

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE MEDECINE

ANNEE 1991

THESE N° 161

**GLUTAMATE ET MORT CELLULAIRE :**  
**ETUDE PHARMACOLOGIQUE**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

présentée et soutenue publiquement le 1er Octobre 1991

PAR

**Philippe COURATIER**

né le 20 Décembre 1959 à Courbevoie

**EXAMINATEURS DE LA THESE**

Monsieur le Professeur LEGER  
Monsieur le Professeur DUMAS  
Monsieur le Professeur HUGON  
Monsieur le Professeur MERLE  
Monsieur le Professeur VALLAT

- Président  
- Juge  
- Juge  
- Juge  
- Juge

## UNIVERSITE DE LIMOGES

## FACULTE DE MEDECINE

\*\*\*\*\*

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur BONNAUD  
 - ASSESSEURS : Monsieur le Professeur PIVA  
 Monsieur le Professeur COLOMBEAU

PERSONNEL ENSEIGNANT

## . PROFESSEURS DES UNIVERSITES

ADENIS Jean-Paul	Ophtalmologie
ALAIN Luc	Chirurgie infantile
ARCHAMBEAUD Françoise	Médecine interne
ARNAUD Jean-Paul	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BARTHE Dominique	Histologie, Embryologie
BAUDET Jean	Clinique obstétricale et Gynécologie
BENSAID Julien	Clinique médicale cardiologique
BONNAUD François	Pneumo-Phtisiologie
BONNETBLANC Jean-Marie	Dermatologie
BORDESSOULE Dominique	Hématologie et Transfusion
BOULESTEIX Jean	Pédiatrie
BOQUIER Jean-José	Clinique de Pédiatrie
BRETON Jean-Christian	Biochimie
CAIX Michel	Anatomie
CATANZANO Gilbert	Anatomie pathologique
CHASSAIN Albert	Physiologie
CHRISTIDES Constantin	Chirurgie thoracique et cardiaque
COLOMBEAU Pierre	Urologie
CUBERTAFOND Pierre	Clinique de chirurgie digestive
de LUMLEY WOODYEAR Lionel	Pédiatrie
DENIS François	Bactériologie - Virologie
DESCOTTES Bernard	Anatomie
DESROGES-GOTTERON Robert	Clinique thérapeutique et rhumatologique
DUDOGNON Pierre	Rééducation fonctionnelle
DUMAS Michel	Neurologie
DUMAS Jean-Philippe	Urologie
DUMONT Daniel	Médecine du Travail
DUPUY Jean-Paul	Radiologie
FEISS Pierre	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale
GAINANT Alain	Chirurgie digestive
GAROUX Roger	Pédopsychiatrie
GASTINNE Hervé	Réanimation médicale
GAY Roger	Réanimation médicale

GERMOUTY Jean	Pathologie médicale et respiratoire
GUERET Pascal	Cardiologie et Maladies vasculaires
HUGON Jacques	Histologie-Embryologie- Cytogénétique
LABADIE Michel	Biochimie
LABROUSSE Claude	Rééducation fonctionnelle
LASKAR Marc	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
LAUBIE Bernard	Endocrinologie et Maladies métaboliques
LEGER Jean-Marie	Psychiatrie d'Adultes
LEROUX-ROBERT Claude	Néphrologie
LIOZON Frédéric	Clinique Médicale A
LOUBET René	Anatomie pathologique
MALINVAUD Gilbert	Hématologie
MENIER Robert	Physiologie
MERLE Louis	Pharmacologie
MOREAU Jean-Jacques	Neurochirurgie
MOULIES Dominique	Chirurgie infantile
<del>NICOT Georges</del>	<del>Pharmacologie</del>
OLIVIER Jean-Pierre	Radiothérapie et Cancérologie
OUTREQUIN Gérard	Anatomie
PECOUT Claude	Chirurgie orthopédique et traumatologique
PESTRE-ALEXANDRE Madeleine	Parasitologie
PILLEGAND Bernard	Hépatologie-Gastrologie- Entérologie
PIVA Claude	Médecine légale
RAVON Robert	Neurochirurgie
RIGAUD Michel	Biochimie
ROUSSEAU Jacques	Radiologie
SAUVAGE Jean-Pierre	Oto-Rhino-Laryngologie
TABASTE Jean-Louis	Gynécologie - Obstétrique
TREVES Richard	Thérapeutique
VALLAT Jean-Michel	Neurologie
VANDROUX Jean-Claude	Biophysique
WEINBRECK Pierre	Maladies infectieuses

CRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

A mes grands parents,

A mes parents,

A Hélène,

A mon frère et ma soeur,

A toute ma famille,

A Anne,

A tous mes amis et collègues d'internat.

A tout le Personnel infirmier

du Service du Professeur LEGER

et du Service de Neurologie.

A mon Président de Thèse,

Monsieur le Professeur LEGER  
Professeur des Universités de Psychiatrie adulte  
Psychiatre des Hôpitaux  
Chef de Service

Au cours de mes stages effectués dans votre service,  
j'ai pu admirer l'étendue de vos connaissances. Vous  
m'avez initié à la Psychiatrie. Vous m'avez fait aimer  
cette spécialité.

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites en  
acceptant de présider cette thèse.

A mes Juges,

Monsieur le Professeur DUMAS  
Professeur des Universités de Neurologie  
Médecin des Hôpitaux  
Chef de Service

Tout au long de mon internat, vous m'avez permis de travailler dans votre service où j'ai pu apprécier vos grandes qualités pédagogiques, humaines et votre dynamisme.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur HUGON  
Professeur des Universités d'Histologie-Embryologie  
et Cytogénétique.

Vous m'avez confié ce travail.

Vous m'avez initié à la recherche.

J'ai pu admirer votre grande culture scientifique et clinique.

J'espère me montrer digne de votre enseignement.

Monsieur le Professeur MERLE  
Professeur des Universités de Pharmacologie  
Clinique  
Médecin des Hôpitaux.

Vous avez accepté de juger ce travail.  
J'ai pu apprécier votre grande disponibilité et vous  
remercie de tous les conseils que vous m'avez  
donnés.

Monsieur le Professeur VALLAT  
Professeur des Universités de Neurologie  
Médecin des Hôpitaux

Tout au long de mon internant, j'ai pu admirer vos  
grandes qualités de clinicien, votre sens de  
l'organisation, votre disponibilité.  
Je vous remercie de votre confiance et j'espère me  
montrer digne de votre enseignement.



Je remercie le Docteur SINDOU pour l'aide  
apportée dans ce travail.

L'amitié qui nous unit devrait nous permettre une  
collaboration fructueuse.

Je remercie Monsieur SOUSTRE du Service de  
Biochimie qui a réalisé les dosages de LDH.

# **PLAN**

## **INTRODUCTION**

## **ETAT ACTUEL DE LA QUESTION**

### **1ère partie : Pharmacologie du glutamate**

#### **1 - Introduction**

#### **2 - Neurotransmetteur**

##### **2.1 - Synthèse et métabolisme**

##### **2.2 - Localisation présynaptique**

##### **2.3 - Libération et recapture synaptique**

##### **2.4 - Récepteurs au glutamate**

###### **2.4.1 - Récepteur N méthyl D Aspartate (NMDA)**

###### **2.4.2 - Récepteur AMPA**

###### **2.4.3 - Récepteur Kainate**

###### **2.4.4 - Récepteur L AP4**

###### **2.4.5 - Récepteur métabotrope**

###### **2.4.6 - Données de biologie moléculaire**

#### **3 - Relations glutamate - affections neurodégénératives**

##### **3.1 - Généralités**

##### **3.2 - Etude pharmacologique de la toxicité du glutamate**

###### **3.2.1 - Mécanismes impliqués dans la toxicité du glutamate**

##### **3.3 - Affections neurologiques et excitotoxicité**

###### **3.3.1 - Affections neurodégénératives aiguës**

###### **3.3.2 - Affections neurodégénératives chroniques**

## 2ème partie : Le RP 54274 ou Riluzole

### 2.1 - Pharmacologie comportementale

#### 2.1.1 - Effet anticonvulsivant

#### 2.1.2 - Effet antiischémique

#### 2.1.3 - Modification de l'utilisation du glucose cérébral après administration du Riluzole chez le rat

### 2.2 - Neurobiochimie

### 2.3 - Protocole de pharmacologie clinique

## **PROTOCOLE DE PHARMACOLOGIE EXPERIMENTALE**

### 1 - Modèle d'étude pharmacologique

#### 1.1 - Généralités

#### 1.2 - Cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de rat

##### 1.2.1 - Dissection

##### 1.2.2 - Dissociation mécanique

##### 1.2.3 - Supports

##### 1.2.4 - Milieux de culture

##### 1.2.5 - Ensemencement

##### 1.2.6 - Suivi des cultures

##### 1.2.7 - Tests de viabilité cellulaire

#### 1.3 - Etude pharmacologique

##### 1.3.1 - Neurotoxicité induite par le glutamate

##### 1.3.2 - Modèle d'hypoxie in vitro

#### 1.4 - Analyse statistique des résultats

## **RESULTATS**

- 1 - Survie des neurones corticaux en culture primaire
- 2 - Neurotoxicité du glutamate : Relation concentrations effets
- 3 - Effet neurotoxique du RP 54274
- 4 - Effet neuroprotecteur du RP 54274 vis à vis de la toxicité induite par le glutamate
  - 4.1 - Toxicité calcium-dépendant
  - 4.2 - Toxicité aiguë
- 5 - Effet neuroprotecteur du RP 54274 dans un modèle d'hypoxie expérimentale

## **DISCUSSION**

## **CONCLUSION**

## **BIBLIOGRAPHIE**

## **ANNEXES**

## INTRODUCTION

L'acide glutamique est un acide aminé ubiquitaire du tissu nerveux. Son identification en tant que neurotoxine cellulaire puis de neurotransmetteur a conduit de nombreux auteurs à penser que cet acide aminé était impliqué dans la pathogénie de diverses maladies neurologiques. Ces affections sont caractérisées par une dégénérescence neuronale soit aiguë (ischémie et hypoxie cérébrale, épilepsie) soit chronique (maladie de Huntington, sclérose latérale amyotrophique, maladie d'Alzheimer, atrophie olivopontocérébelleuse). La mort neuronale semble essentiellement médiée par l'action excitotoxique de cet acide aminé endogène activant ses différents sous types de récepteurs. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu dans les processus neurodégénératifs pourrait en partie bénéficier des progrès de la neuropharmacologie. Cependant il n'existe pas actuellement de molécule antagoniste de l'action excitotoxique du glutamate n'entraînant pas d'effets indésirables graves chez l'homme.

Le but de ce travail a été d'évaluer l'effet neuroprotecteur d'un nouvel inhibiteur de la transmission glutamatergique, le RP54274, sur des cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de rat.

Nous avons étudié l'effet cytoprotecteur du RP54274 dans deux modèles :

1 - vis à vis de la neurotoxicité aiguë et retardée induite par le glutamate.

2 - dans un modèle d'hypoxie expérimentale.

Nous avons comparé cet effet aux antagonistes des récepteurs post synaptiques de l'acide glutamique. Les résultats obtenus nous ont permis d'émettre des hypothèses sur les mécanismes d'action de cette molécule.

## ETAT ACTUEL DE LA QUESTION

## 1ère PARTIE : PHARMACOLOGIE DU GLUTAMATE

### 1 - INTRODUCTION

En 1960 Curtis et Watkins [22] ont mis en évidence l'action excitatrice de l'acide glutamique sur des neurones de moelle épinière. Cette action est définie sur le plan électrophysiologique par une dépolarisation de la membrane post synaptique rapprochant ainsi le potentiel de membrane de la valeur seuil d'émission des potentiels d'action.

Son identification en tant que neurotransmetteur a posé par contre de nombreux problèmes. A la différence des autres neurotransmetteurs, le glutamate joue un rôle important dans le métabolisme cellulaire, soit métabolisme intermédiaire, soit synthèse de protéines, soit précurseur du GABA, et est de ce fait présent dans tous les neurones.

Il est maintenant clairement démontré que le L glutamate est le principal médiateur de la neurotransmission excitatrice rapide au niveau du système nerveux central.

La localisation des voies nerveuses centrales glutamatergiques a bénéficié des techniques de capture à haute affinité en utilisant l'acide D aspartique marqué, associé à des destructions nerveuses [19]. Par des techniques d'immunohistochimie, Ottersen et Storm-Mathisen [102] ont montré qu'il existe des efférences corticales vers le noyau caudé et le putamen, le noyau accumbens, le tubercule olfactif, le thalamus, l'amygdale, le colliculum supérieur et inférieur, le noyau rouge, la substance noire et la moelle. Il existe également de nombreuses projections hippocampiques. On distingue des voies partant des régions

allo corticales et sous corticales, des voies intrinsèques cérébelleuses et des voies cérébellifuges.

De façon plus récente, les techniques de "binding" et d'autoradiographie des récepteurs ont montré l'existence de différentes populations de sites de liaison au [<sup>3</sup>H] glutamate possédant une haute affinité pour les agonistes tels que le NMDA, l'AMPA, et le kainate. Il existe une bonne corrélation entre la distribution régionale de ces différents sous types de récepteurs et la localisation des voies glutamatergiques [120].

## **2 - NEUROTRANSMETTEUR**

### **2.1 - SYNTHÈSE ET MÉTABOLISME [10]**

L'acide glutamique peut être synthétisé au niveau des mitochondries cellulaires par transamination de l'acide 2 oxoglutarique grâce à l'aspartate amino transférase et à partir de l'acide oxalo acétique en présence d'ion ammonium grâce à l'action de la glutamate déshydrogénase. Les acides 2 oxoglutarique et oxaloacétique sont produits par le cycle de Krebs. Un autre précurseur de l'acide glutamique est la glutamine qui est hydrolysée en glutamate grâce à un enzyme mitochondrial : la glutaminase.

Une autre voie de biosynthèse est également possible à partir de l'arginine, l'ornithine et la proline. Au niveau des cellules gliales, l'acide glutamique peut prendre deux voies : soit il est oxydé dans le cycle de Krebs, soit il est transformé en glutamine par la glutamine synthétase, enzyme exclusivement glial. Après libération dans l'espace extracellulaire, la glutamine peut être recaptée au niveau des terminaisons



présynaptiques et être reconvertie en acide glutamique par la glutaminase.

## **2.2 - LOCALISATION PRESYNAPTIQUE**

Le glutamate intracellulaire est réparti en quatre pools distincts [30]. Le plus important est lié au métabolisme neuronal (pool métabolique) et représente environ 50 % du pool total. Un deuxième pool est contenu dans les cellules gliales (10 à 30 % du total) tandis qu'un pool plus petit (5 % du total) sert de précurseur au GABA. Le dernier pool représente le glutamate libérable par les terminaisons nerveuses pendant la neurotransmission (20 à 30 % du total [30,90]).

## **2.3 - LIBERATION ET RECAPTURE SYNAPTIQUE (fig.A)**

Dans les années 1970, on pensait que le glutamate était libéré de façon différente des autres neurotransmetteurs. La mise en évidence d'une compartimentation en pools distincts et d'une libération par un phénomène d'exocytose calcium-dépendant a permis de résoudre ce problème [62]. Les concentrations en glutamate sont respectivement de 1  $\mu\text{M}$  dans l'espace extracellulaire, de 10  $\text{mM}$  dans le cytoplasme présynaptique et de 100  $\text{mM}$  au sein des vésicules présynaptiques glutamatergiques [62]. Ces gradients sont maintenus par deux systèmes électrogéniques distincts. Un système sodium-dépendant est présent à la fois au niveau de la membrane présynaptique et des cellules gliales, et possède une haute affinité (2-20  $\mu\text{M}$ ) pour le glutamate. Pour chaque anion glutamate recapté, trois ions  $\text{Na}^+$  ou deux ions  $\text{Na}^+$  et un ion  $\text{H}^+$  sont cotransportés à l'intérieur de la cellule tandis qu'un ion  $\text{K}^+$  sort de la cellule. Ce système peut théoriquement maintenir un gradient de

concentration en glutamate de 280 000 (si trois ions  $\text{Na}^+$  sont cotransportés) ou de 23 000 (si deux ions  $\text{Na}^+$  et un ion  $\text{H}^+$  sont cotransportés), de part et d'autre de la membrane plasmatique. Un deuxième système existe au niveau vésiculaire permettant l'accumulation des anions glutamate grâce à l'action d'une ATPase vésiculaire. Ce transporteur possède une faible affinité de l'ordre de la millimole pour le glutamate. La libération du glutamate par un phénomène d'exocytose est soumise à une régulation présynaptique. Sur une préparation de synaptosomes hippocampiques, il a été montré que L AP4, analogue du glutamate, agissant sur un récepteur présynaptique diminue le "release" du glutamate. Cette inhibition est également produite par le Baclofène agoniste GABA B et l'adénosine [27]. Une augmentation du "release" peut être obtenue par l'action de hautes concentrations de phorbol esters [26].

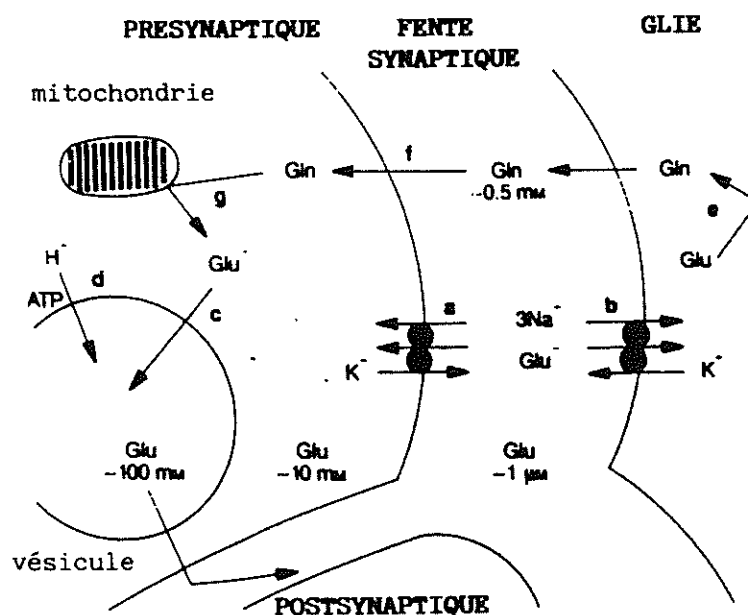


Figure A - Stockage, libération et recapture du glutamate.

## 2.4 - RECEPTEURS AU GLUTAMATE

L'étude des récepteurs au glutamate est devenue complexe ces dix dernières années [59,111] en raison du développement d'un grand nombre d'agents pharmacologiques agissant à leur niveau. L'utilisation d'antagonistes spécifiques des acides aminés excitateurs et d'analogues structuraux a permis de démontrer l'existence de plusieurs sous types de récepteurs au glutamate. On distingue actuellement cinq types de récepteurs. Trois ont été définis par l'action dépolarisante d'agonistes sélectifs : N methyl D-aspartate, NMDA ; Kainate ; quisqualate, ou acide  $\alpha$  amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique AMPA, et leur blocage par des antagonistes sélectifs [59]. Le récepteur AP4 (L-2 amino-4-phosphonobutyrate) serait un autorécepteur inhibiteur [59]. Le cinquième récepteur, activé par l'acide trans-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylique (ACPD) modifie le métabolisme du phosphatidyl inositol (IP3) et est appelé récepteur métabotrope [59].

### 2.4.1 - Récepteur N-méthyl-D-Aspartate (NMDA) (fig.C)

Le NMDA induit un puissant effet excitateur sur certains neurones centraux et de la moelle épinière. Il entraîne une dépolarisation de la membrane par ouverture d'un canal qui permet le passage de cations monovalents ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) et divalents ( $\text{Ca}^{++}$ ). Il existe au niveau du complexe récepteur NMDA une possibilité de régulation importante par différents composés et ions. Ces mécanismes régulateurs modifient donc la transmission synaptique médiée par la liaison du glutamate sur le récepteur NMDA.

Les études électrophysiologiques ont permis de montrer que les récepteurs NMDA sont dépendants du voltage neuronal. Le

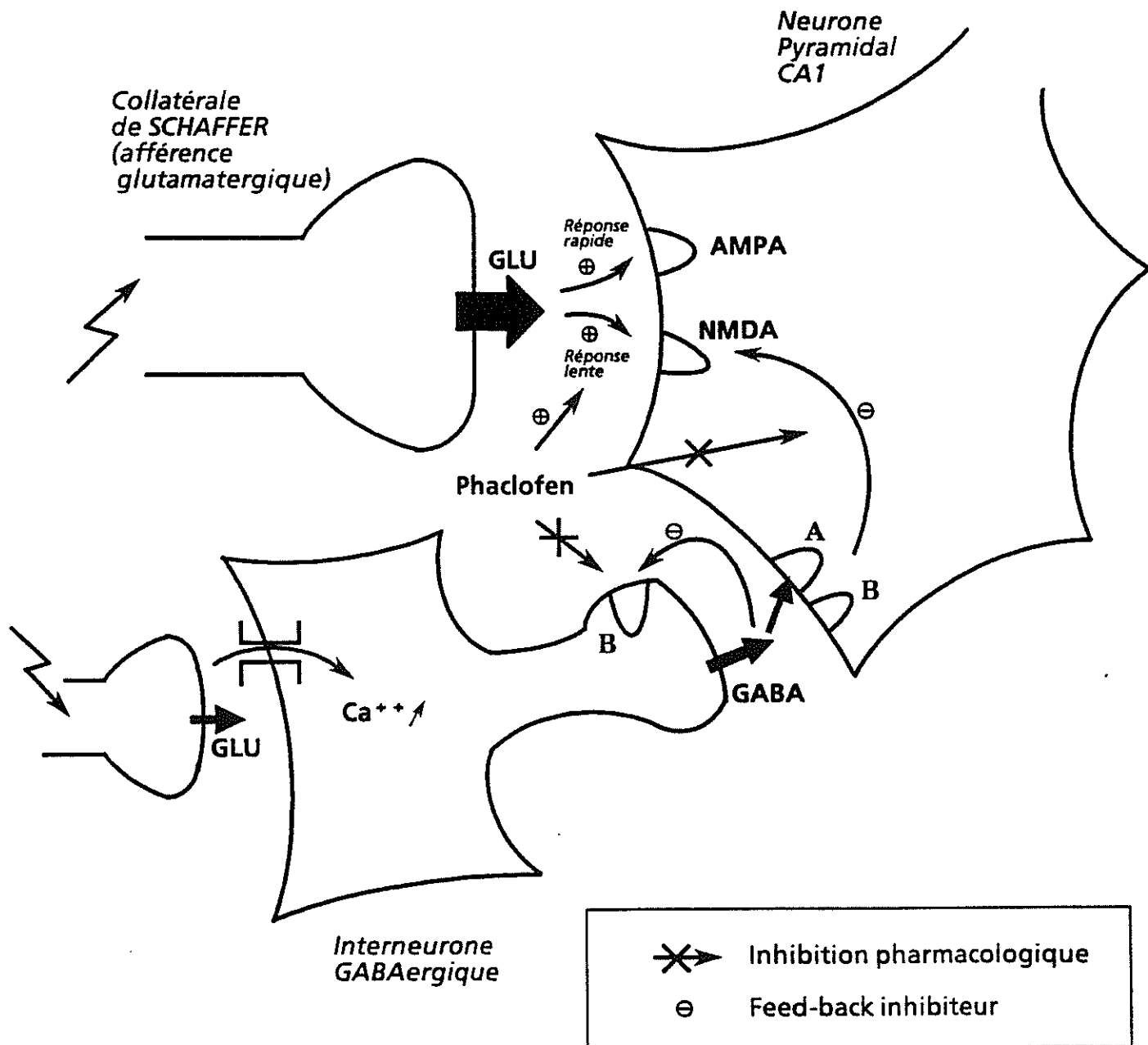
glutamate entraîne une dépolarisation membranaire peu importante si les neurones sont polarisés, intense et prolongée si la membrane est dépolarisée. Cette dépendance du voltage est liée à un blocage du canal ionique par les cations Magnésium [56,63]. Cette propriété est importante à considérer. Si un neurone est coactivé par un neurotransmetteur qui entraîne une dépolarisation membranaire, ou si ce neurone contient aussi d'autres récepteurs au glutamate non bloqués par les ions Magnésium, il en résultera un feedback positif entre les récepteurs des deux neurotransmetteurs. Ce mécanisme de coopération sous tend une variété de phénomènes physiologiques du système nerveux comme la potentialisation à long terme (LTP) (fig.B) La LTP est définie par une augmentation persistante de l'efficacité synaptique consécutive à une stimulation brève et téтанisante des circuits excitateurs contribuant à une "mémoire cérébrale". Les cations divalents  $Zn^{++}$  diminuent également le courant du récepteur NMDA par un blocage rapide du canal [114].

