

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 081821 6

ANNEE 1997

THESE n°

329 / 1

**ETUDE *IN VIVO* DE L'ACTION D'INHIBITEURS DES
CANAUX SODIQUES SUR LA CONCENTRATION
EXTRACELLULAIRE HIPPOCAMPALE DE
GLUTAMATE, DANS DES CONDITIONS
PHYSIOLOGIQUES ET SOUS UN MODELE
PATHOLOGIQUE**

THESE

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 15 octobre 1997



par

Frédéric CASTILLO

Né le 14 janvier 1971 à Prades (Pyrénées Orientales)

Examineurs de la Thèse

Madame le Professeur Chulia, *Professeur des Universités*
Mademoiselle Obinu, *docteur ès biologie (Rhône-Poulenc Rorer)*
Monsieur le Professeur Cardot, *Professeur des Universités*
Monsieur E.A. Kim, *Maître de conférences*

PRESIDENT
DIRECTEUR DE TRAVAUX
JUGE
JUGE

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE: Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS: Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE FONDAMENTALE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE
LOUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETARE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

AVANT PROPOS

Le travail présenté ici a été réalisé au centre de recherche de Vitry-Alfortville de Rhône-Poulenc Rorer, au département de biologie, dirigé par Mme Assunta Imperato.

Je tiens à vous remercier, Madame pour m'avoir accueilli dans la structure dont vous êtes responsable et de m'avoir permis de travailler en toute confiance.

Je tiens également à remercier :

Mme le Professeur Dominique Chulia, vous me faites l'honneur de présider ce jury, je vous en suis reconnaissant. Votre aide dans la rédaction aura été précieuse et appréciée. Puisque ce mémoire clôture les études, je vous témoigne en outre ma reconnaissance pour les enseignements que vous nous avez octroyés au cours de ces années.

Mlle le Docteur Marie Carmen Obinu, responsable du laboratoire de microdialyse, qui m'a confié ce sujet et qui a su me guider tout au long de l'évolution du travail, malgré un emploi du temps extrêmement chargé. Je te remercie en outre pour ta patience et tes explications toujours très pédagogiques.

M. Leng E.A. Kim, Maître de conférence, pour les conseils que vous m'avez apportés et l'honneur que vous me faites bien vouloir juger ce travail.

M. Le professeur Philippe Cardot, pour avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie également

M. Daniel Boccio, technicien, sans qui les expériences sur l'ischémie n'auraient pu être réalisées. Je te remercie également pour ton aide dans la rédaction de ce mémoire en particulier pour ton regard aiguisé sur l'orthographe...

M. Michel Reibaud, chef de laboratoire, pour les longues heures passées à corriger ce mémoire.

MM. Olivier Gobbo et Jean-Marie Miquet, techniciens, pour votre aide, votre soutien et votre bonne humeur, mais surtout pour m'avoir initié...à l'art du café à l'italienne.

Enfin, je n'aurais pas pu effectuer ce travail à Vitry sur Seine sans la décision de Mme Odile Piot, chef de laboratoire. En décembre 1996, vous m'avez accordé ce stage, veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Je tiens encore à exprimer ma gratitude à M. le Professeur Raby, qui a souvent su m'écouter et me soutenir efficacement durant mes années d'études. En acceptant que l'expérience ne se compose pas seulement d'un apprentissage livresque, vous avez souvent permis que les sentiers battus ne soient pas la seule route possible. Pour votre conception peu casanière de la vie, et pour les leçons que j'ai pu en retirer, je vous remercie.

A Dorine (la femme est l'avenir de l'homme, l'amour est la lumière du coeur)

A Julien (si tu savais tout ce qui t'attend...)

A mes parents (en espérant que l'investissement sera payant avant la retraite...)

A Thierry (objectif Nihan...)

A Sam (ouah !)

A toute ma famille, un peu dispersée mais qui globalement passe plus de temps au soleil que

moi !

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	I
---------------------	----------

INTRODUCTION	1
---------------------	----------

<i>première partie</i> RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES
--

<i>chapitre premier</i> : PHYSIOLOGIE DU SYSTEME GLUTAMATERGIQUE	4
---	----------

I. LES VOIES GLUTAMATERGIQUES	6
--------------------------------------	----------

II. ROLES PHYSIOLOGIQUES DU GLUTAMATE	6
--	----------

II.1. Implication du glutamate dans les processus d'apprentissage et de mémorisation	7
--	---

II.2. Implication du glutamate dans la plasticité cellulaire	8
--	---

III. SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE	9
-------------------------------------	----------

III.1. Synthèse du glutamate	9
------------------------------	---

III.2. Stockage dans les vésicules présynaptiques	13
---	----

III.3. Libération	14
-------------------	----

III.4. Recapture	16
------------------	----

III.5. Les récepteurs	18
-----------------------	----

<i>chapitre deuxième</i> : IMPLICATION DU GLUTAMATE DANS LES PATHOLOGIES CEREBRALES	23
--	-----------

I. MECANISME D'EXCYTOTOXICITE	24
--------------------------------------	-----------

II. PATHOLOGIES AIGUES	26
-------------------------------	-----------

II.1. Crises épileptiques	26
---------------------------	----

II.2. accidents vasculaires cérébraux (ischémies)	27
---	----

III. PATHOLOGIES CHRONIQUES	27
------------------------------------	-----------

III.1. Maladie d'Alzheimer	27
----------------------------	----

III.2. Maladie de Parkinson	28
-----------------------------	----

III.3. Chorée de Huntington	29
III.4. Sclérose amyotrophique latérale (maladie de Charcot)	30

<i>deuxième partie</i> ASPECTS TECHNIQUES DE NOTRE ETUDE

OBJECTIFS	31
------------------	-----------

<i>chapitre premier : LA MICRODIALYSE TRANSCEREBRALE</i>	32
---	-----------

I. PRINCIPE	33
--------------------	-----------

II. INTERETS DE LA MICRODIALYSE TRANSVERSALE	35
---	-----------

<i>chapitre deuxième : PROTOCOLES OPERATOIRES</i>	37
--	-----------

I. ISCHEMIE TRANSITOIRE GLOBALE, TECHNIQUE DE L'OCCLUSION DES 4 VAISSEAUX	38
--	-----------

II. OPERATION DE MISE EN PLACE DE LA FIBRE DE MICRODIALYSE	39
---	-----------

II.1. Préparation de la fibre	39
-------------------------------	----

II.2. Pose de la fibre de microdialyse dans l'hippocampe	40
--	----

II.3. Précautions postopératoires	41
-----------------------------------	----

<i>chapitre troisième : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX, 24 HEURES APRES LA PHASE OPERATOIRE</i>	42
--	-----------

I. INDUCTION DE L'ISCHEMIE SUR DES RATS VIGILES	42
--	-----------

I.1. Obturation des carotides (clampage)	42
--	----

I.2. Reperfusion (déclampage)	43
-------------------------------	----

II. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS	44
---	-----------

II.1. La solution de dialyse « le liquide de Ringer »	44
---	----

II.2. Agencement du système	45
-----------------------------	----

III. DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE, PHASE INVERSE	47
---	-----------

III.1. Matériels utilisés	48
---------------------------	----

III.2. Principe du dosage	49
---------------------------	----

III.3. Protocole de préparation des réactifs	49
III.4. Protocole de préparation de la phase mobile	50
III.5. Utilisation de standards	51
III.6. Procédure de dérivation	51
IV. STATISTIQUES	52
V. PRECAUTIONS	53

<i>troisième partie</i> RESULTATS
--

INTRODUCTION	54
---------------------	-----------

<i>chapitre premier : EFFETS DE LA LAMOTRIGINE</i>	55
---	-----------

I. LA LAMOTRIGINE	55
--------------------------	-----------

II. EFFETS DE LA LAMOTRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES	57
--	-----------

II.1. Observations symptomatologiques	57
---------------------------------------	----

II.2. Résultats	57
-----------------	----

III. EFFETS DE LA LAMOTRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE LORS D'UNE ISCHEMIETRANSITOIRE GLOBALE	58
---	-----------

III.1. Observations	58
---------------------	----

III.2. Résultats	59
------------------	----

III.3. Discussion	59
-------------------	----

<i>chapitre deuxième : EFFETS DE LA SIPATRIGINE</i>	60
--	-----------

I. LA SIPATRIGINE	60
--------------------------	-----------

II. EFFETS DE LA SIPATRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES	61
--	-----------

II.1. Symptomatologie	62
-----------------------	----

II.2. Résultats	62
-----------------	----

III. EFFETS DE LA SIPATRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE LORS D'UNE ISCHEMIETRANSITOIRE GLOBALE	62
---	-----------

III.1. Résultats	63
------------------	----

III.2. Discussion	63
IV. INTERPRETATION	64
<u>chapitre troisième : EFFETS DE LA DIZOCILPINE OU MK-801</u>	66
I. LA DIZOCILPINE	66
II. EFFETS DU MK-801 SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES	68
II.1. Symptomatologie	68
II.2. Résultats	69
II.3. Discussion	69
<u>CONCLUSION GENERALE</u>	70
<u>ANNEXES</u>	72
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	75
<u>TABLE DES ABREVIATIONS</u>	82

INTRODUCTION

Les acides aminés excitateurs (AAEs) jouent un rôle important dans la transmission des informations cérébrales. Il est aujourd'hui reconnu que leur emploi est ubiquitaire dans l'encéphale (53). Leur rôle physiologique est encore mal défini. Le principal AAE est le glutamate. Il intervient notamment dans la neurotransmission impliquée dans la mémoire, l'apprentissage ou la plasticité neuronale. Cependant, lorsque les concentrations extracellulaires deviennent trop importantes et débordent les mécanismes de recapture et de contrôle, il devient dangereux car cytotoxique, suite à l'apparition d'une cascade de réactions auto-entretenues et auto-amplifiées qui aboutissent à la mort cellulaire. Ainsi, la destruction neuronale par le glutamate est considérée comme une cause importante de neurodégénération dans certaines maladies chroniques (Maladie de Parkinson, Maladie d'Alzheimer, Chorée de Huntington, épilepsie etc.) mais aussi dans certains chocs aigus (traumatismes, ischémies cérébrales, hypoxies ou hypoglycémies graves).

Aujourd'hui, les stratégies thérapeutiques mises en place contre les pathologies neurodégénératives (aiguës ou chroniques) se présentent selon plusieurs approches :

- Prévention de l'excytotoxicité induite par le glutamate
- Capture des radicaux libres
- Préservation de l'homéostasie intracellulaire

L'objet de ce travail est d'évaluer l'action de différentes substances sur la concentration de glutamate dans l'espace extracellulaire au niveau central. En effet, une molécule capable

d'atténuer la libération de glutamate est potentiellement neuroprotectrice. Notre étude portera sur l'hippocampe (l'une des structures du cerveau les plus chargée en synapses glutamatergiques) de rats vigiles. Nous étudierons ici les effets de la lamotrigine, de la sipatrigine, de la dizocilpine ou MK-801,. Les propriétés de la lamotrigine et de la sipatrigine sont proches (bloqueurs des canaux sodiques voltage-dépendants). Par contre, le MK-801 agit selon un mécanisme différent, en bloquant le canal associé au récepteur NMDA.

Nous utiliserons la technique de microdialyse transcérébrale mise au point par Imperato et Di Chiara en 1983 (40), modifiée en 1992 (41). L'effet des substances testées sera étudié sur la libération basale de glutamate, puis sur un modèle pathologique censé provoquer une très forte augmentation d'acides aminés excitateurs dans l'espace extracellulaire : l'ischémie transitoire globale, dérivée de la technique dite d'occlusion des 4 vaisseaux, proposée par Pulsinelli et Brierley en 1979 (75). Le dosage se fera par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP) phase inverse, avec un détecteur de type fluorimétrique, selon une méthode dérivée de celle mise au point en 1979 par Lindorth et Mopper (51).

L'utilisation de la microdialyse permet de doser de manière précise les neuromédiateurs (entre autres) *in vivo*. Cette technique, mise au point au début des années 1980, par Ungerstedt et ses collaborateurs, a été modifiée par Imperato et Di Chiara, qui proposèrent une méthode permettant de pratiquer la microdialyse dans de meilleures conditions : moins de lésions, plus grande surface dialysée, plus de sécurité lors de traitements chroniques, moindre coût, mais une procédure opératoire plus lourde à mettre en oeuvre.

Pour cette étude, il nous a paru utile de faire un rappel bibliographique sur la transmission glutamatergique. Nous ne ferons qu'évoquer les autres acides aminés excitateurs, dont les rôles ne sont encore que très mal connus et dont l'implication dans les dégénérescences neuronales semblent moindres. Nous détaillerons donc dans une première partie le fonctionnement du système glutamatergique, son rôle physiologique, son importance dans certaines pathologies. La seconde partie sera consacrée à l'introduction de l'étude menée, nous y décrirons les principes et modes opératoires des techniques utilisées. Enfin, nous exposerons nos travaux personnels : résultats obtenus, observations, discussion et conclusion.

Première partie

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

PHYSIOLOGIE DU SYSTEME GLUTAMATERGIQUE

Le rôle important du glutamate est connu depuis la première moitié du siècle, les données sur son mode de fonctionnement se sont peu à peu précisées. L'action du glutamate est excitatrice, via la plupart des récepteurs postsynaptiques (c'est même le principal acide aminé excitateur dans le cerveau), mais elle peut aussi être inhibitrice par l'intermédiaire de certains récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G, comme nous le verrons plus loin. De plus, comme de nombreux autres acides aminés, il a la double fonction de neurotransmetteur et de précurseur (précurseur notamment de l'acide γ aminobutyrique, le GABA). Cependant, à l'instar de la dopamine ou de l'acétylcholine, le pool métabolique de glutamate (c'est à dire le glutamate issu du métabolisme général sans finalité de neurotransmission) est très important, environ 50% de la quantité totale (26). Le glutamate non métabolique se répartit dans les synapses gabaergiques (10%), dans les cellules gliales (15%) et enfin dans les synapses glutamatergiques à hauteur de 20 à 30% de la quantité totale (26). En conséquence, sa qualité de neurotransmetteur est plus ou moins « masquée » par sa forte concentration due au métabolisme. Cependant, de nombreuses recherches ont démontré que le glutamate satisfait aux principaux critères d'un neurotransmetteur (80, 27) :

- ☛ Libération exocytotique Ca^{2+} dépendante. Visible en dépolarisant la membrane (*in vitro*) dans un bain contenant du K^+ .
- ☛ Libération sous une impulsion électrique ou suite à un potentiel d'action.
- ☛ Effet postsynaptique après fixation sur des récepteurs spécifiques, qu'ils soient ionotropiques (directement couplés à un canal ionique) ou métabotropiques (couplés à une protéine G et entraînant la formation d'un second messenger). Étudié par l'application de glutamate au niveau des cellules cibles (apparition d'un potentiel postsynaptique excitateur ou PPSE).
- ☛ Présence d'un système d'inactivation par recapture neuronale.
- ☛ Capacité de synthèse par les tissus cérébraux.

Aujourd'hui, la plupart des auteurs s'accordent pour lui attribuer cette fonction de neurotransmetteur (13, 14, 24, 28, 37, 80, 81, 97), alors que l'aspartate, autre acide aminé excitateur important reste controversé dans ce rôle (26).

Dans ce chapitre, nous évoquerons brièvement les différentes voies glutamatergiques, ainsi que ses différents rôles physiologiques, nous étudierons plus en détail le fonctionnement de la synapse glutamatergique (synthèse, stockage, libération et recapture, différenciation des récepteurs).

I. LES VOIES GLUTAMATERGIQUES

Elles sont très nombreuses dans le cerveau, et semblent être plutôt descendantes, en provenance du cortex ou des noyaux gris. Le cervelet ou les noyaux bulbaires utilisent aussi ce mode de transmission et on trouve des efférences glutamatergiques descendant dans la moelle épinière (voir figure 1). Ces voies entrent en jeu dans les mécanismes de plasticité cellulaire (60), d'apprentissage et de mémorisation (76).

L'hippocampe est l'une des structures les mieux connues. Elle est organisée en trois couches (trois synapses en série utilisant des AAEs comme neurotransmetteurs, ce qui est tout à fait exceptionnel dans le cerveau, voir figure 2):

- ☞ Les fibres perforantes, issues du cortex entorhinal, innervent les cellules du gyrus denté.
- ☞ Les fibres moussues innervant les cellules pyramidales de la zone CA3.
- ☞ Les collatérales de Schäffer, innervant les cellules de la zone CA1.

II. ROLES PHYSIOLOGIQUES DU GLUTAMATE

Les acides aminés jouent un rôle très important dans le cerveau, certains en tant qu'inhibiteurs (acide γ amino butyrique, glycine, taurine), d'autres en tant qu'activateurs (glutamate, aspartate, acide homocystéique, acide quinolinique). Le glutamate est le

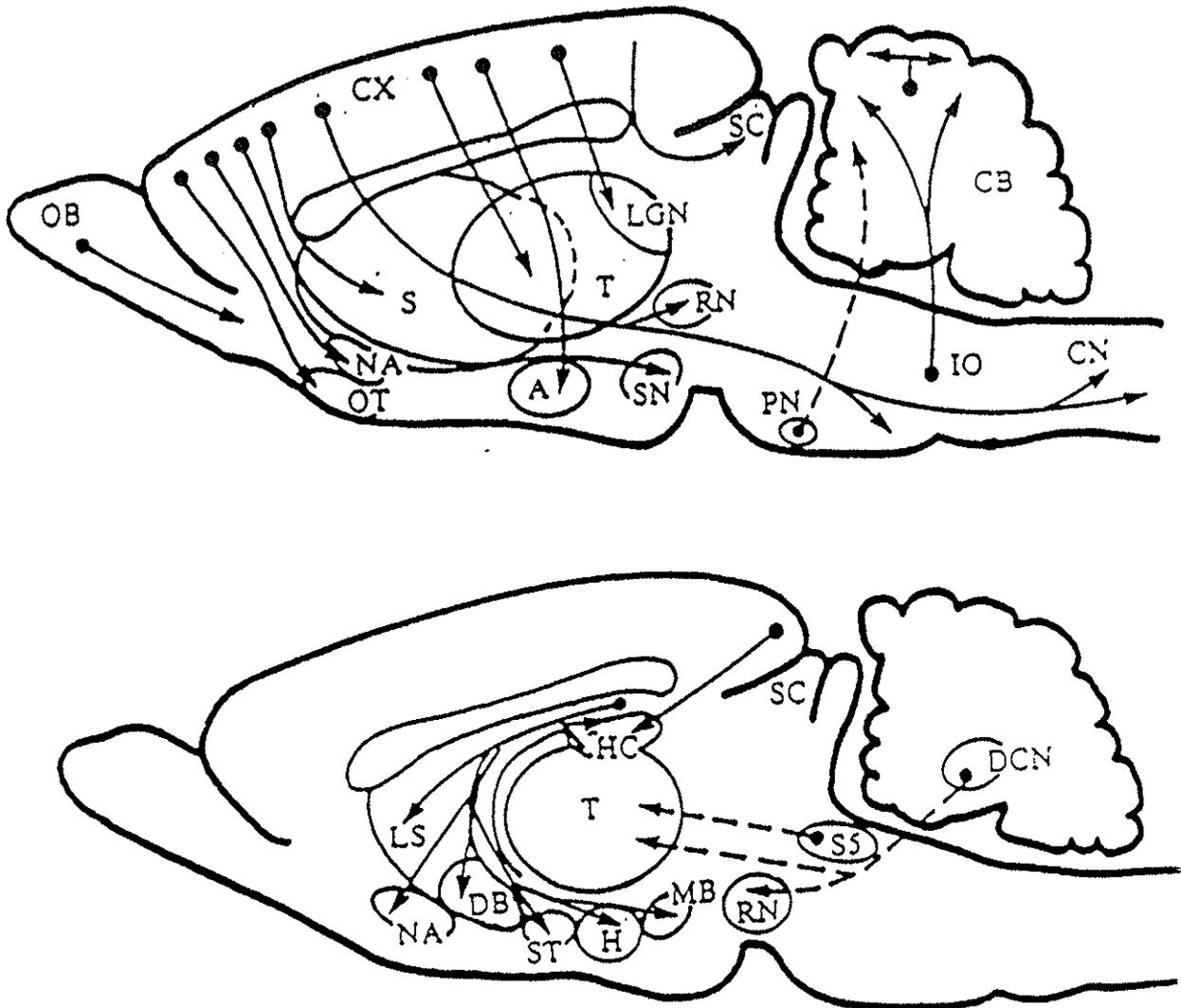


figure 1 : voies glutamatergiques, d'après McGeer, 1993 (61)

A: amygdale; CB: cervelet; CN: noyau cunéiforme; CX: cortex cérébral; S: striatum; H: hypothalamus; DB: noyau de la bande diagonale de Broca; DCN: noyaux cérébelleux profonds; HC: hippocampe; IO: olive inférieure; LGN: corps genouillé latéral; LS: septum latéral; T: thalamus; MB: corps mammillaire; NA: noyau accumbens; OB: bulbe olfactif; OT: tubercule olfactif; PN: noyau du pont; RN: noyau rouge; SC: colliculus supérieur; SN: substance noire; ST: noyau de la strie terminale; S5: noyau spinal du trijumeau.

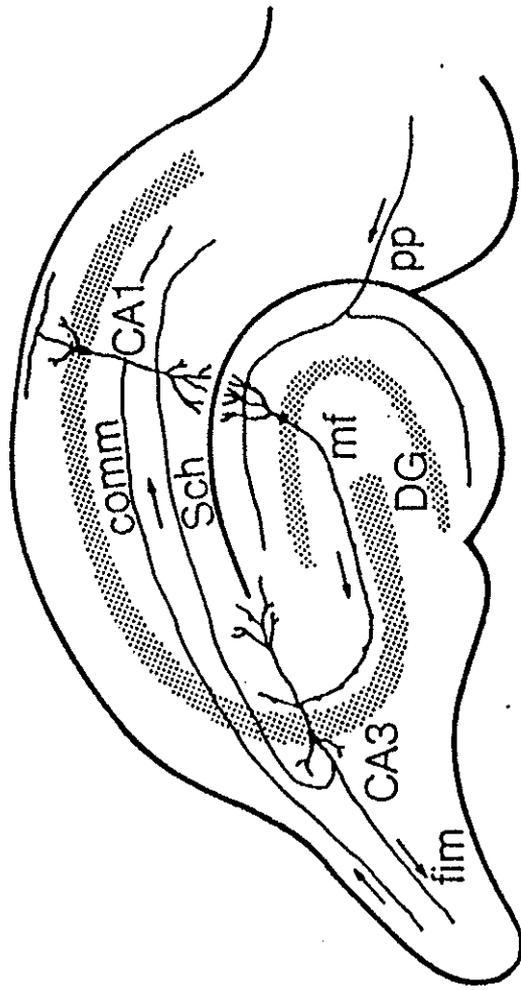


figure 2 : L'hippocampe : différentes couches cellulaires (48).

fimbria (fim), aires de cellules pyramidales (CA1 et CA3), gyrus denté (DG), fibres moussues (mf), voie perforante (PP), fibres de la collatérale de Schaffer, projection commissurale vers l'aire CA1.

principal acide aminé excitateur, il est ubiquitaire dans le système nerveux central, mais on le retrouve dans toutes les cellules de l'organisme puisqu'il entre dans de nombreux mécanismes :

- ☛ Comme précurseur dans la synthèse des protéines, des peptides, du GABA.
- ☛ Il est impliqué dans la synthèse des acides gras et le métabolisme des carbohydrates.
- ☛ C'est un constituant des cofacteurs du glutathion et de l'acide folique.
- ☛ Enfin, il contribue à la régulation de l'ammoniac.

II.1. Implication du glutamate dans les processus d'apprentissage et de mémorisation

L'importance des récepteurs glutamatergiques dans ces processus ont été démontrés chez le rat par Morris et col. (1986, 1990) (76), grâce au test du labyrinthe dans l'eau. Pour vérifier la mémoire, les rats sont placés dans un bassin inondé. Un labyrinthe les sépare d'une plate-forme. Les animaux doivent se souvenir du chemin à parcourir pour retrouver la terre ferme. On constate que l'administration de bloqueurs des récepteurs NMDA provoque une régression de la mémorisation du chemin par les rats traités (*versus* rats témoins). Il semblerait que pour cette fonction, les récepteurs métabotropiques joueraient un rôle prépondérant (76).

II.2. Implication du glutamate dans la plasticité cellulaire

Les expériences sur la plasticité cellulaire montrent une formation neuronale rapide, des réarrangements, des connections en formation etc. Tous ces phénomènes sont en partie médiés par les systèmes glutamatergiques. Des paramètres hormonaux interviennent aussi très certainement (70).

La plasticité cellulaire fait appel au phénomène de Potentialisation à Long Terme (PLT). Cette stimulation observable grâce aux techniques d'électrophysiologie montre qu'un grand nombre de fibres s'associent dans une stimulation de haute fréquence (comparable à un tétanos). La propagation de cette potentialisation peut être interrompue par l'administration d'un antagoniste sélectif des récepteurs AMPA et kainate (le 1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3,-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide, ou NBQX), mais pas du récepteur NMDA. Ce qui tend à prouver que la PLT est médiée par les récepteurs AMPA et/ou kainate (12). Cette hypothèse reste cependant contestée, certains auteurs ont montré que le canal NMDA joue un rôle dans la propagation de la PLT. Il a cependant été montré que les récepteurs métabotropiques interviennent aussi (15).

III. SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE

La figure 3 résume les différents paramètres inhérents à la synapse glutamatergique.

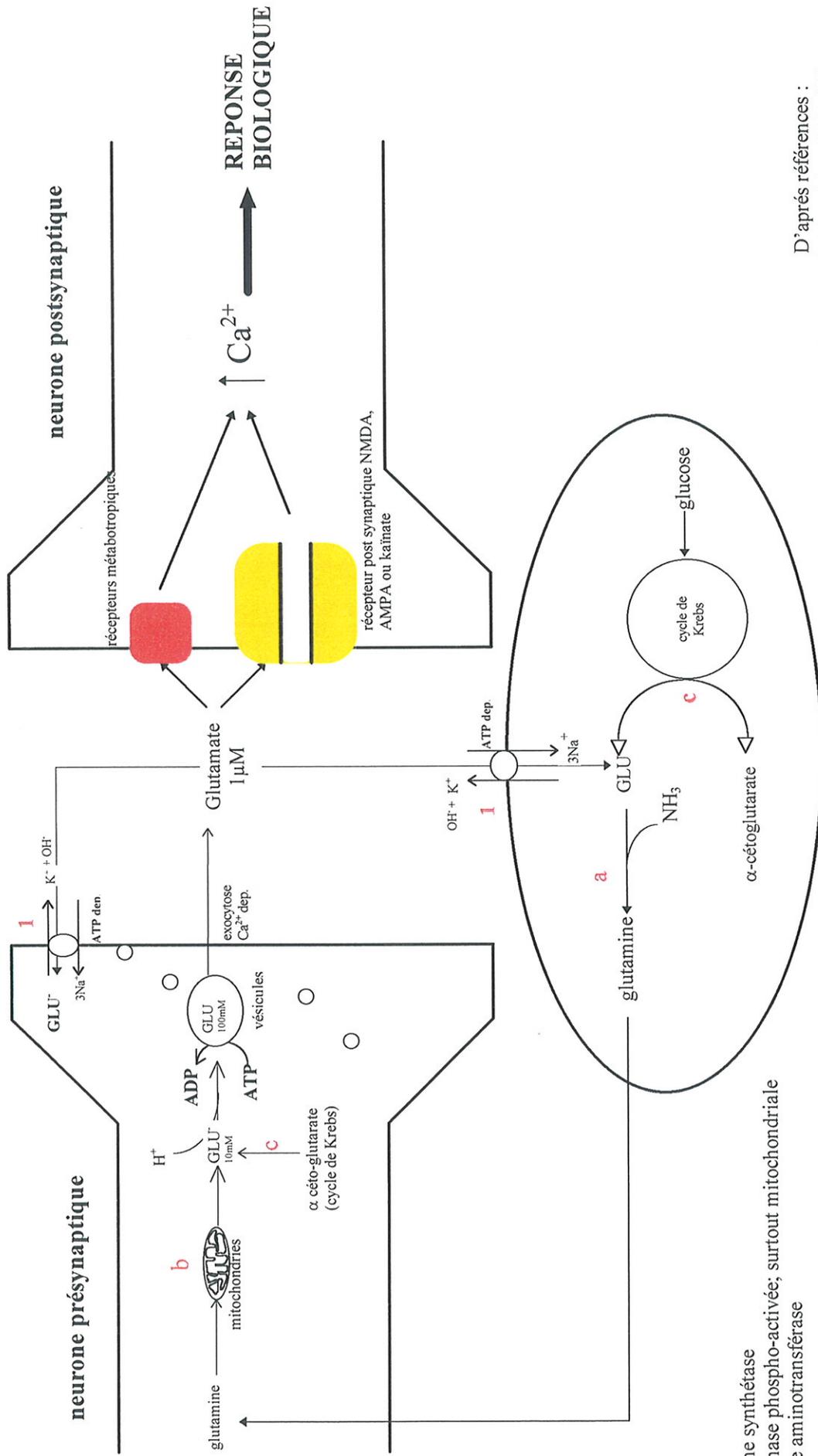
III.1. Synthèse du glutamate

Le glutamate présent dans le cerveau est synthétisé *in situ*. En effet, l'influx de glutamate arrivant, via la barrière hémato-encéphalique est largement inférieur à l'efflux vers le plasma, la proportion de glutamate provenant de la périphérie est donc négligeable (20).

