, 153: 5

KIMELBERG, H. , NORENBURG, M. (1989) The astrocytes, *scientific american*,44-52.

LABARCA, C. , PAIGEN, K. (1980) A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure, *analytical biochemistry*, 102: 344-35

LUST, W.D. , SCHATZ, J.P. , PASSONNEAU, J.V. (1975) Glycolytic metabolism in cultured cells of the nervous system, *molecular and cellular biochemistry*, 8: 169-176.

MANTHORPE, M. , ADLER, R. , VARON, S. (1979) Development, reactivity and GFA immunofluorescence of astroglia containing monolayer cultures from rat cerebrum, *journal of neurocytology*, 8: 605-621.

MANTHORPE, M. , RUDGE, J. S. , VARON , S. (1986) Astroglial cell contributions to neuronal survival and neuritic growth, in *biochemistry, physiology and pharmacology of astrocytes*, ed.by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 315.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. , BELL, K. P. , NOREMBERG, M. D. (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain, *science*, 195: 1356-1358.

MASARELLI, R. , JYKITA, S. , SORRENTINO, G. (1986) The supply of choline to glial cells, in *biochemistry, physiology and pharmacological of astrocytes*, ed. by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 155-178.

MAX, S. R. , LANDRY, M. E. , ZIELKE, R. H. (1990) Induction of glutamine synthetase by 8-bromo cyclic AMP in primary cultures of rat brain astrocytes, *neurochemical research*, 15: 583-586.

MERTENS-STRIJTHAGEN, J., ROELANDT, C., DE SCHRYVER, C. (1991) The effect of glucose deprivation on glutamine synthetase activity in cultured astrocytes (non publié).

MILLER, G.L. (1959) *Analytical chemistry*, 31: 964-968.

MOONEN, G., SENSENBRENNER, M. , MANDEL, P. (1975) Variability of the effects of serum-free medium, dibutyryl cAMP or theophylline on the morphology of cultured newborn rat astroblasts, *cell tissue research*, 163:365-372.

MURRAY, R. K. , GRANNER, D.K. , MAYES, P.A. , RODWELL, V.W. , (1988) a large medical book, harper's biochemistry.

NELSON, S.R., SCHULTZ, D.W. , PASSONNEAU, J.V. , LOWRY, O.H. (1968) Control of glycogen levels in brain, *journal of neurochemistry*, 15:1271-1279.

NOREMBERG, M. (1979) The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system, *the journal of histochemistry and cytochemistry*, 27: 756-762.

OLIVER, C.N., STARKE-REED, P.E., STADMAN, E.R., LIU, G.J., CARNEY, J.M., FLOYD, R.A. (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/ reperfusion-induced injury to gerbil brain, *neurobiology*, 87: 5144-5147.

PALMIJANS, V., KRISHNASWAMY, P.R., DUMVILLE, G., MEISTER, A. (1962) Studies of the mechanism of glutamine synthesis, isolation and properties of the enzyme from sheep brain, *biochemistry*, 1, 153-158.

PASSONEAU, J.V., SCHATZ, J.P., LUST, W.D. (1978) Some aspects of intermediary metabolism in glioma cells in culture, in *dynamic properties of glia cells* (E. SCHOFFENIELS, G. FRANCK, D.B. TOWER, L. HERTZ), pergamon press, OXFORD, 133-143.

PEARCE, B., ALBRECHT, J., MORROW, C., MURPHY, S. (1986) Astrocyte glutamate receptor activation promotes inositol phospholipid turnover and calcium flux, *neurosciences letters*, 72, 335-340.

PAUWELS, P.J. (1984) Karakterisering van energremetabolisme en receptoren voor neurotransmitters in hersencellen in vitro: farmacologische toe passingsmogelij heden, thèse présentée pour le grade de Docteur en biologie, GAND.

RAFF, M.C. , MILLER, R. , NOBLE, M. (1983) A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium, *nature*, 302: 390-396.

RANSOM, B.R., CARLINI, W.G. (1986) Electrophysiological properties of astrocytes, in *biochemistry, physiology and phamacology of astrocytes*, ed. by SERGEY FEDEROFF-ANTONIA VERNADAKIS, academic press, 2: 1-39.

RUSSEL, A., M.D. (1973) The implications of hyperammonemia in rare and common disorders, including migraine, *Mount Sinaï journal of medecine*, 40: 723-735.

SCHOUSBOE, A. , HERTZ, L. , SVENNEBY, G. , KVAMME, E. (1979) Phosphate actived glutaminase activity and glutamine uptake in primary cultures of astrocytes, *journal of neurochemistry*, 32: 943-950.

SCHOUSBOE, A. , NISSEN, C. , BOCK, E. , SAPIRSTEIN, V.S. , JUULINK, B. H. J. HERTZ, L. (1980) Biochemical development of rodent astrocytes in primary cultures, issue culture in neurobiology, 397-406.

SENSENBRENNER, M. , DEVILLERS, G. , BOCK, E. , PORTE, A. (1980) Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells, differentiation, 17: 51-61.

SENSENBRENNER, M. , PETTMAN, B. , LABOURDETTE, G. , WEIBEL (1985) Properties of a brain growth factor promoting proliferation and maturation of rat astroglial cells in culture, hormones and cell regulation, 9: 345-361.

SIESJÖ, B.K. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis, journal of cerebral blood flow and metabolism, 1: 155-185.

SIESJÖ, B.K. , AGARDH, C.D. (1983) Hypoglycemia, handbook of neurochemistry (3) , ed. Iajtha A; , plenum press, 405-422.

SVENNEBY, G. , TORGNER, I. A. (1986) Localization and function of glutamine synthetase and glutaminase, biochemical society transactions, 213-214.

SWANSON, R.A. , YU, A.C.H. , SHARP, R. , CHAN, P.H. (1989) Regulation of glycogen content in primary astrocyte culture: effects of glucose analogues, phenobarbitol, and methionine sulfoximine, journal of neurochemistry, 52: 1359-1365.

TANSEZ, F. A. , FAROOQ, M. , CAMMER, W. (1991) Glutamine synthetase in oligodendrocyte and astrocytes: new biochemical and immunocytochemical evidence, journal of neurochemistry, 56: 266-27

TIEMEIER, D.C., MILMAN, G. (1972) Regulation of glutamine synthetase in cultured chinese hamster cells, the journal of biological chemistry, 247, 5722-5725.

WHITE, F. , HERTZ, L. (1981) Protein synthesis by astrocytes in primary cultures, neurochemical research, 6: 353-363

YUDKOFF, M. , NISSIM, I. , PLEASURE, D. (1988) Astrocyte metabolism of N glutamine: implications for the glutamine-glutamate cycle, *journal of neurochemistry*, 51: 843-850.

WEINGARTEN, D.P., KUMAR, S., dE VELLIS, J. (1981) Paradoxical effects of sodium butyrate on the glucocorticoid inductions of glutamine synthetase and glycerol phosphate dehydrogenase in C<sub>6</sub> cells, *Febs letter*, 2: 289-291.

WU, D. K. , SCULLY, S. , dE VELLIS, J. (1988) Induction of glutamine synthetase in rat astrocytes by co-cultivation with embryonic chick neurons, *journal of neurochemistry*, 50: 929-935.