En dehors du blocage du canal par des ions divalents, un certain nombre d'antagonistes non compétitifs du récepteur NMDA ont été développés [49,51]. Ces composés se lient à l'intérieur du canal avec une haute affinité. On distingue les anesthésiques dissociatifs tels que la kétamine, le dextrophan, le SKF 10047, le PCP et le MK-801 [2,117]. Bien qu'ils soient de puissants antagonistes, ces composés ne peuvent être utilisés en clinique du fait d'importants effets secondaires [115]. Il existe également des antagonistes sélectifs compétitifs du NMDA sur son site de liaison. Ces composés incluent le 2-amino-5-phosphonovalérate (APV), 3-(± 2 carboxypiperazine-4-yl) - propyl-1-phosphonate (CPP), le D-2-amino-5-phosphonopentanoate (AP5) et le D-2-amino-phosphonoheptanoate (AP7) [23,24]. D'autres molécules ont été synthétisées et s'avèrent être de plus puissants antagonistes tel que le CGS - 19755

analogue piperidinique. Ces antagonistes réduisent les effets du glutamate sur les récepteurs NMDA et pourraient être utilisés dans le traitement de certaines formes d'épilepsie et dans les accidents vasculaires cérébraux.

Sur les récepteurs NMDA, il existe de plus des sites allostériques de régulation qui potentialisent l'action des agonistes de ces récepteurs (fig.D). Le premier site allostérique décrit est celui de l'acide aminé inhibiteur, la glycine. La glycine potentialise la transmission glutamatergique en agissant sur un site allostérique insensible à la strychnine [44] mis en évidence dans des expériences de "patch clamp". Ascher et Johnson ont confirmé cette facilitation allostérique démontrant que si la glycine n'était pas capable d'ouvrir elle même le canal ionique, sa liaison semblait nécessaire à l'action du NMDA [44]. Plusieurs travaux récents ont précisé cette modulation. Pour certains, il y aurait une situation de coagonisme au niveau d'un complexe récepteur [47] à l'instar de ce que l'on connaît de l'association entre les benzodiazépines et le récepteur GABA-A. Un second mode d'action a été suggéré par d'autres travaux [57]. Le principal effet de la glycine serait la prévention de la désensibilisation qui apparaît lors de l'application prolongée d'un agoniste NMDA. La glycine n'empêcherait pas le phénomène mais accélérerait considérablement la récupération. Plusieurs antagonistes de ce site ont été étudiés le 7 chloro-kynurenate [46], l'acide 5-fluoro indole-2-carboxylique [37], le HA 996 [29] et la cycloleucine [96].

Un autre site de régulation a été récemment mis en évidence. Ransom et Stec [81] ont montré que les polyamines spermidine et spermine et non la putrescine modifiaient la fonction des récepteurs NMDA (fig.E). La spermine et la spermidine augmentent le courant du récepteur NMDA par un mécanisme indépendant du site de liaison de la glycine, suggérant l'existence d'un site polyamine [9,53].



**Fig.B : Régulation de l'excitation hippocampique au glutamate par le système GABAergique**

**- genèse de la LTP.**

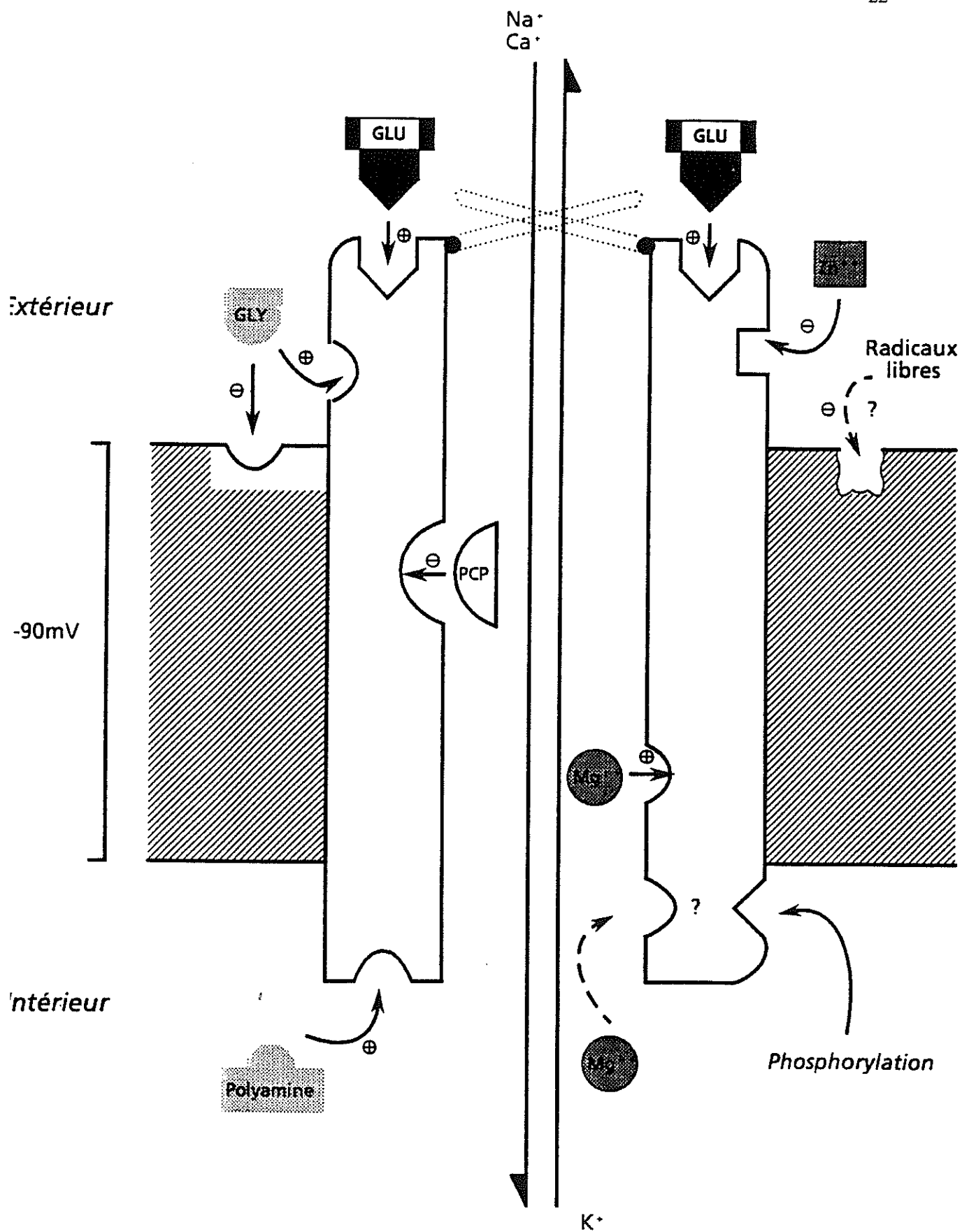


Fig.C : Le complexe NMDA.

- GLYCINE :  $\oplus$  ou  $\ominus$
- $Mg^{++}$  :  $\ominus$
- $Zn^{++}$  :  $\ominus$
- POLYAMINES :  $\oplus$

Fig.D : Récepteur NMDA - Modulation de la liaison au récepteur.

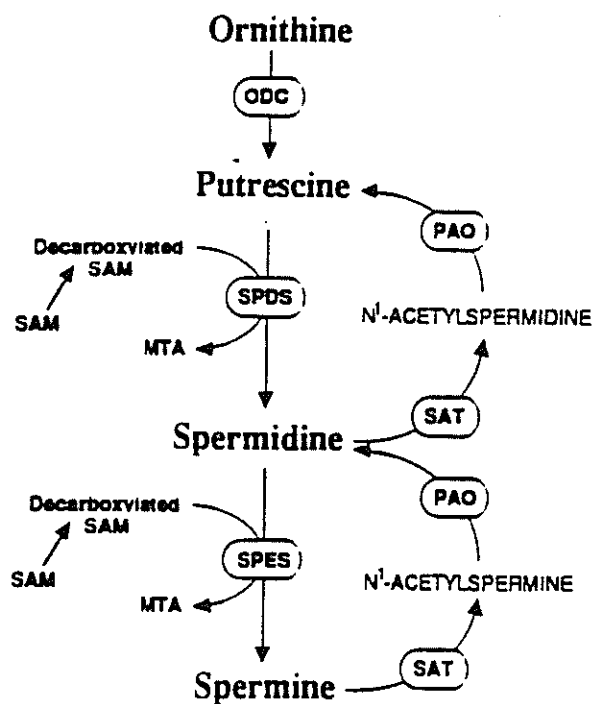


Fig.E : Voies du métabolisme des polyamines.



Un autre niveau possible de régulation existerait, mis en évidence par les variations anatomiques de la distribution de liaison avec des agonistes ou des antagonistes radio marqués. Cette distinction pourrait être sous tendue par une modification covalente, c'est à dire par l'existence de sites de phosphorylation. Mody et coll. ont montré que l'activité du récepteur NMDA était régulé par un mécanisme dépendant d'une adénosine triphosphate.

L'activité du récepteur NMDA peut également être modulée par les variations du pH. C'est un des rares récepteurs qui soit inhibé après oxydation et activé après réduction. Cela suppose qu'indépendamment des sites de liaison glycinergique, polyaminergique, aux ions  $Mg^{++}$  et  $Zn^{++}$ , il existe un site redox externe[104] (fig. F).

- OXYDATION :  $\ominus$
  - REDUCTION :  $\oplus$
- } *Modifications chimiques  
du récepteur  
Spécifique au NMDA*

- Site redox externe (pont disulfure?)
- Indépendant des sites de liaison NMDA,  
Glycine, Spermidine,  $Mg^{++}$ ,  $Zn^{++}$

OXYDATION	REDUCTION
(ex: dithiobisnitro benzoate)	(ex : dithiothreitol)
<ul style="list-style-type: none"> <li>↘ <math>Ca_i</math></li> <li>↘ mort neuronale</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ ouverture canal</li> <li>↗ entrée <math>Ca^{++}</math></li> <li>↗ mort neuronale</li> <li>↗ LTP</li> </ul>

**Radicaux libres : toxiques ou protecteurs ?**

- PHOSPHORYLATION :  $\oplus$   
PKC ↗ (ester de phorbol) →

**Fig.F : Récepteur NMDA - Modification chimique du récepteur.**

### 2.4.2 - Récepteur AMPA

Le récepteur AMPA était originellement appelé récepteur au quisqualate. Il est apparu que le quisqualate n'est pas un ligand sélectif puisqu'il se lie avec une haute affinité sur d'autres récepteurs (kainate et métabotropique), sur des sites de transport (site AP4 dépendant de l'ion Cl<sup>-</sup>) et sur un enzyme qui dégrade le N-acétyl aspartyl glutamate, la NAALADase.

Il n'existe pas d'antagoniste sélectif de ce récepteur bien que deux analogues de l'acide kynurénique, le CNQX et le DNQX aient une certaine sélectivité et relative haute affinité pour le récepteur AMPA [35].

Les études d'autoradiographie des récepteurs montrent que la localisation des récepteurs AMPA dans les régions télencéphaliques (hippocampe), le cortex, le septum latéral, le striatum, et la couche moléculaire du cervelet est superposable à celle des récepteurs NMDA. Les études électrophysiologiques ont permis de conclure que ces deux types de récepteurs fonctionnent ensemble. Les récepteurs NMDA contribuent aux réponses synaptiques, uniquement dans des conditions particulières [120], alors que les récepteurs AMPA sont responsables du potentiel post synaptique excitateur rapide [120]. Au niveau moléculaire, le récepteur apparait être influencé par une protéine modulatrice et des ions chaotropiques (qui changent l'état d'hydratation de la membrane) tel que le thiocyanate [120].

### 2.4.3 - Récepteur kainate [120]

La relation entre la fixation du [<sup>3</sup>H] kainate sur son site et l'action neuroexcitatrice médiée par le récepteur kainate est peu claire. Récemment, certains auteurs ont suggéré que les effets

neurophysiologiques du kainate étaient médiés par le récepteur AMPA sous tendus par des études électrophysiologiques et de "binding". Malgré ces observations, il semble qu'il soit possible de définir un profil pharmacologique distinct du récepteur AMPA. Sur des cultures neuronales, le kainate et le quisqualate activent les canaux ioniques avec des conductances différentes. De plus, la dépolarisation des fibres afférentes sensitives C induite par le kainate est aussi importante que celle obtenue sur des membranes isolées de cerveau pour les sites de fixation de haute affinité de [ $^3\text{H}$ ] kainate. Les techniques autoradiographiques montrent que les sites de fixation du [ $^3\text{H}$ ] kainate correspondent bien aux localisations cérébrales (aire CA3 de l'hippocampe, cortex et septum latéral) vulnérables à l'action neurotoxique du kainate [108]. Récemment, il a été montré qu'un puissant agoniste du kainate, l'acide domoïque, entraîne une encéphalopathie [107]. Toutes ces données confirment l'existence d'une interaction avec les sites de fixation de haute affinité du [ $^3\text{H}$ ] kainate.

#### **2.4.4 - Récepteur L AP4 [59]**

Le récepteur L AP4 a été identifié par l'action d'un antagoniste de la transmission glutamatergique.

Le mode d'action exact du L AP4 n'est pas clair. Les études électrophysiologiques ont montré qu'à une concentration micromolaire, L AP4 n'antagonise pas les réponses excitatrices induites par le NMDA, le quisqualate ou le kainate. Au contraire sur la rétine, L AP4 mime l'action d'un transmetteur naturel sur les cellules bipolaires ON. Des études récentes ont mis en évidence une action présynaptique inhibitrice. Le site de liaison membranaire n'a pas été identifié. Il semble que le site

de liaison du [ $^3\text{H}$ ] glutamate dépendant du  $\text{Cl}^-$  soit le récepteur L AP4 bien que certaines études infirment ce fait.

#### 2.4.5 - Récepteur métabotrope [86] (fig.G)

Ce récepteur est lié au métabolisme du phosphatidyl inositol (PI). Ce récepteur a été identifié par l'étude du turn over du PI sur coupes de cerveau.

Le quisqualate, l'ibotenate et le glutamate sont de puissants agonistes. Il n'existe pas d'antagonistes compétitifs (bien que AP4 puisse être un antagoniste indirect). Son rôle physiologique reste à préciser bien qu'il semble impliqué dans les phénomènes de plasticité neuronale.

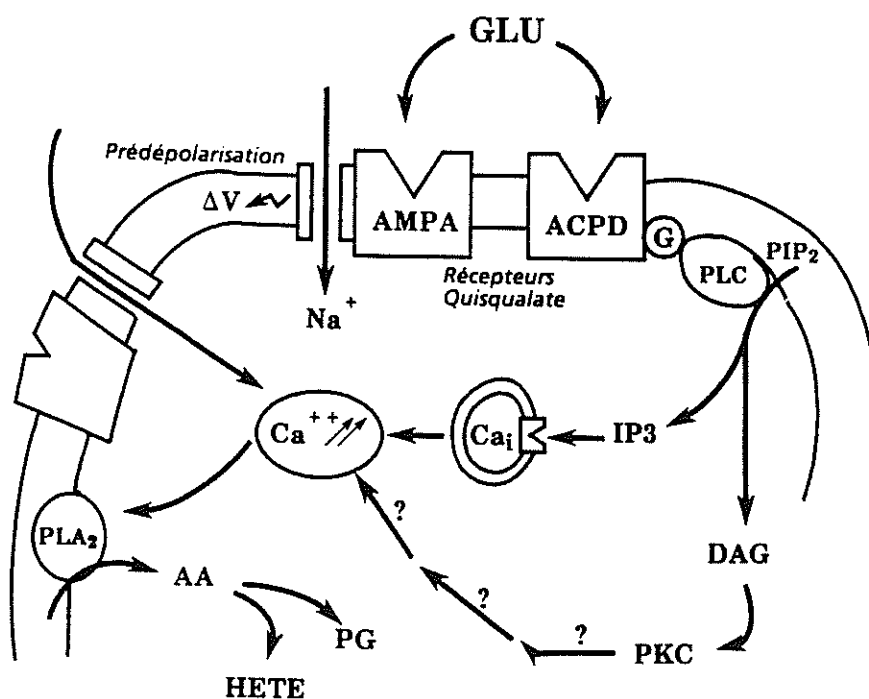


Fig.G : Implication des récepteurs de type "Quisqualate" dans "excitotoxicité" au glutamate.

#### 2.4.6 - Données de biologie moléculaire

L'étude de l'expression de clones sur *Xenopus* oocytes a été utilisée pour isoler un clone cDNA à partir d'une bibliothèque de cerveau de rat codant pour une protéine homomérique du canal ionique kainate [34]. Depuis cette description initiale du récepteur kainate, un grand nombre de cDNA apparentés ont été identifiés codant pour une variété de sous unités ayant d'importantes séquences similaires [6,8,45,61]. Heinmen et col. ont identifié quatre gènes appelés GluR<sub>1</sub>, GluR<sub>2</sub>, GluR<sub>3</sub> et GluR<sub>4</sub> produisant les récepteurs quisqualate, kainate quand le mRNA approprié est injecté dans les oocytes *Xenopus* [8]. Ces gènes codent pour des récepteurs sensibles à la fois à l'AMPA et au kainate mais pas au NMDA. C'est comme si AMPA et kainate étaient liés à un seul type de récepteur non NMDA. Les mêmes auteurs ont de plus identifié un gène codant pour un récepteur au glutamate (GluR<sub>5</sub>) appartenant à une nouvelle classe de récepteur glutamatergique [6]. De façon récente, deux versions du récepteur AMPA ont été identifiés différant par la séquence en acides aminés d'un petit fragment qui précède la quatrième région transmembranaire [97]. Les deux versions sont appelés "flip" et "flop". Pour chacun de ces deux récepteurs, l'épissage alternatif des mRNA entraîne une expression différente du cerveau de rat, en particulier dans l'hippocampe. Cela montre qu'il existe un autre type de régulation des récepteurs non NMDA par l'épissage alternatif.

### **3 - RELATIONS GLUTAMATE - AFFECTIONS NEURODEGENERATIVES**

#### **3.1 - GENERALITES**

En plus d'être un neurotransmetteur, l'acide glutamique possède des propriétés cytotoxiques. En 1957, Lucas et Newhouse [50] ont mis en évidence que des injections systémiques d'acide glutamique provoquaient une destruction de la couche neuronale interne de la rétine chez les souris nouveaux-nées. Ce mécanisme neurotoxique apparaissait obscur et l'acide glutamique n'était pas considéré comme un neurotransmetteur. En 1969, Olney et col. [65] ont montré que des souris traitées par l'acide glutamique à la naissance étaient anormalement petites et obèses. L'examen du cerveau mettait en évidence des lésions dégénératives, en particulier de l'hypothalamus, non protégées par la barrière hématoencéphalique [66]. Notant une corrélation entre les propriétés excitatrices de l'acide glutamique et les lésions neurotoxiques, Olney introduisit le terme d'excitotoxine.

Les lésions observées sont identiques à celles induites par des crises comitiales chez le rat [28]. L'injection d'excitotoxines dans le cerveau entraîne une destruction des neurones épargnant les axones de passage, les terminaisons présynaptiques et les cellules gliales (Axon-Sparing lesions).

La possibilité de bloquer ces effets par des antagonistes des récepteurs au glutamate [68] a permis de suggérer que la toxicité était médiée par un phénomène lié au récepteur post membranaire.

### 3.2 - ETUDE PHARMACOLOGIQUE DE LA TOXICITE DU GLUTAMATE

L'étude pharmacologique de la toxicité du glutamate est difficile, à la fois dans les modèles *in vivo* et dans les préparations *in vitro*. Les mécanismes de recapture par les cellules gliales et les terminaisons présynaptiques constituent une barrière à la diffusion de l'acide aminé dans l'espace extracellulaire. De grandes concentrations de glutamate doivent être infusées (mM) pour pénétrer dans le tissu et induire une neurodégénérescence [54]. Les études de pharmacologie cellulaire sur cultures neuronales utilisant des antagonistes du glutamate ont donné des résultats variables. Il semble en effet que les différents paramètres expérimentaux (concentration de l'agoniste, temps d'exposition, conditions de culture) favorisent la participation de l'un ou de l'autre des récepteurs. En accord avec les études électrophysiologiques, de faibles concentrations de glutamate activeraient de façon sélective les récepteurs NMDA.

Il existe une variabilité quant à la vulnérabilité de différents neurones reflétant des différences dans l'expression des récepteurs. Il a ainsi été montré sur des coupes de cervelet de rats que le NMDA, le kainate et l'AMPA induisaient respectivement une neurodégénérescence des cellules granuleuses, des cellules de Golgi et des cellules de Purkinje.

Quel que soit le type cellulaire, il est également possible de différencier les lésions sur le plan histopathologique : le NMDA induit une nécrose cellulaire rapide marquée par une ballonisation et une vacuolisation du cytoplasme, une expansion mitochondriale, une excentration du nucléole. L'AMPA et le quisqualate induisent une dégénérescence plus progressive avec des cellules condensées et sombres, une microvacuolisation du cytoplasme et une ballonisation dendritique.



Ces deux aspects de nécrose et de condensation picnotique sont observés *in vivo* dans différentes affections neurodégénératives (état de mal épileptique, ischémie cérébrale, traumatisme cérébral).

### **3.2.1 - Mécanismes impliqués dans la toxicité du glutamate**

Les mécanismes biochimiques exacts impliqués dans les processus excitotoxiques ne sont pas encore complètement élucidés. De nombreuses expérimentations ont cependant montré qu'il existe une dépendance ionique de ce phénomène. La neurotoxicité du glutamate peut être différenciée en deux phases pouvant correspondre à l'aspect de ballonnisation aiguë neuronale et de dégénérescence retardée avec condensation cellulaire observés *in vivo* [13,83].

La première composante est chlore et sodium dépendante et peut être induite par d'autres agents dépolarisants [83]. L'ouverture des canaux cationiques entraîne un influx de sodium, une dépolarisation membranaire et secondairement un influx de chlore et d'eau responsable de la ballonnisation des cellules.

La deuxième composante dépend de la concentration en calcium extracellulaire et peut être médiée par les effets toxiques produits par un influx excessif de calcium [12]. Il en résulte une élévation des concentrations cytosoliques en calcium libre entraînant des modifications des processus régulés par la biodisponibilité du calcium, en particulier du métabolisme énergétique de la cellule [85]. L'activation d'enzymes cataboliques joue un rôle primordial dans la mort cellulaire par une dégradation des protéines structurales par la calpaïne I, la production de radicaux libres cytotoxiques produits par activation des phospholipases et de la Xanthine oxydase [58]. L'activation de la protéine kinase C entraîne une altération des canaux ioniques avec augmentation de l'influx

de calcium. Cet influx exerce de plus un feed back positif sur la libération du glutamate. Ces deux mécanismes, sodium et calcium dépendant peuvent être induits de façon isolée. La composante calcique prédomine à de faibles concentrations de glutamate et dans certaines conditions pathologiques [15]. L'augmentation de calcium intracellulaire semble essentiellement médiée par l'activation des récepteurs NMDA [15]. Les antagonistes compétitifs des récepteurs NMDA abolissent la perte neuronale retardée [17].