Il est synthétisé à la fois dans les astrocytes et dans les terminaisons synaptiques.

Dans les cellules gliales (6), la recapture est très active mais la synthèse de glutamate conduit à la formation de glutamine pour une très large part.

En fait, la synthèse du glutamate peut suivre plusieurs voies. Selon Fonnum, en 1984 (28), les deux principaux précurseurs du glutamate sont le glucose et l'acétate. Le premier est de loin le plus important (85 à 98% du pool de glutamate dans le cerveau), et représente la synthèse dans les terminaisons synaptiques. Le deuxième est consécutif à la synthèse d'une forte proportion de glutamine et se situe dans les cellules gliales. En 1979, Norenberg et col. (68) ont d'ailleurs montré que la glutamine synthétase se trouvait concentrée dans les astrocytes quasiment en exclusivité. La glutamine, recaptée par les neurones est ensuite dégradée en glutamate par la glutaminase.



a : glutamine synthétase
 b : glutaminase phospho-activée; surtout mitochondriale
 c : aspartate aminotransférase

1 : transporteur membranaire réversible si les gradients Na^+ et / ou K^+ régressent. (26)

D'après références :
 Lodge et Collingridge 1990 (53)
 Scatton et Carter 1989 (80)
 Nicholls et Attwell 1990 (65)
 Filenz 1995 (26)

Figure 3 : synapse glutamatergique

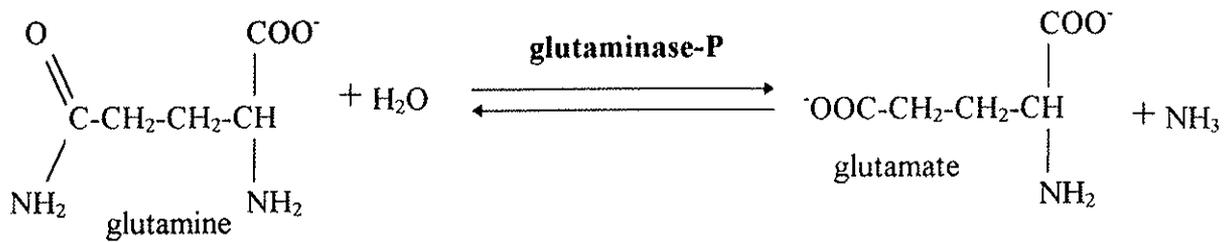
S'il est prouvé que le glutamate peut être synthétisé à partir du glucose et/ou de l'acétate (28, 78), il n'est pas commode de compartimenter cette synthèse selon ces deux voies. Nous préférons une classification qui présente les différentes voies de synthèse selon les enzymes qui interviennent (28, 29, 80). On distingue alors les voies de la glutaminase dont le substrat est la glutamine, de la glutamate déshydrogénase dont le substrat est l' α -cétoglutarate, issu du cycle de Krebs, de l'aspartate aminotransférase qui forme du glutamate et de l'oxaloacétate à partir d'aspartate et d' α -cétoglutarate. Il existe encore d'autres enzymes conduisant au glutamate, mais pas toujours pour son rôle de neurotransmetteur. Ainsi, l'ornithine δ -aminotransférase, pour laquelle la faible activité et la faible teneur en ornithine dans les cellules laissent penser qu'elle intervient peu dans la synthèse du glutamate (29), la proline oxydase peuvent former du glutamate à partir d'ornithine et de proline respectivement.

L'alanine aminotransférase entre aussi en jeu pour la formation de glutamate mais, elle fonctionne plutôt dans le sens d'une formation d'alanine dans les conditions normales d'une cellule saine.

Les principales enzymes intervenant dans la synthèse du glutamate sont détaillées ci-dessous.

1- La glutaminase

C'est une enzyme neuronale, située à l'extérieur de la membrane interne des mitochondries (49). On la trouve en quantité importante dans les neurones à activité glutamatergique, elle est également présente dans d'autres neurones et dans certaines cellules gliales (36). *In vivo*, son activité dépend de la concentration en phosphates et calcium dans la cellule (28). Elle catalyse la réaction suivante :



Cette enzyme n'est active que sous forme phosphorylée (23).

- Elle est activée par : Ca^{2+} , Pi , quelques acides dicarboxyliques (26, 68, 29)
- Elle est inhibée par : Glutamate, NH_4^+ , H^+ (29)

Le glutamate régule l'activité de cet enzyme par un mécanisme important de rétrocontrôle (28, 36).

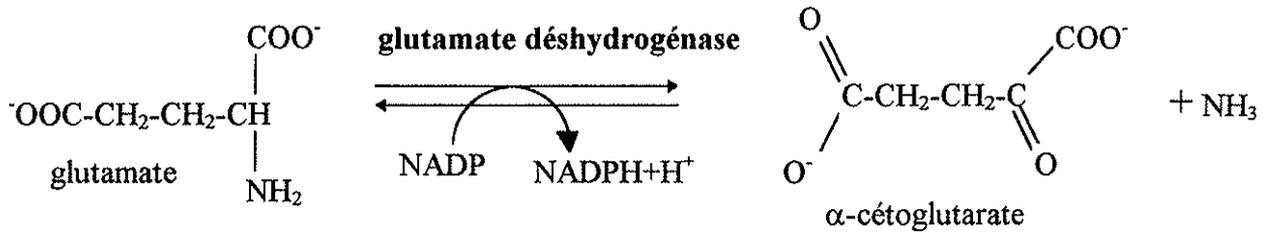
2- L'aspartate aminotransférase

Le fonctionnement de cette enzyme est en relation directe avec le cycle de Krebs (85). Elle existe sous forme de deux isoenzymes, l'un cytoplasmique et de faible affinité, l'autre, mitochondrial et de forte affinité (28), le rapport d'affinité serait de 1 pour 10 d'après Fonnum en 1993 (29).

L' α -cétoglutarate peut être issu directement du cycle de Krebs dans la synapse ou être transporté dans le cytoplasme neuronal depuis les cellules gliales via un transporteur actif, ce qui pourrait remplacer l' α -cétoglutarate perdu pendant la synthèse du glutamate neuronal (28, 80).

3- La glutamate déshydrogénase

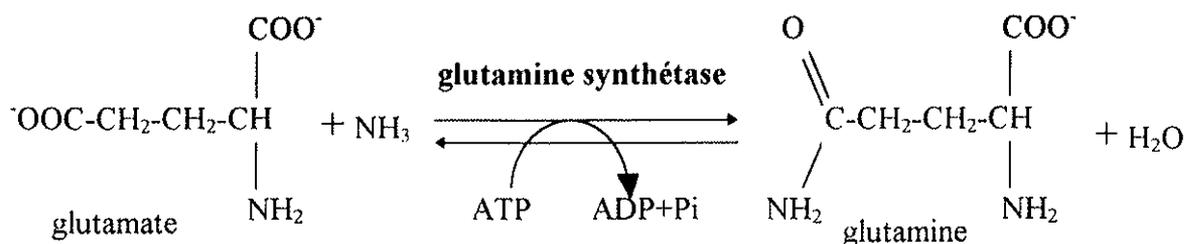
C'est une enzyme mitochondriale, localisée principalement dans les mitochondries non synaptiques, plus particulièrement dans les cellules gliales et dans le cervelet. Son fonctionnement est le suivant :



Au niveau des synapses glutamatergiques, cette enzyme aura plutôt tendance à métaboliser le glutamate pour aboutir à la formation d' α -cétoglutarate ; ceci à cause de la forte concentration en glutamate et des faibles taux de NH_3 et d' α -cétoglutarate (la loi d'action de masse agit dans le sens de la formation des produits de plus faible concentration). Par contre la formation de glutamate sera favorisée dans les neurones gabaergiques et les cellules gliales (29).

4- La glutamine synthétase

Elle n'est pas censée former le glutamate mais le métaboliser. Cependant, cette enzyme est importante à décrire car la glutamine formée sera un des principaux précurseurs du glutamate. Enzyme exclusivement astrocytaire (68, 26), elle se situe au niveau cytoplasmique et souvent en relation avec le réticulum endoplasmique. Elle catalyse la réaction suivante :



Les astrocytes contenant de la glutamine synthétase sont très souvent en relation étroite avec des terminaisons synaptiques. Il serait d'ailleurs possible que des synaptosomes puissent capter cette enzyme provenant des cellules gliales (68).

Son rôle est le métabolisme du glutamate et du GABA, mais aussi et surtout la détoxification de NH_3 (68). Elle est dépendante des taux d'ATP et donc inhibée durant une déficience énergétique (anoxie, hypoglycémie), que l'on peut modéliser par une ischémie transitoire, comme nous le verrons plus loin.

Les neurones sont capables de capter la glutamine libérée par les cellules gliales, afin de synthétiser du glutamate grâce à la glutaminase (comme nous l'avons vu précédemment). Le système de capture de la glutamine par les neurones est peu caractérisé actuellement (29), mais il représente une étape limitante dans la synthèse de glutamate (36). Erecinska et col. (22) ont montré cependant qu'il existait un transporteur actif de la glutamine sur les membranes plasmiques des synapses.

III.2. Stockage dans les vésicules présynaptiques

Les études sur le stockage vésiculaire sont essentielles car les vésicules permettent une exocytose Ca^{2+} dépendante ; or la libération calcium dépendante est l'un des critères qui détermine si un composé peut être ou non considéré comme neurotransmetteur (26).

Le stockage dans les vésicules se fait grâce à un transporteur très spécifique du glutamate (il ne transporte pas l'aspartate), contrairement au système de transport de la membrane plasmique (78). Par contre, l'affinité en est plus faible : $K_m = 1$ à 2 mM selon les auteurs (26, 65, 28, 103).

Ce transport est Mg^{2+} -ATP dépendant (52), il dépend aussi d'un gradient pH, Cl^- , et électrique $\Delta\Psi$. En 1992, Tabb et col. (90) ont montré que le gradient chlore influençait considérablement la recapture du glutamate dans les vésicules, dans les proportions suivantes (par rapport à une concentration de base comprise entre 0 et 1mM) :

- ☞ abaissement de 45% de la recapture vésiculaire pour 4 mM Cl^- .
- ☞ abaissement de 80% de la recapture vésiculaire pour 80 mM Cl^- .

Ces chiffres sont importants car ils montrent (par exemple) que la présence de récepteurs GABA sur les synapses glutamatergiques, faisant entrer du chlore dans la cellule influence considérablement le stockage vésiculaire et donc la libération Ca^{2+} dépendante.

III.3. Libération

La libération de glutamate peut se faire de façon Ca^{2+} dépendante, par exocytose des vésicules présynaptiques ou de façon Ca^{2+} indépendante par inversion des transporteurs membranaires (65, 57).

III.3.1. La libération Ca^{2+} dépendante

En présence d'une élévation locale de Ca^{2+} , le calcium pénètre dans les synapses par les canaux Ca^{2+} voltage- dépendants et provoque l'exocytose des vésicules, comme c'est le cas pour bien d'autres neurotransmetteurs. Cette libération nécessite de l'ATP, ainsi, une baisse du rapport ATP/ ADP entraîne une diminution de la libération exocytotique de glutamate.

On peut provoquer cette exocytose *in vitro* sur des préparations de synaptosomes en utilisant différents modes de dépolarisation tels que :

- ☞ stimulation électrique
- ☞ concentrations élevées de K^+ dans le milieu
- ☞ application de la vératrine
- ☞ toxines animales telles que la toxine *Tityus* (issue du venin de scorpion), ou la β -bungarotoxine (venin de serpent).

On constate, *in vivo*, qu'une libération de glutamate Ca^{2+} dépendante est associée à une libération d'aspartate, de taurine et de glycine (28).

Une libération maximale réclame une concentration de calcium libre de $5\mu M$ (26). De plus, Nicholls et col. ont montré en 1986 qu'une libération Ca^{2+} dépendante provoquée par du K^+ , représentait une quantité de glutamate vésiculaire équivalent à 15-20% du pool synaptosomique total.

III.3.2. La libération Ca^{2+} indépendante

Elle survient quand le gradient Na^+ ou K^+ de part et d'autre de la membrane plasmique s'inverse. On peut la provoquer *in vitro* sur des préparations de synaptosomes ou de cellules gliales par une dépolarisation, en absence de Ca^{2+} .

III.4. Recapture

Il n'y a pas pour le glutamate d'enzyme extracellulaire capable de le métaboliser (26). Cependant, il existe des mécanismes de recapture, actifs et de haute affinité, tant vis-à-vis du L-glutamate que du L et D-aspartate (65). Les études de Erecinska et col. (21) démontrent en 1987, que ces recaptures sont fonction d'un gradient électrochimique de Na^+ et dépendent d'une pompe Na^+/K^+ ATPase. C'est donc à des co-transporteurs Na^+ et K^+ que nous avons affaire le plus fréquemment.

Aujourd'hui, nous distinguons plusieurs types de transporteurs, dépendants du sodium, du chlore ou du calcium (26). Dans des conditions physiologiques normales, ce sont les transporteurs dépendant du sodium qui fonctionnent préférentiellement, la vitesse maximale (V_{max}) relative à la réaction de liaison entre le glutamate et le récepteur étant de loin la plus élevée.

1- transporteurs Na^+ dépendants

Trois types différents de transporteurs sodium dépendants ont pu être clônés. Leur fonctionnement est ATP dépendant. Un ion glutamate entre dans la cellule avec soit 3 Na^+ ,

soit 2 Na⁺ et 1 H⁺, en échange, 1 ion K⁺ et 1 ion OH⁻ sortent (103). Les trois types différents sont les suivants :

- ☞ EAAC1, transporteur neuronal mais aussi gabaergique (26), peu spécifique, il transporte indifféremment le D-aspartate et le L-glutamate l'affinité est moyenne (Kd = 12 μM) d'après Zu-Cheng Ye et coll. en 1996, (103).
- ☞ GLT1, transporteur spécifiquement astrocytaire, sa densité est très forte dans l'hippocampe, de très forte affinité pour le glutamate, Kd = 2 μM, (103).
- ☞ GLAST : transporteur présent au niveau des cellules gliales, il est de faible affinité (Kd = 77 μM, (103)).

2- transporteurs Cl⁻ dépendants

Ils sont localisés sur les cellules gliales. Ce type de transporteur est encore assez mal connu. On en connaît cependant deux isotypes (26). Ces transporteurs sont spécifiques au L-glutamate.

3- Transporteurs Ca²⁺ dépendants

Situés sur les membranes plasmiques des synapses, ces transporteurs entrent en action lorsque les autres types sont inactifs (déficit en sodium ou chlore dans l'espace intersynaptique). Ils agissent de façon dose dépendante, la vitesse maximale étant très faible, l'activité basale de ce type de transporteur est « masquée » par l'activité des autres (voir Tableau I).

Comme les transporteurs dépendant du chlore, ils sont spécifiques au L-glutamate.

Tous ces systèmes de transport permettent une régulation de la concentration extracellulaire de glutamate à environ 1 μM (voir figure 1). Nous pouvons constater que le GLT-1 est de loin le transporteur le plus actif. Il fonctionne pour des concentrations très faibles de glutamate et « à grande vitesse », ce qui explique le fait que la majorité du glutamate extracellulaire soit recapté par la glie (65).

Transporteur	Spécificité	Localisation	Km (μM)	Vmax	référence(s)
Vésiculaire	L-glutamate exclusivement	Synaptosomes glutamatergiques	1000 - 2000		90, 65, 26
GLT-1	L-glutamate, L et D-aspartate	Astrocytes	2	284	103
EAAC1	L-glutamate, L et D-aspartate	Neurones	12	284	103
GLAST	L-glutamate, L et D-aspartate	Cellules gliales	77	284	103
Cl ⁻ dépendant	L-glutamate exclusivement	Cellules gliales	29	100	26
Ca ²⁺ dépendant	L-glutamate exclusivement	Neurones glutamatergiques	84	27	26

Tableau I : résumé des caractéristiques des différents transporteurs du glutamate.

III.5. Les récepteurs

Les études autoradiographiques ont permis de localiser et identifier plusieurs types de récepteurs. Aujourd'hui, on en distingue cinq, chacun se subdivisant en sous-types. Il existe en outre deux modes d'action : l'un ionotrope, engendrant l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants, l'autre, métabotrope, conduisant à l'apparition d'un second messenger (lié au métabolisme des phosphoinositides) (31,101).

Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), quisqualate et kaïnate ont été les premiers découverts, puis vinrent les récepteurs au L-AP4 (définis ainsi par son antagoniste, l'acide α -2-amino-4-phosphonobutyrate). Enfin, les récepteurs métabotropiques furent découverts.

Les appellations ont évolué au cours du temps, selon que l'agoniste principal était plus spécifique. Ainsi, le récepteur de type quisqualate a été rebaptisé « récepteur AMPA » (acide amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), du fait de la plus grande sélectivité de ce composé vis-à-vis du récepteur.

III.5.1. Les récepteurs ionotropiques

Ils sont de trois types, selon que leur agoniste spécifique est le N-méthyl-D-aspartate (NMDA), le kaïnate, ou l'acide amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (97) (AMPA). Leur point commun est d'être couplé directement à un canal ionique (figure 4).

III.5.1.1 Récepteurs NMDA (8, 28, 54, 56, 81, 91, 99)

C'est de loin le plus connu et le mieux caractérisé des récepteurs aux AAEs. Les études électrophysiologiques décrivent 5 propriétés du récepteur NMDA :

- ☞ blocage du canal ionique par Mg^{2+}
- ☞ perméabilité du canal ionique à Ca^{2+} , Na^+ , K^+
- ☞ le canal peut adopter plusieurs états de conductance
- ☞ diminution de la sensibilité lors d'expositions prolongées à ses agonistes

☛ potentialisation possible de la réponse.

Il est analogue au récepteur GABA de part la structure, ce complexe protéique possède un canal ionique central et de plusieurs sites de fixation, glutamate et agonistes, Mg^{2+} , glycine, phencyclidine, polyamine (figure 4).

1- Le site glycine

La glycine agit en facilitant l'ouverture du canal associé au récepteur, ce qui en augmente la fréquence d'ouverture. L'application de glycine seule n'entraîne pas l'ouverture du canal. Ce site ne se rencontre que sur ce récepteur (73, 97).

2- Le site phencyclidine (PCP)

Situé à l'intérieur du canal ionique NMDA, ce site permet la fixation d'antagonistes non compétitifs de type phencyclidine-like, agissant en bloquant l'entrée du canal, comme le MK-801, qui serait l'une des plus actives (98).

3- Le site polyamine

La spermine et la spermidine, polyamines cationiques majorent la liaison des composés phencyclidine-like, antagonistes non compétitifs du récepteur NMDA, avec le canal.

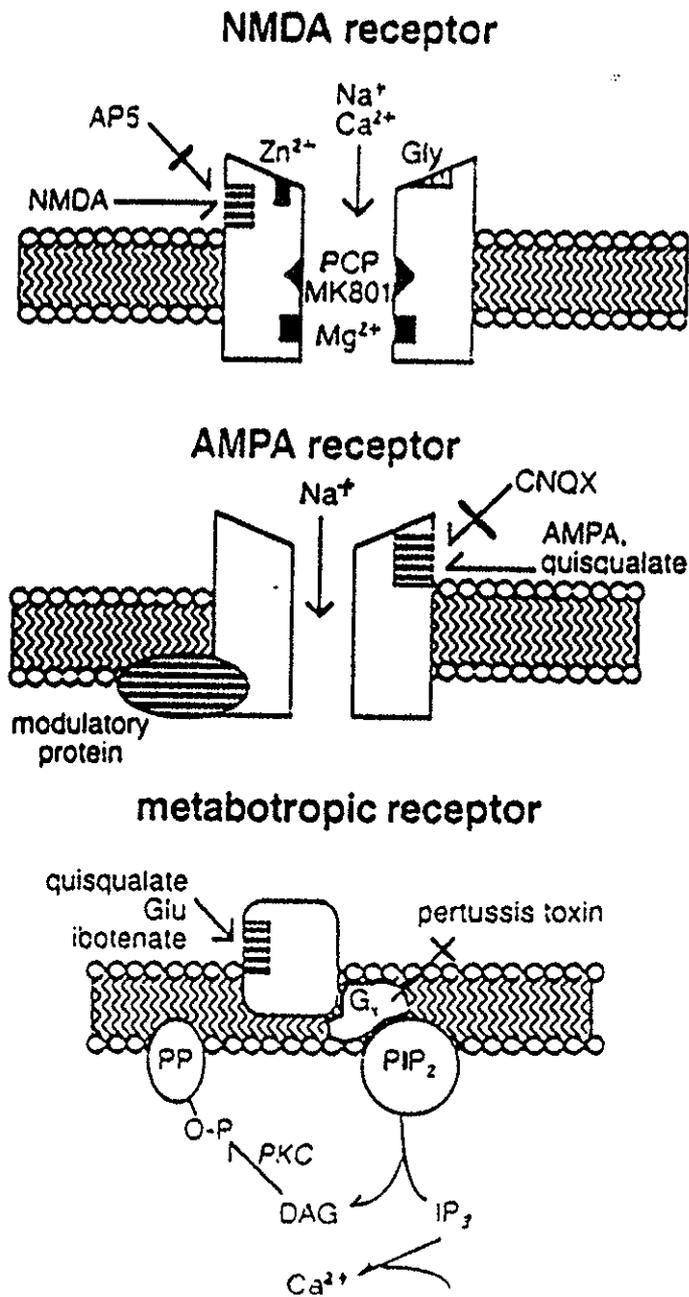


figure 4 : fonctionnement des récepteurs NMDA, AMPA, métabotropiques. Les récepteurs au kaïnate sont similaires aux récepteurs à l'AMPA (56).

III.5.1.2) Récepteurs AMPA et récepteurs kaïnate

Le canal ionique associé à ces deux types de récepteurs ne permet pas l'entrée du calcium. De plus, la conductance est cinq à dix fois plus faible que celle du récepteur NMDA (20). La saturation survient vite et le récepteur devient alors insensible au glutamate (47). Ils sont postsynaptiques et servent surtout à la transmission rapide (ondes à haute fréquence).

La distribution dans le cerveau des récepteurs de type AMPA est à peu près équivalente à celle des récepteurs NMDA (3). Alors que l'on distingue parfaitement les récepteurs NMDA des récepteurs AMPA (par le biais d'agonistes sélectifs), il est plus difficile de discerner les récepteurs AMPA des récepteurs kaïnate. Cependant, il semblerait qu'au niveau des fibres C, les récepteurs kaïnate sont les seuls impliqués (4, 56).

III.5.2. Les récepteurs métabotropiques (mGlu)

Aujourd'hui, huit sous-types de récepteurs mGlu ont pu être clônés (72), (mGlu₁ à mGlu₈). Ils sont couplés à une protéine G. On distingue trois classes de récepteurs selon leur mode d'action (voir figure 5) (72, 76, 82) :

- classe I (mGlu₁ et 5) : stimulation d'une phospholipase C via le système des phosphoinositides. Ils provoquent l'augmentation de calcium et la synthèse de diacylglycérol (DAG) qui peut activer une protéine kinase C.

- classe II (mGlu₂ et 3) : couplés négativement à une adénylate cyclase, ce qui réduit la concentration en AMPc.

- classe III (mGlu_{4, 6, 7, 8}) : appelés aussi récepteurs au L-AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutamate), leur agoniste sélectif. Ils sont de deux types, inhibiteurs des voies glutamatergiques l'un via une protéine G, l'autre, à partir de cellules photoréceptrices par activation d'une phosphodiesterase (31, 101). Ils sont souvent présynaptiques et peuvent servir d'autorécepteurs pour la régulation de la libération du glutamate.

Le trans-ACPD (acide 1-aminocyclopentane-1_S,3_R-dicarboxylique) est un agoniste sélectif des récepteurs métabotropiques. Ces derniers sont pré- ou postsynaptiques. Les récepteurs présynaptiques auraient un rôle dans la plasticité cellulaire (65).

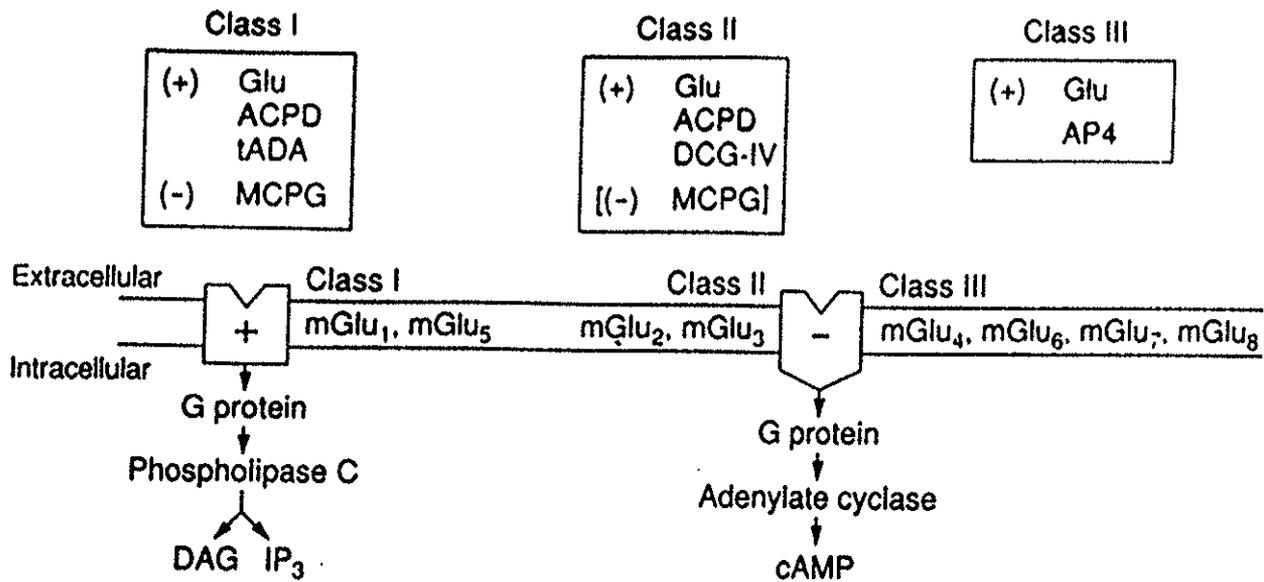


figure 5 : mécanisme d'action des différentes classes de récepteurs métabotropiques (76).

IMPLICATION DU GLUTAMATE DANS LES PATHOLOGIES CEREBRALES

A cause de leur ubiquité et de leur potentiel cytotoxique, les AAEs sont plus ou moins spécifiquement impliqués dans les processus de dégradation neurologique de certaines maladies aiguës ou chroniques, voire même les processus du vieillissement (66). En particulier, les pathologies entraînant de fortes dépolarisations ou une privation d'énergie (58) (hypoglycémie, ischémie) engendrent des désordres physiologiques et une très importante libération d'acides aminés, en particulier de glutamate. Ceci conduit à une cascade de réactions entraînant une forte toxicité neuronale appelée excytotoxicité. Ces réactions peuvent être résumées en trois phases : sodium dépendante, calcium dépendante, amplification par stimulation des récepteurs glutamatergiques. Les deux premières ne peuvent induire les lésions neuronales observées. L'activation des récepteurs glutamatergiques est prépondérante dans la toxicité. Cependant, ils n'ont pas tous la même importance dans la mortalité cellulaire. En effet, diverses études ont montré que la mort neuronale est presque totalement inhibée par les bloqueurs sélectifs des récepteurs NMDA (11, 59, 64). De plus, l'administration d'agonistes sélectifs de ce récepteur (homocystéate, NMDA) accentuent la cytolyse (46, 59). Par contre, l'exposition à l'AMPA ou au kainate entraîne des morts neuronales après une longue exposition puisque leur toxicité est moindre (63).

Actuellement, dans certaines pathologies neurologiques chroniques, le rôle du glutamate, , est souvent bien cerné. Les maladies neurodégénératives engendrent une libération d'acides aminés excitateurs au long cours conduisant peu à peu à des morts neuronales irréversibles (55). Ainsi, le glutamate intervient à un degré plus ou moins important dans les affections cérébrales. Son rôle reste cependant incertain dans la schizophrénie.

I. MECANISME D'EXCITOTOXICITE

Lors d'une ischémie cérébrale, le cerveau n'est plus irrigué, par conséquent, l'apport en glucose et oxygène n'est plus assuré. Il en résulte une diminution rapide de l'ATP intracellulaire par arrêt de la phosphorylation oxydative. Or, l'un des rôles importants de l'ATP est le fonctionnement des pompes Na^+/K^+ ATPase, responsables du maintien du potentiel de repos des membranes. En absence d'ATP, ce potentiel s'annule engendrant une dramatique cascade de réactions conduisant à la mort neuronale. Les trois phases citées plus haut ne sont pas indépendantes, elles peuvent être résumées comme suit (20, 47, 63):

1- Entrée de sodium

L'entrée de sodium est suivie d'une entrée de chlore, afin de respecter l'équilibre ionique. Ce mouvement est accompagné d'une entrée d'eau, suivant le gradient osmotique. La conséquence en est une augmentation du volume cellulaire jusqu'à éclatement et libération du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire.

De plus, l'arrêt des pompes Na^+/K^+ ATPase entraîne un arrêt des transports actifs de H^+ , Ca^{2+} , AAEs. Ainsi, le milieu intracellulaire s'acidifie, le calcium entre en quantité, le glutamate s'accumule dans le milieu extracellulaire.

2- Entrée de calcium

La présence de grandes quantités de calcium dans les cellules entraîne une précipitation de phosphates de calcium. De plus, une multitude de réactions Ca^{2+} dépendantes est activée, comme des interactions protéine-protéine ou des enzymes dangereuses (lipases, protéases, nucléases), qui vont avoir un effet des plus destructeurs sur la cellule. Enfin, le calcium provoque l'exocytose des neurotransmetteurs contenus dans les vésicules, en particulier du glutamate.