Les récepteurs non NMDA contribuent également à la neurotoxicité du glutamate. L'influx sodique médié par l'activation des récepteurs non NMDA mais également par l'activation des canaux ioniques dépendant du voltage et par inversion des pompes membranaires  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  entraîne une excitotoxicité aiguë. Ils jouent un rôle primordial sur certaines populations neuronales, par exemple sur des neurones possédant une diaphorase et résistants à l'action du NMDA. L'AMPA et le kainate sont neurotoxiques après un temps d'exposition de plusieurs heures suggérant un rôle de ces récepteurs dans la genèse d'affections neurodégénératives chroniques. L'étude des mécanismes biochimiques sous tendus par l'activation des récepteurs non NMDA reste cependant difficile du fait d'une libération secondaire de glutamate endogène.

### **3.3 - AFFECTIONS NEUROLOGIQUES ET EXCITOTOXICITE**

De nombreuses affections neurologiques, vasculaires, métaboliques et dégénératives semblent pouvoir être liées soit expérimentalement, soit cliniquement à l'action excitotoxique de l'acide glutamique. On peut schématiquement différencier ces affections sur un mode aigu ou chronique.

### 3.3.1 - Affections neurodégénératives aiguës

Elles regroupent l'épilepsie, l'hypoglycémie, l'ischémie cérébrale et les traumatismes crâniens. La libération d'acides aminés excitateurs endogènes joue un rôle majeur dans ces affections entraînant des aspects cytopathologiques analogues à celles induites par les acides aminés excitateurs (A.A.E) [14]. Les études par microdialyse ont montré une augmentation des concentrations extracellulaires de glutamate et d'aspartate pendant l'ischémie cérébrale. L'effet neuroprotecteur des antagonistes des récepteurs NMDA fait penser que ces récepteurs jouent un rôle primordial dans la perte neuronale. Il n'existe cependant pas de corrélation précise entre les lésions cérébrales et la densité en récepteurs NMDA. Par contre, l'intoxication par l'acide domoïque semble liée à l'activation sélective des récepteurs au kainate.

#### **- Intoxication par l'acide domoïque [107]**

L'acide domoïque est un analogue trois fois plus puissant que le kainate. Il est synthétisé par une algue. En 1987, au Canada, des patients ayant consommé des moules accrochées à ces algues ont développé un syndrome sensitivomoteur quelques heures après l'ingestion avec crises comitiales motrices. Une partie des patients a présenté un syndrome chronique marqué par des troubles mnésiques, un syndrome extrapyramidal et une atteinte de la corne antérieure. L'étude post mortem du cerveau a montré des atteintes de la 5ème et 6ème couche corticale et des structures limbiques, régions riches en récepteurs au kainate.

### **- Ischémie cérébrale**

L'ischémie cérébrale reste une situation fréquente et invalidante en pathologie humaine. A côté de la prévention et de la correction des facteurs de risque, la pharmacologie contribue en développant des drogues capables, d'empêcher la mort cellulaire induite par l'hypoxie-ischémie.

La connaissance précise de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale est un prérequis au développement d'une drogue, sachant que les principales preuves d'efficacité sont l'histopathologie et la clinique.

Différents modèles animaux sont considérés comme validés : ischémie globale, focale ou multifocale. Les modèles d'ischémie globale sont simples à réaliser sur le plan technique mais ne permettent pas un bon contrôle du niveau d'ischémie atteint. La possibilité de créer une ischémie transitoire et réversible les rend intéressants pour l'étude des phénomènes de recirculation. Leur correspondance clinique se limite à l'arrêt cardiaque. Les modèles d'ischémie globale sont fondés sur la technique de la ligature des artères carotides communes associée ou non suivant les espèces animales à une électrocoagulation des artères vertébrales [80]. Le modèle d'ischémie focale par occlusion de l'artère cérébrale moyenne est la plus pertinente quant à sa correspondance avec l'accident ischémique chez l'homme. Cette technique est génératrice d'un oedème biphasique important comportant une phase précoce cytotoxique localisée préférentiellement au niveau de la substance grise, suivi plus tardivement d'une phase vasogénique consécutive à une rupture de la barrière hématoencéphalique, signant une nécrose neuronale irréversible. Un deuxième modèle d'ischémie focale a été décrit récemment [112]. Il utilise la formation de radicaux libres oxygénés

provoquée par une réaction photochimique entre un colorant, le rose bengale administré par voie veineuse chez le rat et un faisceau de lumière (560 nm) appliqué directement sur la peau du crâne. La peroxydation lipidique membranaire des cellules endothéliales ainsi induits et l'agrégation plaquettaire sont à l'origine d'une thrombose puis d'une nécrose cellulaire. Ce modèle permet le choix de la localisation de l'infarct avec une bonne reproductibilité de la taille de la lésion. Les modèles d'ischémie multifocale créent une ischémie peu ou pas réversible qui peut n'intéresser qu'un seul hémisphère ou être bilatérale ; ils auraient un rapport avec la démence vasculaire. On pratique l'injection de microsphères en plastique ou en métal dans l'artère carotide interne. La rupture de la barrière hématoencéphalique concomitante provoque un rapide et important oedème vasogénique. Un intérêt existe également pour une souche de rat dite "stroke-prone" dérivée d'une souche spontanément hypertendue [64] ; 80 % des rats mâles développent spontanément un accident ischémique ; ces animaux sont utiles pour une approche préventive au long cours.

La physiopathologie de l'ischémie [48,93] est dépendante du débit cérébral résiduel. Elle est donc différente dans l'ischémie globale et dans l'ischémie focale où le foyer est entouré d'une zone dite de pénombre offrant un gradient de débit régional [48,93]. Le temps d'interruption de la circulation est également un facteur important, une ischémie assez brève affectant les neurones des aires les plus vulnérables : cellules pyramidales de l'hippocampe et du néocortex, caudé putamen, thalamus ; une ischémie prolongée impliquera également les cellules gliales et vasculaires. L'ischémie résulte en une immédiate double cessation d'apport en oxygène et en glucose. La phosphorylation oxydative s'arrête. C'est une conséquence majeure dont découleront toutes les autres.

Le métabolisme anaérobie du glucose produit de l'acide lactique responsable d'une acidose.

Les pompes ioniques membranaires sont inactivées et provoquent une rupture de l'homeostasie ionique avec afflux de potassium et de chlore et influx de sodium et de calcium. L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium va alors jouer un rôle central induisant une libération massive des neurotransmetteurs monoaminergiques et neuroexcitateurs. L'activation des phospholipases, en particulier la phospholipase A<sub>2</sub> induit une libération d'acide arachidonique aux dépens des phospholipides membranaires. Simultanément, il y aurait activation de nucléases responsables de ruptures de la molécule d'ADN. La reperfusion, en rétablissant les apports d'oxygène, va entraîner également des lésions toxiques. Cette phase est dominée par la production de radicaux libres (O<sub>2</sub> ; OH.) générés par un fonctionnement enzymatique oxydatif à un fort niveau d'activité permis par l'accumulation des substrats dans la phase précédente : acide arachidonique et cyclooxygénase, monoamines et COMT, xanthines et forme O de la xanthine déshydrogénase. Les cibles de ces substances sont multiples : enzymes, protéines souffrées, acides nucléiques et sont à l'origine de la peroxydation lipidique. Les conséquences sont une désagrégation des microtubules, une inhibition du transport axonal, une altération de la structure et du fonctionnement des membranes, des récepteurs et finalement la mort cellulaire retardée (fig.H). Les métaux de transition sont également impliqués. Le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> est normalement stocké par la ferritine et la transferrine ; l'ion superoxyde le libérerait sous forme de fer ferreux Fe<sup>2+</sup>, qui catalyserait et entretiendrait les réactions de peroxydation. Le métabolisme de l'acide arachidonique produit des substances vasoactives

et thrombotiques : prostaglandines, tromboxanes par la voie de la cyclooxygénase, leucotriènes par la voie de la lipooxygénase.

La stratégie pharmacologique (fig.I) peut se concevoir au niveau de la biochimie cellulaire en bloquant l'entrée du calcium, la libération des neurotransmetteurs, l'acidose, la production de radicaux libres ou de façon symptomatique en agissant sur la pathologie consécutive : l'oedème, l'absence de recirculation, les convulsions [4]. L'intérêt de ces différentes approches doit être modulé selon le type d'ischémie : globale ou focale, le niveau de circulation résiduelle, la période où l'on se situe : avant, pendant, juste après, ou à distance de l'accident ischémique. Nous nous intéresserons plus particulièrement au blocage de l'effet des acides aminés excitateurs dont la concentration augmente nettement dans le liquide cérébral interstitiel au niveau des zones ischémisées [69]. Les antagonistes compétitifs et non compétitifs des récepteurs NMDA entraînent une neuroprotection importante des neurones corticaux après occlusion de l'artère cérébrale moyenne dans différentes espèces animales. Cet effet est observé à la fois chez les animaux prétraités ou traités deux heures après [11] (fig.J). Le volume du cortex infarci après occlusion de l'artère sylvienne est réduit de 40 à 65 % par les antagonistes compétitifs (CPP-ène) et non compétitifs (dizoclipine, TCP) et par des antagonistes du site polyamine (ifenprodil, SL 820715). In vivo, cette protection n'est pas spécifique des neurones riches en récepteurs NMDA et fait intervenir des interactions entre les neurones et les cellules gliales marquées par un gonflement astrocytaire, avec secondairement des effets sur le débit sanguin.

Les antagonistes des récepteurs NMDA ne protègent pas contre l'ischémie globale complète. Le NBQX antagoniste du récepteur AMPA protège de la perte neuronale retardée après un certain délai suivant une ischémie globale complète [91]. L'effet neuroprotecteur des

antagonistes NMDA est partiel quand l'ischémie globale est incomplète définie par un maintien du débit sanguin cérébral résiduel de 10 à 25 %. Cette nouvelle approche n'a pas encore reçu de début d'application en clinique. Quelques uns de ces antagonistes pourraient être les premiers candidats pour des essais cliniques dans la pathologie ischémique [1]. Il faudra néanmoins tenir compte du rôle de la neurotransmission amino-excitatrice dans la plasticité neuronale et dans les processus d'apprentissage et de mémoire, processus qu'il n'est pas forcément bon de neutraliser dans une perspective de récupération spontanée.

En conclusion, l'approche pharmacologique de l'ischémie cérébrale suppose les prérequis suivants :

(a) disposition de modèles fiables, non contestables, évoquant une situation clinique pathologique (b) définition des mécanismes physiopathologiques conduisant à la mort cellulaire (c) vérification de la correction des phénomènes délétères par un médicament (d) obtention de preuves neurochimiques, neurocomportementales et histologiques.

#### - épilepsie [89]

L'acide glutamique et ses analogues induisent des convulsions lorsqu'ils sont injectés expérimentalement à l'animal au niveau du cerveau ou de façon systémique [10]. Les lésions histopathologiques initiales se situent au niveau de l'arborisation dendritique. Ces lésions apparaissent dans les zones postsynaptiques au niveau de l'hippocampe. Des lésions similaires sont observées après stimulations prolongées des voies glutamatergiques afférentes [32].

Les injections d'acide kainique effectuées de façon systémique représentent une modèle d'épilepsie temporelle chez l'homme [5]. Les antagonistes des récepteurs NMDA sont parmi les agents anticonvulsivants les plus puissants [88].



## Neurones hippocampiques

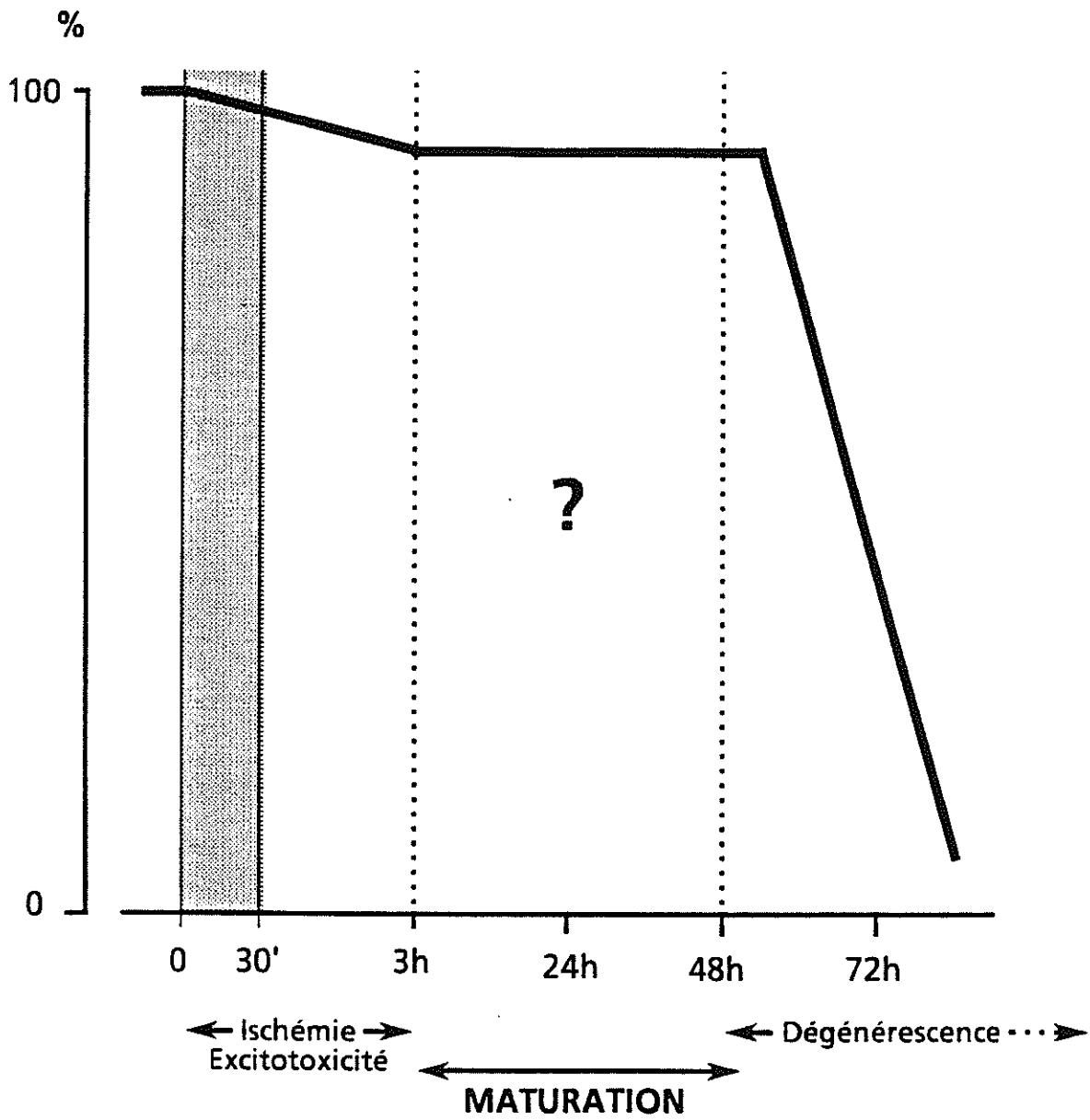


Fig.H : Ischémie cérébrale - Excitotoxicité et dégénérescence neuronale

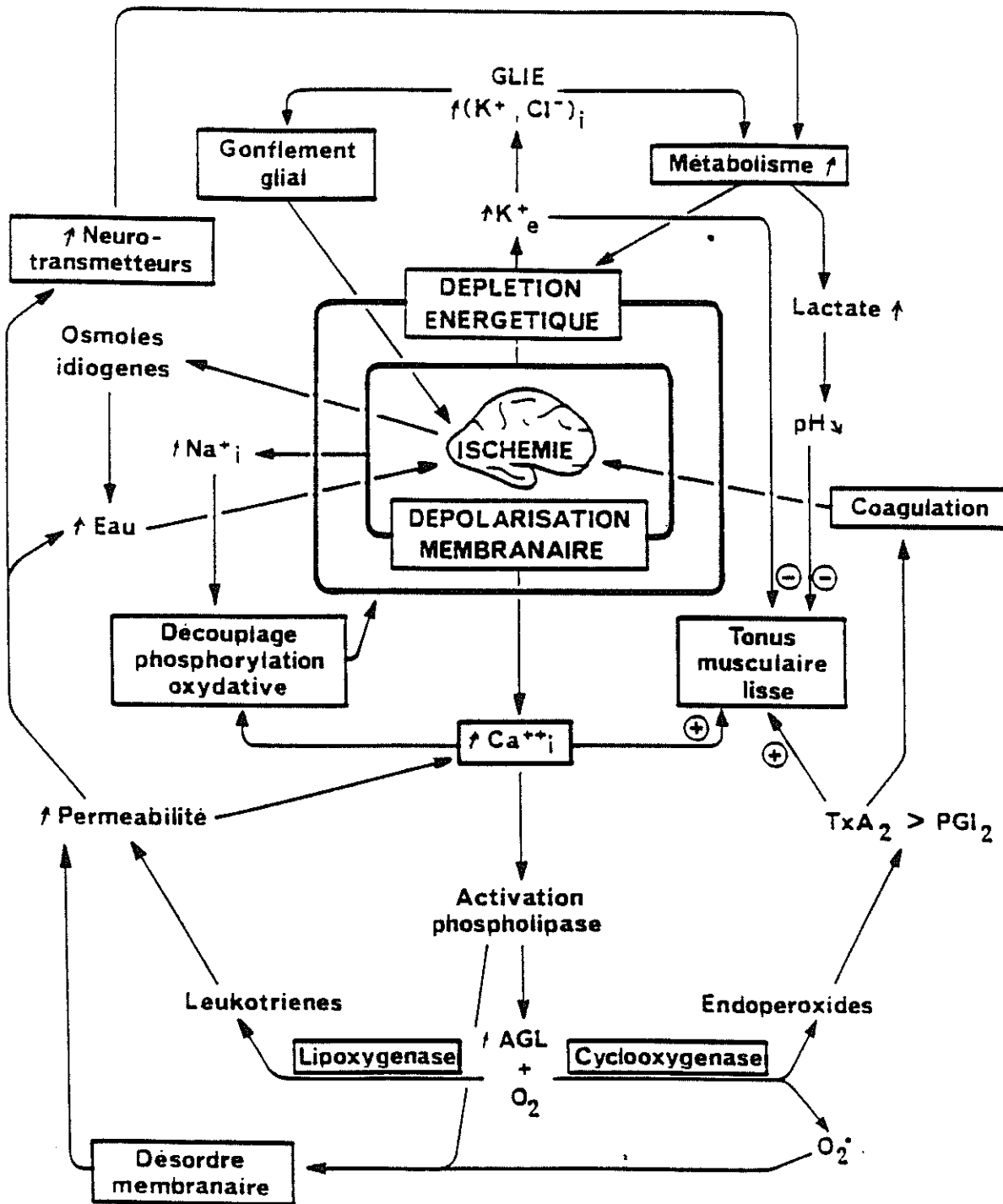
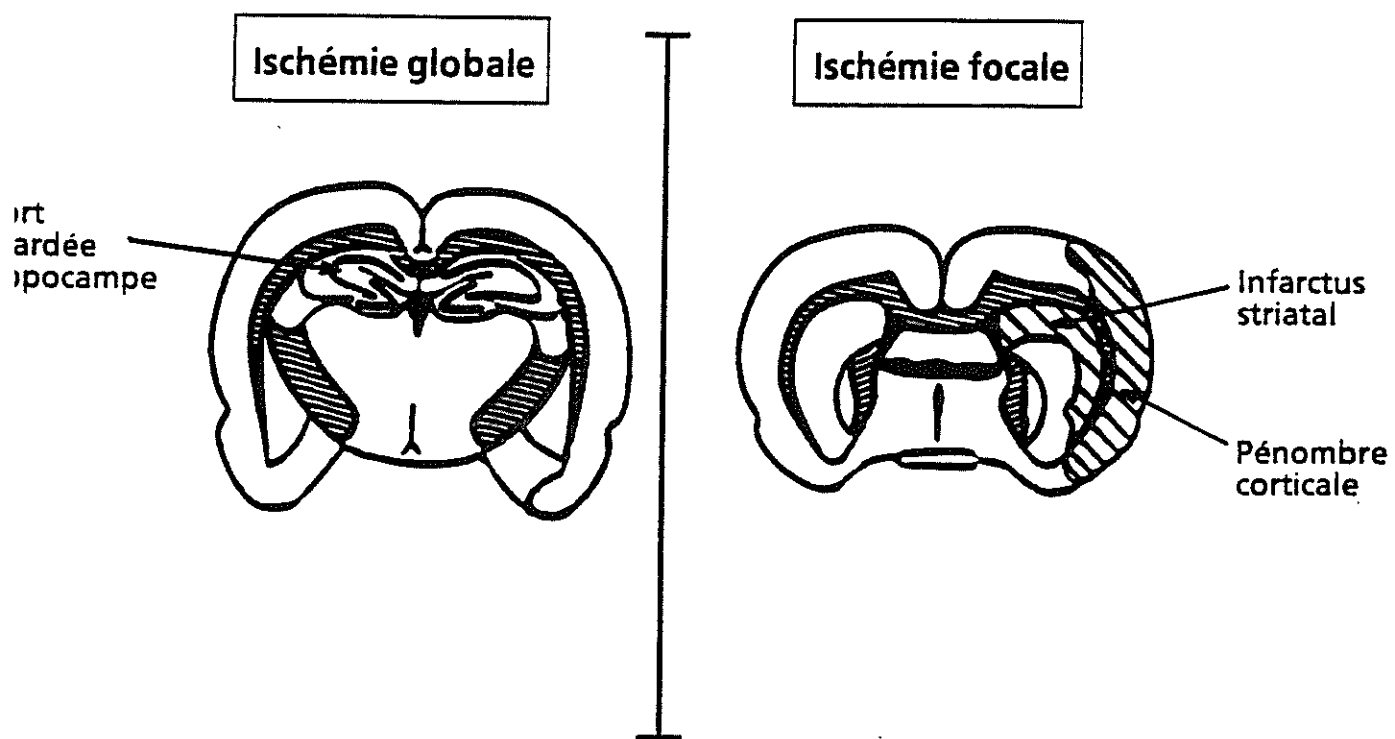


Fig.I : Ischémie cérébrale - Impacts pharmacologiques.



	Ischémie globale Hippocampe	Ischémie focale	
		Infarctus	Pénombre
pH <sub>e</sub>	↘↘	↘↘	≈N
Récepteur NMDA	Inactivé	Inactivé	Fonctionnel
Antagoniste NMDA	Inactif	Inactif	Actif
Autre antagoniste AAE	Actif	?	Actif

Fig.I : Ischémie cérébrale - Efficacité des antagonistes des AAE.

### 3.3.2 - Affections neurodégénératives chroniques

Il existe un certain nombre d'arguments pour penser que des mécanismes neuroexcitateurs interviennent dans la pathogénie des processus neurodégénératifs chroniques incluant la chorée de Huntington, l'atrophie olivopontocérébelleuse, la maladie d'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique [14].

Ces arguments reposent essentiellement sur des données expérimentales. Sur des modèles animaux, les acides aminés excitateurs induisent des modifications morphologiques et biochimiques du système nerveux central comparables à celles trouvées chez des patients atteints d'affections neurodégénératives [14,21,40]. Chez l'homme il existe quelques maladies associées à un déficit de la glutamate déshydrogénase où ce rôle est clairement établi : une forme récessive d'atrophie olivopontocérébelleuse, un déficit enzymatique la sulfite oxydase et peut être la SLA [67,73].

Nous allons voir maintenant dans une brève revue, les différentes maladies neurodégénératives dont la physiopathologie pourrait impliquer le glutamate.

#### **- Atrophie olivopontocérébelleuse (AOPC) forme de Dejerine-Thomas**

L'AOPC est une affection dégénérative du système nerveux caractérisée par une atteinte extrapyramidale, pyramidale, cérébelleuse et protubérantielle. Il a été mis en évidence une association entre une forme récessive de cette affection et un déficit partiel en glutamate déshydrogénase leucocytaire, associée à une élévation des taux plasmatiques d'acide glutamique [72].

### **- Maladie de Huntington**

La maladie de Huntington est une affection liée à une mutation autosomique dominante du bras court du chromosome 4 caractérisée par l'apparition de mouvements choréiques anormaux, et une altération cognitive progressive. En 1976, deux groupes ont montré [21,52] que des injections intrastriatales d'acide kainique reproduisaient les aspects histologiques et biochimiques de la maladie de Huntington. Une dégénérescence des neurones gabaergiques et cholinergiques fut notée, laissant intacts les neurones dopaminergiques, sérotoninergiques et glutamatergiques. Les neurones intrinsèques du striatum sont épargnés. L'injection d'acide quinoléique, une excitotoxine endogène agoniste des récepteurs NMDA reproduit les mêmes lésions en épargnant les neurones à somatostatine et au neuropeptide Y [87]. Récemment, Young et coll. ont rapporté une diminution du nombre de récepteurs NMDA dans le putamen [119].

### **- Maladie d'Alzheimer**

Une des hypothèses étiopathogéniques de cette affection fait intervenir le rôle cytotoxique de l'acide glutamique. Les lésions histologiques sont situées dans les régions corticales et sous corticales. L'application de kainate ou de NMDA induit une dégénérescence du nucléus basal du rat, zone cholinergique dont l'homologue est atteint au cours de la maladie d'Alzheimer.

Il a de plus été découvert que l'acide glutamique pouvait induire la formation de "paires hélicoïdales de neuro filaments (PHF)" lorsqu'il était appliqué à des neurones corticaux humains en culture [25]. L'acide kainique peut également induire une dégénérescence neuronale

marquée par une phosphorylation anormale des neurofilaments [41]. De nombreux auteurs étudient actuellement le lien pouvant exister entre cette phosphorylation anormale et la formation des dépôts de substance amyloïde. Des études récentes ont montré que la protéine Tau est anormalement phosphorylée au niveau des PHF. Sur des cultures primaires de neurones corticaux, des concentrations croissantes de glutamate induisent une augmentation de l'immunoréactivité de la protéine Tau (anticorps anti Tau<sub>2</sub>) [95]. Les antagonistes des récepteurs NMDA (MK 801 et AP7) en plus de leur effet neuroprotecteur entraînent une diminution de l'immunoréactivité de la protéine Tau. Les récepteurs NMDA joueraient un rôle important dans l'accumulation de cette protéine [20].

### - Sclérose latérale amyotrophique (SLA)

La SLA ou maladie de CHARCOT est une affection neurologique chronique d'évolution progressive et sans rémission. Elle se manifeste sur le plan clinique par l'association d'un syndrome neurogène périphérique, un syndrome pyramidal et l'absence de signes sensitifs. Elle est liée à une dégénérescence à la fois des premiers motoneurons du cortex cérébral et des motoneurons du tronc cérébral et de la corne antérieure de la moelle. La prévalence de la forme sporadique est estimée à 4 à 6 pour 100.000. Il n'existe actuellement aucun traitement efficace [105,106]. L'étiologie est inconnue. En dehors d'une hypothèse dysimmunitaire, il existe de nombreux arguments pour penser que des mécanismes neuroexcitateurs médiés par l'acide glutamique interviennent dans la pathogénie de ce processus neurodégénératif. Cette hypothèse excitotoxique repose sur la mise en évidence : d'anomalies du métabolisme du glutamate dans la SLA, d'altérations biochimiques du système nerveux central, et d'anomalies du métabolisme de la glycine. Une dysrégulation du métabolisme du glutamate a été mise en évidence chez des patients présentant un déficit en glutamine deshydrogénase (GDH) [72] et est responsable d'une atteinte sélective de structures du système nerveux central recevant une innervation putative glutamatergique [36]. Plaitakis et coll en 1985 ont montré l'existence d'un déficit de l'oxydation du glutamate chez 22 patients atteints d'une forme typique de SLA [74]. L'activité de la GDH a été retrouvée normale dans les leucocytes de patients atteints de SLA [75] et diminuée chez d'autres [39]. Ces résultats apparemment contradictoires peuvent être expliqués par l'existence de quatre isoformes différentes de la GDH pouvant être à l'origine de l'hétérogénéité clinique et génétique associée à un déficit partiel en GDH [42].

Presque toutes les études sont concordantes et ont mis en évidence une augmentation significative de 100 % ( $p < 0,001$ ) des taux plasmatiques de glutamate chez les patients atteints de SLA par rapport aux sujets contrôles [71,84]. Les tests de charge orale en glutamate monosodique (60 mg/kg) ont montré l'existence d'un pic plasmatique plus élevé et de durée plus longue que chez les sujets contrôles suggérant une distribution tissulaire défectueuse du glutamate dans l'organisme. Dans le liquide céphalorachidien, les concentrations en acide glutamique et aspartique sont augmentées de 100 à 200 % ( $p < 0,01$ ) tandis que les taux du dipeptide N acetyl-aspartyl-glutamate (N.A.A.G) et de son métabolite le N acetyl aspartate (N.A.A) sont multipliés par 2 ou par 3. Il n'a pas été retrouvé de relation entre la concentration en acide aminé, la durée de la maladie, l'atteinte clinique et l'âge des patients [84]. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Patten et coll en 1978 [70].

Les études menées en post mortem sur le SNC ont révélé une diminution significative des taux de glutamate de 21 à 40 % dans différentes régions du SNC de patients atteints de SLA [76]. Bien que cette diminution ait été la même en valeur absolue dans tout le SNC (environ 2 umoles/mg de poids sec), les taux au niveau de la moelle cervicale et lombaire sont les plus affectés (de 38 à 40 %  $p < 0,001$ ) plus que dans d'autres zones du SNC (cortex cérébellux : 21 %  $p < 0,05$ , cortex frontal : 30 %  $p < 0,01$ ). Cette atteinte est spécifique, les taux des autres acides aminés ne sont pas modifiés, en dehors de l'aspartate qui est diminué de façon significative au niveau de la moelle uniquement [76]. Les taux de NAA et de NAAG sont également diminués significativement au niveau de la moelle [18]. Associé à ces altérations, Rothstein et coll ont mis en évidence au niveau de la corne ventrale de la moelle cervicale de 8 patients atteints de SLA une diminution de 35 % de l'activité de la choline acetyl tranferase [84].



La présence de ces anomalies systémiques associées aux altérations biochimiques ont fait suggérer un déficit du métabolisme et ou du transport du glutamate. L'élévation des taux périphériques de glutamate et la diminution dans le SNC suggèrent une altération de la distribution entre le secteur intracellulaire et extracellulaire [79]. Cette altération pourrait être secondaire à une dysrégulation des processus de recyclage par une anomalie membranaire affectant le transport du glutamate, ou à une défaillance des systèmes de recaptage ou du mécanisme de stockage [79]. Le mécanisme exact est actuellement inconnu.

Il a été également mis en évidence des anomalies du métabolisme de la glycine au cours de la SLA. La glycine est un neuromédiateur inhibiteur présent en grande quantité dans la moelle et possède également la propriété d'augmenter les réponses post synaptiques glutamatergiques via le récepteur NMDA. Le métabolisme de la glycine a été étudié chez 17 patients atteints de SLA après test de charge orale (60 mg/kg) [38]. Trente et quarante cinq minutes après le test, les concentrations plasmatiques en glycine sont significativement plus basses chez les patients atteints de SLA que chez les patients témoins. Les dosages urinaires de glycine sont identiques dans les deux groupes. Cette anomalie du métabolisme de la glycine pourrait être liée à un hypercatabolisme. L'anomalie du métabolisme du glutamate couplée à celui de la glycine pourrait provoquer dans le système nerveux central une rupture du couple excitation inhibition post synaptique au niveau des motoneurones provoquant une neuro-excitotoxicité.

Deux modèles cliniques viennent étayer cette hypothèse neuroexcitotoxique, liés à la consommation d'excitotoxines exogènes, le lathyrisme et la maladie de Guam. Le lathyrisme est une forme de paraparésie spastique endémique dans certains pays d'Afrique et d'Asie

dont la prévalence varie de 2 à 5 %. Elle est induite par la consommation excessive d'un légume : le latyrus sativus. Un puissant acide aminé neuroexcitateur, la beta N-oxalylamino L alanine (B.O.A.A) extrait des grains de ce légume provoque une atteinte corticospinale chez l'animal. L'étude des manifestations cliniques chez l'homme et le singe cynomolgus intoxiqués par le B.O.A.A a permis de prouver l'existence d'une association directe entre l'intoxication exogène par ce puissant agoniste glutamatergique et l'atteinte clinique des motoneurones [98,100]. La maladie de Guam est une affection neurologique endémique chez la population Chamorro des Iles Guam et Rota du Pacifique Ouest définie par l'association d'une SLA, d'un syndrome parkinsonien et d'une démence de type Alzheimer. La diminution nette de son incidence après la deuxième guerre mondiale a fait suggérer l'existence d'un facteur environnemental fortement lié à la culture de ce peuple. Un des facteurs retenus est la consommation d'une plante neurotoxique (cycas circinalis). Les noix de cette plante contiennent un acide aminé la Beta N methylamino L alanine (B.M.A.A). Des macaques consommant des cycas développent un syndrome extrapyramidal, des troubles moteurs et des troubles du comportement. Ces signes cliniques sont corrélés à une chromatolyse et à une dégénérescence des motoneurones corticaux et de la corne antérieure de la moelle. Cette action neurotoxique peut être bloquée par des antagonistes des récepteurs NMDA [99,101].

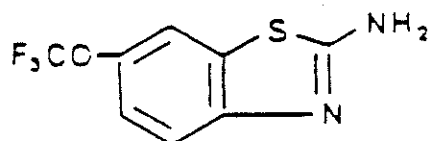
La mise en évidence d'une implication du système glutamatergique dans la SLA conduit à la proposition de stratégies thérapeutiques. Un moyen d'atténuer la neurotoxicité, peut être sans affecter la transmission physiologique glutamatergique pourrait être l'utilisation d'antagonistes des sites glycine des récepteurs NMDA. Ils pourraient prévenir une augmentation anormale des réponses médiées par le NMDA et donc une dégénérescence neuronale dans les régions du

SNC où la concentration de glycine est élevée [79]. Une autre approche préconisée est l'utilisation d'agents agissant en présynaptique sur l'activité de la GDH. Différents composés peuvent stimuler l'activité de la GDH et modifier le métabolisme du glutamate. Les acides aminés branchés, L leucine, L isoleucine et L valine sont absorbés après prise orale avec un bon passage de la barrière hémato-encéphalique [78]. De ces trois acides aminés, la L leucine et à un moindre degré la L isoleucine peuvent activer le GDH cérébrale à des concentrations physiologiques [78]. Une étude pilote en double aveugle contre placebo a montré un bénéfice significatif en terme de conservation de la force musculaire et d'autonomie fonctionnelle dans le groupe de patients atteints de SLA. Cet essai a été réalisé pendant un an chez 22 patients [77]. Il peut également être envisagé une action en pré et en post synaptique en utilisant une combinaison d'antagonistes des récepteurs non NMDA et les acides aminés branchés ou d'inhibiteurs des sites glycines et les acides aminés branchés. Ces nouvelles approches thérapeutiques doivent être explorées.

**EN CONCLUSION** : De nombreuses affections neurologiques vasculaires, métaboliques ou dégénératives semblent liées à l'action excitotoxique du glutamate jouant le rôle de toxine endogène. Ces affections actuellement incurables, justifient donc le développement et l'étude de nouvelles molécules inhibitrices de la transmission glutamatergique.

## 2ème PARTIE : LE RP 54274 ou RILUZOLE

Le Riluzole ou RP 54274 est une molécule synthétisée par Rhône Poulenc Santé; sa formule chimique est la suivante : amino 2 trifluoromethoxy-6 benzothiazole.



Il appartient à la série chimique des benzothiazoles.

### 2.1 - PHARMACOLOGIE COMPORTEMENTALE

#### 2.1.1 - Effet anticonvulsivant

Le RP 54274 est un puissant anticonvulsivant dans les modèles suivants :

- \* modèles de convulsions induites par les AAE (L glutamate, L aspartate et acide homocystéique).
- \* modèles de convulsions induites par les inhibiteurs de l'uptake du glutamate (ouabaïne - harmaline).
- \* modèles de convulsions induites par les inhibiteurs de métabolisme du glutamate (inhibiteurs de l'acide glutamique decarboxylase : Ac 3-mercaptopropionique et isoniazide).
- \* modèles de convulsions induites par stimulation électrique (électrochoc supramaximal chez la souris et le rat).
- \* crise audiogène chez la souris DBA/2.

\* modèles de convulsions induites par les antagonistes du GABA  
(pentétrazol - picrotoxine - bicuculline)

\* modèles de convulsions induites par blocage des canaux potassiques (4 aminopyridine).

Il est particulièrement actif dans l'électrochoc supra-maximal, dans les modèles de convulsions induites par le glutamate, l'aspartate, l'acide homocystéique et l'ouabaïne. Son spectre d'activité anticonvulsivante ressemble donc à celui de la carbamazépine et diffère donc de ceux des benzodiazépines, des barbituriques et du Valproate de Na.

### **2.1.2 - Effet antiischémique**

Le RP 54274 montre un puissant effet protecteur neuronal contre l'ischémie cérébrale dans deux modèles animaux :

- Le modèle d'hypoxie hypobarique chez la souris (méthode Wauquier et coll. modifiée, 1981, 1986) [113].

Le temps de survie moyen de souris dans des conditions d'hypoxie hypobarique déterminé dans des groupes de 12 souris, 30 minutes après administration intrapéritonéale de RP 54274. Le RP 54274 entraîne une augmentation dose dépendante du temps de survie significative à partir de la dose de 4 mg/kg, la DE50 étant de 3,8 mg/kg. Le RP 54274 montre un effet neuroprotecteur statistiquement significatif dès la dose de 4 mg/kg I.P dans ce modèle.

- **Le modèle d'ischémie expérimentale par clampage bilatérale des carotides chez la gerbille** (technique décrite par Jarrot, 1980) [43].

L'effet neuroprotecteur du RP 54274 à la dose de 4 mg/kg i.p a été évalué par :

. test d'évitement passif (Araki et coll. 1987) [3] dans lequel est mesuré le délai mis par l'animal pour descendre sur une grille électrifiée, la gerbille ayant été conditionnée préalablement à éviter la grille électrifiée ; cette approche permet d'évaluer l'effet négatif de l'ischémie sur la capacité de rétention d'un comportement appris et sur la mémoire et donc d'un éventuel effet protecteur du RP 54274.

. examen histopathologique du tissu cérébral.

. une analyse autoradiographique quantitative des récepteurs cholinergiques par QNB tritié.

Dans le test d'évitement passif, les gerbilles ischémisées montrent un raccourcissement significatif du délai de descente sur la plaque électrifiée témoignant d'une détérioration du processus mnésique du fait de l'ischémie. Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les animaux témoins (non ischémisés) et les animaux ischémisés et prétraités par RP 54274.

Sur le plan histologique, le RP 54274 prévient totalement la nécrose des cellules pyramidales de l'aire CA1 de l'hippocampe chez les gerbilles ischémisées.

L'analyse autoradiographique quantitative montre une diminution des récepteurs muscariniques de l'aire CA1 chez les gerbilles ischémisées non prétraitées. Cette diminution est significativement moins importante chez les gerbilles ischémisées prétraitées (cf tableau I).

**Tableau I : Autoradiographie des sites de fixation du QNB tritié dans l'hippocampe de la gerboise.**

Structure	P moles/mg de protéine			
	Animaux contrôles n= 5	Animaux contrôles + RP 54274 n = 5	Animaux ischémies non traités n = 10	Animaux ischémies traités n = 7
CA <sub>1</sub> (stratum oriens)	5,2	5,3	3,5+++	4,3++ <sup>oo</sup>
CA <sub>1</sub> (stratum radiatum)	6,2	6,2	4,3+++	5,4+ <sup>oo</sup>
CA <sub>1</sub> (stratum lacimonum molecular)	4,6	5,2	3,6+++	4,4 <sup>ooo</sup>
CA <sub>3</sub>	4,2	4,2	4,0	4,2
Gyrus denté	5,5	5,8	5,6	5,7

+ p < 0,05

<sup>oo</sup> p < 0,01

++ p < 0,01 / groupe contrôle

<sup>ooo</sup> p < 0,001 / groupe animaux

+++ p < 0,001

ischémiés

### Etude électrocorticographique

De plus l'effet neuroprotecteur du RP 54274 à 2,4,8 mg/kg a été évalué sur l'électrocorticogramme (ECoG) de la gerbille avant et après occlusion bilatérale des carotides pendant six minutes sous anesthésie à l'halothane.

Le RP 54274 protège de façon dose dépendante l'altération des fréquences rapides de l'ECoG (> 7,5 Hz). A 4 et 8 mg/kg, une nette

amélioration de la bande de fréquences 7,5 - 12 Hz est observée chez les animaux ischémiés; de même une amélioration significative de la bande 12 - 20 Hz est enregistrée après traitement avec le RP 54274 à 8 mg/kg.

**Tableau II : Modification de l'électrocorticogramme 7 jours après occlusion bilatérale des carotides chez la gerbille : changement dans la distribution de l'ECOG (% des contrôles).**

Traitement ischémie	Nbre	7,5 - 12 Hz (%)	12 - 20 Hz
Véhicule O	6	7 ± 5	0 ± 3
Véhicule 6'	12	42 ± 3	26 ± 3
RP 54274			
2 mg/kg 6'	5	38 ± 3	27 ± 4
4 mg/kg 6'	6	30 ± 4 *	8 ± 9
8 mg/kg 6'	11	17 ± 4 ***	8 ± 4 **
8 mg/kg 0	4	7 ± 6	0 ± 4

\* p < 0,05

\*\* p < 0,01

\*\*\* p < 0,001 comparaison au groupe véhicule + ischémie

### **2.1.3 - Modification de l'utilisation du glucose cérébral après administration du Riluzole chez le rat**

La consommation cérébrale de glucose est mesurée par la technique d'autoradiographie utilisant le 2 Desoxy D (1 - 14 C) glucose, après une administration unique de Riluzole chez le rat.



Le Riluzole est administré par voie intraveineuse, aux doses de 3 et 9 mg/kg, 10 minutes avant la mesure de la consommation cérébrale de glucose. On observe une diminution dose dépendante dans la majorité des 79 structures analysées. A la dose de 3 mg/kg les réductions de l'utilisation de glucose sont comprises entre 10 et 25 % dans les aires visuelles et auditives. Dans le système limbique, le riluzole provoque une diminution d'environ 15 % de la consommation de glucose mais cette diminution est moins importante dans les zones impliquant le système extrapyramidal et les fonctions sensitives et motrices.

A la plus forte dose de riluzole (9 mg/kg), les aires visuelles et auditives présentent des altérations significatives (approximativement 30 à 45 % de diminution) du métabolisme énergétique. A cette même dose on observe dans les aires limbiques, sensorielles et motrices des diminutions de 40 à 45 % de la consommation de glucose.

Ces résultats démontrent que le riluzole réduit l'activité neuronale dans de nombreuses structures cérébrales.

## 2.2 - NEUROBIOCHIMIE

L'interaction potentielle du RP 54274 avec :

- . Les récepteurs de certains neuromédiateurs [adrénergiques ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ), dopaminergique (D<sub>2</sub>), sérotoninergique (5HT<sub>2</sub>), histaminergiques (H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>), cholinergique et gabaergique (BZD)].

- . Les récepteurs peptidergiques (CGRP, CCKB, galanine, neuropeptide Y, neurotensine, opiacés ( $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\sigma$ ) somatostatine, SP, VIP).

- . Les canaux ioniques (Ca<sup>++</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>).

a été étudiée par des techniques de binding in vitro. Dans les conditions expérimentales retenues, le RP 54274 n'a pas montré d'affinité pour les sites récepteurs ou les canaux ioniques.

De la même manière, le RP 54274 n'a pas d'effet direct sur les seconds messagers étudiés (cGMP, Pi). Toutefois, à faible dose (0,5 mg/kg IV), le RP 54274 antagonise les effets du L glutamate sur la libération de dopamine dans le noyau caudé de rat. Il diminue également les taux de dopamine et de sérotonine dans le striatum de rat à la dose de 0,1 mg/kg IP. Appliqué localement dans le noyau caudé de chat, le RP 54274, à faible concentration ( $10^{-5}M$ ), inhibe la libération spontanée de glutamate.

Les études électrophysiologiques sur cellules de Purkinje montrent que le RP 54274, à des concentrations de l'ordre de 3 à 5  $10^{-6}M$  diminue l'augmentation, induite par le L glutamate, de la fréquence de décharges de ces neurones. Par contre, il ne diminue pas la réponse induite par le L aspartate.

### **2.3 - PROTOCOLE DE PHARMACOLOGIE CLINIQUE**

Un des axes de développement du RP 54274 est la sclérose latérale amyotrophique.

Une étude de phase II a donc débuté le 1er Juin 1990 visant à évaluer l'efficacité et la tolérance du RP 54274 à la posologie de 100 mg/j pendant un an chez 160 patients ambulatoires atteints de SLA. Il s'agit d'une étude multicentrique, en double aveugle contre placebo et en groupes parallèles avec randomisation équilibrée par centre et stratification par forme de début de la maladie (forme à début périphérique et forme à début bulbaire). Sept centres participent à l'étude dont le service de Neurologie du CHU Dupuytren. Dans ce

centre, douze patients ont été sélectionnés. Les critères d'inclusion ont été les suivants : les patients suivis en ambulatoire présentaient une forme typique de SLA associant une lésion de la corne antérieure et un syndrome pyramidal (diagnostic reposant sur des critères cliniques et électriques) ou une forme de début périphérique (atteinte des membres) ou bulbaire, évoluant depuis moins de cinq ans. Les patients de sexe masculin ou féminin sont âgés de 20 à 75 ans et ont été capables de comprendre parfaitement l'information donnée et de signer un consentement éclairé écrit.

Un certain nombre de critères de non inclusion ont été également définis à savoir : être porteur d'une trachéotomie, l'existence de signes de démence ou de troubles psychologiques sévères, les patients étant susceptibles de subir dans les deux mois après l'inclusion une trachéotomie, les patients présentant un syndrome restrictif supérieur ou égal à 40 % aux E.F.R datant de moins de deux mois, les patients présentant une insuffisance hépatique avérée ou un bilan hépatique anormal (SGOT et ou SGPT supérieur à deux fois la borne supérieure), une insuffisance rénale (créatininémie > 200  $\mu\text{mol/l}$ ), les patients nécessitant un traitement inducteur ou inhibiteur enzymatique, les patients présentant une maladie évolutive, grave autre que la SLA, susceptible de gêner l'évaluation du handicap ou susceptible de menacer le pronostic, l'existence d'une gammopathie monoclonale à l'immunoélectrophorèse des protéines, les patients refusant de signer la fiche de consentement, ne pouvant être joints en cas d'urgence, susceptibles de ne pas être coopérants ou respectueux des obligations inhérentes à la participation de l'étude et enfin les femmes enceintes ou qui allaitent.

Les critères principaux d'évaluation de l'efficacité sont la survie dans l'étude et l'échelle de Norris modifiée. Sont regroupés dans

cette échelle, une évaluation fonctionnelle, une évaluation de l'atteinte bulbaire, un examen clinique neurologique et les données de l'interrogatoire. Un score global et quatre sous scores sont calculés. Cette évaluation est réalisée lors de la visite d'inclusion puis lors des visites tous les deux mois.