3- Exocytose de glutamate

Lors d'une ischémie, l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate est extrême, comme nous le verrons plus loin. Le glutamate provoque la dépolarisation des neurones alentour par entrée de sodium via les canaux ioniques des récepteurs NMDA et AMPA/kainate. L'ouverture de ces canaux provoque une arrivée massive de calcium dans le cytoplasme. C'est seulement une fois que le calcium libre intracytoplasmique est parvenu à une certaine concentration, que les réactions calcium dépendantes et toute la cascade de l'excytotoxicité apparaissent. Ainsi, il se crée une boucle sans fin conduisant à la mort neuronale (figure 6 ci-dessous).

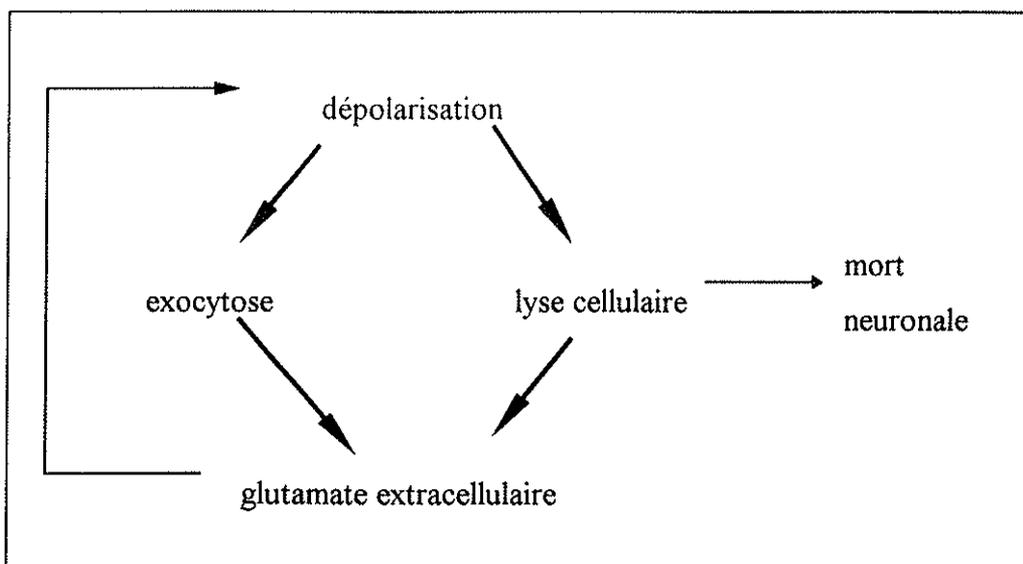


Figure 6 : mécanismes de lyse cellulaire suite à une dépolarisation créée par une ischémie cérébrale.

La mort neuronale est en fait due, en grande partie à l'apparition de radicaux libres par divers mécanismes (production d'acide arachidonique ou de monoxyde d'azote, NO) comme le montre la figure 7; mais aussi par la conversion de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase. Le NO est un agent important de dégradation neuronale, il est formé en quantités lors d'une entrée massive de calcium dans la cellule (voir figure 8 et 9). Carroll et col., 1996 (10) suggèrent que NO stimule la guanylate cyclase soluble formant ainsi la 3'-5'-cyclic guanosine monophosphate, impliquée aussi dans la toxicité.

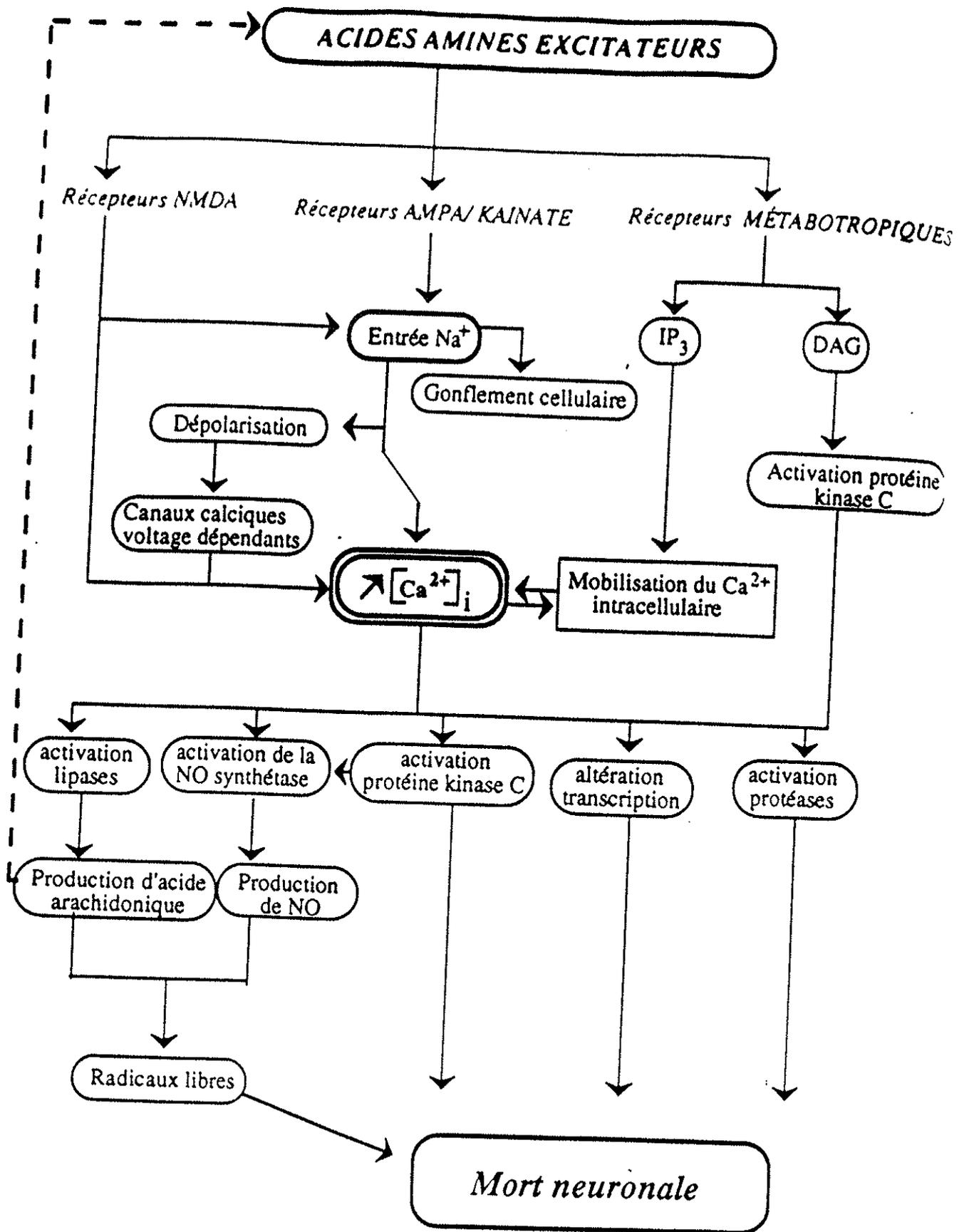


figure 7 : différentes réactions entrant en jeu dans le mécanisme d'excitotoxicité (31).

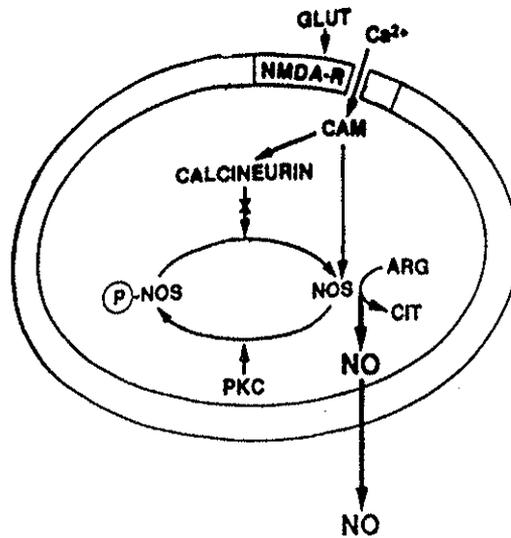


figure 8 : mécanisme de régulation de la synthèse de NO, en fonction de la phosphorylation de la NO synthétase. L'entrée massive de sodium, via les récepteurs-canaux NMDA provoque la déphosphorylation de la NO synthétase et donc la synthèse de NO.

ARG : L-arginine, CAM : calmoduline, CIT : L-citruline, NOS : NO synthétase, PKC : protéine kinase C, (89).

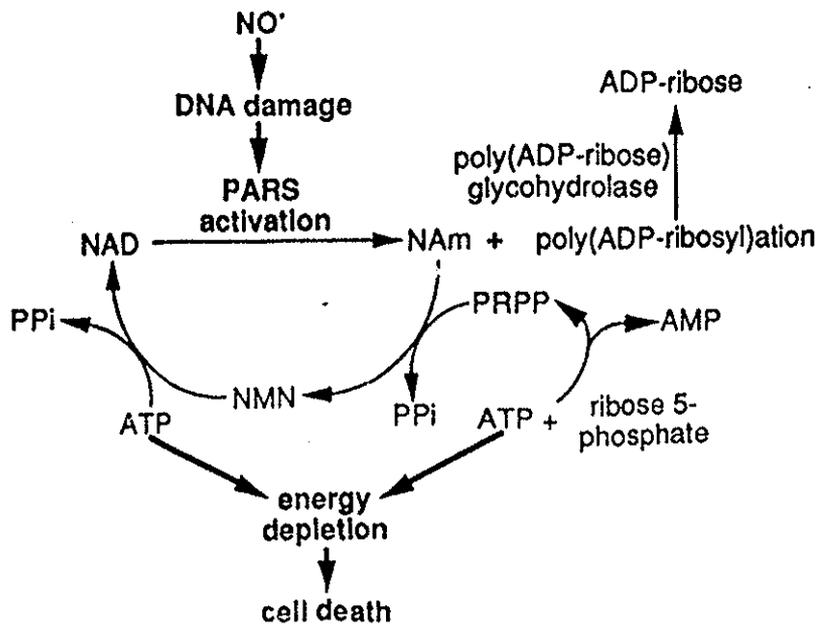


figure 9: Mécanisme de la toxicité due à NO.

PRPP : phosphoribosyl pyrophosphate, PARS : poly (ADP ribose) synthétase, NMN : nicotinamide mononucléotide, Nam : nicotinamide (89).

II. PATHOLOGIES AIGUES

II.1. Crises épileptiques

Historiquement, c'est par le biais de l'épilepsie que les premières recherches sur le blocage des AAEs (62) ont été mises en œuvre. Les AAEs sont convulsivants de part leur action dépolarisatrice au niveau cortical et limbique (18). Lors de crises prolongées ou très répétitives, des lésions irréversibles peuvent subvenir (lors d'un état de mal épileptique par exemple) (48). Elles touchent le plus souvent l'hippocampe et sont contrées par l'emploi d'antagonistes du récepteur NMDA ainsi que par certains bloqueurs des canaux sodiques comme la sipatrigine ou la lamotrigine (11, 19).

II.2. Accidents vasculaires cérébraux (ischémies)

Les accidents vasculaires cérébraux représentent dans les pays industrialisés la 3^{ème} cause de mortalité après le cancer et la pathologie coronarienne. Ces accidents sont des chocs aigus qui provoquent rapidement la cascade de l'excytotoxicité. Il en résulte une cytolyse importante et un grand nombre d'infirmités motrices et cérébrales.

III. PATHOLOGIES CHRONIQUES

III.1. Maladie d'Alzheimer

C'est la principale maladie neurodégénérative (43) (elle affecte 5% de la population au-delà de 65 ans). Cette maladie se caractérise cliniquement par la détérioration progressive des fonctions cognitives (mémoire, raisonnement...). Des études neuropathologiques ont montré l'apparition de lésions dont l'importance est proportionnelle à la sévérité des troubles cliniques. Ces lésions touchent particulièrement le cortex, l'hippocampe, le noyau strié, le thalamus et l'hypothalamus. L'implication glutamatergique dans cette maladie est étayée par son rôle important dans le processus d'apprentissage et de mémorisation, qui sont très altérés chez les malades par la dégradation importante des cellules pyramidales ou les nombreuses lésions dans le cortex frontal. Cependant, d'autres systèmes entrent en jeu dans cette pathologie (cholinergique, GABAergique). Des causes génétiques ont été mises en évidence, notamment au niveau des chromosomes 21 et 17 (48).

III.2. Maladie de Parkinson

Cette maladie se caractérise par une perte de neurones dopaminergiques dans les voies nigrostriatales. Les processus de dégénération neuronale dans cette pathologie ne sont pas encore bien établis, cependant, on sait que plusieurs mécanismes entrent en jeu, comme la production de radicaux libres par des réactions de Fenton avec les ions ferriques, issus du catabolisme de la dopamine par la MAO-B. Ces réactions sont les résultantes du stress

oxydatif, comme en témoigne le taux important de peroxydation lipidique dans la substance noire des patients atteints de la maladie de Parkinson (20). Cependant, le stress oxydatif n'est pas le seul mécanisme physiopathologique invoqué. En effet, les antagonistes sélectifs du récepteur NMDA (comme le MK-801) sont capables de réduire considérablement les lésions neuronales engendrées par l'administration de 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) (9, 79). Le MPTP est métabolisé en 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP+) par la MAO-B. Le MPP+ est alors transporté à l'intérieur des neurones du *nigrostriatum* par les systèmes de transport de la dopamine. Une fois dans le cytoplasme, le MPP+ s'accumule dans les mitochondries et inhibe la chaîne de respiration oxydative, ce qui conduit à la mort neuronale. Ainsi, l'administration de MPTP est un modèle fiable d'imitation de la maladie de Parkinson, puisqu'il détruit spécifiquement les neurones dopaminergiques. Cependant, le MPP+ provoque aussi l'augmentation d'AAEs dans l'espace extracellulaire (visible en microdialyse), probablement suite à l'augmentation de dopamine puisque les neurones glutamatergiques ne le captent pas (20, 9, 79). Ainsi lors de la maladie, la lyse des neurones dopaminergiques pourrait entraîner la libération de glutamate, ce qui accélère la mort neuronale.

La lamotrigine a fait l'objet d'études cliniques sur la maladie de parkinson. Zipp et col. (1993) observent qu'il y a une amélioration de l'évolution de la maladie chez les patients traités (102).

III.3. Chorée de Huntington

C'est une maladie autosomique dominante, qui se déclare plutôt après 50 ans. Elle se caractérise par des mouvements anormaux de la face, des membres et du tronc. L'évolution est rapide et conduit à la démence avant d'entraîner la mort. Des périodes de

type psychotique sont parfois décrites. Le *striatum* est la structure la plus touchée dans cette pathologie.

Par injection de quinolinate (agoniste NMDA), on reproduit fidèlement les lésions striatales observées au cours de la maladie (5). De plus, on constate une diminution du nombre de récepteurs NMDA dans le striatum au cours de l'évolution de la maladie. Ces éléments argumentent en faveur d'une implication des systèmes glutamatergiques dans l'évolution neurologique de cette maladie.

III.4. Sclérose amyotrophique latérale (maladie de Charcot)

Cette maladie rare se caractérise par une atrophie des motoneurones. Le mécanisme d'excitotoxicité entre en jeu dans la physiopathologie de cette affection (les taux de glutamate dans le sérum et le liquide céphalorachidien sont élevés chez les patients). Il semblerait que la dépolarisation se fasse par l'intermédiaire des récepteurs AMPA et non NMDA dans cette pathologie.

Deuxième partie

**ASPECTS TECHNIQUES DE
NOTRE ETUDE**

OBJECTIFS

Cette étude vise à vérifier les effets de la lamotrigine, de la sipatrigine et du MK-801 sur la libération de glutamate dans l'hippocampe, chez le rat.

Ces substances sont-elles capables de diminuer significativement la libération basale de glutamate ?

Quels mécanismes d'action peut-on envisager ?

Quels sont les effets de ces produits sur le comportement des animaux traités ?

Enfin, peut-on démontrer qu'ils ont un réel effet neuroprotecteur ?

Telles seront les questions auxquelles nous aurons à répondre à la suite de cette analyse.

Pour cela, nous vérifierons tout d'abord l'effet de ces substances sur la libération basale de glutamate. Deux groupes d'animaux seront comparés, un groupe témoin recevant 3 ml/kg de solvant par voie intra-péritonéale, un groupe traité, recevant 3 ml/kg du produit à la concentration voulue, par la même voie. Dans un deuxième temps, nous testerons l'effet protecteur de la lamotrigine et de la sipatrigine sur des animaux ischémiés. Là aussi, un groupe traité sera comparé à un groupe témoin. Tous les essais seront pratiqués dans l'hippocampe du fait de la forte teneur en glutamate de cette structure. Comme nous l'avons vu dans la première partie (page 6), les voies glutamatergiques sont très concentrées à ce niveau et en particulier dans la zone CA1. Dans cette partie seront décrits le principe de la microdialyse ainsi que les protocoles opératoires utilisés et la méthode de dosage du glutamate.

LA MICRODIALYSE TRANSCEREBRALE

Les premières expériences de dosage des neuromédiateurs *in vivo* ont commencé avec l'invention de la technique dite de la canule push-pull par Gaddum, améliorée par Glowinski. Dans cette technique, le liquide était propulsé sous pression à travers le cerveau et récupéré de l'autre côté, il était en contact direct avec les tissus, ce qui engendrait de nombreuses lésions. Par la suite, la microdialyse cérébrale a fait son apparition avec les expériences de Delgado en 1972, elle a ensuite été améliorée puis modifiée par Ungerstedt (93) puis par Imperato et Di Chiara en 1983 (40) et 1992 (41). Ces derniers ont proposé la microdialyse transversale. C'est cette technique que nous utiliserons pour nos expériences. La microdialyse cérébrale selon Ungerstedt consiste à introduire la fibre verticalement par le haut du crâne et jusque dans la structure à étudier. Elle est guidée par une canule rigide scellée sur le crâne de l'animal. La méthode d'Imperato et Di Chiara propose de faire traverser toute la largeur du cerveau à la fibre, afin que celle-ci puisse dialyser les structures sur une plus grande longueur.

I. PRINCIPE

Le principe de la microdialyse est d'implanter une fibre semi-perméable dans la structure à étudier et d'y perfuser un liquide de concentration ionique proche du liquide extracellulaire (17, 25). Les molécules de faible poids moléculaire dont les neurotransmetteurs vont alors diffuser à travers la membrane selon un gradient de concentration depuis le milieu extracellulaire jusque dans le liquide de perfusion (alors que d'éventuelles substances présentes dans le liquide de perfusion diffusent vers le milieu extracellulaire). *In vitro*, la modélisation mathématique des échanges entre le liquide de dialyse et le milieu est relativement simple, ils sont régis par les lois de Fick. Un équilibre s'établit entre les deux compartiments. Cependant, il faut pour être juste faire intervenir le débit de la pompe. Les études montrent alors (45) que le rapport entre les deux concentrations, appelé *recouvrement*, est inversement dépendant du débit.

In vivo, on retrouve les mêmes notions, mais de nombreux paramètres s'ajoutent qui représentent globalement une résistance tissulaire (la figure n, ci-dessous présente en vis-à-vis les différences entre les modèles).

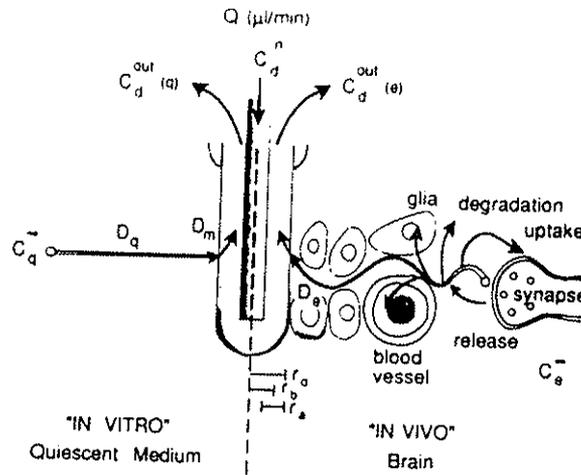


figure 10 : illustration schématique des différences entre les paramètres de diffusion d'une molécule hypothétique *in vivo* (dans le cerveau) et *in vitro* (d'après Jan Kehr 1993) (45).

Q: débit de dialyse, $C_d^{out}(q)$: concentration à la sortie de la fibre (*in vitro*), $C_d^{out}(e)$: concentration à la sortie de la fibre (*in vivo*), C_d^{in} : concentration de la molécule dans la fibre en entrée, C_q^- : concentration dans la solution, C_b^- : concentration dans le cerveau, D_q : coefficient de diffusion dans la solution, D_b : coefficient de diffusion dans le cerveau, D_m : coefficient de diffusion à travers la membrane, r_0 : rayon externe de la fibre

Ainsi, les auteurs ont successivement proposé différents modèles mathématiques régissant ces échanges, et faisant intervenir le plus possible de paramètres.

La formule ci-dessous, proposée par Bungay et col. en 1990 est un modèle étendu de celle de Jacobson et col., 1985 (35, 45):

$$\frac{(C_s - C_i)}{(C_e - C_i)} = 1 - e\left(-\frac{K_0 A}{Q}\right)$$

- ☞ C_s est la concentration à la sortie de la fibre de dialyse.
- ☞ C_i est la concentration dans le milieu extracellulaire, à proximité de la fibre.

- ☛ Ce est la concentration dans le milieu, mais suffisamment éloignée de la fibre pour ne pas être influencée par la dialyse.
- ☛ K_0 est le coefficient de transfert (relatif à la masse de la molécule).
- ☛ A est la surface de dialyse (surface de la face interne de la partie dialysante de la fibre).
- ☛ Q est le débit volumétrique du liquide de dialyse.

Le but à atteindre est que C_s soit le plus proche possible de C_e , ce qui donnerait une idée précise de la concentration réelle dans le milieu extracellulaire de la structure étudiée.

K_0 est inversement proportionnel à la résistance tissulaire. Cette dernière est due à l'action du métabolisme, aux mécanismes de transport tissulaire, aux caractéristiques de diffusion du liquide extracellulaire.

II. INTERETS DE LA MICRODIALYSE TRANSVERSALE

La technique d'Ungerstedt est toujours largement répandue, elle représente encore la majorité des expériences de microdialyse. Cependant, la technique transversale apporte des avantages certains. Notamment, elle permet de provoquer moins de lésions puisqu'il n'y a aucune structure rigide présente dans le cerveau. Le maintien de la fibre dans la technique verticale implique qu'un mandrin métallique reste implanté dans le cerveau, provoquant d'importantes réactions gliales. L'encéphale baigne dans le liquide céphalorachidien ce qui lui permet de s'équilibrer librement dans l'espace. Toute pièce rigide plantée dans les tissus

provoque donc des lésions à chaque mouvement. Les lésions sont néfastes pour l'expérience à double titre. D'abord elles détruisent des neurones donc faussent la mesure de libération de neuromédiateurs, d'autre part, elles provoquent une réaction de protection par les cellules gliales, qui viennent enrober la fibre de façon à l'isoler des tissus, empêchant ainsi les échanges. La fibre souple de la technique transverse accompagne les mouvements du cerveau, cet avantage est particulièrement pertinent lors de tests sur des traitements chroniques (la concentration de dopamine reste constante pendant au moins 5 jours) d'après Imperato et col., 1985 et 1994 (42, 39).

En outre, une fibre de microdialyse verticale coûte très cher et le risque de la casser au moment de l'implantation est important.

PROTOCOLES OPERATOIRES

Nous utiliserons pour toutes nos expériences des rats de souche WISTAR mâles, pesant de 240 à 310 g, hébergés à cinq par cage (44 x 29 x 18 cm), pendant cinq à sept jours avant utilisation. Ils ont pendant ce temps libre accès à l'eau et à la nourriture, et ils sont placés dans des pièces à cycles circadiens réguliers (lumière de 6 h 00 à 18 h 00), à taux d'humidité de $55 \pm 20\%$, à une température ambiante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$.

Pour l'opération en vue de l'étude dans des conditions physiologiques, les rats sont anesthésiés, puis placés sur l'appareil de contention stéréotaxique, où la fibre de microdialyse est implantée dans l'hippocampe. Les échantillons sont prélevés 24 h après. Durant la nuit, les animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau, et sont toujours sous l'effet des mêmes conditions de lumière, température, humidité citées ci-dessus. Le lendemain, des échantillons sont prélevés toutes les 20 minutes et dosés par CLHP.

Pour l'ischémie, après l'anesthésie, les animaux subissent une opération consistant à cautériser les deux artères vertébrales et à préparer les deux artères carotides de façon à pouvoir les clamper et les déclamper au moment voulu. Ensuite, La fibre de microdialyse est placée, l'animal restant sous le coup de l'anesthésie. Le dosage est effectué le lendemain, sur des échantillons prélevés toutes les 10 minutes.

I. ISCHEMIE TRANSITOIRE GLOBALE, TECHNIQUE DE L'OCCLUSION DES 4 VAISSEAUX

Les animaux sont préalablement anesthésiés par 400 mg/kg d'hydrate de chloral (demi-vie : 4 à 9,5 heures d'après Goodman and Gilman's (32) par voie intra-péritonéale. solvant : eau distillée (40 mg/ml), soit une injection de 1 ml/100 g. L'installation de l'anesthésie est rapide (quelques minutes) et dure environ 2 h ce qui laisse le temps d'opérer dans de bonnes conditions.

Nous utiliserons une technique dérivée de celle de Pulsinelli et col., 1979 (75). On prépare d'abord les deux carotides communes. En dégagant bien les muscles du cou, on a facilement accès à ces vaisseaux, (voir planche A). On désolidarise l'artère du nerf sympathique accolé. Des cathéters (*Sani-Tech, tube silicone de qualité médicale* diamètre externe 1,19 mm, diamètre interne 0,64 mm), passés de part et d'autre de la carotide sont enchâssés dans une petite pièce ronde en plastique souple et noués à 5 mm au-dessus de l'artère. Au moment du clampage, cette pièce servira d'appuis au système pour maintenir la fermeture serrée.

L'animal est ensuite placé sur un appareil à stéréotaxie (*David Kopf instruments*, dont les barres d'oreilles ont été modifiées pour faciliter l'entrée de la fibre transversalement) afin de procéder à la cautérisation des artères vertébrales. Les muscles de la nuque sont incisés sur 2 cm environ. Les *alar foraminae* de l'atlas, sous lesquelles cheminent les artères vertébrales sont dégagées (voir planche B). Elles sont cautérisées par un thermocoagulateur avec une

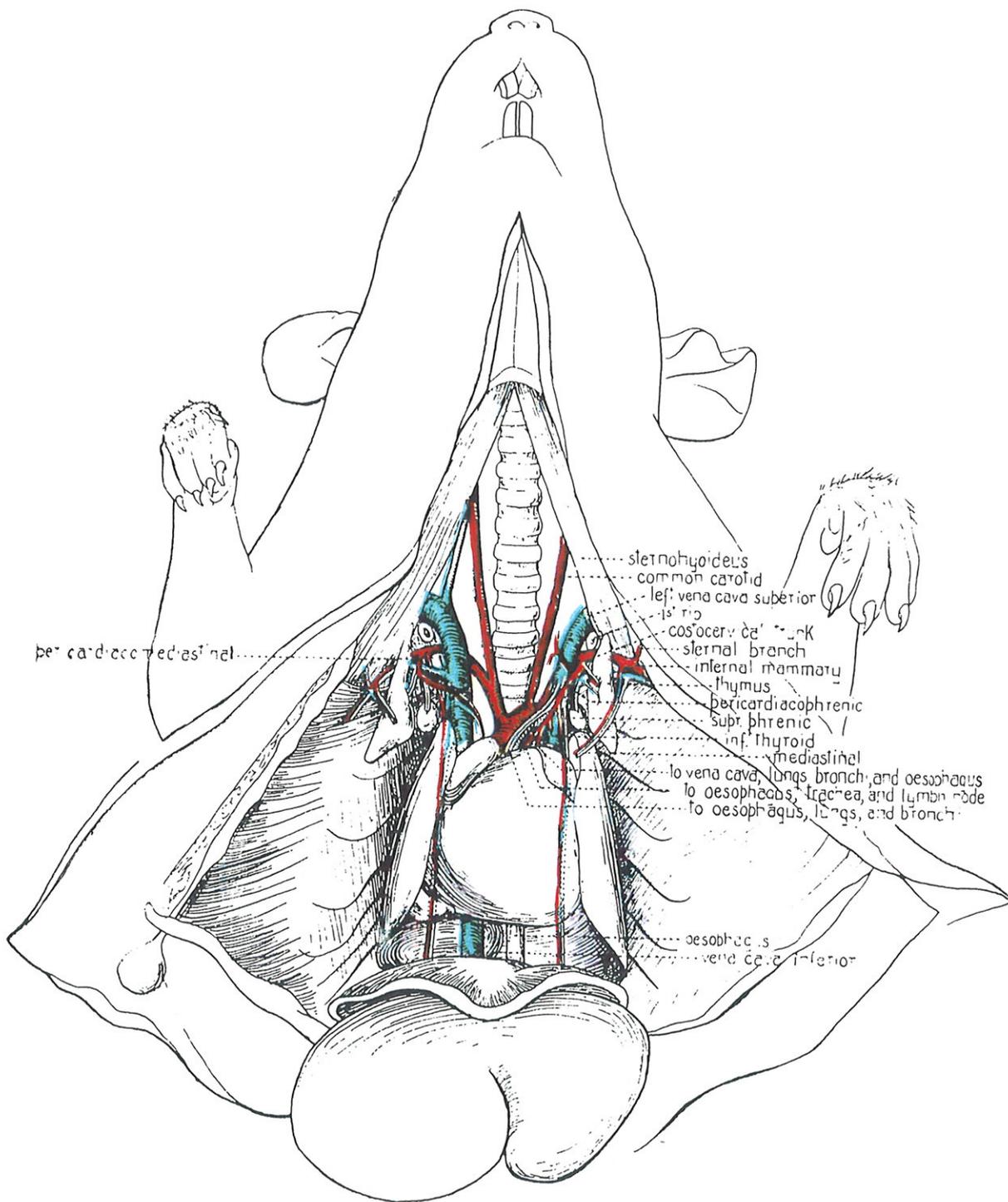


Planche A : position des carotides communes par rapport à la trachée (d'après 34).