Les critères secondaires sont le testing de la force musculaire segmentaire, les épreuves fonctionnelles respiratoires, l'appréciation clinique globale par l'investigateur (CGI) et des échelles analogiques visuelles d'auto-évaluation (E.A.V).

L'évaluation de la tolérance est réalisée par un suivi clinique avec recueil des évènements intercurrents, par une mesure des pressions artérielles et des fréquences cardiaques en position couchée ou assise, un ECG et par un bilan biologique tous les deux mois. Six mois d'inclusion ont été prévus de juin à novembre 1990. L'étude doit donc être terminée le 30 Novembre 1991. la date de point est fixée au 30 Novembre 1991.

Les résultats ne seront connus qu'après analyse. Entre la date de point et la disponibilité des résultats (31 Mars 1992) un suivi en aveugle sera réalisé.

**PROCOLE PHARMACOLOGIE**

**EXPERIMENTALE**

## **1 - MODELE D'ETUDE PHARMACOLOGIQUE**

### **1.1 - GENERALITES**

Des cultures de tissu nerveux ont été pratiquées depuis 1907, date à laquelle Harrison les employa pour maintenir des cellules somatiques vivantes in vitro et explorer la génèse des fibres nerveuses. Depuis plusieurs années, leur champ d'application s'est élargi en raison des possibilités accrues de standardisation. On distingue les cultures primaires des cultures de lignées transformées telles les PC 12 (cellules de la médullo surrénale de rat) ou les neuroblastomes.

Au sein des cultures primaires, il faut également distinguer les cultures en explant de tissus non dissociés proches des systèmes de perfusion, les cultures organotypiques, des cultures de cellules dissociées.

Nous avons utilisé un de ces modèles de culture de cellules dissociées. Il s'agit des cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de rat.

La première partie de notre travail a consisté à obtenir des cultures pratiquement pures de neurones corticaux.

### **1.2 - CULTURES PRIMAIRES DE NEURONES CORTICAUX**

#### **D'EMBRYONS DE RAT**

En préambule, il faut rappeler que lors du développement du système nerveux, on assiste à la succession chronologique de deux phases: la phase mitotique pendant laquelle se multiplient les neuroblastes dérivant du tube neural et la phase de différenciation durant laquelle ils acquièrent la morphologie et le phénotype neuronaux avec la

mise en place de leurs prolongements et la synthèse des neurotransmetteurs. Les neurones doivent être prélevés en fin de phase mitotique. Pour ces raisons, chez le rat, on prélève les neurones au cours du deuxième tiers de la gestation, la phase mitotique s'achèvant pendant cette période. La différenciation neuronale s'effectuera ex vivo dans les boîtes de culture.

### 1.2.1 - Dissection

Des rates Wistar ont été sacrifiées après 17-18 jours de gestation. La peau de l'abdomen des rates gestantes est stérilisée par immersion dans 70 % d'éthanol pendant quelques minutes. Les foetus de 17-18 jours sont extraits par césarienne de l'utérus gravide de façon stérile et placés dans des boîtes de Petri de 120 mm de diamètre contenant du PBS (phosphate buffered saline) glucose sans magnésium sans calcium.

Les foetus sont ensuite dégagés de leurs enveloppes embryonnaires. Avec une paire de ciseaux stériles, les foetus sont décapités. Après avoir placé les têtes des foetus dans une boîte de Petri de 60 mm de diamètre contenant du PBS glucose stérile, la peau est incisée en partant de la base du crâne jusqu'au milieu des yeux pour exposer la voûte crânienne. Avec une deuxième paire de ciseaux stériles, une incision médiane est pratiquée en prenant soin de ne pas léser le tissu nerveux en assurant une pression légère vers le haut. Une petite incision perpendiculaire à la partie supérieure de la ligne médiane permet la libération du cerveau. Celui-ci est excisé de façon soigneuse avec une spatule stérile des lobes olfactifs vers la partie postérieure du cerveau. Les cortex sont ensuite placés dans une boîte de Petri de 35 mm de diamètre et immergés dans une solution saline stérile (138 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 32 mM glucose). Les cortex sont

disséqués permettant de les séparer du striatum et de l'hippocampe. Ensuite, une excision des méninges est réalisée. Cette étape est importante car elle détermine la pureté de la culture.

Les cortex sont ensuite placés dans une nouvelle boîte de Petri contenant la solution saline définie ci-dessus après avoir ajusté le pH à 7,4. Les cortex sont ensuite découpés en cubes de 1 mm de côté.

### **1.2.2 - Dissociation mécanique**

Ces fragments sont ensuite dissociés mécaniquement pendant cinq minutes dans une solution saline PBS glucose sans calcium sans magnésium. Cette dissociation est assurée après aspiration des fragments par des passages itératifs dans une pipette Pasteur. Après sédimentation, le surnageant est recueilli et le culot est resuspendu dans 2 ml de la même solution. Une deuxième dissociation est réalisée. Une centrifugation de la suspension cellulaire (300 G pendant 10 minutes) permet de récupérer un culot cellulaire qui servira à l'ensemencement. Il est repris par du milieu de culture MEM (minimum essential medium) de Eagle contenant des sels de Earle (MEM Earles' salts GIBCO) supplémenté en glutamine (200 mM) et dont le pH est ajusté à 7,4.

### **1.2.3 - Supports**

Il s'agit des boîtes de Petri (NUNC) de 35 mm de diamètre (20 puits). Le support synthétique des boîtes est incubé avec une solution de poly - L - Lysine (SIGMA P 9955) de poids moléculaire 30 000 - 70 000 qui est déposée de façon à recouvrir le support, pendant une heure. Les boîtes sont placées à 37°C dans un incubateur sous 5 % de CO<sub>2</sub> - 95 % d'air et à saturation de vapeur d'eau.



#### 1.2.4 - Milieux de culture

La reproductibilité des cultures étant un paramètre essentiel, les milieux de cultures doivent être définis le plus rigoureusement possible. Ils doivent apporter les éléments minéraux et organiques en quantités proches de celles du milieu intérieur.

Il s'agit du milieu type MEM (MEM Earles' salts GIBCO) contenant des acides aminés, des vitamines, des sels minéraux et des substances énergétiques. Ce milieu de base est enrichi en glutamine transformé par les enzymes cellulaires en leucine, isoleucine et acide glutamique (1 ml de L-glutamine pour 100 ml MEM), en glucose (1,5 ml glucose 20 % pour 100 ml MEM) en antibiotiques (Pénicilline 5 UI/ml - Streptomycine 100 ug/ml) et en bicarbonates (38 mM). Le pH est ajusté à 7,4.

Nous avons testé trois milieux de culture différents.

**Le milieu M1** ou milieu enrichi en sérum est défini par une supplémentation au milieu de base, de 10 % de sérum de veau foetal et de 10 % de sérum de cheval testés pour cultures. Des échantillons de ces sérums ont été expérimentés au préalable sur des cultures. Ils sont conservés congelés par aliquots à -20°C.

**Le milieu M2** : est un milieu synthétique sans sérum appelé milieu défini.

Le tableau III regroupe les différents constituants additionnés au milieu synthétique de base.

**Tableau III : Composition du milieu défini M<sub>2</sub>**

Composants	Conservation	Concentration finale
INSULINE testée pour culture	+ 4°C	25 ug/ml
PROGESTERONE MW 314.5	T° ambiante	2 - 10 <sup>-8</sup> M
TRANSFERRINE	+ 4°C	100 ug/ml
SELENIUM Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 5H <sub>2</sub> O	T° ambiante	3 - 10 <sup>-8</sup> M
PUTRESCINE	T° ambiante	10 <sup>-4</sup> M
OVALBUMINE 1 % (SIGMA B2518)	- 20°C	10 ul/ml

Le milieu M<sub>2</sub> a été utilisé après un "coating" pendant une heure avec 10 % de sérum de veau foetal testé pour culture. Cette opération est réalisée après incubation des boîtes de cultures avec la solution de poly L Lysine et un rinçage avec une solution saline type PBS.

Le milieu M<sub>3</sub> est défini par un mélange à part égale des milieux M<sub>1</sub> et M<sub>2</sub> ci dessus déterminés.

### 1.2.5 - Ensemencement

Le culot cellulaire est remis en suspension dans 3 ml du milieu de culture. La densité cellulaire est déterminée à la cellule de THOMA. La suspension est alors diluée à la concentration de 1,25 10<sup>6</sup> cellules/ml puisensemencée.

### 1.2.6 - Suivi des cultures

Le développement des cultures est apprécié par l'observation en microscopie à contraste de phase.

Le milieu de culture doit être renouvelé régulièrement : un renouvellement par tiers tous les trois jours représente un bon compromis. Après 5 à 7 jours de culture, la division des cellules gliales est stoppée après application de cytosine arabinooside  $10^{-5}M$  pendant 24 heures. Ce blocage des mitoses des cellules gliales n'a pas été nécessaire avec le milieu de culture défini M2.

Les boîtes de culture sont maintenues à  $37^{\circ}C$  dans un incubateur sous 5 %  $CO_2$  - 95 % d'air et à saturation de vapeur d'eau.

### 1.2.7 - Tests de viabilité cellulaire

La viabilité des neurones corticaux en culture a été appréciée par :

**1 - comptage** de cent neurones observés dans des champs prédéterminés en microscopie à contraste de phase. Des photographies de ces champs ont été faites.

**2 - test d'exclusion d'un colorant vital (Bleu Trypan).**

Les cellules vivantes sont imperméables à ce colorant. Le pourcentage de cellules non colorées représente l'indice de viabilité après incubation dans une solution à 0,4 % de bleu Trypan.

**3 - dosage dans le milieu de culture d'un enzyme la lacticoeshydrogenase (LDH) (UI/L).**

Un autre indice de viabilité utilisé est la mesure de la concentration extracellulaire en LDH libéré par les neurones lésés. Nous avons utilisé la méthode de Wroblewski et La Due [118]. Cent microlitres

de milieu sont ajoutés à 2,3 umole de pyruvate sodique et à 0,2 mg de NADH dans une solution tampon KPO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 7,5 -25°C). L'absorption de la réaction à 340 nm est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à 2 sec. d'intervalle. La concentration en LDH est déterminée par la pente de la courbe d'absorption obtenue par régression linéaire à partir de la portion linéaire initiale de la courbe. Un contrôle est effectué périodiquement à l'aide d'une solution contenant un enzyme standard (enzyme contrôle 2.E SIGMA).

#### **4 - Réduction photométrique du MTT [60]**

Cette technique permet de mesurer un index de cellules vivantes. Le MTT (3 - (4,5 - dimethylthiazol -2-yL) - 2,5 diphenyl tetrazolium bromide ; SIGMA M2128) est dissous dans du PBS à la concentration de 5 mg/ml puis filtré. La solution MTT (10 ul pour 100 ul de milieu) est rajoutée dans chaque boite de culture. Après une incubation à 37°C pendant 4 heures, un mélange 1 ml d'isopropanol - acide chlorydrique 0,08 N permet la dissolution des cristaux bleus. Après quelques minutes à température ambiante, 0,15 ml du milieu est prélevé et lu sur un lecteur Micro Elisa (Dynatech MR580) (longueur d'onde test 570 nm, longueur d'onde de référence 630 nm).

### **1.3 - ETUDE PHARMACOLOGIQUE**

#### **1.3.1 - Neurotoxicité induite par le glutamate [16]**

Des cultures de neurones corticaux matures, définies à la fois par des caractéristiques morphologiques et par un test d'exclusion au bleu Trypan ont été traitées avec du glutamate. Les neurones corticaux sont différenciés après 10 à 12 jours de culture, l'appréciation ayant été

faite par des techniques histologiques. Le glutamate a été dissous à température ambiante dans une solution tampon standard ("control salt solution" CSS tamponnée par du Tris Cl). Les cultures de neurones ont été exposées au glutamate pendant 5 minutes. Cette opération a été effectuée également avec une solution tampon dont on a modifié la composition ionique, les ions sodium étant substitués par de la choline-chlore. Nous avons ainsi défini plusieurs solutions tampons de pH 7,4 dont la composition est la suivante :

**Tableau IV : Composition des solutions**

	Solutions (mM)			
	CSS	CSS sans Na <sup>+</sup>	CSS sans Ca <sup>++</sup>	CSS sans Na <sup>+</sup> sans Ca <sup>++</sup>
NaCl	120	-	120	-
KCl	5,4	5,4	5,4	5,4
CaCl <sub>2</sub>	1,8	1,8	-	-
Tris Cl	25	25	25	25
Glucose	15	15	15	15
Choline Cl		120		120

Ces solutions ne contiennent pas d'ions Mg<sup>++</sup> qui entraînent un blocage du canal ionique des récepteurs NMDA [63].

Quatre concentrations de glutamate ont été utilisées 50 uM, 100 uM, 200 uM, 500 uM.

Après cinq minutes, le glutamate a été enlevé des cultures et un rinçage avec une solution CSS sans sodium et sans calcium [13] a été effectué et remplacé par le milieu de culture "Eagle's MEM". Des contrôles du pH ont été réalisées durant toute cette procédure. Les boîtes

témoins ont été traitées dans les mêmes conditions. La viabilité des cellules a été appréciée par :

1 - un comptage des cellules avant l'exposition au glutamate et 12 heures après dans des champs prédéterminés (microscopie à contraste de phase).

2 - test d'exclusion d'un colorant vital le bleu Trypan.

3 - mesure de l'activité LDH dans le milieu de culture avant et 12 heures après l'exposition au glutamate.

4 - mesure de la réduction photométrique du MTT avant et 12 heures après l'exposition au glutamate.

Après avoir défini, une relation concentrations de glutamate - effet neurotoxique, nous avons étudié ce phénomène de neurotoxicité en faisant varier la composition ionique du milieu extracellulaire, définissant une toxicité calcium dépendante et une toxicité aiguë induites par le glutamate. Nous avons utilisé un milieu synthétique défini (M2) qui permet une meilleure survie neuronale (cf résultats).

#### **Molécules testées**

\* RP 54274 ou Riluzole (DCI) : PM : 234,2 g

- Un échantillon de cette molécule a été fourni par le laboratoire Rhône Poulenc Santé.

- Les caractéristiques physico chimiques sont :

. apparence : poudre fine, cristalline, blanche

. solubilité à 20°C : insoluble dans l'eau et l'acide chlorhydrique 0,1 N ; facilement soluble dans une solution de dimethyl sulfoxyde ou DMSO.

Nous avons testé des concentrations croissantes de Riluzole ( $10^{-7}$  M à  $10^{-3}$  M).

Dans un premier temps, nous avons recherché un effet neurotoxique intrinsèque du RP 54274 sur des cultures de neurones corticaux, les boîtes témoins étant traitées avec du DMSO.

L'étude de l'effet neuroprotecteur du RP 54274 vis à vis de la toxicité du glutamate s'est déroulée en deux phases :

1 - recherche d'un effet neuroprotecteur en milieu calcium-dépendant.

2 - recherche d'un effet neuroprotecteur vis à vis de la neurotoxicité aiguë induite par le glutamate.

Le RP 54274 dissous dans du DMSO, à différentes concentrations a été ajouté pendant l'exposition au glutamate et après rinçage avec la solution CSS sans sodium sans calcium, dans le milieu de culture pendant 12 heures. L'étude de la viabilité des neurones a été réalisée avant et 12 heures après l'adjonction du glutamate et du RP 54274.

\* En milieu calcium-dépendant, sans sodium nous avons comparé l'effet neuroprotecteur du RP 54274 à deux antagonistes des récepteurs NMDA vis à vis de la toxicité induite par 200  $\mu$ M de glutamate: le MK 801 (MERCK) et l'AP7 (SANDOZ) ont été utilisés à deux concentrations différentes 10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M. Ces molécules dissoutes dans du MEM ont été additionnées au glutamate puis dans le milieu de culture. Les résultats ont été évalués 12 heures après et comparés à ceux obtenus après association du RP 54274 - MK 801 et RP 54274 - AP7 aux concentrations respectives de  $10^{-6}$  M et  $10^{-5}$  M.

\* En milieu sodium-dépendant sans calcium, l'effet neuroprotecteur du RP 54274 vis à vis de la toxicité aiguë induite par 50 et 100  $\mu$ M d'acide glutamique a été étudié et évalué 3 heures, 6 heures et 24 heures après l'exposition au glutamate (solution CSS sans calcium).

### **1.3.2 - Modèle d'hypoxie in vitro**

Des cultures de neurones corticaux matures de 12 jours ont été traités par 1 mM de NaCN (SIGMA) rajouté dans le milieu de culture, pendant 24 heures. Nous avons évalué l'effet neuroprotecteur du RP 54274 dans ce modèle. Le RP 54274 à concentrations croissantes a été ajouté au milieu de culture défini sans ions  $Mg^{++}$ , 5 minutes avant l'exposition au NaCN.

### **1.4 - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS [92]**

Les résultats sont exprimés en pourcentage de neurones vivants (moyenne  $\pm$  SD), estimé à partir des tests de viabilité cellulaire. Nous avons utilisé pour la comparaison des moyennes observées sur des petits échantillons, un test non paramétrique : test de Mann-Withney. Le degré de signification est fixé à  $p < 0.05$ .



## **RESULTATS**

## **1 - SURVIE DES NEURONES CORTICAUX EN CULTURE PRIMAIRE**

### **(fig. 1). PLANCHES 1 ET 2.**

Nous avons étudié la survie des neurones corticaux en cultures primaires, en utilisant différents milieux, l'intérêt portant sur leur survie et sur l'utilisation de ces cultures en pharmacotoxicologie.

Tous les deux jours, un comptage cellulaire et un dosage de la LDH du milieu extracellulaire ont été effectués jusqu'au 14ème jour de culture.

Les résultats montrent que la survie neuronale est de l'ordre de 75 % en milieu défini M2 et seulement 60 % pour les deux autres milieux M1 et M3 au 8ème jour de culture. Cette différence est significative ( $p < 0,05$ ,  $n = 6$ ). Le pourcentage de cellules gliales estimé par comptage est de  $3,5 \% \pm 1,5$  ( $n = 4$ ) en milieu défini M2 et est significativement plus faible qu'en milieu sérum (milieu M1  $75 \% \pm 5$ , milieu M3  $60 \% \pm 5$ ). La division des cellules gliales a été bloquée au 8ème jour par de la cytosine arabinoside ( $10^{-5}$  M) dans les milieux M1 et M3.

Au 14ème jour, les valeurs de survie neuronale sont respectivement de 50 % pour le milieu M2 et seulement de 15 % pour les milieux M1 et M3 ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ ).

Le milieu défini semble être un facteur majeur agissant sur la croissance et la trophicité des neurones en cultures primaires. Il a donc été choisi pour l'utilisation des études pharmacologiques.

## **2 - NEUROTOXICITE DU GLUTAMATE : RELATION CONCENTRATIONS - EFFETS (fig.2)**

Des cultures de neurones corticaux matures (10ème jour) ont été exposées à des concentrations croissantes de glutamate : 50 uM, 100 uM, 200 uM et 500 uM pendant cinq minutes.

Pour chaque concentration testée, un comptage cellulaire une mesure de l'activité LDH et une détermination de l'index de viabilité par réduction photométrique du MTT ont été réalisés avant et 12 h après l'exposition au glutamate. Les résultats sont exprimés en pourcentage de neurones vivants (moyenne  $\pm$  écart type).

La neurotoxicité induite par le glutamate augmente avec les concentrations de glutamate.

Des concentrations relativement faibles de glutamate (50 uM) induisent une perte neuronale supérieure à 30 %. La dose létale 50 déterminée sur plusieurs séries de culture ( $n = 16$ ) est comprise entre 100 et 200 uM, confirmant que le glutamate est une puissante neurotoxine sur des cultures de neurones corticaux. A 500 uM de glutamate, la plupart des neurones corticaux sont détruits et remplacés par des débris cellulaires. Un certain nombre de neurones (environ 8 %) restent viables, localisés par plages au contact des cellules gliales. La survie de ces neurones pourrait être expliquée par l'existence d'une densité importante d'interconnexions synaptiques dans les cultures. L'effet neurotoxique du glutamate est relativement bien corrélé ( $r = 0,80$ ) à la libération de LDH dans le milieu extracellulaire par les neurones lésés (fig.3A). La corrélation est plus importante pour des concentrations de glutamate supérieures ou égales à 200 uM ( $r = 0,90$ ).

### **3 - EFFET NEUROTOXIQUE DU RP 54274 (fig.4)**

Avant d'évaluer l'effet neuroprotecteur du RP 54274 vis à vis de la neurotoxicité induite par le glutamate, nous avons recherché l'existence d'un effet neurotoxique intrinsèque de la molécule. Des cultures de neurones corticaux matures (10ème jour) ont été exposées pendant douze heures au RP 54274 ( $10^{-7}$  M à  $10^{-4}$  M) dissous dans du DMSO (dimethyl sulfoxyde). Les boîtes témoins ont été traitées par du DMSO. Les résultats montrent que le DMSO n'est pas neurotoxique. Le RP 54274 induit une neurotoxicité dose-dépendante. Pour des concentrations supérieures à  $10^{-5}$  M, la mort neuronale estimée est d'environ 30 % différant significativement de celle des boîtes témoins ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ). La neurotoxicité induite par le RP 54274 est précoce survenant dès la première heure et marquée par une ballonnisation aigue neuronale. Le RP 54274 à concentration élevée ( $10^{-3}$  M) induit une mort neuronale supérieure à 50 % ( $p < 0,01$ ) trois heures après l'exposition.

Des concentrations comprises entre 0,1  $\mu$ M et 10  $\mu$ M ne sont pas considérées comme neurotoxiques sur ce modèle.

### **4 - EFFET NEUROPROTECTEUR DU RP 54274 VIS A VIS DE LA TOXICITE INDUITE PAR LE GLUTAMATE**

#### **4.1 - Toxicité calcium-dépendant (fig.5A - fig.5B). Planche 3.**

Des cultures de neurones corticaux matures (10ème jour) ont été exposées pendant cinq minutes à des concentrations croissantes de glutamate dissous dans une solution CSS sans sodium. Le glutamate induit une mort neuronale retardée apparaissant après plusieurs heures et

marquée par le développement de microvacuoles cytoplasmiques et une condensation cellulaire. Cette neurotoxicité est dose dépendante.

Des cultures ont été traitées par des concentrations croissantes de RP 54274 dissous dans du DMSO appliqué en même temps que le glutamate.

Les résultats montrent que pour une concentration fixe de glutamate, la mort neuronale est plus importante pour des concentrations de RP 54274 supérieures ou égales à  $10^{-5}$  M. Ces résultats peuvent en partie être expliqués par l'effet neurotoxique intrinsèque surajouté de la molécule à ces concentrations.

Le RP 54274 à la concentration de  $10^{-6}$  M exerce un effet neuroprotecteur partiel vis à vis de la neurotoxicité induite par 50  $\mu$ M d'acide glutamique.

La mort neuronale est estimée à 15 % contre 35 % sur les cultures témoins ( $p < 0,05$   $n=4$ ).

Cet effet neuroprotecteur n'existe pas pour des concentrations de glutamate supérieures ou égales à 100  $\mu$ M.

La neurotoxicité retardée induite par le glutamate est en grande partie médiée par l'activation des récepteurs post synaptiques NMDA comme le confirme la diminution de la mort neuronale après application d'antagonistes des récepteurs NMDA (fig.6 - fig.7). Sur des cultures de neurones corticaux matures, le MK801 à une concentration de 10  $\mu$ M (3) exerce un effet neuroprotecteur important avec moins de 20% de mort neuronale, différant de façon significative des cultures traitées par RP 54274 ( $10^{-6}$  M) (2) et des témoins (1). L'augmentation de la concentration de MK801 à 50  $\mu$ M (4) n'entraîne pas une neuroprotection plus importante. Des résultats analogues ont été obtenus après application d'un antagoniste compétitif des récepteurs NMDA, l'AP7 utilisé à 2 concentrations différents 10  $\mu$ M (3) et 50  $\mu$ M (4).

Il est intéressant de constater que l'association du RP 54274 ( $10^{-6}$  M) à un antagoniste NMDA ( $10^{-5}$  M) (5) n'est pas additive. On peut donc supposer que le RP 54274 exerce peu ou pas d'action en post synaptique.

La courbe concentrations de glutamate-effet neuroprotecteur du RP 54274 ( $10^{-6}$  M) est présentée à la fig.8. Elle est très proche d'une courbe dose-effet obtenue avec un agoniste inverse.

#### **4.2 - Toxicité aiguë (fig.9). Planche 3.**

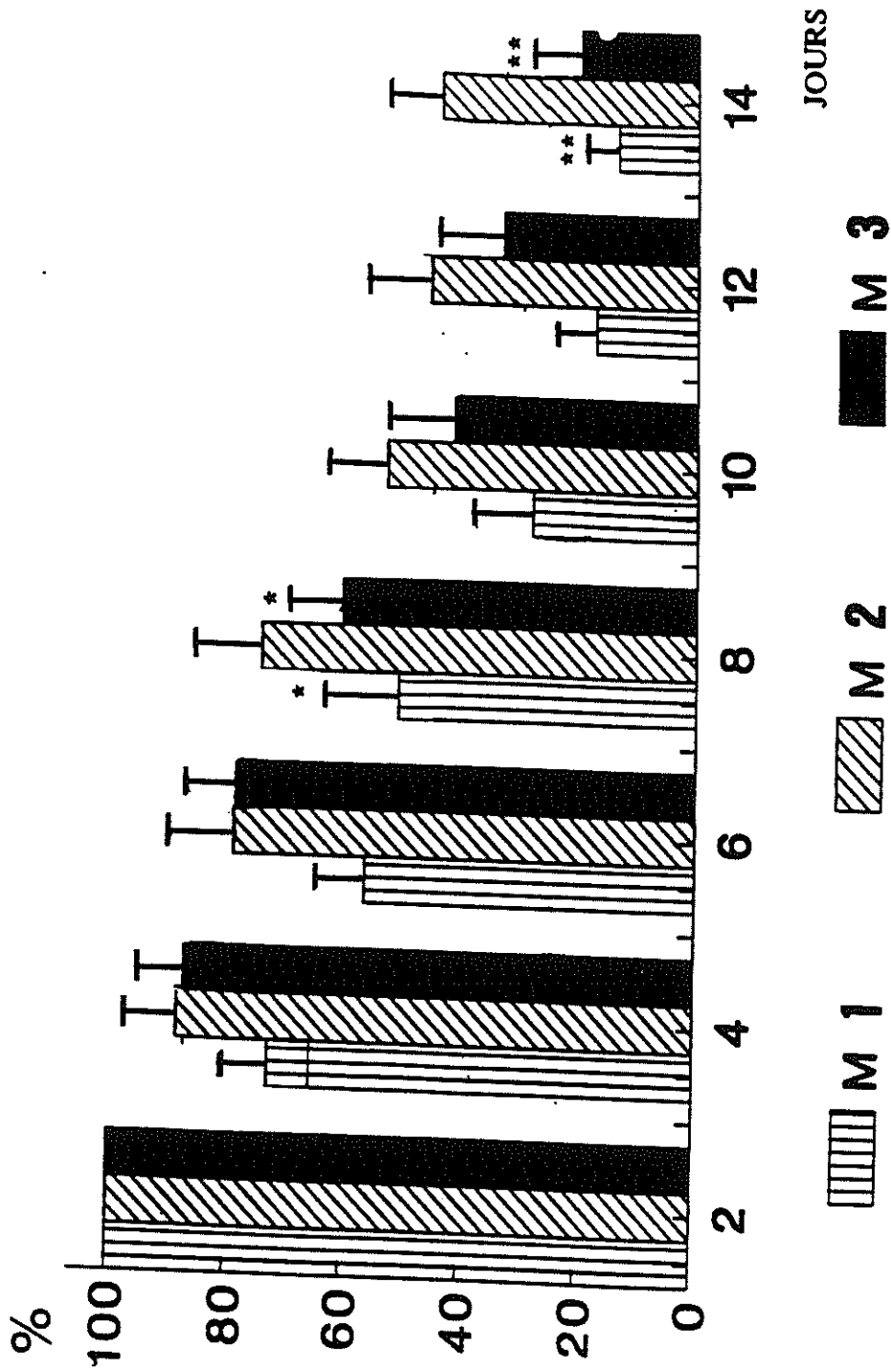
En milieu CSS sans calcium et en présence de sodium, l'acide glutamique entraîne une mort neuronale très rapide avec ballonisation des neurones dès la 1ère heure. Nous avons étudié l'effet neuroprotecteur du RP 54274 à concentrations croissantes vis à vis de la neurotoxicité induite par 50 et 100  $\mu$ M d'acide glutamique pendant 5 minutes. Cet effet a été évalué 3h, 6h et 24h après l'exposition.

Les résultats montrent l'absence totale d'effet neuroprotecteur du RP 54274 dans ce modèle. Au contraire, la mort neuronale estimée à 24 heures est plus importante dans les cultures traitées avec le RP 54274, quelle que soit la concentration. Tout se passe comme s'il existait un phénomène neurotoxique surajouté.

#### **5 - EFFET NEUROPROTECTEUR DU RP 54274 DANS UN MODELE D'HYPOXIE EXPERIMENTALE (FIG.10)**

Sur des neurones corticaux matures de 12 jours, l'addition de 1 mM d'ions NaCN entraîne dès la 1ère heure une neurodégénérescence aiguë marquée par une ballonisation des neurones et l'apparition de vacuoles intracytoplasmiques. Au bout de 4 heures, les neurones

commencent à se désintégrer et sont remplacés dès la 24ème heure par des débris cellulaires. La mort neuronale est estimée à 70 % après 24 heures d'exposition. Le RP 54274 a été ajouté au milieu de culture défini sans ions  $Mg^{++}$ . Des concentrations croissantes de RP 54274 ont été utilisées ( $10^{-7}$  M (1)  $5 \cdot 10^{-7}$  M (2)  $10^{-6}$  M (3)). Le RP 54274 exerce une effet neuroprotecteur dans ce modèle lorsqu'il est appliqué à une concentration de  $10^{-6}$  M, soixante pour cent des neurones sont viables ( $p < 0,05$ ,  $n = 4$ ). Il est intéressant de constater que l'association MK801 10  $\mu$ M - RP 54274 1  $\mu$ M entraîne une neuroprotection importante proche de 80 % ( $p < 0,01$ ,  $n = 4$ ) supérieur au RP 54274 seul. Dans ce modèle, le RP 54274 et le MK801 antagonisent au moins partiellement l'effet neurotoxique du glutamate endogène dont la libération est induite classiquement dans les modèles d'hypoxie *in vivo*.

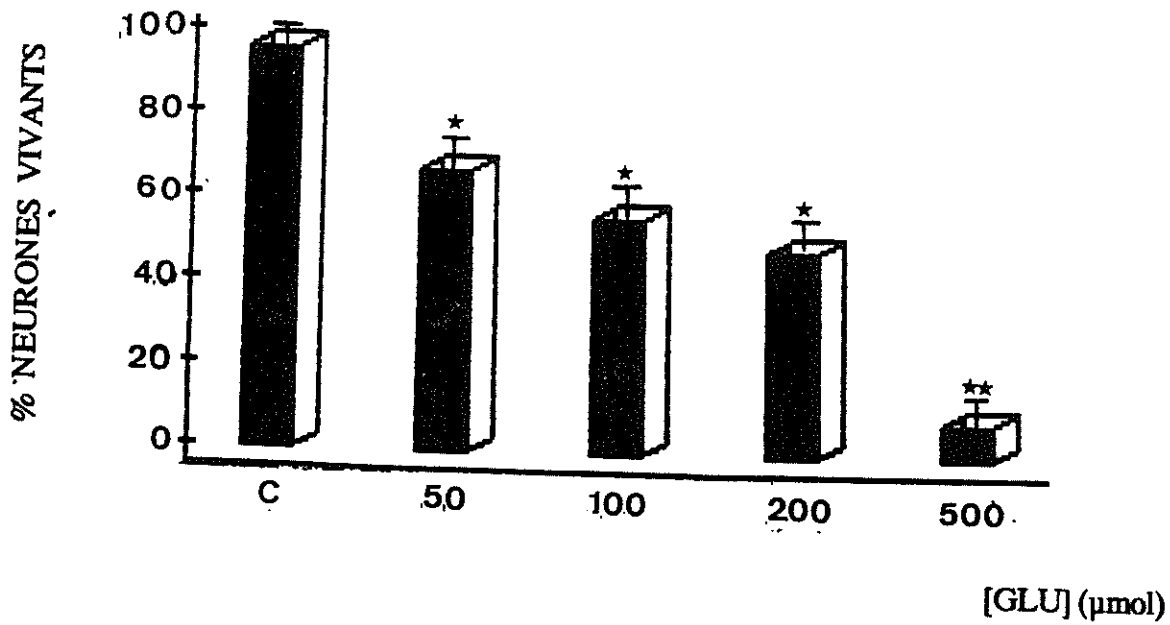


**FIG. 1 : TAUX DE SURVIE (en %)**

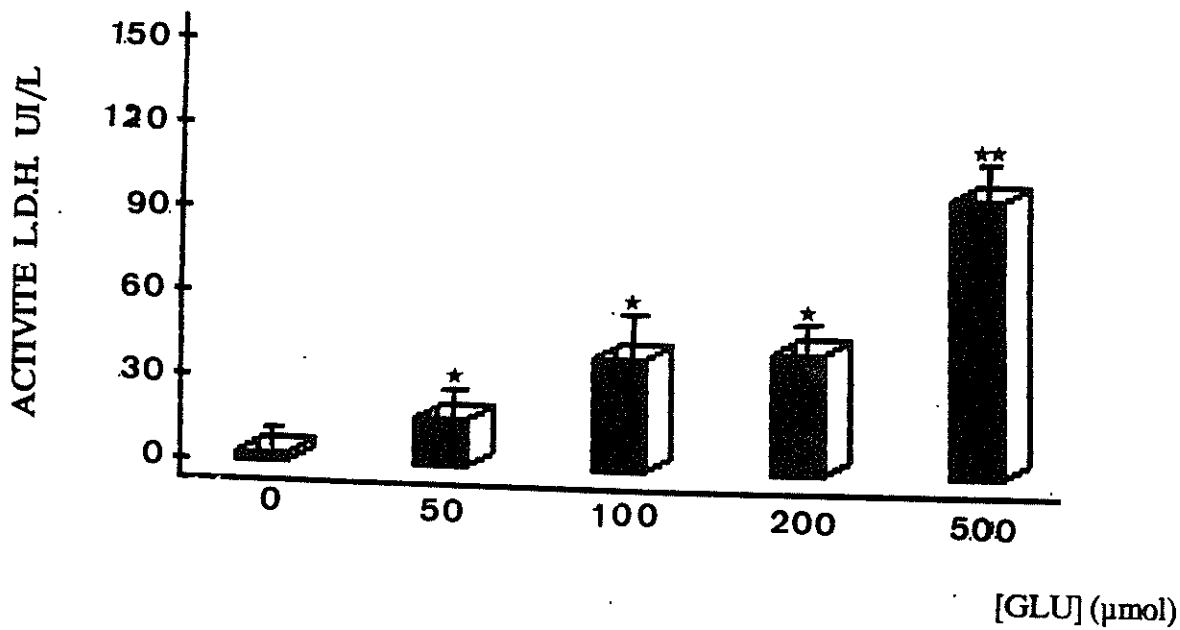
\*  $P < 0.05$

\*\*  $P < 0.01$



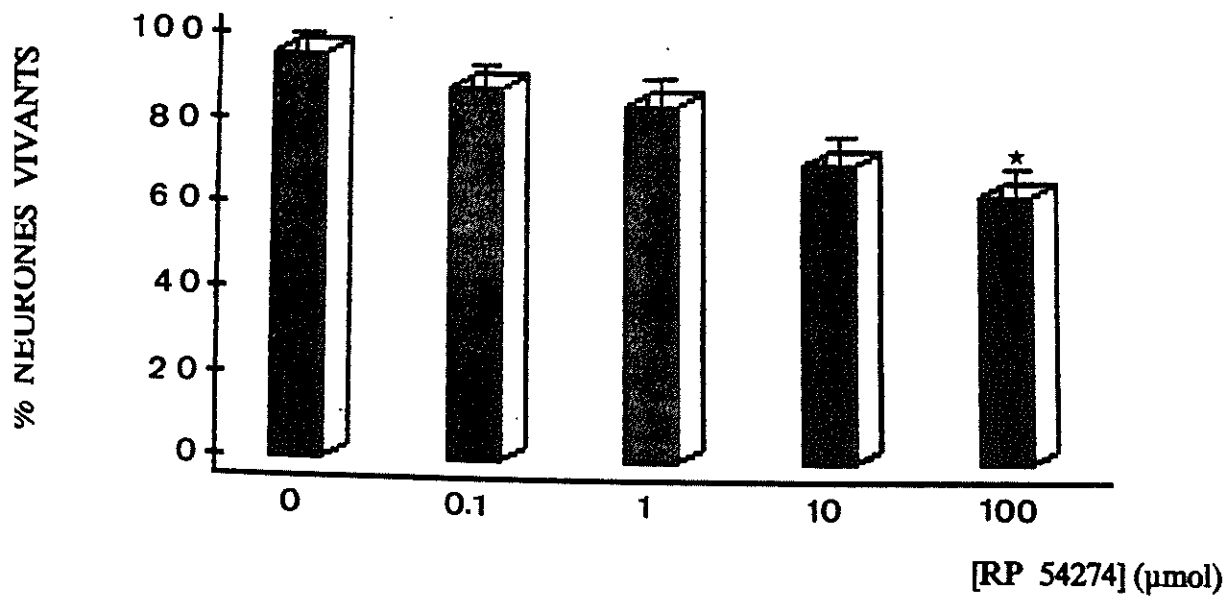


**FIG. 2 : SURVIE NEURONALE**



**FIG. 3 A : ACTIVITE L.D.H.**

\* P < 0.05  
\*\* P < 0.01



**FIG. 4 : TOXICITE INTRINSEQUE  
R.P. 54274**

\* P < 0.05

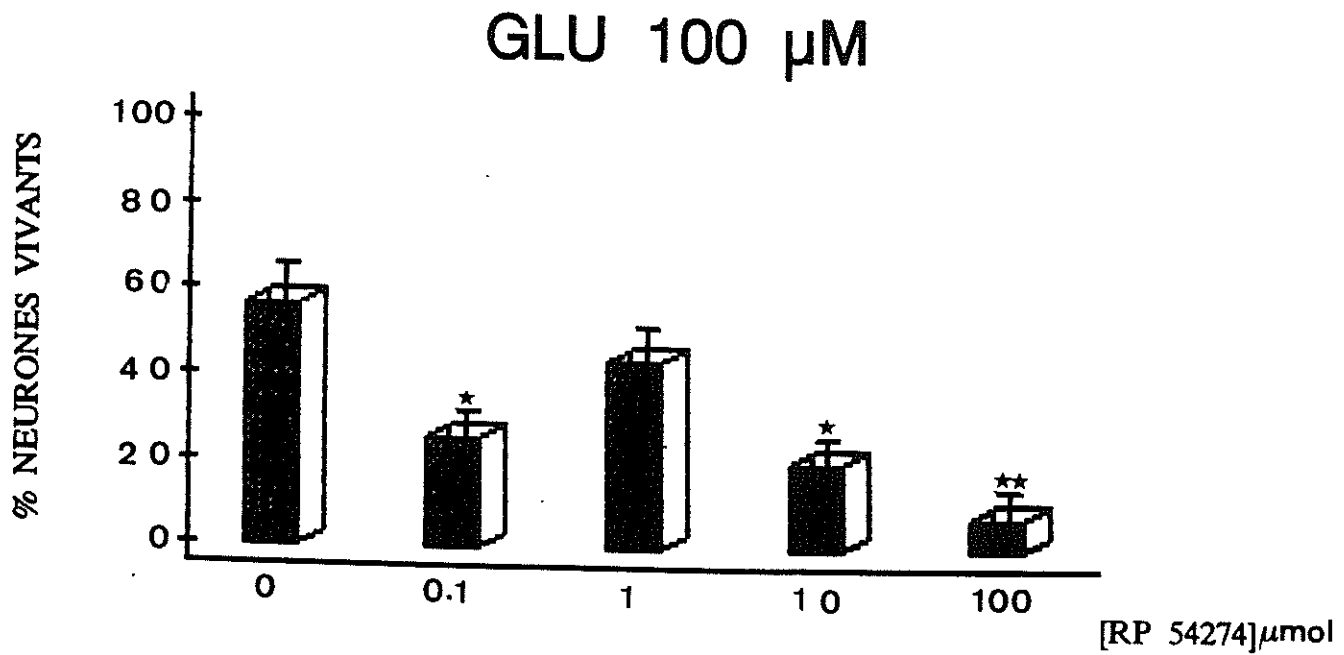
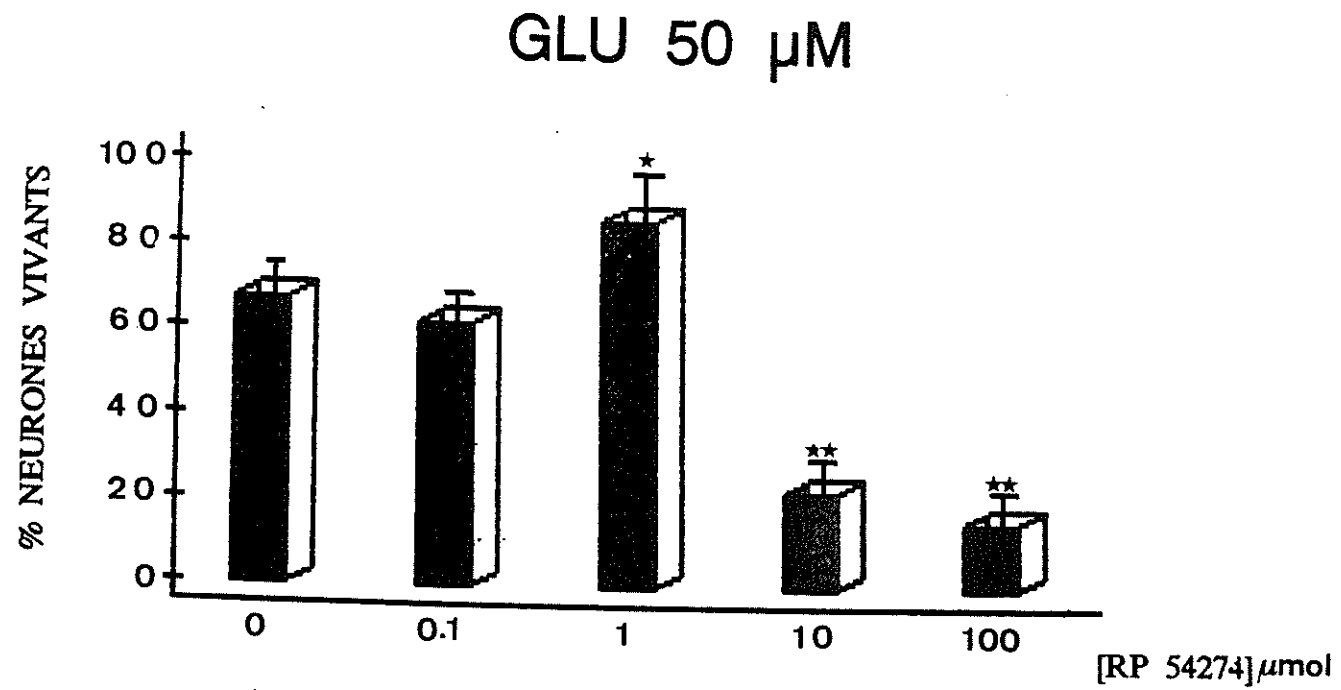


FIG. 5 A :