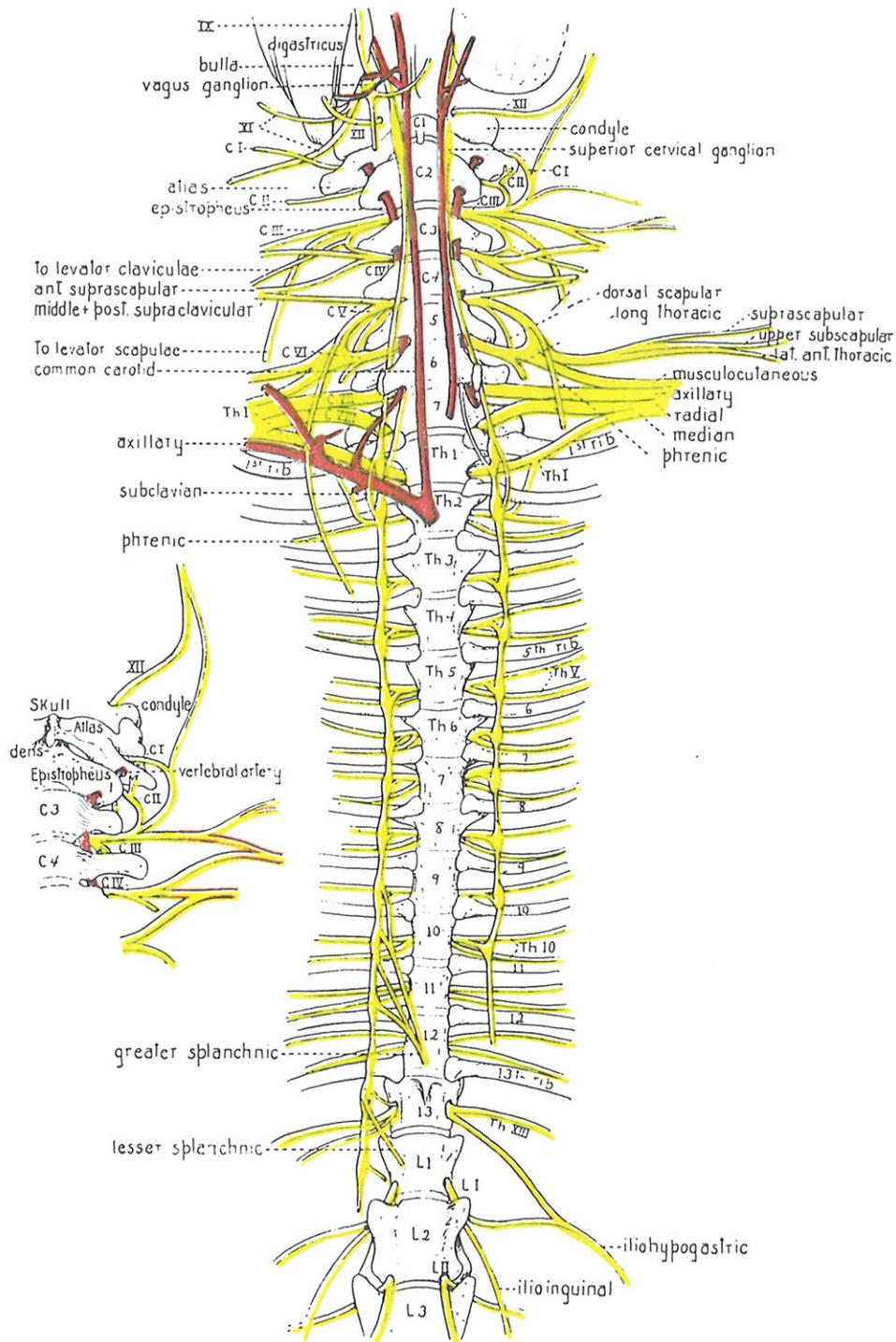


Planche B : présentation du parcours des artères carotides communes et vertébrales le long de la colonne. Les alar foraminae sont les trous présents sur les ailes des premières vertèbres. l'atlas présente l'alar foraminae la plus accessible (d'après 34).

pointe de 0,3 mm de diamètre. Ainsi, lorsque les carotides seront clampées, l'irrigation du cerveau ne sera plus assurée que par la seule artère spinale, que l'on peut voir sur la figure 11.

II. OPERATION DE MISE EN PLACE DE LA FIBRE DE MICRODIALYSE

II.1. Préparation de la fibre

Les fibres que nous utiliserons sont issues des dialyseurs Hospal (type :AN 69-HF™).

- ☞ diamètre externe : 320 μm .
- ☞ diamètre interne à sec: 220 μm .
- ☞ humide : 240 μm .
- ☞ composition : copolymère de sulfonate de méthallyl acrylonitrile de sodium.
- ☞ seuil de coupure à 44 000 daltons.

Un mandrin en tungstène (diamètre :127 μm), meulé en pointe à un bout est glissé à l'intérieur, ceci afin de rigidifier la fibre pour l'introduire dans le cerveau. Une canule (longueur 1 cm, diamètre externe 350 μm) est collée à la fibre avec une colle époxy. Enfin, des marques sont apposées, délimitant les zones de dialyse (fig. 12). Les zones non dialysées et les parties extérieures au cerveau sont enduites d'une très fine couche de colle (17). Ces zones sont déterminées grâce aux coordonnées stéréotaxiques de l'atlas de G. Paxinos et C. Watson (71).

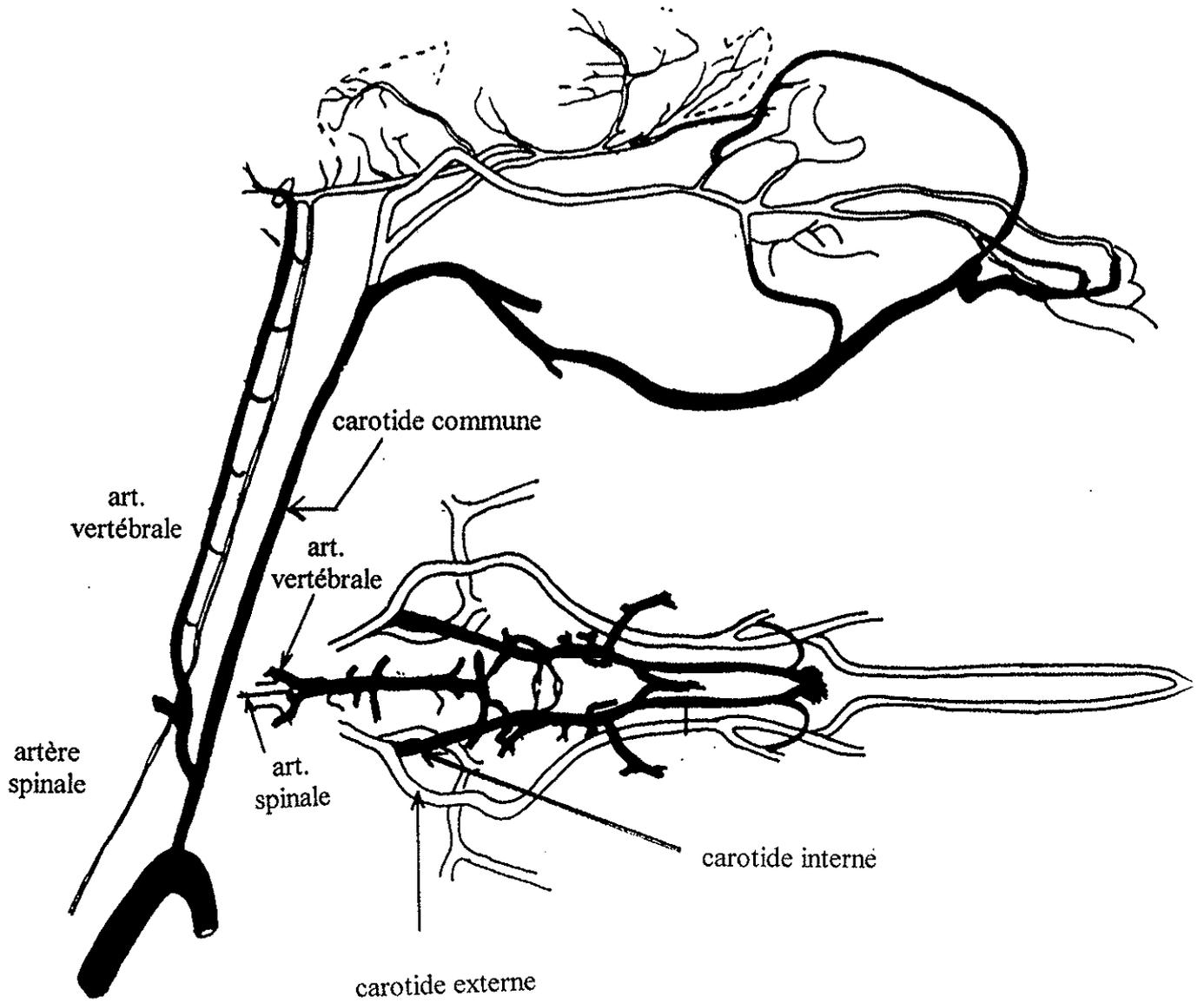


figure 11 : circulation cérébrale chez le rat (83).

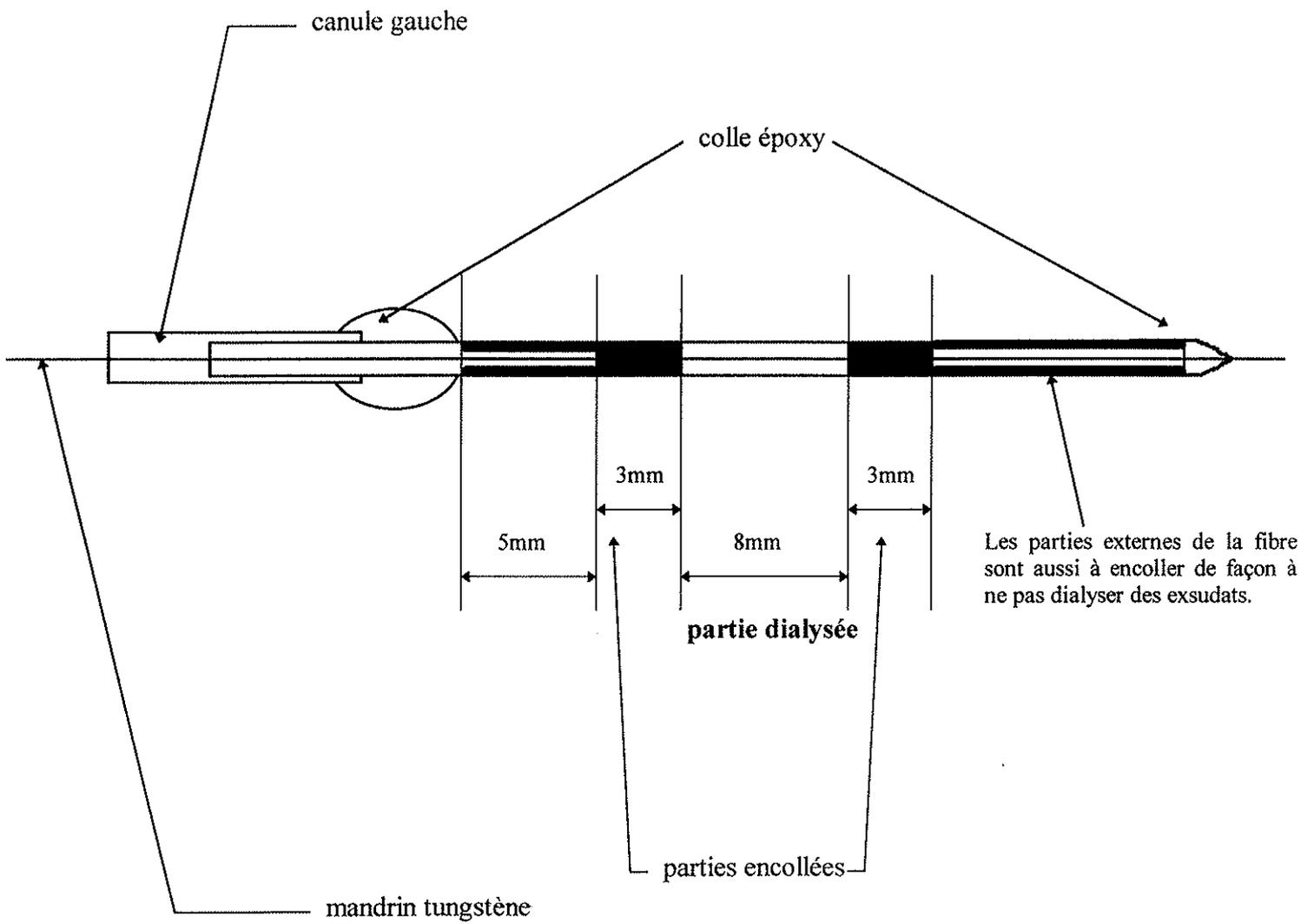


figure 12 : aspect de la fibre avant implantation.
(échelle non respectée)

II.2. Pose de la fibre de microdialyse dans l'hippocampe

- ☞ L'animal est placé sur l'appareil à stéréotaxie (identique à celui décrit plus haut), les muscles latéraux sont sectionnés et dégagés jusqu'à l'os (38).
- ☞ deux trous de 2 mm de diamètre sont pratiqués de part et d'autre de la tête du rat, aux coordonnées stéréotaxiques suivants :
 - axe antéropostérieur : - 3,3 mm
 - axe vertical : - 3,5 mm

Ces coordonnées sont mesurées à partir du bregma, en accord avec l'atlas de Paxinos et Watson (voir planche C, les axes de coordonnées et l'origine du repère : le bregma, et planche D, une coupe transversale tirée de l'atlas de Paxinos et Watson, montrant le positionnement de l'hippocampe et justifiant les coordonnées que nous avons choisies).

- ☞ La dure-mère est incisée de chaque côté.
- ☞ La fibre est introduite dans le cerveau grâce au bras de l'appareil. Il est important de la faire pénétrer le plus lentement possible afin de minimiser les lésions.
- ☞ Une fois la fibre mise en place, le mandrin est coupé, retiré, puis nous collons une canule à l'extrémité droite de la fibre. La partie gauche étant toujours maintenue par le bras.
- ☞ Les parties externes sont remontées sur le crâne, enchâssées dans un petit tube plastique, le tout étant rigidifié et solidarisé au crâne par du ciment dentaire (*Duralay, Dental Mfg. Co., USA*).
- ☞ La peau est suturée.

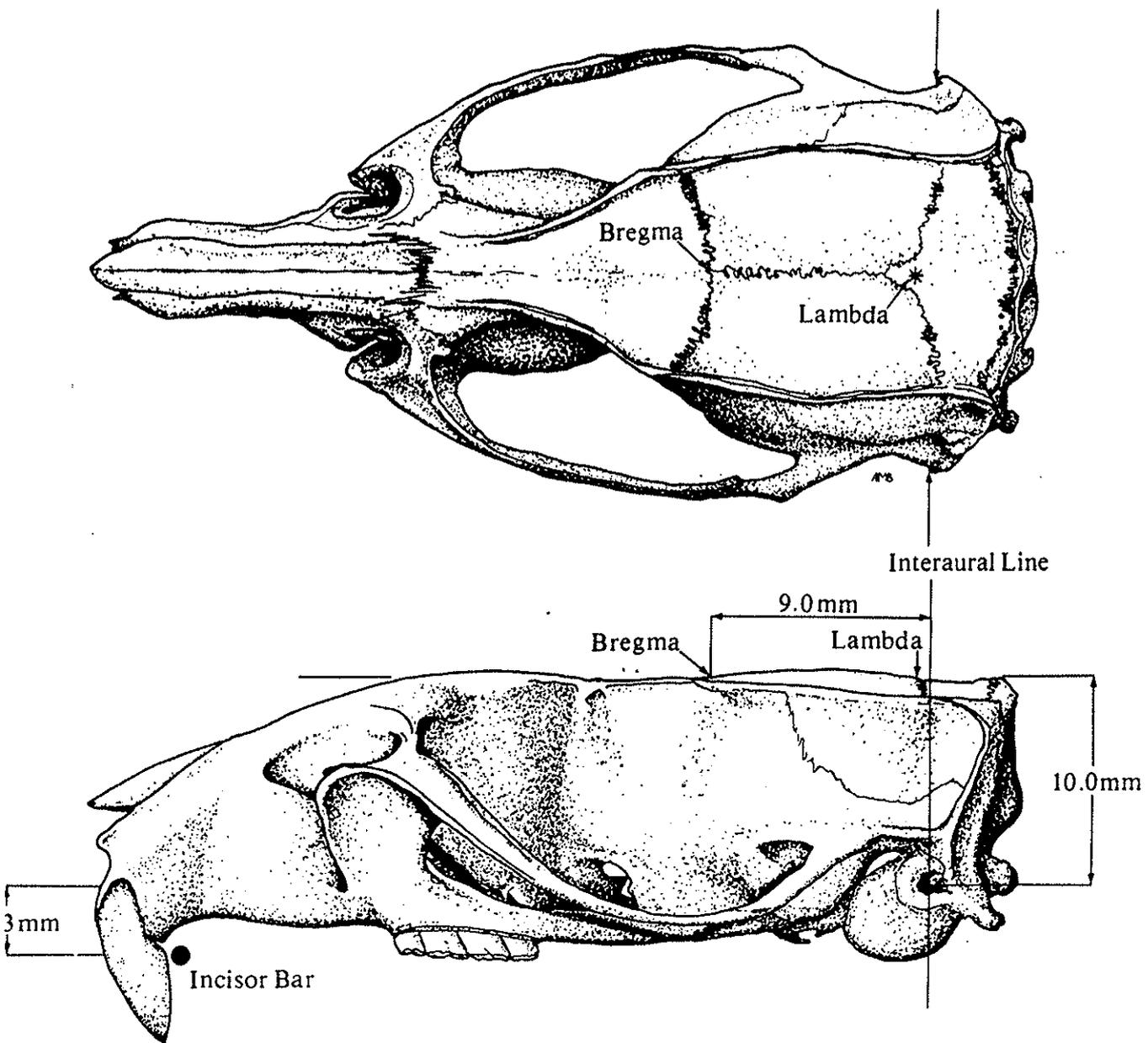


Planche C : Axes de coordonnées stéréotaxiques, mise en évidence du Bregma, d'après l'atlas Paxinos et Watson 1986 (71).

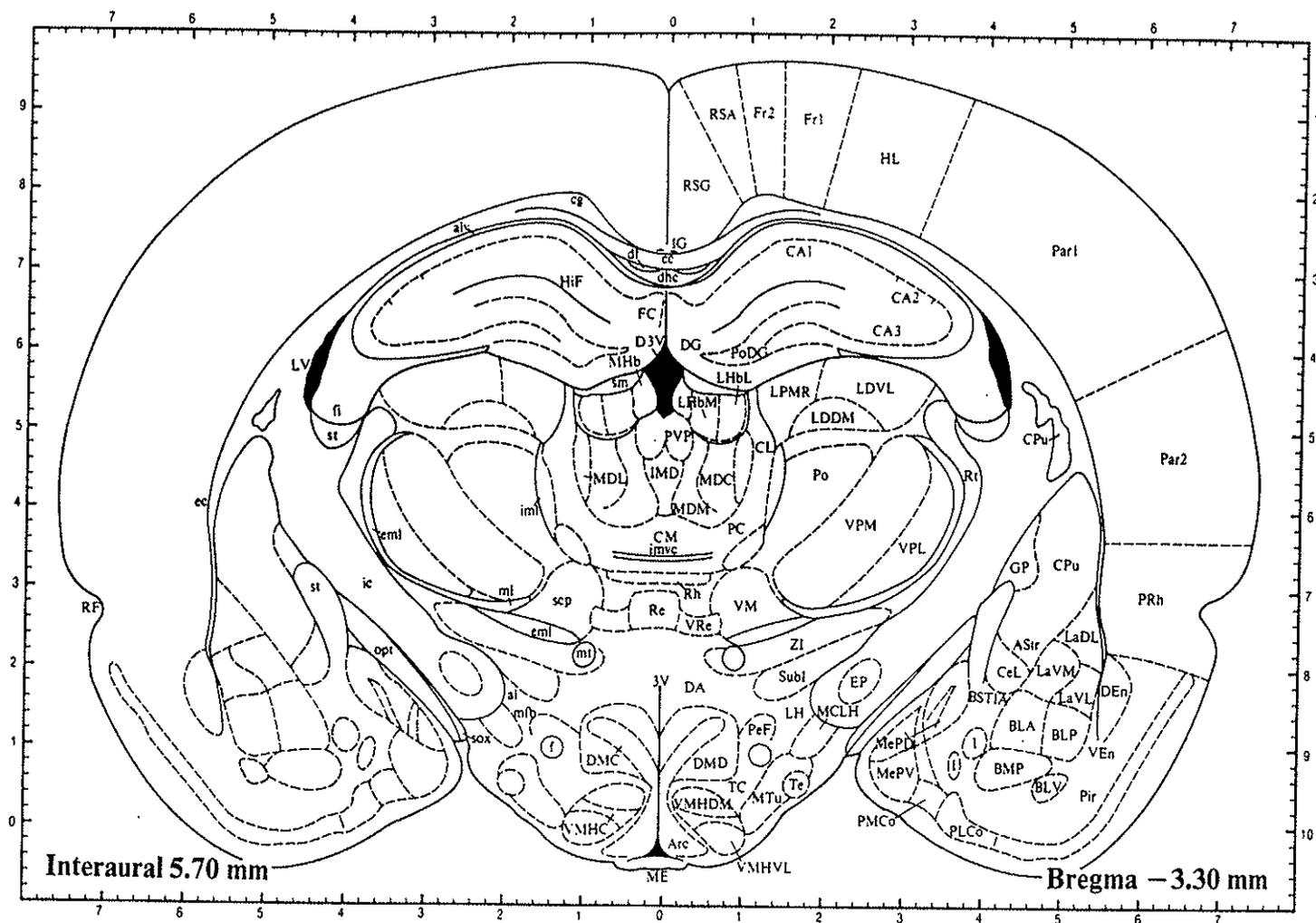


Figure 31

- | | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 3V 3rd ventricle | D3V dorsal third ventricle | HIF hippocampal fissure | LV lateral ventricle | PeF perifornical nu | st stria terminalis |
| al ansa lenticularis | DA dorsal hypoth area | HL hindlimb area of cortex | MCLH magnocellular nu lat hypoth | Pir piriform cortex | Subl subunclear nu |
| alh alveus hippocampus | DEN dorsal endopiriform nu | I intercalated nuclei amygdala | MDC mediadorsal thal nu, central | PLCo posterolateral cortical amyg nu | TC tuber cinereum |
| Arc arcuate hypoth nu | df dorsal fornix | ic internal capsule | MDL mediadorsal thal nu, lateral | PLNCo posteromedial cortical amyg nu | Te tere hypoth nu |
| AStr amygdalostratial transition area | DG dentate gyrus | IG indusium griseum | MDM mediadorsal thal nu, medial | Po posterior thal nuclear group | VM ventromedial thal nu |
| BLA basolateral amygdaloid nu, ant | dhc dorsal hippocampal commissure | IMD intermediodorsal thal nu | ME median eminence | PRh perirhinal cortex | VMHC ventromedial by nu, central |
| BLP basolateral amygdaloid nu, post | DMC dorsomedial hypoth nu, compact | iml internal medullary lamina | MePD medial amyg nu, posterodorsal | PRh perirhinal cortex | VMHDM ventromedial by nu, dorsomed |
| BLV basolateral amygdaloid nu, vent | DMD dorsomedial hypoth nu, diffuse | imve intermediodorsal thal com | MePV medial amyg nu, posteroventral | Re reunions thal nu | VMHVL ventromedial by nu, ventrolat |
| BMP basomedial amygdaloid nu, post | ec external capsule | LaDL lateral amygdaloid nu, dorsolateral | MFB medial forebrain bundle | RF rhinal fissure | VPM ventral posteromedial thal nu |
| BSTIA bed nu st, intraamyg div | eml external medullary lamina | LaVL lateral amyg nu, ventrolateral | MHB medial habenular nu | RSA retrosplenial granular Cv | VPL ventral posterolateral thal nu |
| CA1-3 fields CA1-3 of Ammon's horn | EP epiopticular nu | LAVM lateral amyg nu, ventromedial | ML medial lemniscus | RSG retrosplenial granular Cv | VRe ventral reunions thal nu |
| cc corpus callosum | f fornix | LDVM laterodorsal thal nu, dorsomedial | MTu medial tuberal nu | Rh rhomboid thal nu | ZI zona incerta |
| CeL central amygdaloid nu, lateral | FC fasciola cinereum | LDVL laterodorsal thal nu, ventrolateral | opt optic tract | Ri reticular thal nu | |
| cg cingulum | fi fimbria hippocampus | LH lateral hypoth area | Par1 parastal cortex, area 1 | Scp superior cerebellar peduncle | |
| CL ventral lateral thal nu | fl fimbria hippocampus | LHBL lateral habenular nu, lateral | Par2 parastal cortex, area 2 | sm supraoptic decussation | |
| CNI ventral medial thal nu | fr frontal cortex, area 1 | LHBM lateral habenular nu, medial | PoDG polymorph layer dentate gyrus | | |
| CPu caudate putamen | Fr2 frontal cortex, area 2 | LPMR lat post thal nu, mediodorsal | PC paracentral thal nu | | |
| | GP globus pallidus | | | | |

Planche D : Coupe transversale du cerveau de rat, correspondante à un rat de poids moyen 250 g, à -3,30 mm du Bregma (71).

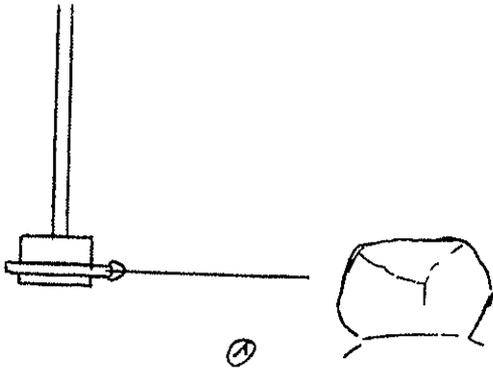
L'acte chirurgical est terminé. La figure 13 résume les principales étapes de la mise en place de la fibre.

II.3. Précautions postopératoires

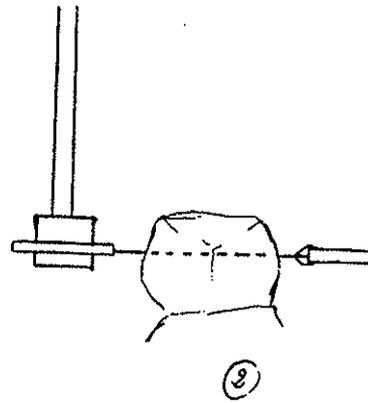
Une perfusion de *Ringer* à 2,2 μl / min. est tout de suite appliquée de façon à vérifier le bon écoulement, à nettoyer l'intérieur de la fibre, à éliminer les premières libérations de glutamate, très puissantes et peu stables pendant les premières heures après l'opération.

avec la pompe et le système collecteur. On pose également un collier de serrage autour du cou du rat. Il servira de soutien au bras de la rehausse de cage.

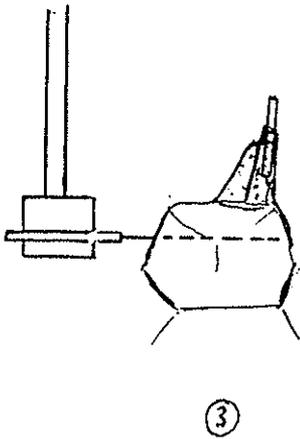
Le dosage ne se fera que 24 h après, on élimine ainsi les interactions possibles avec l'anesthésique ; de plus, on est assuré que le rat a eu le temps de retrouver le calme, et « de se remettre de son opération », les taux de glutamates reviennent à des valeurs stables.



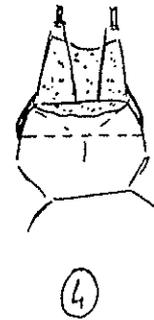
Fibre fixée sur le bras de l'appareil à stéréotaxie, elle va pénétrer dans le cerveau à faible vitesse.



Une fois la fibre en place, le mandrin est ôté et on colle une canule à la sortie.



Fixation du côté droit par du ciment dentaire. Le côté gauche reste solidaire du bras.



Fixation de la partie gauche. Le ciment recouvre la quasi totalité de la partie dégagée du crâne.

figure 13 : étapes schématiques du positionnement de la fibre de microdialyse.

PROTOCOLES EXPERIMENTAUX, 24 HEURES APRES LA PHASE OPERATOIRE

I. INDUCTION DE L'ISCHEMIE SUR DES RATS VIGILES

I.1. Obturation des carotides (clampage)

Les cathéters qui sortent du cou sont tirés et enchâssés dans un cône en plastique pourvu d'une entaille, cette dernière les maintient serrés en position tendue. Ainsi, la rondelle de plastique appuie contre l'artère et la clampé. Voir schéma ci-dessous.

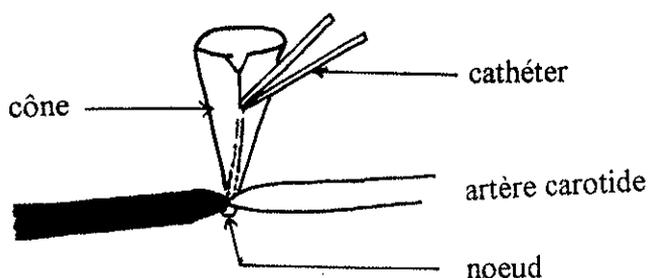


Figure 14 : schéma de clampage d'une carotide. Le cône appuie sur la rondelle qui écrase l'artère.

Pour vérifier la qualité de l'ischémie provoquée, nous observerons 4 critères décrits par Pulsinelli et col.(71) :

- ☛ Tentative de fuite, qui a lieu dans les secondes suivant le clampage, l'animal essaie de sauter hors de la cage dans des mouvements impulsifs et violents.
- ☛ Perte du réflexe de retournement. Le rat ne doit faire aucun mouvement réflexe pour retrouver sa stabilité sur ses pattes. Il reste sur le dos tant que le cerveau n'est pas irrigué. Ce test est le plus important, si le rat retrouve son réflexe de retournement, l'ischémie n'est pas réussie.
- ☛ Tension des pattes. Le rat garde ses pattes avant en position tendue.
- ☛ Tout le corps de l'animal est maintenu par un tonus musculaire assez important, la rigidité persiste tout au long de la durée de l'ischémie.

Afin de caractériser le degré d'efficacité du clampage, nous noterons la symptomatologie observée de la façon suivante :

- 0 Pas de perte de conscience, ni du réflexe de retournement.
- + Symptomatologie incomplète et de courte durée (l'animal se remet sur ses pattes en moins de 10 minutes).
- ++ Il n'y a pas de tentative de fuite, l'animal peut se retourner un peu avant la fin des trente minutes.
- +++ Symptomatologie complète.

I.2. Reperfusion des carotides (déclampage)

Les cônes sont retirés, les cathéters sont coupés, le cerveau est alors remis sous perfusion, peu à peu, le rat retrouve son réflexe de retournement.

II. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS

Qu'il s'agisse d'un rat ischémié ou non, le lendemain de l'opération, les échantillons sont prélevés et analysés. Par convention, nous connecterons la pompe de microdialyse (type CMA 100, distributeur : PHYMEP, France) par la canule droite, et au système collecteur par la gauche. La solution de dialyse doit être à température ambiante afin d'éviter la formation de bulles d'air. Elle sera poussée par une seringue en verre parfaitement propre à un débit de 2,2 $\mu\text{l}/\text{min}$. A la sortie de la fibre, elle sera recueillie et maintenue à basse température.

II.1. La solution de dialyse « le liquide de Ringer »

La composition ionique du *Ringer* doit être proche de celle du liquide extracellulaire. Il doit évidemment être parfaitement propre et exempt de glutamate et d'aspartate (le tester avant chaque dosage). Sa composition dans l'eau désionisée est la suivante :

- ☞ Na^+ : 147 mM
- ☞ K^+ : 4 mM
- ☞ Ca^{2+} : 1,5 mM
- ☞ Cl^- : 154 mM

Le pH doit être proche de 6. A ce pH, plus de 99,9% du glutamate est sous forme ionisée (pK_{a1} acide glutamique / glutamate = 2,19, d'après l'index Merck).

II.2. Agencement du système

II.2.1. Rehausse de cage et bras porte-cathéters :

Une rehausse de cage, en métal est placée sur la cage en Plexiglas de l'animal afin qu'il ne puisse pas s'échapper. Cette rehausse est surmontée d'un bras muni d'un levier faisant contrepoids (voir figure 15). Ainsi, le filin soutenant le rat est toujours tendu, ce qui maintient les cathéters dans une position correcte. A l'autre bout du bras, une canule double voie permet de connecter les cathéters en laissant au rat une totale liberté de mouvements. Il peut ainsi tourner dans tous les sens sans risque de torsion des cathéters (voir figure 16).

II.2.2. Système collecteur

1) Le collecteur automatique CMA 170 réfrigéré, couplé à un transformateur est piloté par ordinateur, il permet de collecter 64 échantillons. Le temps de prélèvement et la température de l'enceinte sont programmables, les échantillons seront maintenus à 8°C.

- volume mort :	cathéter à la sortie de la fibre, soit	10 µl environ
	jusqu'à la canule double entrée	24 µl
	jusqu'au collecteur	2 µl
	aiguille interne du collecteur	11 µl
		—————
	total :	47 µl

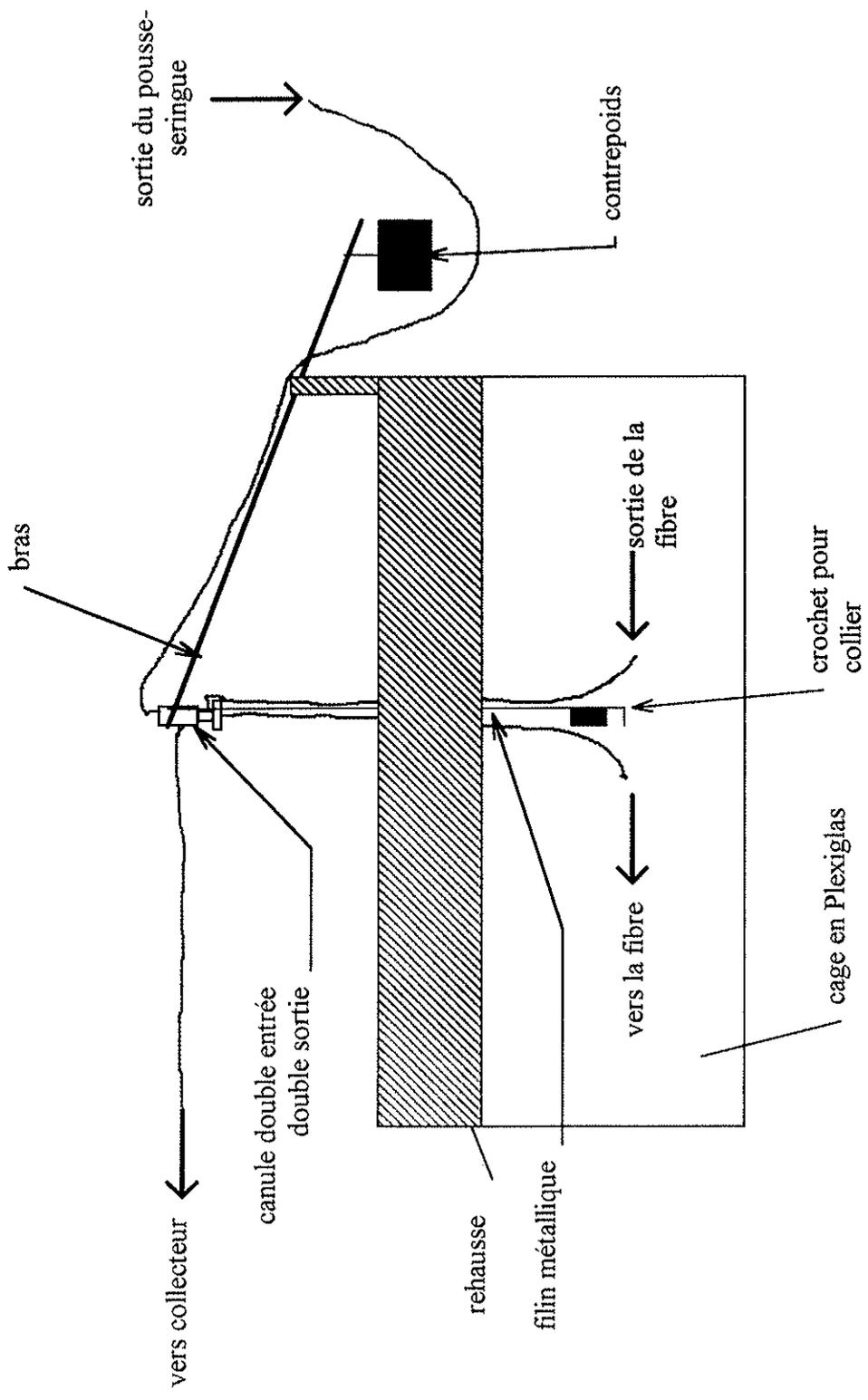


figure 15 : représentation schématique du système de maintien des cathéters.

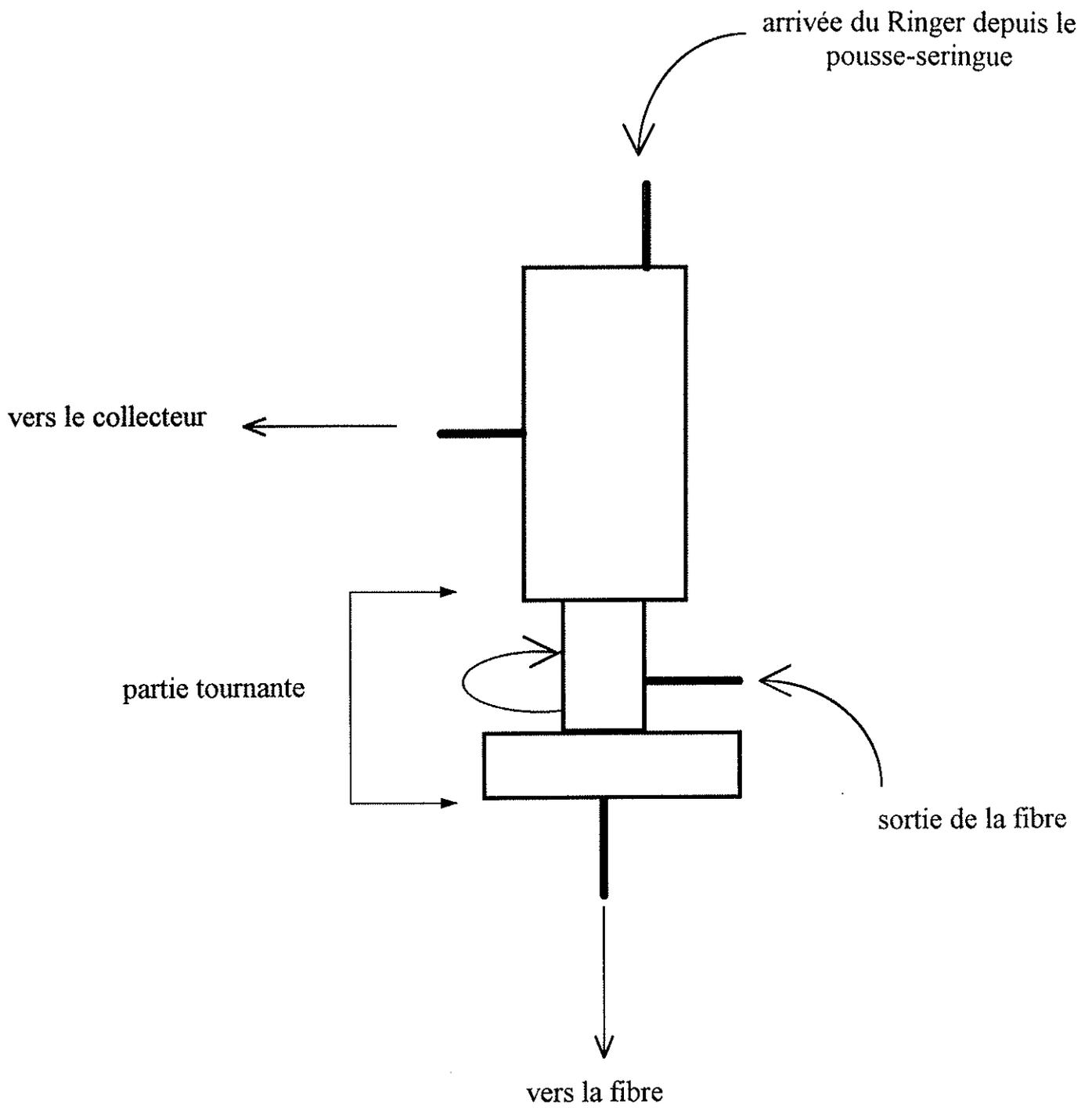


figure 16 : détail de la canule double voie, fixée sur le bras de la réhausse de cage.

Ce volume mort est important à prendre en considération si on veut établir une cinétique précise de l'apparition d'un effet sur le glutamate. Il entrera d'autant plus en jeu que le temps de prélèvement est faible. En effet, selon notre protocole expérimental (débit de la pompe de 2,2 μl / min.) pour un prélèvement toutes les 20 minutes, le volume mort représente 1 échantillon, et plus de 2 pour un prélèvement toutes les 10 minutes. C'est la raison pour laquelle nous n'utiliserons pas ce type de collecteur pour faire le dosage chez les rats ischémiés (prélèvements toutes les 10 minutes).

2) Système de prélèvement manuel : un cathéter enroulé en serpentín est fixé directement sur le cathéter de sortie. Dans ce cas, il faudra chronométrer les temps de prélèvement et stocker les échantillons au froid jusqu'à leur passage dans la chaîne de chromatographie.

- Le volume mort ici n'est représenté que par le cathéter de sortie, soit environ 10 μl . Ce qui correspond à un demi-échantillon dans le protocole du dosage sous ischémie. Cela suffit à notre analyse, si nous voulions une plus grande précision dans la cinétique, nous pourrions fixer le serpentín directement sur la canule de sortie, ce qui engendrerait des difficultés techniques importantes sur un rat vigile.

3) protocole de prélèvement : il est conforme au tableau II ci-dessous :

	Sous ischémie	Sans ischémie
Mode de prélèvement	Serpentin	Collecteur automatique
Température de maintien des échantillons une fois prélevés	Dans la glace	8°C (dans le collecteur automatique)
Nombre d'échantillons	13	16
Temps de prélèvement par échantillon	10 minutes	20 minutes
Nombre de valeurs basales prélevées avant traitement	3 (soit trente minutes)	6 (soit 2 heures)
Moment du traitement	30 minutes après le début	2 heures après le début
Moment et durée de l'ischémie	30 minutes après le traitement, et pendant 30 minutes	
Prélèvement des échantillons pendant la reperfusion	10, 20, 30, 60 minutes après l'ischémie	

tableau II : protocoles de prélèvement des échantillons

Le nombre de valeurs basales recueillies avant traitement est plus grand lorsqu'on vérifie la libération de glutamate sans ischémie, car les variations attendues sont faibles et la stabilité des valeurs basales doit donc être très sûre.

III. DOSAGE PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE, PHASE INVERSE

Les acides aminés et autres neuromédiateurs extraits du cerveau sont solubilisés dans le *Ringer* à la sortie de la fibre de dialyse. Il s'agit là d'une phase polaire, nous utiliserons donc une technique de chromatographie en phase inverse. La phase mobile étant polaire, la phase stationnaire étant lipophile (colonne C18), il se crée des échanges de solutés entre les deux phases. Chaque soluté possède un caractère hydrophile plus ou moins important, déterminant le nombre d'échanges de phase subit par chaque soluté. Ainsi, les différents neuromédiateurs peuvent être séparés. Les différents composés possèdent un temps de rétention qui leur sont propre. Nous exprimerons les ordres d'apparition des pics par le facteur de capacité K' ($K' = t_r - t_0 / t_0$), où t_r et t_0 sont respectivement les temps de rétention du composé et d'un produit non retenu dans la colonne (ici l'acétonitrile).

Nous utiliserons un tampon acétate décimolaire, de pH 6,0. Le débit de la pompe sera de 0,25 ml/min. Avant injection, une réaction de dérivation inspirée de la technique de Lindorth et Mopper, 1979 (51) sera effectuée pour synthétiser un complexe fluorescent. La colonne utilisée est de type C18 (voir caractéristiques plus loin). Enfin, la détection sera fluorimétrique. Nous n'utiliserons pas d'intégrateur de pics pour nos expériences.

III.1. Matériels utilisés

Nous utiliserons une chaîne de chromatographie CMA (Voir planche E). La colonne est de type C18 (dimensions (mm) : 200 x 2, taille des particules : 5 μ m).

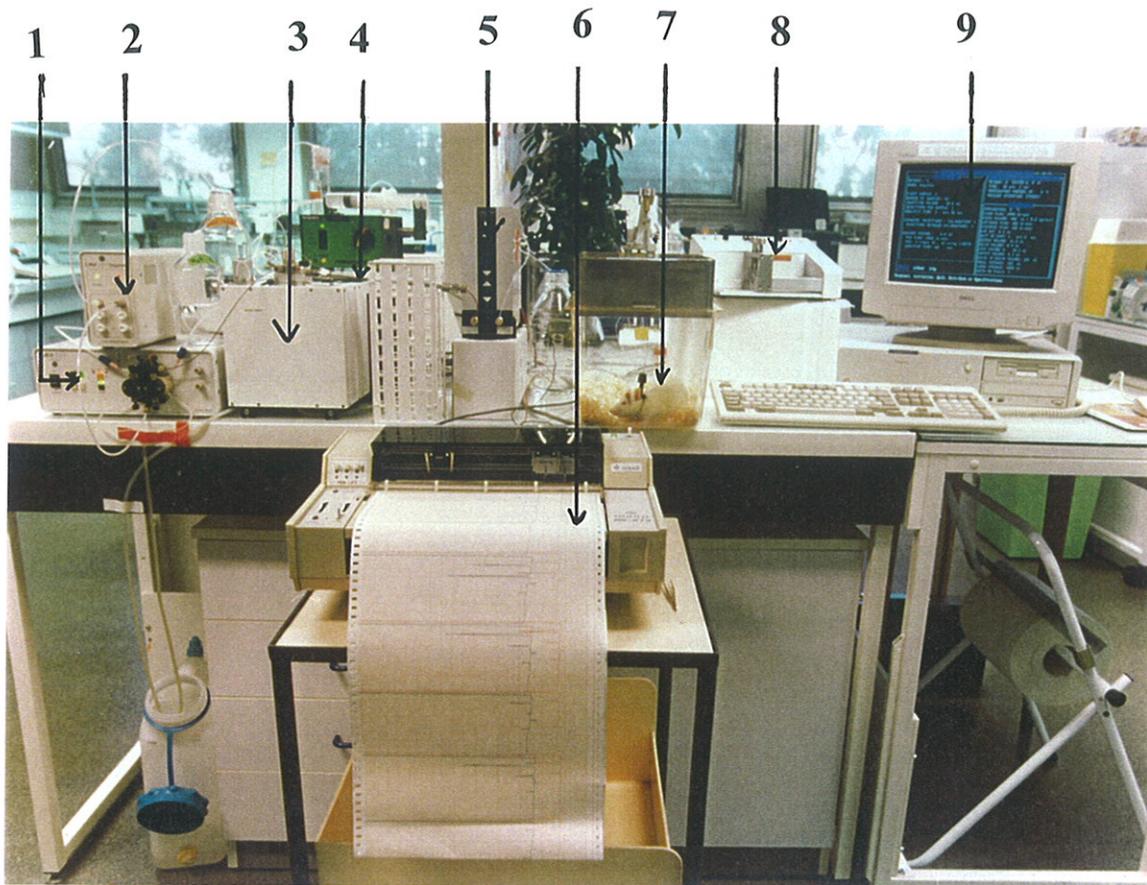
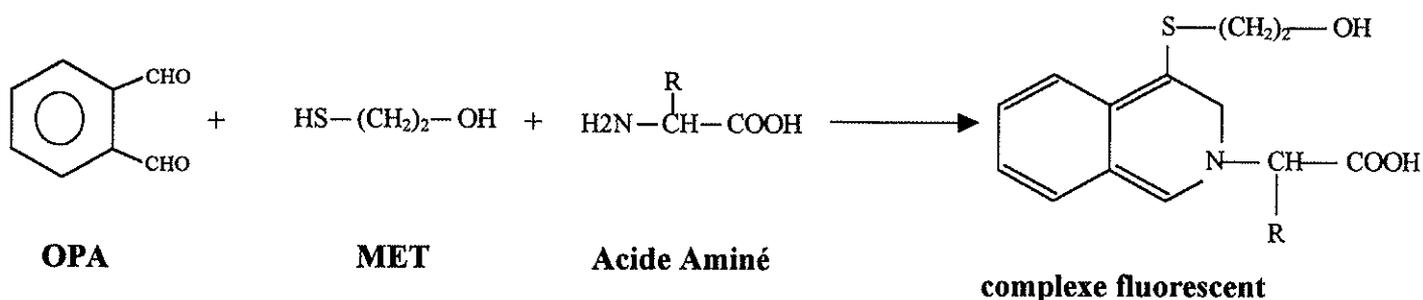


Planche E : système de prélèvement et de dosage des échantillons.

- 1 : pompe
- 2 : dégazeur
- 3 : injecteur automatique
- 4 : colonne
- 5 : détecteur fluorimétrique
- 6 : enregistreur
- 7 : rat vigile avec sa fibre de microdialyse implantée
- 8 : pousse-seringues
- 9 : pilotage informatique du système

III.2. Principe du dosage

De nombreux chercheurs ont tenté, dans les années soixante-dix, de mettre au point des méthodes de dérivation pré-colonne pour la détection en UV ou fluorescente. Il a été montré, en particulier que l'o-phthaldialdéhyde (OPA) et le mercaptoéthanol (MET) pouvaient former, dans une réaction stoechiométrique avec les acides aminés, une molécule fluorescente, facilement détectable. C'est ce principe que nous utiliserons. La réaction est la suivante :



La longueur d'onde d'excitation du complexe fluorescent sera de 320 nm. La réaction se réalise en moins de 60 secondes.

III.3. Protocole de préparation des réactifs (références en annexe 2)

- MET : On diluera le MET au 1/10^e dans le méthanol.
- Avant chaque analyse, on préparera un flacon de mélange OPA / MET (dilué) dans les proportions suivantes : - MET 14µl, OPA 1000µl. Nous appellerons ce mélange OPT.

III.4. Protocole de préparation de la phase mobile

Nous utiliserons un tampon acétate de pH 6,0, préparé selon le protocole suivant :

- ☞ Dissoudre 8,2 g d'acétate de sodium anhydre par litre d'eau (eau désionisée deux fois), soit une concentration de 0,1 M.
- ☞ Ajuster le pH à 6,0 par de l'acide ortho-phosphorique concentré.
- ☞ filtrer la solution précédente sur une membrane d'acétate de cellulose de porosité 0,20 μm (Whatman, 0,2 μm x 47 mm Φ).
- ☞ Ajouter 100 ml d'acétonitrile pour 900 ml de tampon.
- ☞ Mélanger.

Ainsi, nous obtenons une phase mobile aux caractéristiques suivantes :

- ☞ pH = 6,0
- ☞ polarité (selon Rohrschneider) : $P' = 9,76$ (77)

Cette phase mobile est préconisée par le constructeur (CMA), adaptée au dosage du glutamate et de l'aspartate. Elle permet une bonne résolution entre ces deux composés et l'obtention de facteurs de capacité acceptables. Sur une colonne neuve, nous trouvons les caractéristiques suivantes :

- $t_0 = 2,05$ min.
- $K' \text{ ASP} = 0,86$
- $K' \text{ GLU} = 2,03$
- Résolution $R = 2(\text{tr}_2 - \text{tr}_1) / (l_1 + l_2) = 6,58$

Où tr_1 et tr_2 sont respectivement les temps de rétention de l'ASP et du GLU, et l_1 et l_2 les largeurs des pics d'ASP et de GLU (distance entre les points d'intersection des tangentes au point d'inflexion $H/2$, et la ligne de base), t_0 , le temps d'apparition d'un composé non retenu (ici l'acétonitrile).

III.5. Utilisation de standards

Pour référence, nous utiliserons des concentrations standards de glutamate et d'aspartate de 1 μM (20 μl). Le protocole de dilution est le suivant :

- ☞ solution mère (SM) à 2,5 mM.
- ☞ solution fille 1 (SF1): 500 μl de SM dans 750 μl d'eau désionisée **soit 10^{-3} M**
- ☞ SF2 : 0,1 ml de SF1 dans 9,9 ml d'eau désionisée **soit 10^{-5} M**
- ☞ SF3 : 1 ml de SF2 dans 9 ml d'eau désionisée **soit 10^{-6} M**

Les 10 ml de standard μM seront ensuite répartis en tubes de 200 μl et conservés au congélateur.

III.6. Procédure de dérivation

Nous travaillerons en mode isocratique. La procédure incluant le dosage des 21 acides aminés nécessite l'emploi d'un mode gradient. De plus, toute la procédure est totalement automatisée et assistée par informatique, ce qui permet d'assurer la reproductibilité nécessaire au dosage.

Les échantillons utilisés ont un volume de 20 µl et sont placés dans de petits flacons de verre scellés d'un bouchon de Téflon. L'appareil mélange 6 µl d'OPT, puis attend 60 secondes avant que la réaction s'opère. 10 µl du mélange obtenu précédemment sont ensuite injectés dans la colonne, après une attente de 60 secondes dans la boucle d'injection.

Tous les acides aminés peuvent être détectés, l'ASP et le GLU sont élués les premiers (voir figure 17). Aussi, après le passage des deux premiers pics, l'appareil injecte 10 µl d'acétonitrile de façon à entraîner tous les acides aminés présents dans la colonne, et ramener la ligne de base à sa valeur normale.

Tous les trois échantillons, nous placerons un flacon d'acétonitrile supplémentaire pour « laver » la colonne.

Tous les 6 échantillons, nous placerons un standard pour vérifier qu'il n'y a pas de dérive dans la hauteur des pics.

IV. STATISTIQUES

Les résultats seront exprimés sous la forme de la moyenne \pm ESM (Ecart Standards à la Moyenne).

$$\text{ESM} = \text{écart type} / \sqrt{(\text{nombre de points})}$$

Les courbes subiront une analyse de variance à deux voies pour mesures répétées. Ce test permet de déterminer trois paramètres :

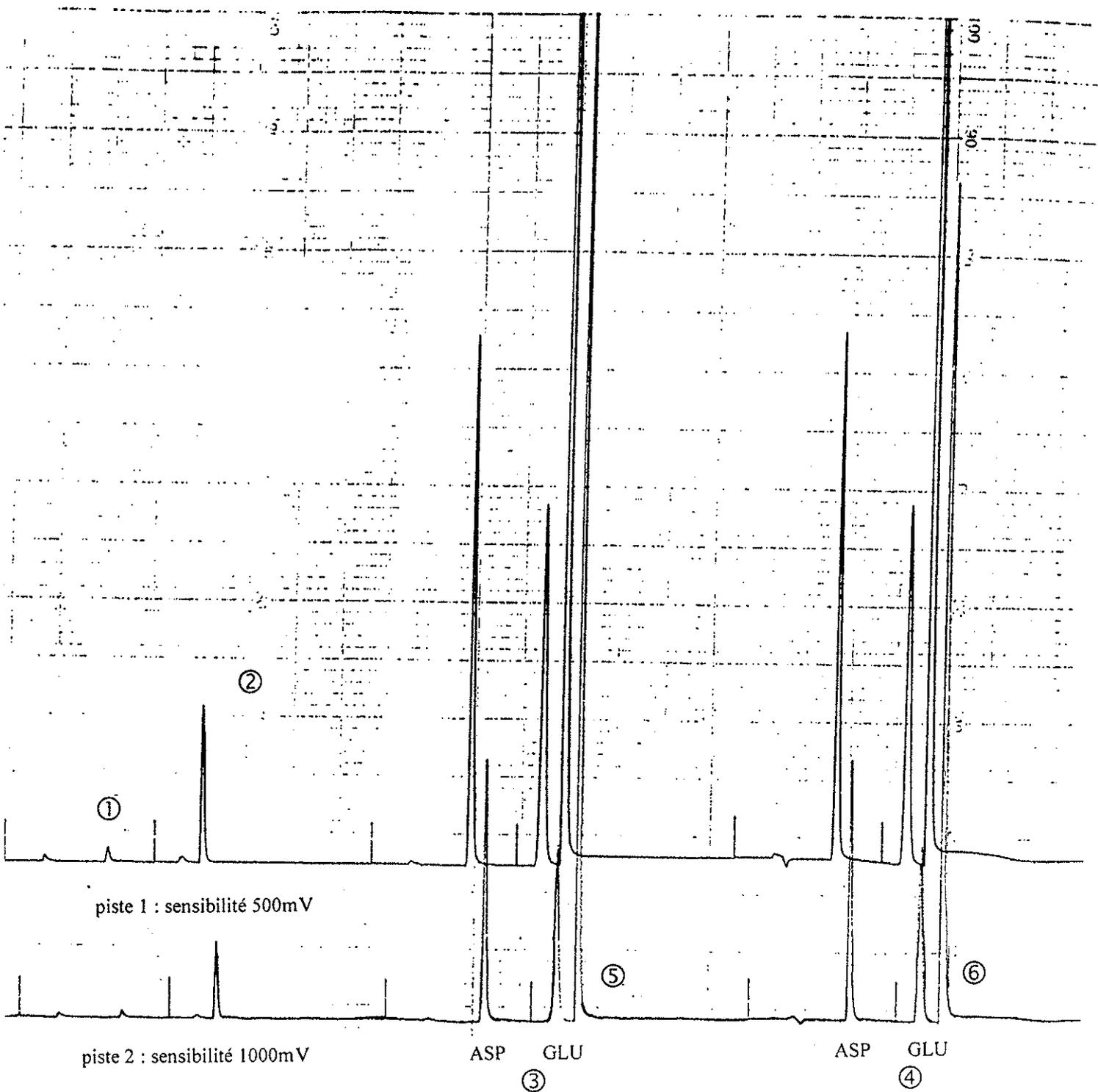


figure 17 : apparition des pics en début d'analyse (échelle 8:10).