TOXICITE CALCIUM DEPENDANTE

\* P < 0.05  
\*\* P < 0.01

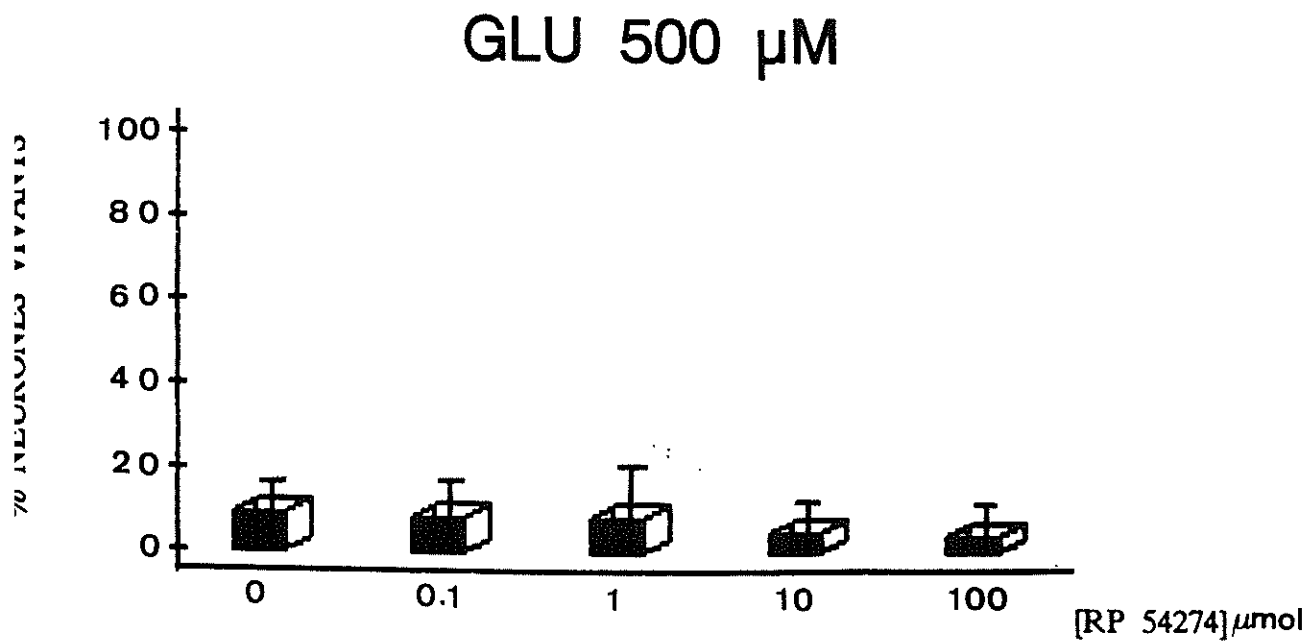
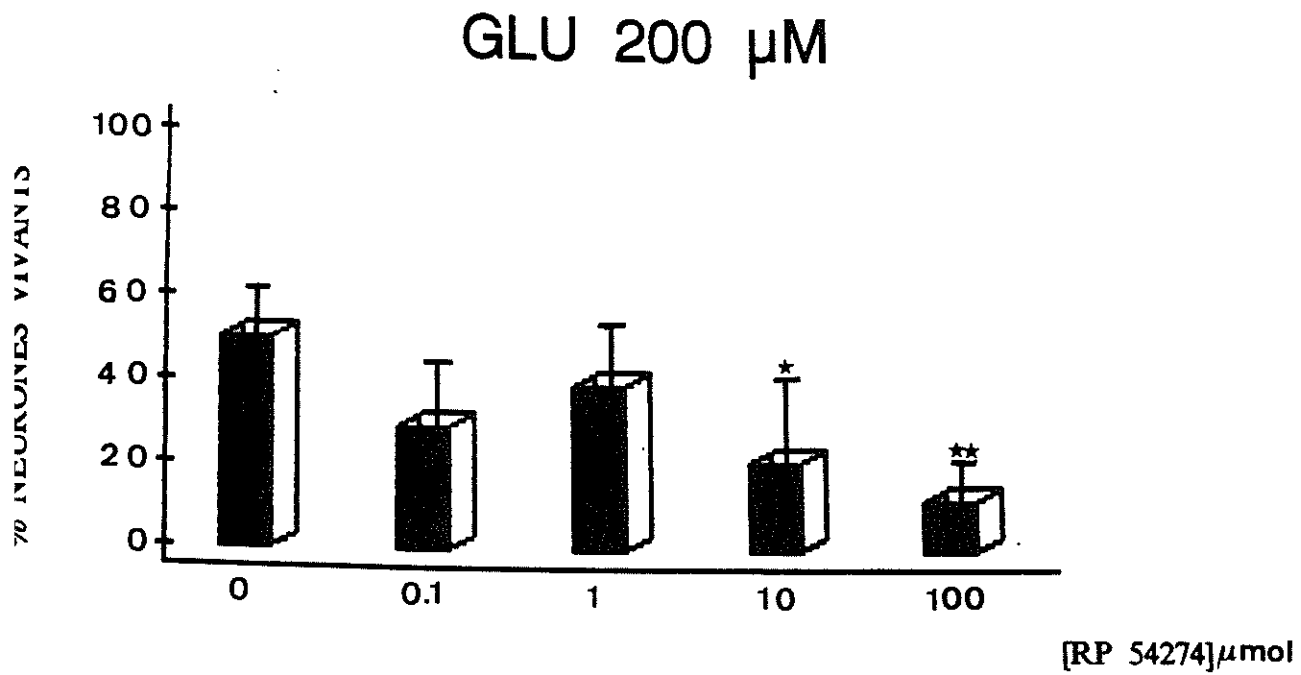
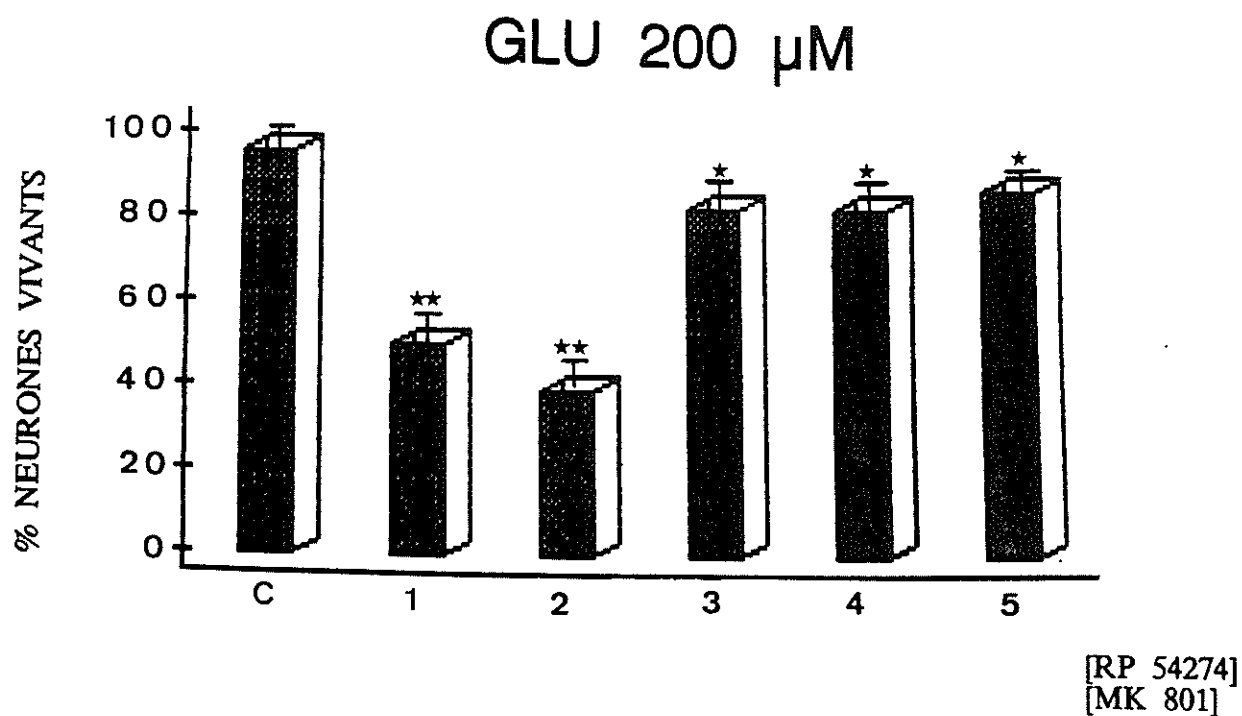


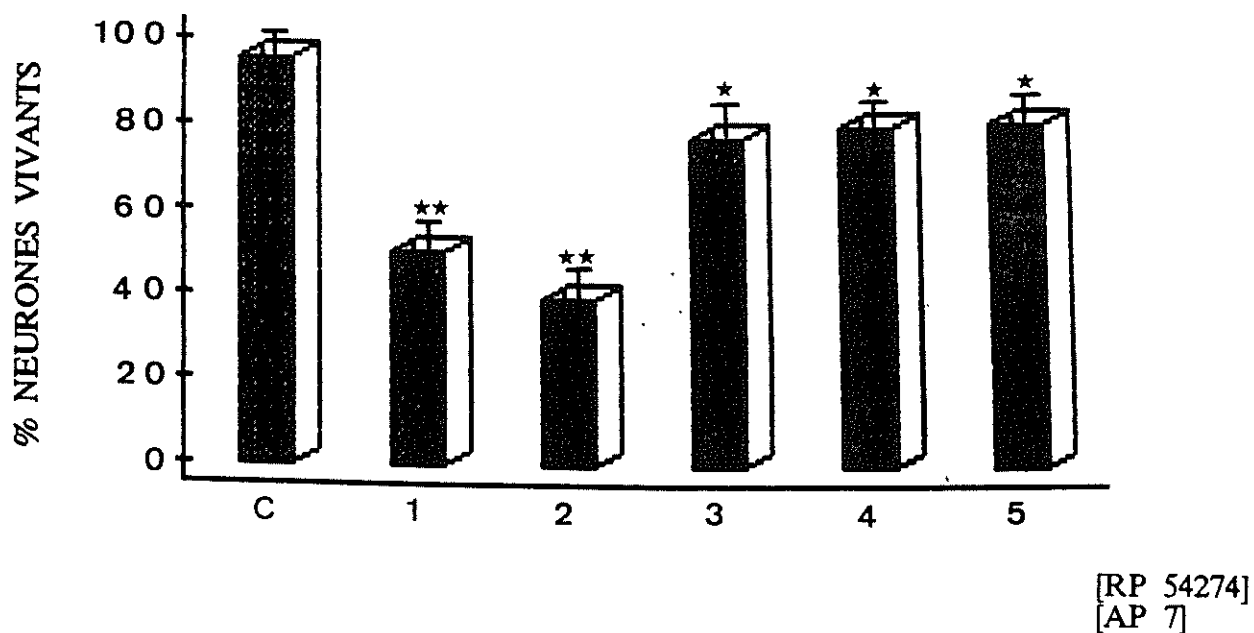
FIG. 5 B :

TOXICITE CALCIUM DEPENDANTE

\* P < 0.05  
 \*\* P < 0.01

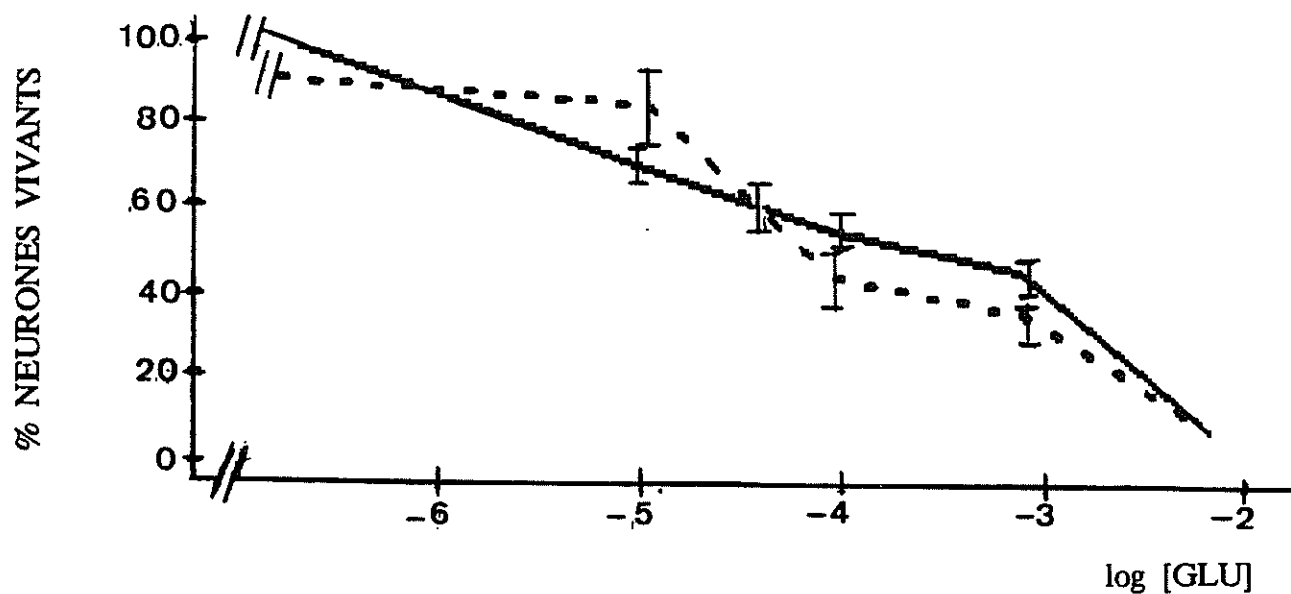


**FIG. 6 : RP 54274 VERSUS MK 801**



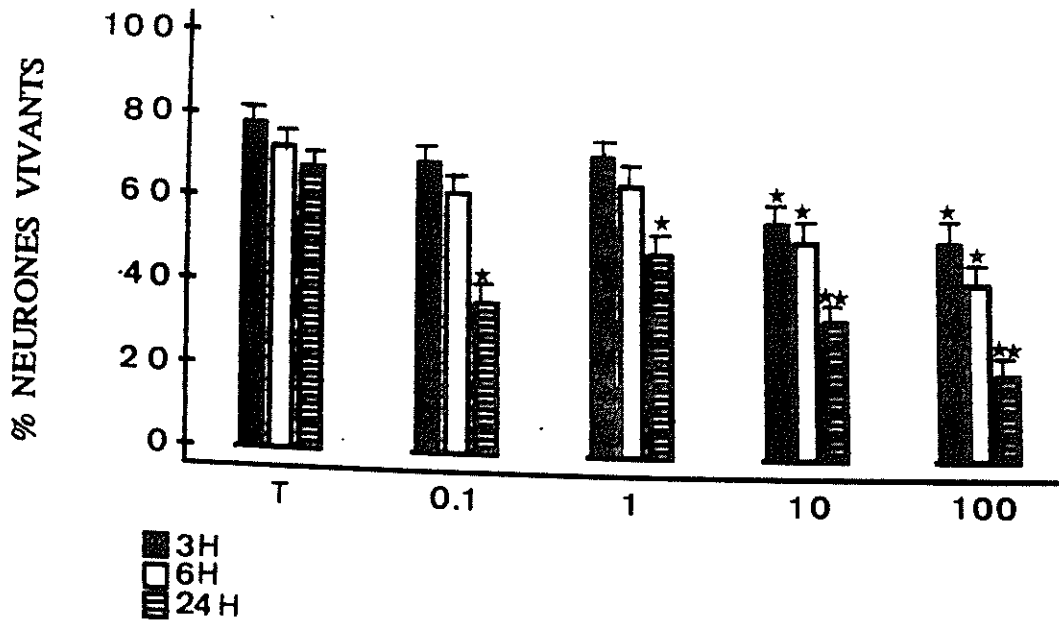
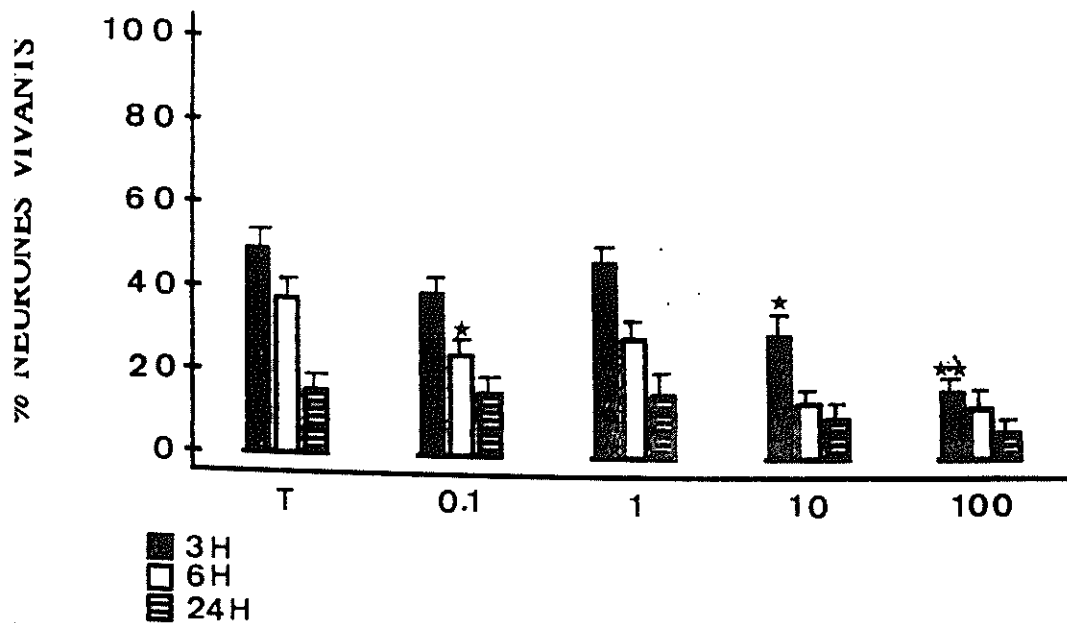
**FIG. 7 : RP 54274 VERSUS AP7**

\* P < 0.05  
\*\* P < 0.01



— TEMOINS  
- - - RP54274

**FIG. 8 :**  
**TOXICITE-CALCIUM-DEPENDANTE**  
**RELATION CONCENTRATION-EFFET**  
**RP 54274 ( $10^{-6}$  M)**

GLU 50  $\mu$ M[RP 54274]  $\mu$ molGLU 100  $\mu$ M[RP 54274]  $\mu$ mol

**FIG. 9 : TOXICITE AIGUE**

\* P < 0.05  
 \*\* P < 0.01

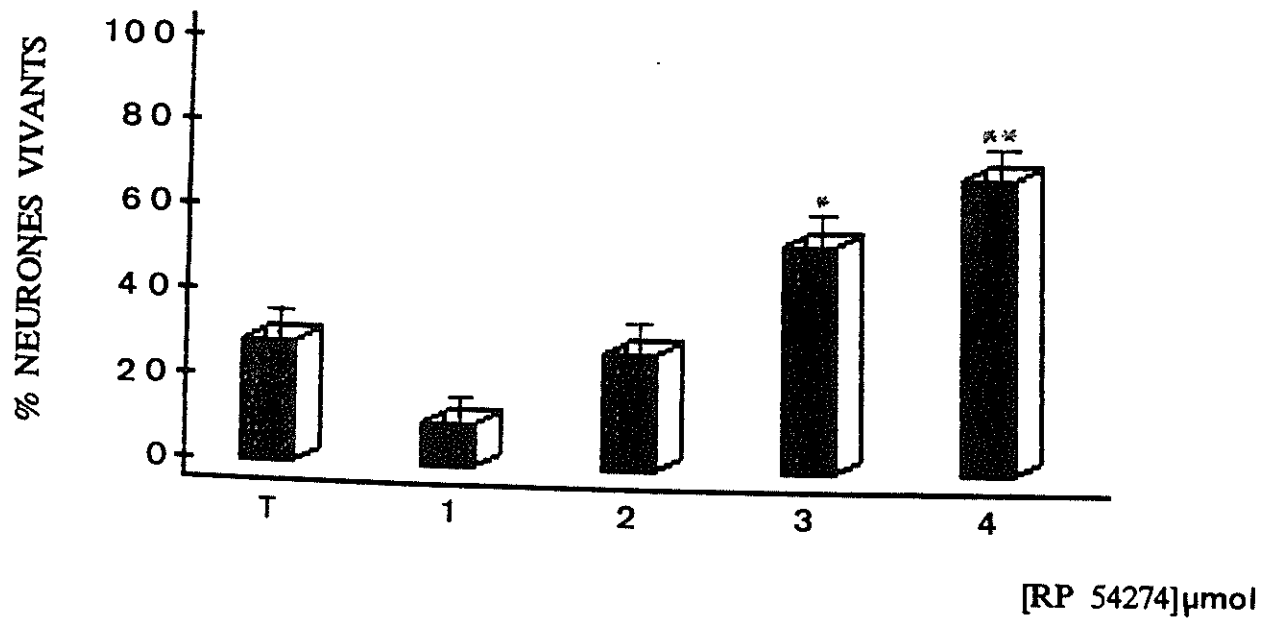


FIG. 10 :  
MODELE HYPOXIE IN VITRO  
NACN 1 mM

\* P < 0.05  
\*\* P < 0.01



## DISCUSSION

La mise en évidence d'une implication possible du système glutamatergique dans les affections neurodégénératives a conduit à l'élaboration de stratégies thérapeutiques dans ces affections incurables. L'effort principal de l'industrie pharmaceutique porte à l'heure actuelle sur le développement de molécules susceptibles d'antagoniser l'effet neurotoxique du glutamate tout en sachant que le blocage effectif de la transmission glutamatergique peut être incompatible avec une fonction normale du système nerveux central.

Les études de pharmacologie comportementale et électrophysiologiques ont justifié les axes de développement du RP 54274, principalement dans deux affections neurodégénératives; chronique, la sclérose latérale amyotrophique et aiguë, l'ischémie cérébrale. Une étude multicentrique en double aveugle contre placebo a débuté en juin 1990 visant à évaluer pendant un an l'effet thérapeutique du RP 54274 à la posologie de 100 mg par jour chez 160 patients atteints de sclérose latérale amyotrophique. Le critère d'efficacité principal choisi est la durée de survie. Les résultats de cette étude ne sont pas encore publiés, la date d'"end point" étant fixé au 31 Novembre 1991.

Bien que les mécanismes physiopathologiques de ces affections ne soient pas totalement élucidés, ils pourraient mettre en jeu l'action excitotoxique du glutamate. Il a donc paru intéressant d'évaluer l'effet neuroprotecteur du RP 54274 vis à vis de la toxicité induite par le glutamate et dans un modèle d'hypoxie expérimentale sur des cultures primaires de neurones corticaux. Nos résultats sont en accord avec les travaux récents de Choi et coll. confirmant que le glutamate est une puissante neurotoxine sur des cultures de neurones corticaux [12]. Ce potentiel neurotoxique dépend de la concentration de l'agoniste mais également du temps d'exposition. Rosenberg et coll. ont montré que des concentrations de l'ordre de la micromole pendant une durée

d'exposition de 30 minutes induisaient une neurodégénérescence [82]. Des concentrations supérieures de NMDA et un temps d'exposition plus long sont nécessaires pour entraîner une perte neuronale équivalente [82]. Dans notre modèle de culture, défini par un pourcentage très faible de cellules gliales, les mécanismes d'inactivation de la neurotoxicité du glutamate par un phénomène de recapture au niveau de ces cellules apparaissent peu importants. Seuls persistent sur le plan fonctionnel les systèmes électrogéniques sodium-dépendant présents sur les terminaisons présynaptiques.

La neurotoxicité du glutamate semble médiée par deux phénomènes distincts confirmant les travaux de Choi et coll. [13,16]. Une neurodégénérescence aiguë survenant dès les premières heures et marquée par une ballonnisation neuronale dépend de la concentration extracellulaire en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ . Le glutamate augmenterait les conductances sodiques entraînant un influx d'ions  $\text{Na}^+$  dans la cellule et donc une dépolarisation membranaire et secondairement un influx d'ions chlore et d'eau. Il est également possible d'induire cette neurodégénérescence aiguë en présence d'autres agents dépolarisants (hautes concentrations de potassium, vétratridine) [83]. L'absence d'effet neuroprotecteur de la tétrodotoxine (TTX) qui agit sur le site 1 des canaux  $\text{Na}^+$  dépendant du voltage, en inhibant la conductance ionique implique que ces canaux ne jouent pas un rôle majeur dans l'influx sodique [83].

La deuxième composante est marquée par une dégénérescence neuronale retardée et dépend de la concentration extracellulaire en ions  $\text{Ca}^{++}$  et peut être induite par le ionophore A 23187 [16] et serait médiée par un influx d'ions calcium. Cet influx calcique est induit par l'activation des récepteurs canaux mais également des canaux dépendant du voltage activés par la dépolarisation membranaire [15]. L'influx de calcium extracellulaire associé à une libération de calcium à

partir des stocks intracellulaires du réticulum endoplasmique contribuent à une augmentation du calcium libre cytoplasmique activant les enzymes cataboliques responsables de la mort cellulaire retardée [16]. Rothman et coll. [83] ont cependant montré que le glutamate pouvait induire une neurodégénérescence en l'absence de calcium extracellulaire. Ces auteurs ont utilisé un temps d'exposition plus long (30 minutes). Pour de faibles concentrations de glutamate, la mort neuronale est essentiellement médiée par un mécanisme calcium-dépendant. De nombreux travaux ont montré que la neurotoxicité du glutamate est essentiellement médiée par l'activation des récepteurs NMDA [17,24,117] ce que nos résultats confirment. L'application d'un antagoniste du récepteur NMDA entraîne une neuroprotection supérieure à 75 %. Les résultats obtenus avec le RP 54274 appellent quelques commentaires. Dans notre modèle, le RP 54274 n'antagonise que peu ou pas la neurotoxicité induite par le glutamate. Seul un effet neuroprotecteur partiel existe pour une concentration faible de glutamate (50  $\mu$ M) en milieu calcium-dépendant. On peut donc penser que le RP 54274 exerce une faible action en post synaptique.

De nombreux auteurs ont montré qu'il existe une altération de la distribution du glutamate dans la sclérose latérale amyotrophique conduisant à une élévation des taux de glutamate au niveau de la fente synaptique [75,79]. Le mécanisme exact est actuellement inconnu : anomalies de l'oxydation du glutamate ? troubles de la perméabilité membranaire ? Les conséquences d'une augmentation des taux synaptiques du glutamate sont caractérisées par une dégénérescence des neurones post synaptiques par activation des récepteurs post synaptiques. Si l'on se réfère à cette hypothèse excitotoxique, il demeure donc incertain que le RP 54274 puisse exercer un effet neuroprotecteur des motoneurones chez les patients atteints de SLA.

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'ischémie cérébrale sont par contre mieux élucidés . L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium majorée par la défaillance, faute d'énergie, des processus de séquestration par les mitochondries et le réticulum endoplasmique joue un rôle central. Elle induit une libération massive des neurotransmetteurs monoaminergiques et aminoexcitateurs. C'est cette activation du système excitotoxique qui serait responsable de la mort cellulaire différée. L'une des stratégies thérapeutiques préconisée dans l'ischémie cérébrale est donc de bloquer l'entrée de calcium [15,85]. L'élévation de la concentration cytosolique de l'ion calcium étant plurifactorielle (entrée par les canaux calciques de type L et N potentiel dépendant, échange  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , libération membranaire non spécifique, ouverture post synaptique des canaux agonistes dépendants médiée par le récepteur NMDA), de nouvelles approches ont été proposées. Les travaux expérimentaux concernant les antagonistes calciques dominés par la Nimodipine sont en faveur d'un effet bénéfique préventif et ou curatif. Une interrogation demeure quant au point d'impact des antagonistes calciques : vasculaire ou neuronal ? Une autre façon de bloquer l'entrée du calcium est l'utilisation des antagonistes NMDA. Presque toutes les études concluent à un effet favorable de cette thérapeutique dans l'ischémie cérébrale expérimentale [94,117]. Cependant les antagonistes compétitifs franchissent mal la barrière hémato-encéphalique et les antagonistes non compétitifs induisent des effets psychomimétiques indésirables et provoquent une dépendance [109,115].