- ① « Ringer »
- ② acétonitrile
- ③ et ④ standards micromolaires
- ⑤ et ⑥ acétonitrile destiné à laver la colonne (tous les acides aminés encore présents à l'intérieur sont élués en même temps)

- ☛ s'il y a globalement une différence significative entre les courbes (traitements)
- ☛ si les courbes évoluent différemment au cours du temps (temps)
- ☛ enfin s'il n'y a pas d'interaction entre les différents facteurs

Si ce test montre une différence entre les courbes (les trois paramètres ci-dessus sont positifs), elles seront comparées entre elles point à point et deux à deux par un test de Student en séries non appariées, afin de déterminer quels sont les points différents.

V. PRECAUTIONS

Pour l'étude dans des conditions physiologiques, seront retenus les animaux présentant au moins les trois dernières valeurs basales stables (plus ou moins 10%).

La mise en place de l'ischémie entraîne de nombreux échecs. Nous éliminerons systématiquement les animaux :

- dont les valeurs basales sont très instables ou inférieures à 10 pmol/10 µl (les augmentations de la libération de glutamate sont d'autant plus fortes que les valeurs basales sont faibles)
- dont la symptomatologie n'a pas reçue une cotation de ++ au moins
- qui ont convulsé
- qui n'ont pas retrouvé leur réflexe de retournement.

Troisième partie

RESULTATS

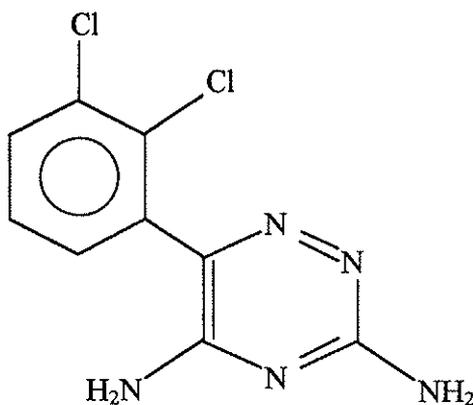
INTRODUCTION

Nous présentons ici les résultats obtenus par l'action de 2 inhibiteurs des canaux sodiques (la lamotrigine et la sipatrigine) et d'un antagoniste non compétitif des récepteurs NMDA (le MK-801) vis-à-vis de la libération de glutamate dans l'hippocampe. La lamotrigine et la sipatrigine ont fait l'objet d'études dans des conditions physiologiques et sous ischémie, tandis que l'effet du MK-801 a été vérifié uniquement dans les conditions physiologiques. Dans cette troisième partie, nous présenterons les courbes % de glutamate = f(temps). La moyenne des valeurs basales mesurées avant traitement représente 100 % de glutamate. Les taux de glutamate mesurés au cours des expériences sont compris entre 5 et 200 pmol pour 10 μ l de solution de dialyse.

En Annexe 3, seront présentées les valeurs obtenues pour chaque animal, les % de glutamate à chaque temps, la moyenne des valeurs basales (en pmol pour 10 μ l), ainsi qu'une indication de la symptomatologie observée sur les animaux ischémiés.

Remarque : l'unité pmol / 10 μ l est choisie car l'échantillon injecté dans la colonne est de 10 μ l.

EFFETS DE LA LAMOTRIGINE



3,5-diamino-6-(2,3-dichlorophenyl)-1,2,4-triazine

I. LA LAMOTRIGINE

La lamotrigine est un nouvel anti-épileptique, utilisable dans les cas réfractaires aux traitements classiques, sur des crises généralisées tonico-cloniques (8, 74). Elle est commercialisée par Glaxo-Wellcome, sous le nom de LAMICTAL[®] en France.

C'est un faible inhibiteur de la dihydrofolate réductase ; elle pourrait donc interférer avec le métabolisme des folates et provoquer des troubles hématologiques. Cependant, la

pharmacovigilance ne rapporte pas de signes d'anémies par carences folique en rapport avec le traitement. Elle possède la propriété de bloquer les canaux sodiques de façon dose-dépendante (44, 50), ce qui lui vaut des propriétés de stabilisant de membranes donc anti-convulsivantes. En particulier, elle bloque les canaux Na^+ IIA, qui représentent 80% des canaux sodiques dans l'aire CA1 de l'hippocampe (100). Elle serait probablement aussi capable de bloquer les canaux calciques (83, 94, 96).

De nombreuses études montrent que cette molécule possède des capacités de protection vis à vis des décharges nerveuses dans l'épilepsie. De plus il a été montré sur des études *in vitro* (8) qu'elle pouvait inhiber la libération de glutamate induite lors d'une dépolarisation par le chlorhydrate de vératrine ($\text{IC}_{50} = 20$ à $25 \mu\text{M}$ selon 94, 92, 95). La vératrine ouvre les canaux Na^+ et provoque ainsi la dépolarisation. Par contre ? La lamotrigine n'a pas d'effet sur une dépolarisation induite par K^+ (93). *In vivo*, des expériences sur les gerbilles (84) ou les lapins (2) ont montré que la lamotrigine pouvait protéger les neurones d'une élévation excessive de glutamate. Par contre elle ne semble pas influencer Sa libération basale (8).

La lamotrigine se présente sous forme d'une poudre blanche. Insoluble dans l'eau, elle sera mise en suspension dans un mélange aqueux méthylcellulose 0,5% et tween 80 0,2% (afin d'obtenir une suspension stable).

II. EFFETS DE LA LAMOTRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

Cette étude se fera avec deux doses de lamotrigine de 24 mg/kg puis de 72 mg/kg, administrées par voie intra-péritonéale (i.p.).

II.1. Observations symptomatologiques

A la dose de 24 mg/kg, les animaux présentent une légère sédation, et une modeste réduction de l'activité locomotrice.

A la dose de 72 mg/kg, par contre, les rats présentent une forte sédation et une réduction de l'activité locomotrice très nette.

II.2. Résultats

Après l'analyse de variance multifactorielle pour mesures répétées, nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre les courbes des rats témoins et celles des rats traités. La lamotrigine n'influence pas significativement la concentration extracellulaire basale de glutamate à 24 mg/kg et à 72 mg/kg dans l'hippocampe de rat.

III. EFFETS DE LA LAMOTRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE LORS D'UNE ISCHEMIE TRANSITOIRE GLOBALE

La dose utilisée ici sera choisie entre les deux valeurs précédemment étudiées, soit 48 mg/kg i.p..

De plus, l'équipe de A. Shuaib. en 1995 (84), démontre une nette protection vis à vis du glutamate pour les animaux traités (*versus* animaux témoins) avec la lamotrigine 25 mg/kg i.v sur une ischémie globale chez des gerbilles, ceci, dans l'hippocampe. Cette équipe précise en outre qu'il y a une très forte mortalité chez des animaux traités par 50 mg/kg i.v..

Bacher et Zornow montrent en 1997 (2) que des lapins traités par la lamotrigine (20 et 50mg/kg i.v.) sont protégés des libérations excessives de glutamate sous ischémie globale. La dose de 50 mg/kg i.v. semble significativement plus active que la dose de 20 mg/kg chez le lapin.

III.1. Observations

Il y a un chevauchement des symptomatologies imputables à la lamotrigine et à l'ischémie. Ainsi, on observe rarement la rigidité musculaire qu'il existe chez les témoins. La tentative de fuite, si elle est présente, reste de faible intensité. Par contre, les autres symptômes sont bien présents.

III.2. Résultats

L'analyse de variance multifactorielle pour mesures répétées, montre qu'il y a des différences significatives entre les courbes :

- ☛ traitements : $F(1; 168) = 50,042; p < 0,001$
- ☛ temps : $F(12; 168) = 7,878; p < 0,001$
- ☛ interactions entre les facteurs: $F(12; 168) = 9,576; p < 0,001$

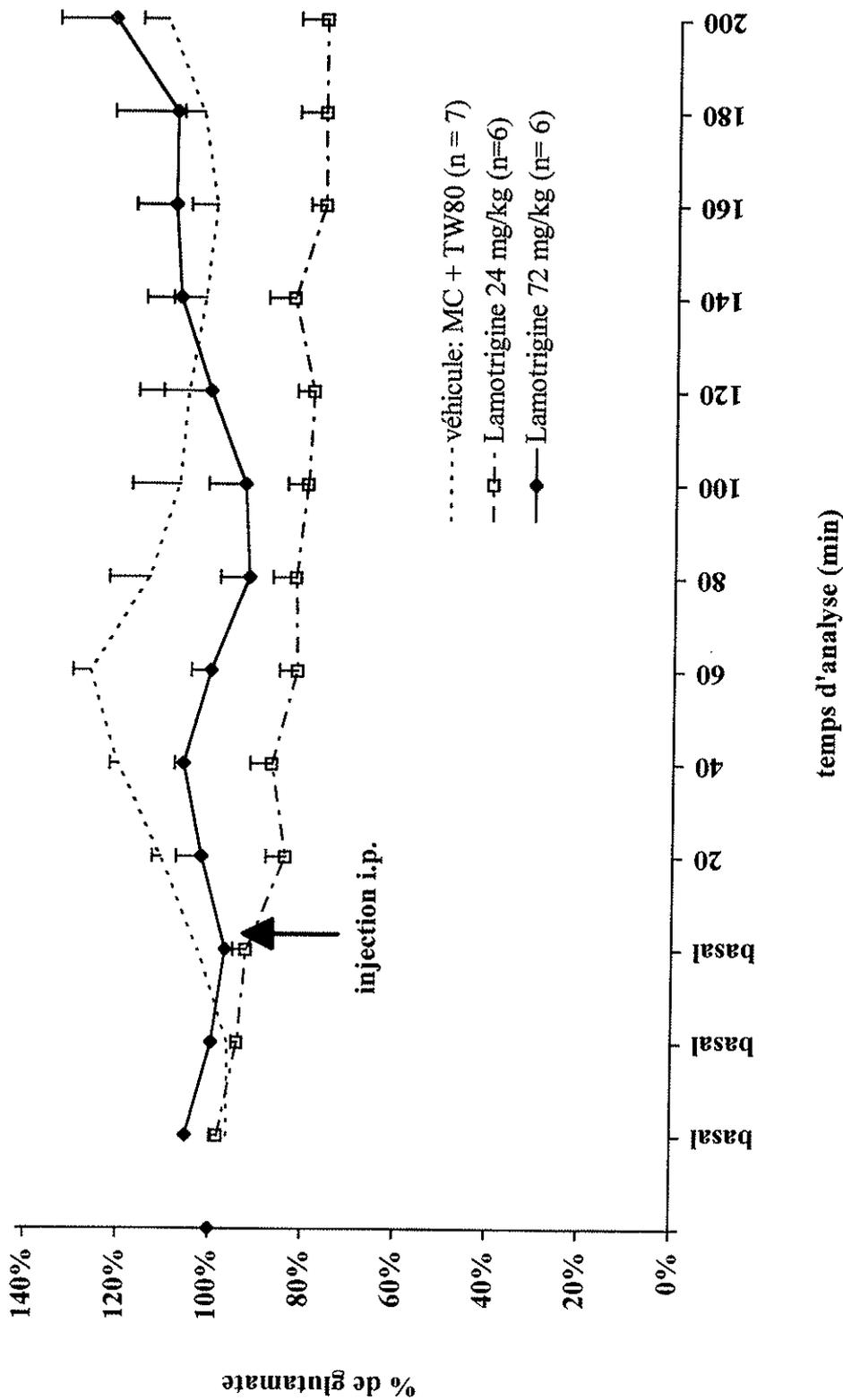
Le test de Student montre une différence très significative ($p < 0,01$) sur trois points entre les courbes témoins et traités.

III.3. Discussion

La lamotrigine inhibe la libération de glutamate de façon très significative durant toute la durée de l'ischémie. Certains auteurs ont pu montrer une protection neuronale à plus long terme (jusqu'à 28 jours) sur des études histologiques et comportementales (84).

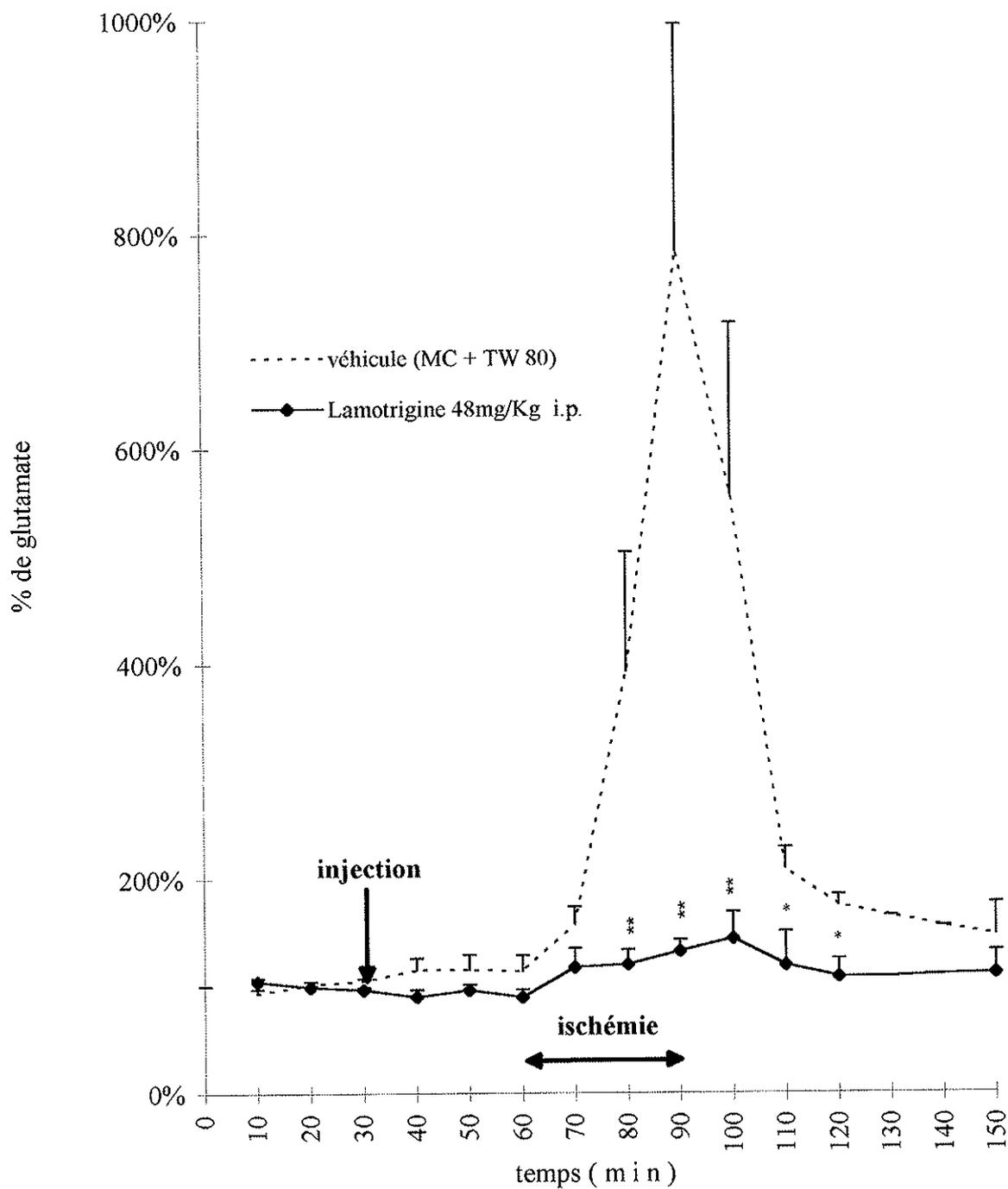
GRAPHIQUE 1

Effets de la lamotrigine 24 et 72 mg/kg i.p. sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats



GRAPHIQUE 2

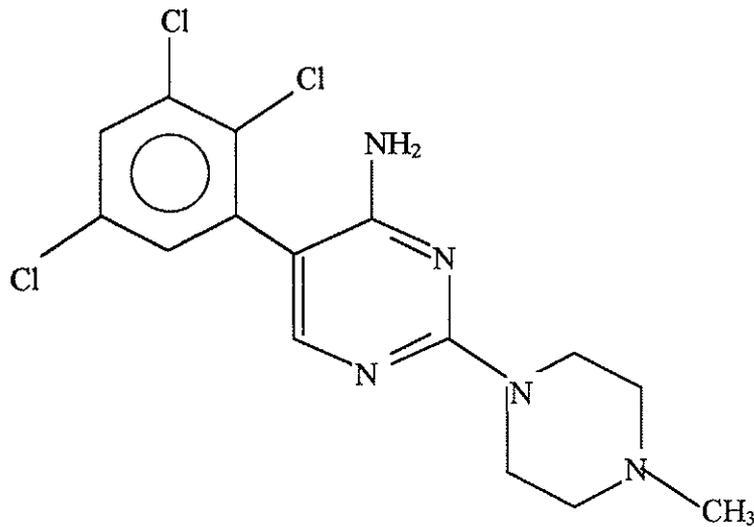
Effets de la lamotrigine 48 mg/kg sur la libération de glutamate dans l'hippocampe de rats, lors d'une ischémie globale et transitoire.



statistiques : * : significatif ($p < 0,05$)

** : très significatif ($p < 0,01$)

EFFETS DE LA SIPATRIGINE



4-amino-2-(4-méthyl-1 piperaziny)-5-(2,3,5-trichlorophenyl)pyrimidine

I. LA SIPATRIGINE

Molécule développée par Glaxo-Wellcome sous le nom de code BW619C89 pour les traitements des traumatismes cérébraux. Les recherches sur cette molécule sont allées jusqu'à la phase de recherche clinique puis ont été abandonnées suite à l'apparition d'effets secondaires gênants (hallucinations, agitations, nausées et vomissements). La sipatrigine n'a pas les effets antifolate de la lamotrigine cependant, elle est décrite comme bloqueur des canaux sodiques (33, 88). Steven et col. montrent en 1994 que la sipatrigine offre une

protection certaine contre les dégâts dus à une ischémie focale chez le rat, même si la drogue est injectée 45min après l'ischémie. De plus, elle inhibe la libération de glutamate de façon extrêmement significative ($p < 0,001$) pour une dose de 30 mg/kg i.p., 5 min avant une ischémie focale (33). En 1995, Sun et col. (88) démontrent que la sipatrigine offre une protection cellulaire post-ischémique sur les zones CA1 et CA3 de l'hippocampe tant du point de vue histologique que comportemental et ce jusqu'à deux semaines après l'ischémie. Ils montrent également qu'un maximum de protection est apporté pour une dose de 22,5 mg/kg i.v. de sipatrigine base dans le cas d'une ischémie focale.

La sipatrigine se présente sous forme d'une poudre jaunâtre, elle est soluble dans l'eau. Nous utiliserons le sérum physiologique comme véhicule, l'injection se fera par voie intra-péritonéale.

II. EFFETS DE LA SIPATRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

D'après la littérature, les IC_{50} de la sipatrigine et de la lamotrigine vis-à-vis de la libération de glutamate sont dans un rapport 4 à 5 (5 μ M pour la sipatrigine, 20 à 25 μ M pour la lamotrigine selon les auteurs). Nous emploierons la dose de 8 mg /kg.

II.1. Symptomatologie

Aucune affection symptomatologique n'est observée après injection.

II.2. Résultats

Après l'analyse de variance multifactorielle pour mesures répétées, nous constatons qu'il n'y a pas de différence significative entre les courbes des rats témoins et celles des rats traités. De même que la lamotrigine, la sipatrigine n'influence pas significativement la concentration extracellulaire basale de glutamate à 8 mg/kg dans l'hippocampe de rat.

III. EFFETS DE LA SIPATRIGINE SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE LORS D'UNE ISCHEMIE TRANSITOIRE GLOBALE

Pour des raisons matérielles (difficulté à synthétiser le produit et forte mortalité chez les animaux ischémiés), nous ne pouvons présenter ici les résultats que sur trois animaux pour le groupe des traités.

La dose utilisée est de 8 mg/kg i.p..

III.1. Résultats

L'analyse de variance multifactorielle pour mesures répétées ne montre pas de différence significative entre les groupes témoins et traités.

- ☛ traitements : $F(1; 193) = 5,137; p < 0,002$
- ☛ temps : $F(12; 193) = 15,091; p < 0,001$
- ☛ interactions entre les facteurs: $F(12; 193) = 1,439; p < 0,15$

III.2. Discussion

L'analyse de variance montre que globalement, les courbes des témoins et des traités sont différentes ($p < 0,002$). Elle montre aussi que ces courbes n'évoluent pas de la même façon au cours du temps ($p < 0,001$). Par contre, il n'y a pas d'interactions significatives entre les facteurs ($p < 0,15$), probablement due à une variabilité importante à cause du faible nombre d'animaux traités. Ceci pourrait indiquer une tendance à atténuer l'augmentation de glutamate, de même que l'aspect de la courbe (voir en fin de chapitre).

Graham et col. montrent en 1994 (33) que la sipatrigine à la dose de 30 mg/kg i.v réduit de façon extrêmement significative ($p < 0,001$) la libération de glutamate dans le cortex et significativement dans le noyau strié (*lateral caudate*), sous une ischémie focale et. Si la sipatrigine est active dans ces structures, il est donc probable qu'elle le soit aussi dans l'hippocampe...

IV. INTERPRETATION

La lamotrigine et la sipatrigine (ainsi que le BW 1003C87, dont nous ne parlerons pas ici) sont des analogues structuraux et possèdent le même mécanisme d'action vis-à-vis de l'inhibition de la libération des neuromédiateurs. Ils agissent de façon non spécifique sur la concentration de glutamate (mais aussi d'aspartate, de glycine, de thréonine ou de GABA) (33).

Dans les conditions physiologiques, la concentration extracellulaire de glutamate est la résultante des phénomènes de libération, de recapture et de métabolisme.

- ☞ La libération est représentée par l'exocytose Ca^{2+} dépendante, provoquée par une entrée de calcium dans la cellule, suite à la dépolarisation créée par un potentiel d'action, ainsi que par une libération gliale (28, 65)
- ☞ La recapture est assurée par un ensemble de transporteurs actifs très efficaces mais ne dépendant ni des canaux sodiques ni des canaux calciques. Elle est surtout imputable aux cellules gliales (65).
- ☞ Le métabolisme est intracellulaire, hors du domaine d'action des bloqueurs des canaux sodiques. Il faut noter que lors d'une ischémie, l'augmentation de la concentration en glutamate est surtout d'origine métabolique (94, 20).

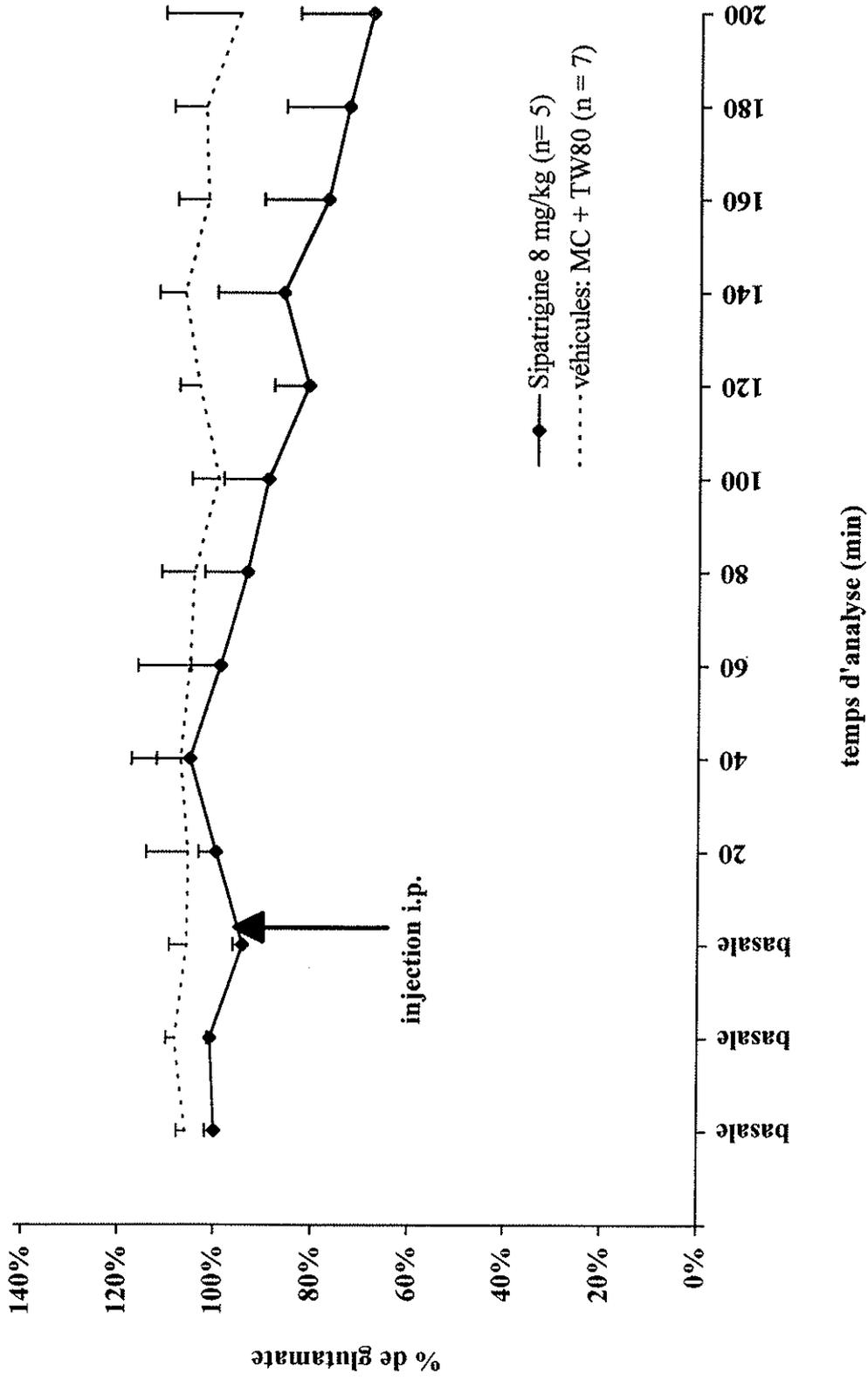
Nous constatons, en accord avec d'autres auteurs (8), que la lamotrigine et la sipatrigine n'ont pas d'effet significatif sur la concentration extracellulaire basale de glutamate dans l'hippocampe de rats. Ceci ne signifie pas qu'elle n'agit pas sur sa libération, puisqu'il a été montré que ces molécules inhibent les canaux sodiques et peut-être calciques (83, 94). Elles freinent l'exocytose Ca^{2+} dépendante. Dans ce cas, l'hypothèse que les

systemes de transport actif modulent leur action en fonction de la concentration extracellulaire pourrait expliquer ces résultats.

Lors d'une ischémie cérébrale, il y a, certes, une augmentation de l'exocytose mais surtout une inversion des systèmes de transport membranaires du glutamate. En s'opposant à la fréquence d'ouverture des canaux sodiques, la lamotrigine et ses analogues réduisent la dépolarisation, ce qui freine l'exocytose. D'autre part, le gradient de concentration de Na⁺ est moins déséquilibré, ce qui ralentit l'inversion des systèmes de transport. La recapture reste assurée, au moins partiellement par les transporteurs encore fonctionnels, en particulier ceux dépendant du chlore et du calcium. Si les canaux calciques sont aussi bloqués, l'exocytose s'en trouve d'autant amoindrie.

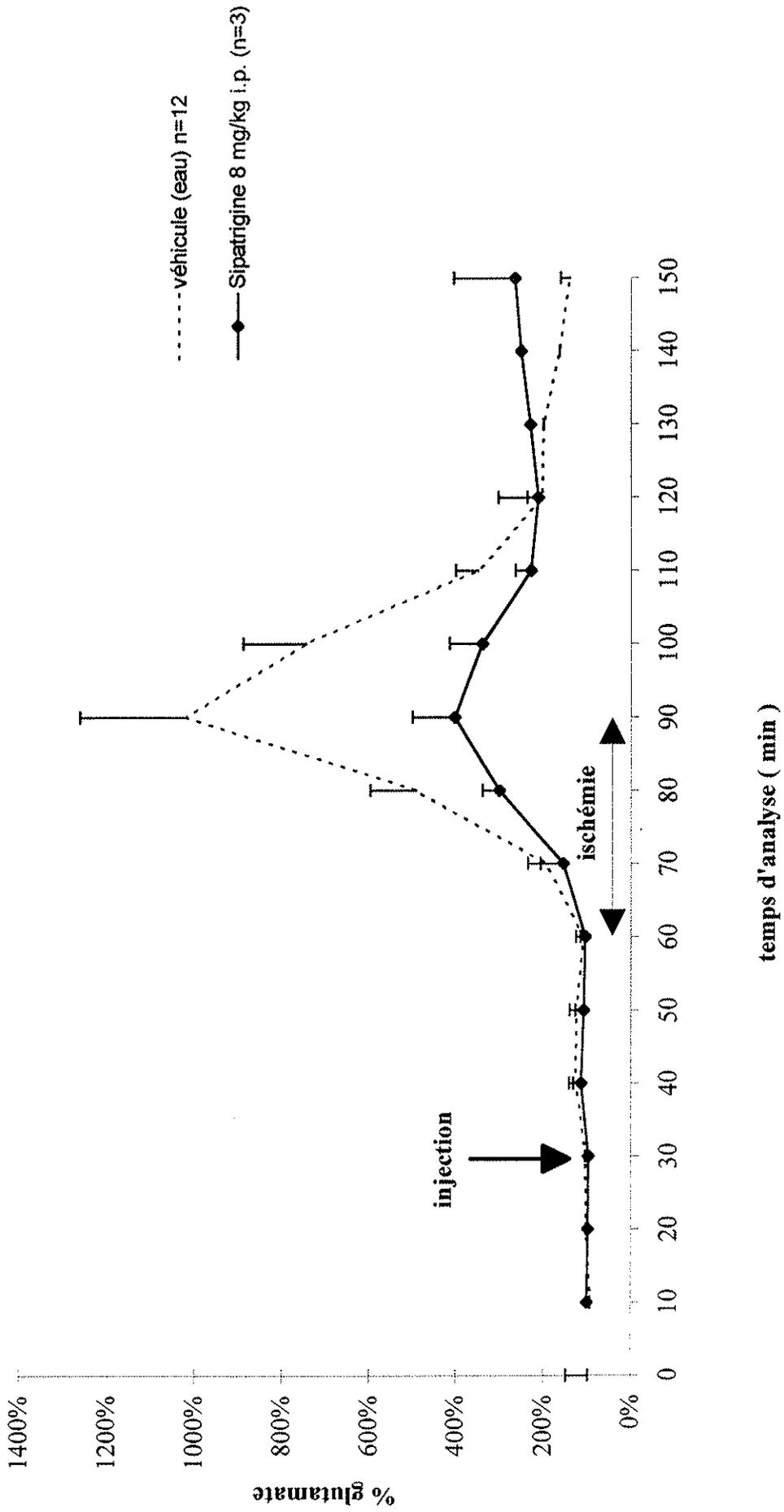
GRAPHIQUE 3

Effets de la sipatrigine 8 mg/kg i.p. sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats

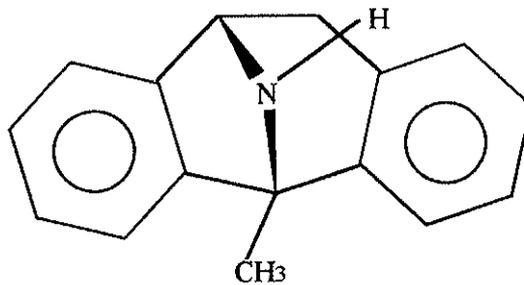


GRAPHIQUE 4

Effets de la sipatrigine 8 mg/kg i.p. sur la libération de glutamate dans l'hippocampe de rats, lors d'une ischémie globale et transitoire



EFFETS DE LA DIZOCILPINE OU MK-801



(+)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,b]cycloheptane-5,10-imine maléate

I. LA DIZOCILPINE

C'est une molécule brevetée de la firme Merck. Elle n'est pas commercialisée en thérapeutique à cause des nombreux et graves troubles neurologiques qu'elle engendre. Les recherches sur cette molécule étaient fondées sur ses capacités anti-convulsivantes et sur ses fortes potentialités dans la prévention des dégâts dus aux ischémies cérébrales.

C'est un puissant antagoniste sélectif et non compétitif du récepteur NMDA. Il bloque l'ouverture du canal ionique associé au récepteur en se fixant à l'intérieur, sur le site

PCP. Cette liaison empêche l'entrée du calcium, ce qui prévient la neurotoxicité directement liée à cet ion (69).

La dizocilpine est hautement sélective vis-à-vis du récepteur NMDA, ce qui en fait un outil largement utilisé pour évaluer le rôle de ce récepteur dans l'ischémie cérébrale.

De nombreuses études montrent l'effet de protection important qu'offre la dizocilpine vis-à-vis d'une ischémie cérébrale. Dalkara et col., 1990 (16) montrent par des études électrophysiologiques *in vivo* que le PPSE (potentiel postsynaptique excitateur) est diminué après administration de MK-801 lors d'une ischémie (versus témoins) mais ne présente pas d'effet particulier sur le PPSE dans les conditions avant ischémie. Ces résultats rejoignent ceux de Ghribi et col., 1995 (30) qui démontrent, avec la même technique de microdialyse et d'analyse que nous, que le MK-801 (perfusion pendant 40 minutes de MK-801 à 75 μ M) ne modifie pas le niveau basal de glutamate, mais par contre antagonise très significativement sa libération ainsi que celle d'aspartate lors d'une ischémie, dans le *striatum*. Streit et col., 1992 (87) montrent que l'administration de MK-801 (1 mg/kg i.m.) atténue très nettement la réaction gliale dans l'hippocampe qui précède les dommages neuronaux, suite à une ischémie globale. D'autres études montrent que le MK-801 est actif dans d'autres modèles pathologiques :

- ☞ Parkinson induit par le 1-méthyl-4-phenylpyridinium (MPP+), MK-801 à la dose de 5 mg/kg i.p. (9, 79).
- ☞ Dommages neuronaux induits par un organophosphoré (le soman), le MK-801 à la dose de 5 mg/kg i.p. prévient à la fois les crises épileptiques et les dégâts neuronaux (86).

Le MK-801 se présente sous forme d'une poudre blanche, soluble dans l'eau. Nous utiliserons l'eau comme véhicule et l'administration se fera par voie intra-péritonéale.

II. EFFETS DU MK-801 SUR LA CONCENTRATION DE GLUTAMATE DANS DES CONDITIONS PHYSIOLOGIQUES

Nous utiliserons une dose de 1 mg/kg.

II.1. Symptomatologie

Willetts et col. (99), décrivent en 1990 les affections comportementales observées chez le rat suite à l'administration d'antagonistes compétitifs ou non du récepteur NMDA.

Le syndrome PCP-like se caractérise par :

- ☞ Une augmentation de la locomotion.
- ☞ Un circling (l'animal tourne autour de la cage).
- ☞ Un head weaving (l'animal balance la tête d'avant en arrière).
- ☞ Souvent une ataxie.
- ☞ Un risque convulsif important.

Durant nos expériences, la symptomatologie observée correspond bien à celle décrite par Willetts. Les animaux s'agitent de façon importante environ 10 minutes après

l'injection, on observe bien le circling et le head weaving, cependant, aucune convulsion n'est apparue. L'agitation s'est prolongée toute la durée de la manipulation.

II.2. Résultats

La courbe des rats témoins et celle des rats traités ne diffèrent pas significativement. Il n'y a pas non plus d'évolution significative de la concentration en glutamate dans le temps.

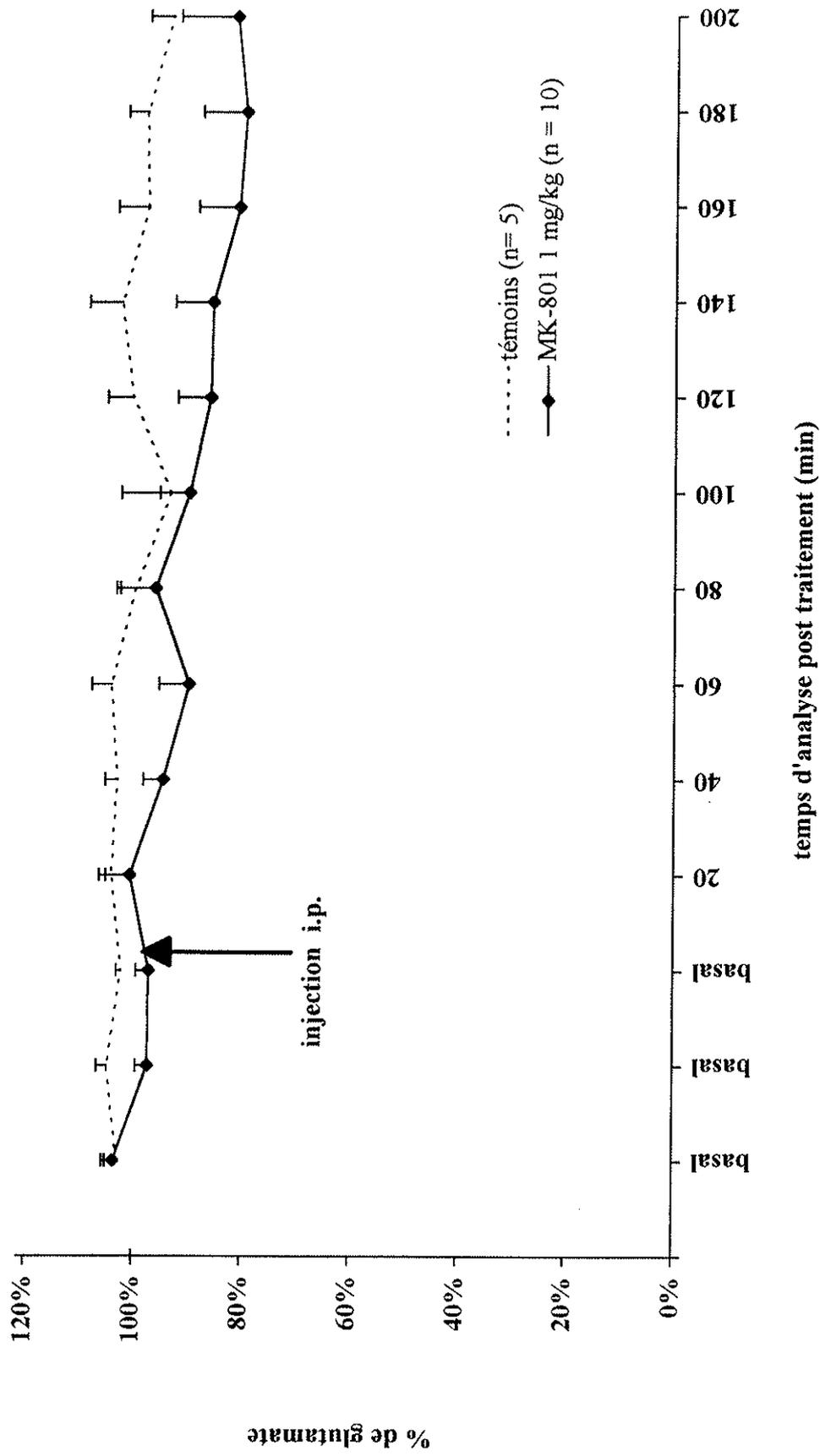
II.3. Discussion

A la dose de 1 et 3 mg/kg i.p., Ghribi montre en 1994 (31) que le MK-801 n'a pas d'effet sur la concentration basale de glutamate et d'aspartate dans le noyau strié et l'hippocampe, en accord avec les travaux cités plus haut. Nous confirmons ici ce résultat. Il constate cependant, qu'à ces doses, le MK-801 n'a pas non plus d'effet sur l'ischémie.

Le canal NMDA est exclusivement postsynaptique, il n'intervient pas sur la libération de glutamate, présynaptique, il n'y a donc pas de raison que l'administration de MK-801 agisse sur la libération basale.

GRAPHIQUE 5

Effets du MK-801 sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats



CONCLUSION GENERALE

L'ensemble des données présentées ici souligne l'importance des acides aminés excitateurs et en particulier du glutamate dans la physiologie de la transmission neuronale et dans l'apparition de troubles neurologiques. Ainsi, il apparaît qu'un excès d'activité des systèmes glutamatergiques entraîne une neurodégénérescence, alors qu'à l'inverse, un hypofonctionnement provoque des troubles psychotiques et de mémorisation.

Les systèmes utilisant la transmission glutamatergique sont complexes et encore incomplètement décrits, cependant, de nombreux éléments permettent de cerner leur pharmacologie. Il y a maintenant une vingtaine d'année que le phénomène d'excitotoxicité a été décrit par Olney. Ce mécanisme complexe a permis peu à peu de mieux comprendre les processus de neurodégénération de certaines pathologies très préoccupantes dans notre société. Le rôle du glutamate dans ces affections est maintenant admis mais demande encore à être précisé. Le traitement, quant à lui reste le plus souvent symptomatique. De plus en plus la recherche pharmaceutique se tourne vers une stratégie de prévention des lésions et un ralentissement du processus de neurodégénération.

Nous avons montré, que l'emploi de deux bloqueurs des canaux sodiques, la lamotrigine et la sipatrigine, et d'un antagoniste sélectif du canal NMDA n'influence pas la concentration basale de glutamate dans l'hippocampe de rats. Par contre, la lamotrigine s'oppose très nettement à une accumulation de glutamate dans l'espace extracellulaire lors

d'une ischémie télencéphalique, à la dose de 48 mg/kg i.p.. Nous n'avons pas démontré que la sipatrigine agit efficacement dans l'ischémie. Cependant, une tendance à une activité se profile dans nos résultats. La littérature rend compte d'un effet protecteur de cette molécule mais à des doses plus importantes que 8 mg/kg i.p.. L'emploi d'une dose faible et le petit nombre d'animaux traités sont peut-être responsables du manque d'activité observé.

Le MK-801, quant à lui, n'a pas été testé dans l'ischémie, une abondante littérature s'accorde pour lui attribuer des propriétés protectrices dans divers modèles pathologiques (67), cependant, il reste controversé dans ses propriétés face à l'ischémie télencéphalique. En continuité de notre étude, des essais sous ischémie globale et transitoire seraient utiles, il faut cependant rester vigilant car la dizocilpine est convulsivante. Aujourd'hui, il n'existe pas sur le marché de bloqueur non compétitif et sélectif du canal NMDA à cause des nombreux et graves effets secondaires qu'ils engendrent.

Afin de compléter cette étude, il serait pertinent de rechercher la dose minimale active de la lamotrigine. Cette donnée permettrait de posséder sous ce modèle d'ischémie télencéphalique une substance de référence à laquelle pourraient être comparées les autres molécules potentiellement actives. La lamotrigine présente l'avantage d'être commercialisée (donc facile à obtenir) et très largement documentée. Des essais plus poussés avec d'autres bloqueurs des canaux sodiques pourraient préciser le mécanisme d'action de ces molécules et peut-être trouver des différences d'activité selon la structure étudiée.

Enfin, Il est permis, au vu de ces résultats de penser que l'emploi d'un bloqueur des canaux sodiques centraux permettrait de palier aux dégâts occasionnés par une ischémie cérébrale.

ANNEXES

ANNEXE 1 :

AGONISTES / ANTAGONISTES DES
RECEPTEURS DU GLUTAMATE

	<i>NMDA</i>	<i>AMPA</i>	<i>Kainate</i>	<i>L-AP4</i>	<i>Metabotropic</i>
Other names	—	quisqualate	—	L-APB	ACPD
Selective agonists	NMDA, trans-2,3-PDA	AMPA, ATPA, 4-AHCP, 5-HPCA, 7-HPCA, Br-HIBO	—	L-AP4	—
Other important agonists	<i>Recognition site:</i> Glu, Asp, quinolinate ibotenate <i>Glycine binding site:</i> Gly, D-Ser	Glu, kainate, L-β- ODAP, 5-Br- willardine	Glu, kainate, domoate, 5-bromo- willardine	Glu, L-α- phosphoserine	Glu, quisqualate*, ibotenate*, trans- ACPD
Selective antagonists	D-AP5, CPP, CGS19755, CGP37849, D-CPPene	NBQX	—	—	—
Other antagonists	<i>Channel blockers:</i> Ketamine, PCP, SKF10047, MK801 <i>Glycine site:</i> HA966, 7- chlorokynurenate, CNQX, DNQX, MNQX	CNQX, DNQX, NBQX	CNQZX/DNQX kynurenate, γ-DGG, GAMS	—	—
Active pathways	NA ⁺ /CA ²⁺ /K ⁺	NA ⁺ /K ⁺	presumed Na ⁺ /K ⁺ (presynaptic?)	presynaptic inhibition?	IP ₃ /DAG

selective in terms of IP₃/DG stimulation only. Glu, glutamate; Asp, aspartate; gly., glycine; Ser, serine; NMDA, N-methyl aspartate; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; L-APA, L-2-amino-4 phosphonobutanoic acid; ACPD, 1-amino-cyclopentane-1,3-dicarboxylic acid; PCP, phencyclidine; HA966, 3-amino-1-hydroxypyrrolidone-2. Modified from Watkins et al, 1990)

ANNEXE 2 :

REFERENCES DES PRODUITS UTILISE

Réactifs :

OPA : fabriquant : Sigma Chemical Company

présentation : flacons de 50ml, spécial pour analyse des amino acides par CLHP.

conservation : au froid, à l'abri de la lumière.

MET fabriquant : Sigma Chémical Company.

présentation : flacons de 100ml.

conservation : à l'abri de la lumière et à température ambiante.

utilisation : On diluera le MET au 1/10e dans le méthanol, on conservera cette solution une semaine maximum à l'abri de la lumière.

acétate de sodium anhydre : Carlo Erba Reagenti « pour analyse ».

acide ortho-phosphorique concentré : RP Normapur, Prolabo « pour analyse ».

acétonitrile : Sigma Aldrich 99,9%, HPLC grade.

standards :

- fabriquant : Sigma Chemical Company.

- présentation : flacon de 1ml contenant 18 acides aminés dont les acides aspartique et glutamique à 2,5 mM, dans HCl 0,1 M.

ANNEXE 3 :

RESULTATS DETAILLES DES EXPERIENCES

Les tableaux suivants donnent le pourcentage de glutamate dans le milieu extracellulaire au temps correspondant pour chaque rat.

Nous avons choisi d'attribuer le taux de 100% à la concentration moyenne des valeurs basales (valeurs avant traitement). Chaque concentration mesurée au cours de l'expérience est rapportée à cette moyenne et exprimée en pourcentage.

Les tableaux présentant les résultats sous ischémie, donnent la concentration moyenne des valeurs basales (dernière ligne des tableaux) en pmol / 10 μ l. On y trouve également une notation globale de la symptomatologie, correspondant à celle décrite à la page 43.

La reperfusion (reperf.) est appréciée selon le code suivant :

- ☞ OK : bonne symptomatologie de reperfusion, l'animal retrouve son réflexe de retournement en quelques minutes.
- ☞ diff. : Bien que retrouvant une certaine mobilité, le rat reste très affecté par l'ischémie subie et retrouve son réflexe de retournement longtemps après le déclantage.
- ☞ non : l'animal ne retrouve pas son réflexe de retournement.

TE01 = rat témoin N° 1

TR01 = rat traité N° 1

Tableau IV

Véhicule de la lamotrigine (MC + TW80) sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats

temps	TE01	TE02	TE03	TE04	TE05	TE06	TE07	moyennes	ESM
basal	95,2%	86,3%	96,5%	97,8%	102,0%	98,0%	96,8%	96,1%	1,8%
basal	92,3%	96,9%	105,3%	97,3%	93,2%	95,9%	91,7%	96,1%	1,8%
basal	95,2%	116,3%	117,1%	94,4%	97,6%	104,1%	95,5%	102,9%	3,8%
20	92,3%	144,5%	145,4%	96,7%	98,1%	102,0%	98,1%	111,0%	8,8%
40	104,2%	169,2%	143,1%	97,3%	126,6%	103,1%	100,6%	120,6%	10,3%
60	119,0%	178,0%	154,7%	107,5%	119,7%	99,0%	109,6%	126,8%	10,9%
80	107,1%	126,9%	134,2%	85,3%	121,7%	95,9%	126,1%	113,9%	6,9%
100	92,3%	109,3%	125,8%	93,3%	112,8%	93,9%	126,1%	107,6%	5,6%
120	89,3%	114,5%	107,2%	100,1%	111,9%	96,9%	121,0%	105,8%	4,2%
140	86,3%	112,8%	93,2%	89,9%	116,8%	98,0%	121,0%	102,6%	5,3%
160	80,4%	125,1%	84,8%	92,1%	109,9%	91,8%	117,2%	100,2%	6,5%
180	89,3%	128,6%	96,0%	89,9%	115,8%	84,7%	118,5%	103,2%	6,6%
200	92,3%	193,8%	68,0%	88,7%	120,7%	91,8%	123,6%	111,3%	15,6%

Tableaux V et VI

Effets de la lamotrigine sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats

lamotrigine 24 mg/kg

temps (min)	TR01	TR02	TR03	TR04	TR05	TR06	moyennes		ESM
	basal	98,0%	91,0%	98,0%	101,0%	102,3%	99,3%	98,3%	98,3%
basal	91,0%	93,0%	90,0%	96,0%	98,5%	95,2%	93,9%	93,9%	1,3%
basal	91,0%	84,0%	85,0%	93,0%	101,0%	99,3%	92,2%	92,2%	2,9%
20	81,0%	67,0%	84,0%	82,0%	98,5%	91,0%	83,9%	83,9%	4,3%
40	83,0%	66,0%	94,0%	93,0%	96,0%	91,0%	87,2%	87,2%	4,6%
60	83,0%	64,0%	81,0%	88,0%	91,5%	82,8%	81,7%	81,7%	3,9%
80	76,0%	66,0%	98,0%	83,0%	94,1%	76,6%	82,3%	82,3%	4,9%
100	72,0%	66,0%	86,0%	79,0%	97,2%	78,6%	79,8%	79,8%	4,5%
120	69,0%	78,0%	81,0%	75,0%	94,7%	74,5%	78,7%	78,7%	3,6%
140	66,0%	81,0%	104,0%	80,0%	93,4%	74,5%	83,2%	83,2%	5,6%
160	65,0%	82,0%	77,0%	73,0%	88,4%	74,0%	76,6%	76,6%	3,3%
180	60,0%	81,0%	65,0%	89,0%	94,7%	70,3%	76,7%	76,7%	5,6%
200	58,0%	88,0%	83,0%	63,0%	93,4%	74,5%	76,7%	76,7%	5,7%

Lamotrigine 72 mg/kg

temps (min)	TR01	TR02	TR03	TR04	TR05	TR06	moyennes		ESM
	basal	109,1%	101,3%	130,4%	98,9%	95,1%	96,0%	105,2%	105,2%
basal	105,3%	99,2%	91,3%	101,1%	101,0%	100,8%	99,8%	99,8%	1,9%
basal	96,8%	108,7%	78,3%	98,9%	102,9%	96,0%	96,9%	96,9%	4,2%
20	104,5%	125,6%	78,3%	105,3%	103,9%	96,0%	102,2%	102,2%	6,3%
40	129,9%	127,7%	78,3%	103,2%	102,9%	96,0%	106,3%	106,3%	8,0%
60	123,1%	134,0%	65,2%	92,6%	87,4%	100,8%	100,5%	100,5%	10,2%
80	104,5%	112,9%	65,2%	84,2%	81,6%	105,6%	92,3%	92,3%	7,4%
100	94,3%	115,0%	65,2%	84,2%	81,6%	120,0%	93,4%	93,4%	8,6%
120	94,7%	152,0%	65,2%	75,8%	89,3%	129,6%	101,1%	101,1%	13,6%
140	91,7%	140,9%	91,3%	75,8%	98,1%	148,8%	107,8%	107,8%	12,1%
160	96,0%	123,5%	104,3%	75,8%	105,8%	148,8%	109,0%	109,0%	10,2%
180	94,7%	115,0%	104,3%	75,8%	124,3%	139,2%	108,9%	108,9%	9,1%
200	88,7%	127,2%	130,4%	71,6%	144,7%	172,8%	122,6%	122,6%	15,1%

Tableau VII

Véhicule de la lamotrigine (MC + TW 80) sur la libération de glutamate, lors d'une ischémie globale et transitoire

temps (min)	TE01	TE02	TE03	TE04	TE05	moyennes	ESM
10	96%	97%	96%	78%	99%	93%	4%
20	98%	100%	99%	110%	102%	102%	2%
30	106%	103%	104%	112%	99%	105%	2%
40	100%	113%	103%	157%	102%	115%	11%
50	98%	108%	99%	171%	100%	115%	14%
60	95%	107%	94%	172%	100%	114%	15%
70	140%	138%	120%	192%	200%	158%	16%
80	413%	248%	373%	139%	793%	393%	111%
90	1303%	353%	1108%	221%	936%	784%	217%
100	1147%	361%	511%	205%	561%	557%	160%
110	261%	239%	204%	151%	193%	209%	19%
120	187%	199%	175%	173%	139%	175%	10%
150	128%	122%	109%	268%	107%	147%	30%
pmol / 10 µl	73	119,5	55	57	28,2		

Valeurs basales

post-traitement

ischémie

Reperfusion

symptomatologie

note :

reperf. :

++	++	++	++	++	++
OK	OK	OK	OK	OK	OK

Tableau VIII

Effets de la lamotrigine sur la libération de glutamate dans l'hippocampe de rats, lors d'une ischémie globale et transitoire

temps	TR01	TR02	TR03	TR04	TR06	TR07	TR08	TR09
10	95%	101%	119%	111%	97%	101%	100%	102%
20	102%	98%	99%	94%	102%	103%	98%	99%
30	102%	101%	82%	94%	101%	96%	102%	99%
40	106%	90%	49%	93%	107%	91%	102%	99%
50	102%	109%	62%	94%	101%	101%	105%	101%
60	95%	90%	41%	93%	92%	100%	105%	105%
70	92%	90%	238%	88%	89%	87%	114%	114%
80	86%	90%	210%	116%	106%	97%	115%	105%
90	85%	122%	144%	148%	104%	183%	118%	105%
100	97%	159%	107%	76%	114%	298%	122%	132%
110	86%	96%	33%	64%	91%	328%	106%	114%
120	99%	96%	25%	181%	84%	159%	105%	105%
150	78%	77%	41%	122%	81%	109%	244%	104%
pmol / 10 µl	28,5	13,9	19,2	40,8	63,2	63,8	29,5	22,3

symptomatologie

note :

reperf. :

++	++	+++	++	+++	++	+++	+++	++
diff.	OK	non	OK	OK	non	diff.	diff.	diff.

Valeurs basales

post-traitement

ischémie

Reperfusion

moyennes	ESM
104%	3%
99%	1%
96%	2%
90%	7%
96%	5%
89%	7%
117%	18%
120%	14%
132%	11%
144%	24%
119%	32%
108%	17%
111%	21%

Effets de la sipatrigine sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats

Sipatrigine 8 mg/kg

temps (min)	TR01	TR02	TR03	TR04	TR05	moyennes	ESM
basal	102,0%	104%	95,6%	95,7%	102,6%	100,0%	1,8%
basal	102,0%	100%	99,2%	102,8%	100,2%	100,9%	0,7%
basal	98,0%	96%	86,6%	97,0%	94,2%	94,4%	2,0%
20	113,0%	92%	95,6%	100,9%	97,8%	99,9%	3,6%
40	106,0%	84%	120,0%	120,3%	96,6%	105,4%	7,0%
60	115,0%	80%	92,0%	107,3%	101,4%	99,2%	6,1%
80	119,0%	68%	81,2%	100,9%	99,0%	93,6%	8,8%
100	119,0%	72%	68,6%	98,3%	89,3%	89,4%	9,2%
120	106,0%	72%	63,2%	80,2%	84,5%	81,2%	7,2%
140	123,0%	64%	54,1%	77,6%	113,5%	86,4%	13,6%
160	119,0%	56%	48,7%	65,9%	96,6%	77,2%	13,2%
180	106,0%	52%	48,7%	54,3%	103,8%	73,0%	13,1%
200	106,0%	48%	30,7%	55,0%	101,4%	68,2%	15,0%

témoins

temps (min)	TE01	TE02	TE03	TE04	TE05	moyennes	ESM
basal	108,0%	95,0%	103,0%	117,8%	106,0%	106,0%	1,8%
basal	102,0%	103,0%	112,0%	118,7%	106,0%	108,3%	1,8%
basal	102,0%	103,0%	105,0%	118,7%	100,0%	105,7%	3,8%
20	102,0%	105,0%	111,0%	113,2%	97,0%	105,6%	8,8%
40	105,0%	103,0%	111,0%	120,6%	97,0%	107,3%	10,3%
60	111,0%	97,0%	112,0%	113,2%	94,0%	105,4%	10,9%
80	105,0%	92,0%	111,0%	122,4%	93,0%	104,7%	6,9%
100	105,0%	62,0%	117,0%	126,0%	88,0%	99,6%	5,6%
120	105,0%	92,0%	115,0%	118,7%	88,0%	103,7%	4,2%
140	111,0%	97,0%	120,0%	121,5%	85,0%	106,9%	5,3%
160	105,0%	85,0%	114,0%	120,6%	85,0%	101,9%	6,5%
180	102,0%	95,0%	108,0%	121,5%	87,0%	102,7%	6,6%
200	89,0%	85,0%	98,0%	119,0%	87,0%	95,6%	15,6%

Tableau XI

Véhicule de la sipatrigine (solution physiologique) sur la libération de glutamate dans l'hippocampe de rats, lors d'une ischémie globale et transitoire

temps	TE01	TE02	TE03	TE04	TE05	TE06	TE07
10	96%	97%	96%	78%	99%	98%	97%
20	98%	100%	99%	110%	102%	102%	99%
30	106%	103%	104%	112%	99%	100%	104%
40	86%	97%	109%	126%	266%	110%	103%
50	94%	103%	104%	109%	266%	118%	100%
60	86%	96%	100%	109%	167%	118%	100%
70	103%	116%	126%	265%	503%	136%	100%
80	203%	264%	417%	526%	1267%	700%	169%
90	353%	669%	978%	622%	2833%	1582%	323%
100	300%	578%	557%	574%	1800%	981%	415%
110	314%	288%	187%	443%	433%	736%	200%
120	120%	219%	126%	174%	233%	491%	138%
150	58%	133%	74%	265%	200%	182%	123%
pmol / 10 µl	60,8	115,5	45,5	36,1	38,3	15,2	68,3

symptomatologie

note :

reperf. :

++	++	+++	++	+++	++	++	++
OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

TE08	TE09	TE10	TE11	TE12	ESM
96%	85%	86%	110%	102%	3%
98%	110%	106%	98%	100%	2%
106%	105%	108%	92%	98%	2%
117%	150%	100%	87%	91%	23%
119%	125%	117%	90%	81%	23%
110%	100%	106%	113%	70%	10%
107%	250%	256%	305%	147%	56%
252%	700%	433%	565%	294%	145%
386%	1450%	989%	755%	596%	338%
448%	1100%	722%	658%	1106%	193%
214%	350%	339%	229%	702%	72%
150%	150%	222%	140%	334%	49%
100%	175%	106%	529%	204%	28%
23,2	68,9	20,4	66,2	81,5	

++	++	+++	++	++	++
OK	OK	OK	OK	OK	OK

valeurs basales

traitement

ischémie

reperfusion

valeurs basales

traitement

ischémie

reperfusion

Tableau XII

Effets de la sipatrigine sur la libération de glutamate dans l'hippocampe de rats, lors d'une ischémie globale et transitoire

sipatrigine 8 mg/kg i.p.					
temps	moyennes	ESM	TR01	TR02	TR03
10	102%	2%	105%	98%	102%
20	100%	1%	101%	100%	99%
30	98%	3%	94%	102%	99%
40	115%	17%	94%	104%	149%
50	109%	19%	79%	105%	144%
60	106%	21%	69%	105%	143%
70	155%	52%	81%	130%	253%
80	301%	39%	253%	379%	273%
90	404%	98%	356%	592%	263%
100	340%	76%	250%	491%	279%
110	229%	35%	180%	209%	298%
120	212%	93%	112%	126%	397%
150	266%	140%	119%	133%	545%
			44,2	46,9	55,6
pmol/10µl moy.					
SYMPTOMATOLOGIE					
note :					
reperf.					
			++	+	++
			conv.	OK	OK

valeurs basales

traitement

ischémie

reperfusion

Tableaux XIII et XIV
Effets du MK-801 sur la libération basale de glutamate dans l'hippocampe de rats

MK-801 1 mg/Kg

temps	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	TR8	TR9	TR10	moyennes	ESM
basal	100%	105%	119%	97%	109%	105%	98%	103%	99%	100%	104%	2%
basal	87%	93%	93%	108%	98%	97%	95%	94%	110%	98%	97%	2%
basal	81%	98%	88%	103%	100%	106%	98%	97%	94%	105%	97%	2%
20	85%	81%	128%	95%	100%	114%	114%	94%	101%	95%	101%	5%
40	85%	74%	93%	91%	95%	112%	112%	101%	89%	94%	95%	4%
60	57%	65%	99%	100%	92%	105%	112%	93%	79%	97%	90%	6%
80	78%	56%	132%	107%	102%	106%	110%	94%	82%	93%	96%	7%
100	102%	45%	107%	93%	93%	99%	91%	97%	79%	91%	90%	6%
120	100%	38%	93%	74%	93%	101%	97%	98%	84%	85%	86%	6%
140	115%	38%	82%	61%	97%	101%	104%	85%	86%	88%	86%	7%
160	107%	32%	71%	53%	85%	95%	106%	87%	97%	75%	81%	8%
180	95%	31%	64%	43%	86%	99%	98%	83%	109%	87%	80%	8%
200	100%	29%	64%	28%	88%	93%	100%	88%	137%	87%	81%	10%

véhicule : eau

temps (min)	TE01	TE02	TE03	TE04	TE05	moyennes	ESM
basal	106%	102%	103%	95%	108%	103%	2%
basal	106%	101%	112%	103%	102%	105%	2%
basal	100%	101%	105%	103%	102%	102%	1%
20	97%	106%	111%	105%	102%	104%	2%
40	97%	100%	111%	103%	105%	103%	2%
60	94%	106%	112%	97%	111%	104%	4%
80	93%	98%	111%	92%	105%	100%	4%
100	88%	95%	117%	62%	105%	93%	9%
120	88%	101%	115%	92%	105%	100%	5%
140	85%	99%	120%	97%	111%	103%	6%
160	85%	100%	114%	85%	105%	98%	6%
180	87%	99%	108%	95%	102%	98%	3%
200	87%	98%	108%	85%	89%	93%	4%

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Bachelard H.; MRS studies on cerebral metabolism in intact tissues; *Neuroscience Research Communications*; 1996; 18; (3); 143-153.
- 2 Bacher A., Zornow MH.; Lamotrigine inhibits extracellular glutamate accumulation during transient global cerebral ischemia in rabbits. *Anesthesiology*; 1997; 86; (2); 459-63.
- 3 Barnard E. A., Henley J. M.; The non-NMDA receptors : type, protein structure and molecular biology; *Neuroreport*; 1991; 82-89.
- 4 Barnard E. A., Henley J.M. ; The non-NMDA receptors : types, protein structure and molecular biology ; *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 82-89.
- 5 Beal M.F., Kowall N.W., Ellison D.W., Mazurek M.F., Scharz K.J., Martin J.B.; Replication of neuroanatomical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid; *Nature*; 1986; 321; 329-331.
- 6 Bignami A.. Glial cells in the central nervous system; *Discussions in neuroscience*; 1991; 8; (1); 11-45.
- 7 Boireau A.; Bordier F., Dubédát P., Doble A.; Methamphetamine and dopamine neurotoxicity: differential effects of agents interfering with glutamatergic transmission; *Neuroscience letters*; 1995; 195; 9-12.
- 8 Burstein A.H.; Lamotrigine; *Pharmacotherapy*; 1995; 15; 2; 129-143.
- 9 Carboni S., Melis F., Pani L., Hadjiconstantinou M., Rossetti Z.L.; The non-competitive NMDA receptor antagonist MK-801 prevents the massive release of glutamate and aspartate from rat striatum induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+); *Neuroscience letters* ; 1990 ; 117 ; 129-133
- 10 Carroll F.Y., Beat P.M., Cheung N.S. ; NMDA mediated activation of the NO/cGMP pathway : Characteristics and regulation in cultured neocortical neurones ; *J. Neurosci.* ; 1996 ; 43 ; 623-31.
- 11 Choi D.W. ; Calcium mediated neurotoxicity : relationship to specific channel types and role in ischemic damage ; *Trends in neurosci.* ; 1988 ; 11 ; 465-9.
- 12 Collingridge G. L., Singer.W. ; Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 42-48.
- 13 Cotman C.W. and Iversen L.L.; Excitatory amino acids in the brain focus on the NMDA receptors; *Trends Neurosci.*; 1987; 10; 263-264.
- 14 Cotman C.W., Bridge R.J., Taube J.S., Clark A.S., Geddes J.W., Monaghan D.T.; The role of the NMDA receptor in central nervous system plasticity and pathology. *J. NIH Res.*; 1989; 1; 65-74.
- 15 Cotman C.W., Kahle J.S., Miller S.E., Ulas J., Bridges R.J. ; Excitatory amino acid neurotransmission ; *Psychopharmacology : The fourth generations of progress ; ed. : Bloom and Kupfer ; Raven Press , New-York ; 1995 ; 75-85.*

- 16 Dalkara T., Tan E., Erdemli G., Onur R., Zileli T. ; Electrophysiological evidence for activation of NMDA receptors and its antagonism by MK-801 in cerebral ischemia ; *Brain research* ; 1990 ; 532 ; 101-106.
- 17 Damsma G., Westerink B .H.C.; A microdialysis and automated on-line analysis approach to study central cholinergic transmission in vivo; T.E. Robinson and J.B. Justice, JR (eds); microdialysis in the neurosciences; 1991 *Elsevier Science Publishers B.V.*; 237-252
- 18 Dingledine R., McBain C. J., Mc Namara J. O. ; Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends in pharmacological sciences.* 1990; 49-53.
- 19 Dingledine R., McBain C.J., McNamara J.O. ; Excitatory amino acid receptors in epilepsy ; *Trends in pharmacological sciences*; 1990 ; 49-53.
- 20 Doble A.; Excitatory amino acid receptors and neurodegeneration. *Thérapie* 1995; 50; 319-337.
- 21 Erecinska M., Pastouszko A., Wilson D., Nelson D.; Amonia induced release of neurotransmitters from rat brain synaptosomes : differences between the effects on amines and amino acids; *j. Neurochem*; 1987; 49; 1258-1265.
- 22 Erecinska M., Zaleska M.M., Nelson D., Nissim I., Yudkoff M.; Neuronal glutamine utilisation : glutamine / glutamate homeostasis in synaptosomes. *j; Neurochem.*; 1990; 54; 2057-69.
- 23 Erecinska, M., Zaleska, M.M., Nelson, D., Nissim, I., Yudkoff, M.; Neuronal glutamine utilisation : glutamine/glutamate homeostasis in synaptosomes; *J. Neurochem.*; 1990 ; 54 ; 2057-69.
- 24 Fagg G.E., Foster A.C., Ganong A.H.; Excitatory amino acid synaptic mechanisms and neurological function; *Trends Pharmacol. Sci.*; 1986; 7; 357-363.
- 25 Fellows L.K., Boutelle M.G., Fillenz M.; Extracellular brain glucose levels reflect local neuronal activity : a microdialysis study in awake, freely moving rats; *J. Neurochem.*; 1992, 59, (6); 2141-47.
- 26 Fillenz M.; Physiological release of excitatory amino acids; *Research report*; 1995; 71; 51-67.
- 27 Fonnum F.; Neurochemical studies on glutamate mediated neurotransmission in *excitatory amino acids*; eds. Meldrum B.S., Meroni F., Simen R.P., Woods J.H.; Raven Press, New York; 1991; pp. 15-25.
- 28 Fonnum F.. Glutamate : A neurotransmitter in mammalian brain. *J. of Neurochem.*, 1984, 42; (1); 1-11.
- 29 Fonnum F.; Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool; *prog. biophys. molec. biol.*; 1993; 60; 47-57.

- 30 Ghribi O., Callebert J., Verrecchia C., Plotkine M., Boulu RG. ; Blockers of NMDA operated chanel decrease glutamate and aspartate extracellular accumulation in stritum during forebrain ischemia in rats ; *Fundam. Clin. Pharmacol.* ; 1995 ; 9 ; 141-146.
- 31 Ghribi O.. Régulation des concentrations extracellulaires cérébrales des acides glutamique et aspartique au cours d'une ischémie télencéphalique transitoire chez le rat. *Thèse de doctorat, Université René Descartes de Paris.* 1994
- 32 Goodman and Gilman's, *The pharmacological Basis of Therapeutics*, 8^{ième} édition.
- 33 Graham S.H., Chen J., Lan J., Leach M.J., Simon R.P.; Neurprotective effects of a use-dependent sodium chanel, BW619C89, in rat middle cerebral artery occlusion; *J. Pharmacol Exp. Ther.*; 1994; 269; 2; 854-9.
- 34 Greene E.C.; *Anatomy of the rat*; Hafner publishing company, New York and London, 1963.
- 35 Hamberger A., I. Jacobson, S. Larson, P. Lönnroth, B. Nyström, M. Sandberg. Microdialysis techniques for studying brain amino acids in the extracellular fluid : Basic and clinical studies; 407-423.
- 36 Hammond C., Trifsch D.; *neurobiologie cellulaire*; Doin éditeur Paris; 1992.
- 37 Headley P. M., Grillner S.; Excitatory amino acids and synaptic transmission : the evidence for a physiological function. *Trends in pharmacological sciences.* 1990; 30-36.
- 38 Heffner T.G., Hartman J. A., Seiden L. S.; A rapid method for the regional Dissection of the rat brain. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*; 1980; 13; 453-456.
- 39 Imperato A., Di Chiara G.; Dopamine release and metebolism in awake rats after systemic s as studied by trans-striatal dialysis; *J. Neurochem.*; 1985; 5; (2); 297-306.
- 40 Imperato A., Di Chiaria G.; Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection : a new method for the study of the *in-vivo* release of endogenous dopamine and metabolites. *The journal of Neurosciences*; 1983; 4; (4); 966-977.
- 41 Impérato A., Angelucci L., Casolini P., Zocchi A., PuglisiAllegra S.; Repeted stressful experiences differently affect limbic dopamine release during and following stress. *Brain reserch*; 1992; 577; 194-199.
- 42 Imperato A., Obinu M.C., Carta G., Mascia M.S., Casu M.A., Dazzi L., Gessa G.L.; Neuroleptics cause stimulation of dopamine D1 receptors and their desensitization after chronic treatment; *European Journal of Pharmacology*; 1994; 264; 55-60.
- 43 J. Epelbaum, Lamour Y.. La maladie d'Alzheimer; *La recherche*; 1990; 21; (218).
- 44 J. Rateaud, Debarnot F., Mary V., Pratt J., Stutzmann J.-M.; Comparative study of voltage-sensitive sodium channel blockers in focal ischaemia and electric convultions in rodents; *Neuroscience letters*; 1994;172; 19-23.

- 45 Kehr J.; survey on quantitative microdialysis : theoretical models and practical implications; *Journal of Neuroscience methods*; 1993; 48; 251-261.
- 46 Kemp J.A., Foster A.C., Gill R., Woodruff C.N.; MK-801, NMDA receptors and ischemia induced neurodegeneration ; *Trends in neurosci.* ; 1987 ; 8 ; 414-15.
- 47 Koh J., Goldberg M.P., Hartley D.M., Choi D.W. ; Non-NMDA mediated toxicity in cortical culture ; *J. Neurosci.* ; 1991, 10 ; 693-705.
- 48 Krebs M.O.; Systèmes glutamatergiques et pathologies neuropsychiatriques; 136p.; th. Univ. médecine; Paris VI; 1991.
- 49 Kvamme E., Torgner I.A.A., Roberg B.; Evidence indicating that pig renal phosphate-activated glutaminase has a functionally predominant localisation in the inner mitochondrial membrane; *J. biol. Chem.*; 1991, 266; 13185-92.
- 50 Lees G., Leach M.J. ; studies of the mechanism of action of the novel anticonvulsant Lamotrigine (Lamictal) using primary neuroglial cultures from rat cortex ; *Brain research* ; 1993 ; 612 ; 190-199.
- 51 Lindroth P., Mopper K.; High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthalaldehyde. *Analytical chemistry*; 1979; 51; (11); 1667-1674.
- 52 Lobur A.T., Kish P.E., Ueda T.; synaptic vesicular glutamate uptake : modulation by synaptosomal cytosolic factor; *J. Neurochem*; 1990; 54; (5); 1614-1618.
- 53 Lodge D., Collingridge G.L.; The pharmacology of excitatory amino acids. *Trends in pharmacological sciences*. 1990;1-3.
- 54 Lodge D., Johnson K. M.; Non competitive excitatory amino acid receptor antagonists. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 13-17.
- 55 M. Y.-T. Globus, Busto R., Dalton Dietrich W., Martinez E., Valdes I., Ginsberg M. D ; Effect of ischemia on the in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and γ -aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis; *J. Neurochem.*; 1988; 51; (5); 1455-64.
- 56 MacDonald J. F., Nowak L. M. Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 25-30.
- 57 Madl J.E., Burgesser K.; adenosine triphosphate depletion reverse sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices; *The Journal of Neuroscience*; 1993; 13 (10); 4429-4444.
- 58 Magistretti P.J., Pellerin L., Martin J-L.; Brain energy metabolism an integrated cellular perspective; psychopharmacology: *the fourth generation of progress*, edited by Floyd E. Bloom and Kupfer D.J.; Raven press, ltd., New-York, 1995.
- 59 Manev H., Favaron M., Guidotti A., Costa E. ; Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate : rôle in neuronal death. ; *Mol. Pharmacol.* ; 1989 ; 36 ; 106-112.

- 60 Mayer M. L., Miller R. J.; Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca^{2+} in mammalian neurons. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 36-42.
- 61 McGeer P.L., McGeer E.G. ; Amino acid neurotransmitter ; *Basic neurochemistry*, (Siege., Agrnov, Albers, Molinoff eds.) ; *Raven Pres New-York* ; 311-332.
- 62 Meldrum B.S. ; The role of the glutamate in epilepsy and others CNS disorders ; *Neurology* ; 1994 ; 44 (suppl.8) ; s14-s23.
- 63 Meldrum B., Garthwaite J.; Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 54-62.
- 64 Michaels R.L., Rothman S.M. ; Glutamate neurotoxicity in vitro : antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* ; 1991; 10 ; 283-292.
- 65 Nicholls D., D. Attwell. The release and uptake of excitatory amino acids. *TIPS*; 1990; 11; 462-8.
- 66 Nieoullon A. excitatory amino acids, central nervous system neurotransmitters; *Therapie*; 1990; 45, (3); 281-5.
- 67 Nishida K., Markey S.P., Nicardipine and MK-801 attenuate platelet activating factor increases following cerebral ischemia-reperfusion in gerbils ; *brain research* ; 1996 ; 733 ; 203-210.
- 68 Norenberg M.D., Martinez-Hernandez A.; Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain; *Brain research*; 1979; 161; 303-310.
- 69 Oliff H.S., Marek P., Miyazaki B., Weber E. ; The neuroprotective efficacy of MK-801 in focal cerebral ischemia varies with rat strain and vendor ; *Brain research* ; 1996 ; 731 ; 208-12.
- 70 Patterson P.H. ; Neuronal growth and differentiation factors and synaptic plasticity ; *Psychopharmacology : The fourth generations of progress* ; ed. : Bloom and Kupfer ; *Raven Press , New-York* ; 1995 ; 619-27.
- 71 Paxinos G., Watson C. ; The rat brain in stereotaxic coordinates ; 1986 (seconde édition).
- 72 Pellegrini-Giampietro D. E., Torregrossa S.A., Moroni F.; Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D in the rat hippocampus; *British journal of Pharmacology*; 1996; 118; 1035-1043.
- 73 Peschanski M. Neurotransmission : de la glycine autour des canaux NMDA.; *m/s*; décembre 1989; 5; (10); 781-782.
- 74 Porter R. ; Mechanisms of action of new antiepileptic drugs ; *Epilepsia* ; 1989 ; suppl. 1, s29-s34.

- 75 Pulsinelli W.A., Brierley J.B. ; A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat ; *Stroke* ; 1979 ; 10; (3) ; 267-272.
- 76 Riedel G.; Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurosci.* 1996; 19; 219-224.
- 77 Rosset R., Caude M., Jardy A.; *Chromatographies en phases liquide et supercritique*;ed. Masson; 1991.
- 78 Sanchez-Prieto J., Budd D. C., Herrero I., Vázquez E., Nicholls D. G.; Presynaptic receptors and the control of glutamate exocytosis. *TNIS* ; 19; (6); 1996; 235-9.
- 79 Santiago M., Venero J.L., Machado A., Cano J. ; In vivo protection of striatum from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists ; *Brain research* ; 1992 ; 586 ; 203-7
- 80 Scatton B., Carter C.; Rôle des acides aminés excitateurs dans la pathologie des dommages ischémiques cérébraux; *circulation et métabolisme du cerveau*; 1989; 6; 185-210.
- 81 Scatton B.; The NMDA receptor complex. *Fundam clin Pharmacol.* 1993; 7; 389-400.
- 82 Schoepp D., J. Bockaert, F. Sladeczek. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors; *Neuroreport*; 1991; 74-81.
- 83 Scremin O.U.; Cerebral vascular system; The rat nervous system (2e ed.), *Academic press*; 1995; 3-11.
- 84 Shuaib A., Mahmood R.H., Wishart T., Kanthan R., Murabit M.A., Ijaz S; Neuroprotective effects of Lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, in vivo microdialysis and behavioral study; *Brain research*; 1995; 702; 199-206.
- 85 Smith C.U.M., Wiley A.; *Elements of molecular neurobiology*; Medical publication John Wiley and sons.
- 86 Sparenborg S., Brennecke L.H., Jaax N.K., Braitmam D.J. ; Dizocilpine (MK-801) arrests status epilepticus and prevents brain damage induced by soman; *Neuropharmacology* ; 1992 ; 31 ; 4 ; 357-68.
- 87 Streit W.J., Morioka T ; Kalehua A.N. ; MK-801 prevents microglial reaction in rat hippocampus after forebrain ischemia ; *Neuroreport* ; 1992 ; 3, (2) ; 146-148.
- 88 Sun F.Y, Faden A.I.; Neuroprotective effect of BW619C89, a use-dependant sodium chanel blocker, in rat traumatic brain injury; *Brain research*; 1995; 673; 133-140.
- 89 Synder S.H., Dawson T.M. ; Nitric oxide and related substances as neuronal messengers ; *Psychopharmacology : The fourth generaztions of progress* ; ed. : Bloom and Kupfer ; Raven Press , New-York ; 1995 ; 609-618.
- 90 Tabb J.S., Kirsh P.E., Van Dyke R., Ueda T.; Glutamate transport into synaptic vesicles; *The Journal of Biochemical Chemistry*; 1992; 267; (22) ; 15412-15418.

- 91 Tarazi F. I., Florijn W. J., Creese I.; Regulation of ionotropic glutamate receptors following subchronic and chronic treatment with typical atypical antipsychotics. *Psychopharmacology*; 1996; 128; 371-379.
- 92 Teoh H., Fowler L.J., Bowery NG.; Effect of Lamotrigine on the electrically-evoked release of endogenous amino acids from slices of dorsal horn of the rat spinal cord; *Neuropharmacology*; 1995; 34; 10; 1273-8.
- 93 Ungerstedt U.; Introduction to intracerebral microdialysis; *Microdialysis in neurosciences*; Elsevier Science Publishers B.V., T.E. Robinson and J.B. Justice (eds); 1991.
- 94 Urenjak J., Obrenovitch T.P. ; Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels : A rational and effective strategy against ischemic brain damage ; *Pharmacological reviews* ; 1996 ; 48 ; (1) ; 21-67.
- 95 Waldmeier PC., Baumann PA., Wicki P., Feldtrauer JJ., Stierlin C., Schmutz M.; Similar potency of carbamazepine, and Lamotrigine in inhibiting the release of glutamate and other neurotransmitters; *Neurology*; 1995; 45; 10; 1907-13.
- 96 Wang SJ., Huang CC., Hsu KS., Tsai JJ, Gean PW.; Inhibition of N-type calcium currents by lamotrigine in rats amygdalar neurones; *Neuroreport*; 1996; 7; 18; 3037-40.
- 97 Watkins J.C, Olverman HJ.; Agonists and antagonists for excitatory amino acids receptors ; *Trends in neurosciences*.; 1987; 10; (7); 265-72.
- 98 Watkins J.C., Krosggaard-Larsen P., Honoré T.; Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends in pharmacological sciences* 1990; 4-12.
- 99 Willetts J., Balster R. L., Leander D.. The behavioral Pharmacology of NMDA receptor antagonists. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 62-67.
- 100 Xinmin X., Lancasrter B.; Peakman T.; Garthwaite J.; Interaction of the antiepileptic drug Lamotrigine with recombinant rat brain IIA Na⁺ channels and with native Na⁺ channels in rat hippocampal neurones; *Eur J Physiol.*; 1995; 430; 437-46.
- 101 Young A.B., Fagg G. E.; Excitatory amino acid receptors in the brain : membrane binding and receptor autoradiographic approaches. *Trends in pharmacological sciences*. 1990; 18-24.
- 102 Zipp F., Baas H., Fischer P.A.; Lamotrigine - antiparkinsonian activity by blockade of glutamate release ? *Journal of Neurotransmission*; 1993; 5; 67-75.
- 103 Zu-Cheng Ye, Sontheimer H.; Cytokine modulation of glial glutamate uptake : a possible involvement of nitric oxide; *Neuroreport*; 1996;7;2181-85.

TABLE DES ABREVIATIONS

AAE	Acide Aminé Excitateur
ACPD	Acide 1-aminocyclopentane-1 _S ,3 _R -dicarboxylique
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
ASP	Aspartate
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Pression
ESM	Ecarts Standards à la Moyenne
GLU	Glutamate
i.p.	intra péritonéale
L-AP4	L-(+)-2-amino-4-phosphonobutamate
MET	mercaptoéthanol
mGLU	récepteur métabotrope du glutamate
NBQX	1,2,3,4-tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide
NMDA	N-méthyl-D-Aspartate
NO	Monoxide d'azote
OPA	ortho-phthaldialdéhyde
OPT	mélange d'OPA et de MET
Pi	phosphate inorganique
PLT	Potentialisation à long terme
PPSE	Potentiel PostSynaptique Excitateur

CASTILLO (Frédéric). — Etude *in vivo* de l'action d'inhibiteurs des canaux sodiques sur la concentration extracellulaire hippocampale de glutamate, dans des conditions physiologiques et sous un modèle pathologique — 82 p. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (thèse : Pharm. ; Limoges ; 1997).

Résumé :

Le glutamate est le principal acide aminé exciteur dans le cerveau, il a un rôle important dans la physiologie de la transmission nerveuse. Il devient dangereux dans certains états pathologiques et peut même conduire à la dégénérescence dans les maladies neurologiques telles que les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer.

Nous vérifions ici l'activité de bloqueurs des canaux sodiques (lamotrigine et sipatrigine), sur la concentration extracellulaire de glutamate dans l'hippocampe de rats vigiles et libres de leurs mouvements. Ces activités sont étudiées dans des conditions physiologiques (lamotrigine 24 et 72 mg/kg i.p., sipatrigine 8 mg/kg i.p.) puis sous une ischémie globale et transitoire, par la technique de microdialyse transcérébrale, suivie d'un dosage par chromatographie liquide haute pression.

L'ischémie globale est un modèle d'accident vasculaire cérébral. Nous utilisons la technique dite de l'occlusion des quatre vaisseaux et durant trente minutes. Le déficit en oxygène ainsi occasionné engendre une forte dépolarisation responsable d'une cascade de réactions conduisant à la libération massive de glutamate et à la mort neuronale. L'administration de lamotrigine (48 mg/kg i.p.) ou de sipatrigine (8 mg/kg i.p.) réduit cette dépolarisation.

Nous testons également l'activité d'un antagoniste non compétitif du récepteur glutamatergique NMDA, le MK-801 ou dizocilpine, dans des conditions physiologiques, à la dose de 1 mg/kg i.p.

Les résultats de cette étude montrent qu'aucune des molécules testées n'influence significativement la concentration de glutamate dans les conditions physiologiques. Par contre, sous ischémie, la lamotrigine réduit de près de 80% l'augmentation de glutamate. La sipatrigine semble avoir la même tendance, mais la dose de 8 mg/kg est probablement trop faible.

Mots clés :

Dizocilpine ; Glutamate ; Ischémie ; Lamotrigine ; Microdialyse ; MK-801 ; Sipatrigine

Jury :

PRESIDENT :	Madame le Professeur CHULIA , Professeur des Universités
DIRECTEUR DE TRAVAUX :	Mademoiselle OBINU , docteur ès biologie (Rhône-Poulenc Rorer)
JUGES :	Monsieur le Professeur CARDOT , Professeur des Universités
	Monsieur E.A. KIM , Maître de conférences

ON A IMPRIMER N° 29

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

CASTILLO (Frédéric). — Etude *in vivo* de l'action d'inhibiteurs des canaux sodiques sur la concentration extracellulaire hippocampale de glutamate, dans des conditions physiologiques et sous un modèle pathologique — 82 p. ; ill. ; tabl. ; 30 cm (thèse : Pharm. ; Limoges ; 1997).

Résumé :

Le glutamate est le principal acide aminé exciteur dans le cerveau, il a un rôle important dans la physiologie de la transmission nerveuse. Il devient dangereux dans certains états pathologiques et peut même conduire à la dégénérescence dans les maladies neurologiques telles que les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer.

Nous vérifions ici l'activité de bloqueurs des canaux sodiques (lamotrigine et sipatrigine), sur la concentration extracellulaire de glutamate dans l'hippocampe de rats vigiles et libres de leurs mouvements. Ces activités sont étudiées dans des conditions physiologiques (lamotrigine 24 et 72 mg/kg i.p., sipatrigine 8 mg/kg i.p.) puis sous une ischémie globale et transitoire, par la technique de microdialyse transcérébrale, suivie d'un dosage par chromatographie liquide haute pression.

L'ischémie globale est un modèle d'accident vasculaire cérébral. Nous utilisons la technique dite de l'occlusion des quatre vaisseaux et durant trente minutes. Le déficit en oxygène ainsi occasionné engendre une forte dépolarisation responsable d'une cascade de réactions conduisant à la libération massive de glutamate et à la mort neuronale. L'administration de lamotrigine (48 mg/kg i.p.) ou de sipatrigine (8 mg/kg i.p.) réduit cette dépolarisation.

Nous testons également l'activité d'un antagoniste non compétitif du récepteur glutamatergique NMDA, le MK-801 ou dizocilpine, dans des conditions physiologiques, à la dose de 1 mg/kg i.p.

Les résultats de cette étude montrent qu'aucune des molécules testées n'influence significativement la concentration de glutamate dans les conditions physiologiques. Par contre, sous ischémie, la lamotrigine réduit de près de 80% l'augmentation de glutamate. La sipatrigine semble avoir la même tendance, mais la dose de 8 mg/kg est probablement trop faible.

Mots clés :

Dizocilpine ; Glutamate ; Ischémie ; Lamotrigine ; Microdialyse ; MK-801 ; Sipatrigine

Jury :

PRESIDENT :	Madame le Professeur CHULIA , Professeur des Universités
DIRECTEUR DE TRAVAUX :	Mademoiselle OBINU , docteur ès biologie (Rhône-Poulenc Rorer)
JUGES :	Monsieur le Professeur CARDOT , Professeur des Universités
	Monsieur E.A. KIM , Maître de conférences