Les travaux réalisés en pharmacologie expérimentale sur l'animal ont montré que le RP 54274 exerce un effet neuroprotecteur contre l'ischémie cérébrale. Nos résultats sont apparamment contradictoires. Dans notre modèle, le RP 54274 n'exerce pas un effet

neuroprotecteur vis à vis de la neurotoxicité aiguë induite par le glutamate. Notre modèle d'intoxication par le glutamate ne nous permettait pas cependant d'appréhender une possible action en présynaptique. Dans le modèle d'hypoxie induit par les ions NaCN, le RP 54274 montre un effet neuroprotecteur partiel. On peut donc penser qu'il exerce une action en présynaptique soit en diminuant le "release" du glutamate endogène, soit en agissant sur un autorécepteur type AP4 qui régule la libération du neuromédiateur, soit en augmentant la recapture du glutamate au niveau des terminaisons présynaptiques.

Il est possible d'émettre des hypothèses sur le mode d'action de cette molécule à partir des études électrophysiologiques et de pharmacologie comportementale. Le RP 54274 diminue le "firing" induit par 50  $\mu$ M d'acide glutamique sur des cellules de Purkinje. Son spectre d'activité anticonvulsivante est proche de celui de la carbamazépine. Aux concentrations thérapeutiques, la carbamazépine bloque les canaux sodiques. Sur des préparations de synaptosomes, elle inhibe la recapture de norépinéphrine. Si l'on admet une analogie d'action, il est possible que le RP 54274 exerce une action en bloquant les canaux sodiques dépendant du voltage exerçant un effet de type anesthésique local. La neurotoxicité surajoutée en présence du RP 54274 dans notre modèle pourrait être en partie expliquée par une inhibition de la recapture du glutamate par les terminaisons présynaptiques augmentant l'effet excitotoxique du glutamate. Cette hypothèse doit être confirmée par des études électrophysiologiques en "patch clamp". Une meilleure connaissance des mécanismes d'activation et d'inactivation des canaux sodiques dépendant du voltage [62] devrait nous permettre d'élucider le ou les mécanismes d'action du RP 54274.

## CONCLUSION

Cette étude montre que le milieu M2 (synthétique) possède les meilleures possibilités de survie neuronale par rapport aux deux milieux enrichis en sérum.

Le modèle expérimental de dégénérescence neuronale *in vitro* induit par l'acide glutamique, est un modèle fiable, reproductible, comme en témoignent les différentes études de mort cellulaire (comptage, activité LDH, réduction photométrique du MTT).

Le Riluzole possède outre un effet neurotoxique propre (pour des concentrations supérieures à  $10^{-5}$ M) un faible effet neuroprotecteur pour des concentrations d'acide glutamique inférieures à 100  $\mu$ M. Ceci témoigne probablement d'un très faible effet postsynaptique par rapport aux études comparatives effectuées avec deux antagonistes NMDA (MK 801 et AP7).

Le Riluzole possède un effet présynaptique modéré dans le modèle d'ischémie neuronale *in vitro* (induit par le NaCN). Une partie de cet effet peut être en partie expliquée par une diminution de la libération de glutamate lors de l'hypoxie. Ces résultats *in vitro* ne corroborent pas complètement les études *in vivo* réalisées sur des modèles d'hypoxie/ischémie chez l'animal.

Le développement ultérieur de cette molécule devra passer par une meilleure compréhension des mécanismes d'activation de la libération de certains neuromédiateurs comme l'acide glutamique notamment au niveau des canaux sodiques présynaptiques (effet anesthésique local possible). Compte tenu de la toxicité neuronale intrinsèque, il s'avérera nécessaire de ne pas dépasser des concentrations plasmatiques supérieures à  $10^{-6}$ M.

Ce travail devra être complété par d'autres études avec en particulier :

- interaction potentielle du RP 54274 avec les différents sous types des récepteurs au glutamate par des techniques de binding in vitro.
- étude électrophysiologique en "patch clamp".
- étude de la recapture du glutamate sur des préparations de synaptosomes en présence de RP 54274.



**BIBLIOGRAPHIE**

1 - ALBERS GW, GOLDBERG MP, CHOI DW.

N-Methyl-D-aspartate antagonists, ready for clinical trial in brain ischemia ?

Ann Neurol, 1989, 25 : 398-403.

2 - ANIS NA, BERRY SC, BURTON NH, LODGE D.

The dissociative anaesthetics, ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurons by N-methyl-D-aspartate.

Br J Pharmacol, 1983, 79 : 565-575.

3 - ARAKI HM, NOJRI M, KIMURA M, AIHARA H.

Effect of minaprine on "Delayed neuronal death" in Mongolian gerbils with occluded common carotid arteries.

J Pharmacol Exper Ther, 1987, 242: 686-691.

4 - BECKAND TT, BIELENBERG GW.

Pharmacological intervention of cerebral ischemia.

T I P S, 1986, 425-428.

5 - BEN ARI Y.

Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid ; mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy.

Neuroscience, 1985, 14 : 375-380.

6 - BETTLER B, BOULTER J, HERMANS-BORGMAYER L, O'SHEA-GREENFIELD A, DENNERIS ES, MOLL C, BORGMAYER U, HOLLMANN M, HEINEMANN S.

Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GLUR 5 : Expression in the nervous system during development.

Neuron, 1990, 5 : 583-595.

7 - BORMANN J, HAMILL OP, SAKMANN B.

Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons.

J Physiology (Lond.), 1987, 385 : 243-286.

8 - BOULTER J, HOLLMANN M, O'SHEA-GREENFIELD A, HARTLEY M, DENNERIS E, MARON C, HEINEMANN S.

Molecular cloning and functional expression of glutamate receptor subunit genes.

Science, 1990, 249 : 1033-1037.

9 - BRACKLEY P, GOODNOW R Jr, NAKANISHI K, SUDAN H, USHERWOOD PNR.

Spermine and philanthotoxin potentiate excitatory amino acid responses of *Xenopus* oocytes injected with rat and chick brain RNA.

NeuroSci Lett, 1990, 114 : 51-56.

10 - BRADFORD HF.

Chemical Neurobiology, 1986, WH FREMANN : 211-229.

- 11 - BULLOCK R, GRAHAM DI, CHEN MH, LOWE D,  
Mc CULLOGH J.  
Focal cerebral ischemia in the cat : pretreatment with a competitive  
NMDA receptor antagonist D-CPPène.  
J Cereb Blood Flow Metab, 1990, 10 : 668-674.
- 12 - CHOI DW.  
Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent.  
NeuroSci Lett, 1985, 58 : 293-297.
- 13 - CHOI DW.  
Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.  
J Neurosci, 1987, 7 : 369-379.
- 14 - CHOI DW.  
Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system.  
Neuron, 1988, 1 : 623-634.
- 15 - CHOI DW.  
Calcium - mediated neurotoxicity : relationship to specific channel  
types and role in ischemic damage.  
Trends Neurosci, 1988, 11 : 465-469.
- 16 - CHOI DW, MAULUCCI-GEDDE MA, KRIEGSTEIN AR.  
Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture.  
J Neurosci, 1987, 7 : 357-368.

17 - CHOI DW, KOH J, PETERS S.

Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell cultured  
attenuation by NMDA antagonists.

J Neurosci, 1988, 8 : 185-196.

18 - CONSTANTAKAKI E, PLAITAKIS A.

N acetyl aspartate and acetyl aspartylglutamate are altered in the  
spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis.

Ann Neurol, 1988, 24 : 478.

19 - COTMAN CW, MONAGHAN DJ, OTTERSEN OP, STORM-  
MATHISEN J.

Anatomical organization of E.A.A receptors and theirs pathways.

T I N S, 1987, 10 : 273-280.

20 - COURATIER P, SINDOU P, BARTHE D, HUGON J.

NMDA antagonists reduce the abnormal Tau immunoreactivity  
induced by glutamate.

Communication : The Smith Kline Beecham Research Symposium  
on neurodegeneration. (Cambridge) 28th - 29th August 1991.

21 - COYLE JT, SCHWARCZ R.

Lesions of striatal neurons with kainic acid provides a model for  
Huntington's chorea.

Nature, 1976, 263 : 244-246.

22 - CURTIS DR, WATKINS JC.

The excitation and depression of spinal neurons by structurally related amino acids.

J Neurochem, 1960, 6 : 117-141.

23 - DAVIES J, MILLER AJ, JONES AW, WATKINS JC.

2 amino-acid-5-phosphonovalerate (APV), a potent and selective antagonist of amino acid induced and synaptic excitation.

NeuroSci Lett, 1981, 21 : 77-81.

24 - DAVIES J, EVANS RH, HERRLING PL, JONES AW,  
OLVERMAN H.

NMDA antagonist. Depression of central neuron responses, affinity for [<sup>3</sup>H] D-AP5 binding sites on brain membranes and anticonvulsant activity.

Brain Res, 1986, 382 : 169-173.

25 - DE BONI U, CRAPPER Mc LACHLAN DR.

Controlled induction of paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured human neurons by glutamate and aspartate.

J Neurol Sci, 1985, 65 : 105-118.

26 - DIAZ-GUERRA MJM, SANCHEZ-PRIETO J, BOSCA L,  
POCOCK JM, BARRIE AP, NICHOLLS DG.

Phorbol ester translocation of protein kinase C in guinea pig synaptosomes and the potentiation of calcium-dependent glutamate release.

Biochim Biophys Acta, 1988, 970 : 157-165.

## 27 - DOLPHIN AC, PRESWITCH SA.

Pertussis toxin reverses adenosine inhibition of neuronal glutamate release.

Nature, 1985, 316 : 148-150.

## 28 - EVANS MC, GRIFFITHS T, MELDRUM BS.

Early hippocampal changes in the rat following bicuculline and L-allerglycine induced seizures. A light and EM study.

Neuropath Appl Neurobiol, 1983, 9 : 32-52.

## 29 - FLETCHER EJ, LODGE D.

Glycine reverses antagonism of N-methyl-D-aspartate (NMDA) by 1-hydroxy(-3-amino pyrrolidone-2 (HA 966) but not by D-2 amino-5-phosphonovalerate (D AP5) on rat cortical slices.

Eur J Pharmacol, 1988, 151 : 161-172.

## 30 - FONNUM F.

Transmitter glutamate in mammalian hippocampus and striatum.

In glutamine and glutamate in mammals. Kvamme E (ed), vol 2 : 57-69. Boca Raton, FL : CRC Press.

## 31 - GARTHWAITE G, GARTHWAITE J.

Neurotoxicity of excitatory amino acid receptor agonists in rat cerebellar slices : dependence on calcium concentration.

NeuroSci Lett, 1986, 66 : 193-198.

## 32 - GREENAMYRE JT.

The role of glutamate in neurotransmission and in neurologic disease.

Arch Neurol, 1986, 43 : 1058-1063.

- 33 - GUNDERSEN CB, MILEDI R, PARKER I.  
Glutamate and kainate receptors induced by rat brain messenger RNA in *Xenopus* oocytes.  
Proc R Soc London Ser B, 1984, 221 : 127-143.
- 34 - HOLLMANN M, O'SHEA-GREENFIELD A, ROGERS SW, HEINEMANN S.  
Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family.  
Nature, 1989, 342 : 643-648.
- 35 - HONORE T, DAVIES SN, DREJER J, FLETCHER EJ, JACOBSEN P, LODGE D, NIELSEN FE.  
Quinoxalinediones : Potent competitive non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptor antagonists.  
Science, 1988, 241 : 701-703.
- 36 - HUANG YP, PLAITAKIS A.  
Morphological changes in olivo pontocerebellar atrophy in computed tomography and comments on its pathogenesis.  
DUVOISIN RC and PLAITAKIS A, Eds the olivo ponto cerebellar atrophies, *Advances in Neurology*, 1984, vol 1 : 39-81. New York : Revon Press.
- 37 - HUETTNER JE.  
Indole-2-carboxylic acid : A competitive antagonist of potentiation by glycine at the NMDA receptor.  
Science, 1989, 243 : 1611-1613.

- 38 - HUGON J, RIGAUD M, COURATIER P, SINDOU P,  
PREUX PM, VALLAT JM, DUMAS M.  
Anomalies du métabolisme de la glycine au cours de la sclérose  
latérale amyotrophique.  
Communication 4ème Colloque National sur les maladies neuro-  
musculaires, Montpellier 24-28 Juin 1991.
- 39 - HUGON J, TABARAUD F, RIGAUD M, VALLAT JM,  
DUMAS M.  
Glutamate dehydrogenase and aspartate amino transferase in  
leukocytes of patients with motor neuron disease.  
Neurology, 1989, 39 : 956-958.
- 40 - HUGON J, VALLAT JM, SPENCER PS, LEBOUTET MJ,  
BARTHE D.  
Kainic acid induces early and delayed degeneration neuronal  
changes in rat spinal cord.  
NeuroSci Lett, 1989, 104 : 258-262.
- 41 - HUGON J, VALLAT JM, SINDOU P, YARDIN C,  
COURATIER P.  
Aberrant neurofilament phosphorylation produced in neuronal  
degeneration by a glutamate agonist.  
"Alzheimer's disease" : Basic Mechanisms, Diagnosis and  
Therapeutics strategies".  
K IQBAL, DRC Mc LACHLAN, B WINBLAD,  
HM WISNIEWSKI (Eds) 1991 : 213-218.



43 - JARROT DM, DOMER FR.

A gerbil model of cerebral ischemia suitable for drug evaluation.

Stroke, 1980, 11 : 203-209.

44 - JOHNSON JW, ASCHER P.

Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons.

Nature, 1987, 325 : 529-531.

45 - KEINANEN K, WISDEN W, SOMMER B, WERNER P,

HERB A, VERDOORN TA, SAKMANN B, SEEBURG PH.

A family of AMPA selective glutamate receptors.

Science, 1990, 249 : 556-560.

46 - KEMP JA, FOSTER AC, LEESON PD, PRIESTLEY T,

TRIDGETT R, IVERSEN LL, WOODRUFF GN.

7 chlorokynuretic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D aspartate receptor complex.

Proc Nat Acad Sci USA, 1988, 85 : 6547-6550.

47 - KLECKNER NW, DINGLEDINE R.

Requirement for glycine in activation of NMDA receptors expressed in *Xenopus* oocytes.

Science, 1988, 241 : 835-837.

48 - KRAUSE GS, WHITE BC, AUST SD, NAYINI NR, KUMAR K.

Brain cell death following ischemia and reperfusion : a proposed biochemical sequence.

Crit Care Med, 1988, 16 : 714-726.

49 - LODGE D, JOHNSON KM.

Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists.

T I P S, 1990, 11 : 81-86.

50 - LUCAS DR, NEWHOUSE JP.

The toxic effect of L-glutamate on the inner layers of the retina.

Arch Ophtalmol, 1957, 58 : 193-204.

51 - MAC DONALD JF, NOWAK LM.

Mechanism of blockade of excitatory amino acid receptor channels.

T I P S, 1990, 11 : 167-172.

52 - MAC GEER EG, MAC GEER PL.

Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrathecal injections of glutamic and aspartic acid.

Nature, 1976, 276 : 517-519.

53 - MAC GURK JF, BENNETT MLV, ZUKIN RS.

Polyamines potentiate the responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes.

Proc Nat Acad Sci, 1990, 87 : 9971-9974.

54 - MANGANO M, SCHWARCZ R.

Chronic infusion of EAA into rat striatum and hippocampus.

Brain Res Bull, 1983, 10 : 47-51.

55 - MARAGOS WF, GREENAMYRE JT, PENNEY JB, YOUNG AB.

Glutamate dysfunction in Alzheimer's diseases : An hypothesis.

Trends Neursci, 1987, 10 : 65-68.

56 - MAYER ML, WESTBROOK GL, GUTHRIE PB.

Voltage dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurons.

Nature, 1984, 309 : 261-263.

57 - MAYER ML, VYKLIČKY LJ, CLEMENTS J.

Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine.

Nature, 1989, 338 : 425-427.

58 - MAYER ML, MILLER RJ.

Excitatory amino acid receptors, second messengers and regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  in mammalian neurons.

T I P S special report : 1991, 36-41.

59 - MONAGHAN DT, BRIDGES RJ, COTMAN CW.

The excitatory amino acid receptors. Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system.

Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1989, 29 : 365-402

60 - MOSMANN T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays

J Immunol Methods, 1983, 55 : 55-63

61 - NAKANISHI N, SHNEIDER NA, AXEL R.

A family of glutamate receptor genes : evidence for the formation of heteromultimeric receptors with distinct channel properties.

Neuron, 1990, 5 : 569-581.

62 - NICHOLLS D, ATTWELL D.

The release and uptake of excitatory amino acids.

T I P S special report, 1991 : 68-74.

63 - NOWAK L, BREGESTOVSKI P, ASCHER P, HERBET A,  
PROCHIANTZ A.

Magnesium gates glutamate activated channels in mouse central neurons.

Nature, 1984, 307 : 462-465.

64 - OKAMOTO K, YAMORI Y, NAGAOKA A.

Establishment of the stroke prone spontaneously hypertensive rat (SHR).

Circ Res, 1974, 34 : 143-153.

65 - OLNEY JW.

Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate.

Science, 1969, 164 : 719-721.

66 - OLNEY JW.

Glutamate induces neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study.

J Neuropath Exp Neurol, 1971, 15 : 75-90.

67 - OLNEY JW, MISRA CH, De GUBAREFF T.

Cysteine S-sulfate brain damaging metabolite in sulfite oxidase deficiency.

J Neuropathol Exp Neurol, 1975, 34 : 167-177.

68 - OLNEY JW, LA BRUYERE J, COLLINS JF, CURRY K.

D aminophosphonavalerate is 100 fold more powerful than D alphaaminoadebate in blocking NMDA toxicity.

Brain Res, 1981, 221 : 207-210.

69 - PARK CK, NEHLS DG, GRAHAM DI, TEASDALE GM,  
Mc CULLOCH J.

Focal cerebral ischaemia in the cat : treatment with the glutamate antagonist MK 801 after induction of ischaemia.

J Cereb Blood Flow Metab, 1988, 8 : 757-762.

70 - PATTEN BM, HARATI Y, ACOSTA L, JUNG SS, FELMUS MI.

Free amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis.

Ann Neurol, 1978, 3 : 305-309.

71 - PERRY TL, HANSEN S, JOWES K.

Brain glutamate deficiency in amyotrophic lateral sclerosis.

Neurology, 1987, 37 : 1845-1848.

72 - PLAITAKIS A, BERL S, YAHR MD.

Abnormal glutamate metabolism in an adult onset degenerative neurological disorder.

Science, 1982, 216 : 193-196.

73 - PLAITAKIS A, BERL S, YAHR MD.

Neurological disorders associated with deficiency of glutamate dehydrogenase.

Ann Neurol, 1984, 15 : 144-153.

74 - PLAITAKIS A, CAROSCIO JT.

Abnormal glutamate metabolism in ALS.

Ann Neurol, 1985, 18 : 165.

75 - PLAITAKIS A, CAROSCIO JT.

Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis.

Ann Neurol, 1987, 22 : 575-579.

76 - PLAITAKIS A, CONSTANTAKAKIS E, SMITH J.

The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis.

Ann Neurol, 1988, 24 : 446-449.

77 - PLAITAKIS A, SMITH J, MANDELI J, YAHR MD.

Pilot trial of branched chain amino acids in amyotrophic lateral sclerosis.

Lancet, 1988, 1 : 1015-1018.

78 - PLAITAKIS A, SHASHIDHARAN P.

Branched chain amino acids in amyotrophic lateral sclerosis.

Lancet, 1988, 2 : 680-682.

## 79 - PLAITAKIS A.

Glutamate dysfunction and selective motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis : An hypothesis.

Ann Neurol, 1990, 28 : 3-8.

## 80 - PULSINELLI WA, BRIERLEY JB.

A new model of bilateral hemispheric ischaemia in the unanaesthetized rat.

Stroke, 1979, 10 : 267-272.

## 81 - RANSOM RW, STEC NL.

Cooperative modulation of [<sup>3</sup>H] MK 801 binding to the N methyl D aspartate receptor ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines.

J Neurochem, 1988, 51 : 830-836.

## 82 - ROSENBERG PA, AIZENMAN E.

Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex

Neurosci Lett, 1989, 103 : 162-168.

## 83 - ROTHMAN SM.

The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx.

J Neurosci, 1985, 5 : 1483-1489.

- 84 - ROTHSTEIN JD, ISAI G, KUNCL RW, CLAWSON L,  
COMBLATH DR, DRACHMAN DB, PESTRONK A.  
Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic  
lateral sclerosis.  
Ann Neurol, 1990, 28 : 18-25.
- 85 - SCHANNE FAX, KANE AB, YOUNG EE, FARBER JL.  
Calcium dependence of toxic cell death. A final common pathway.  
Science, 1979, 206 : 700-702.
- 86 - SCHOEPP D, BOCKAERT J, SLADDECZEK F.  
Pharmacological and functional characteristics of metabotropic  
excitatory amino acid receptors.  
T I P S special report, 1991 : 74-81.
- 87 - SCHWARCZ R, WHETZELL WO, MANGANO RN.  
Quinolinic acid : An endogenous metabolite that causes axon sparing  
lesions in the rat brain.  
Science, 1983, 219 : 316-318.
- 88 - SCHWARCZ R, MELDRUM B.  
EAA antagonists provide a therapeutic approach to neurological  
disorders.  
Lancet, 1985, 11 : 140-143.
- 89 - SCHWARCZ R, BEN ARI Y.  
Excitatory amino acid and epilepsy.  
Advance in Experimental Medicine and Biology, 1986, 23, Alewin  
Press.



90 - SHANK RP, CAMPBELL GL.

Glutamine, glutamate and other possible regulators of alpha ketoglutarate and malate uptake by synaptic terminals.

J Neurochem, 1984, 42 : 1162

91 - SHEARDOWN MJ, NIELSEN EO, HANSEN AJ, JACOBSEN P, HONORE T.

2,3 Dihydro-6-nitro 7 sulfonyl-benzo(F)Quinoxaline: a neuro protectant for cerebral ischemia.

Science, 1990, 247 : 571-574.

92 - SIEGEL S.

Non parametric statistics for the behavioral sciences.

Mc Graw Hill Ed, New York, 312 p, 1956.

93 - SIESJO BK.

Mechanisms of ischemic brain damage.

Crit Care Med, 1988, 16 : 954-963.

94 - SIMON RP, SWAN JH, GRIFFITHS R, MELDRUM BS.

Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain.

Science, 1984, 226 : 850-852.

95 - SINDOU P, COURATIER P, YARDIN C, BARTHE D, HUGON J

Immunocytochemical modifications of Tau protein induced by glutamate in primary neuronal cultures.

Communication : The Smith Kline Beecham Research Symposium on neurodegeneration (Cambridge) 28th - 29th August 1991.

96 - SNELL LD, JOHNSON KM.

Cycloleucine competitively antagonizes the strychnine - insensitive glycine receptor.

Eur J Pharmacol, 1988, 151 : 165-166.

97 - SOMMER B, KEINANEN K, VERDOORN TA, WISDEN W,  
BURNASHEV N, HERB A, KOHLER M, TAKAGI T,  
SAKMANN B, SEEBURG PH.

Flip and flop : A cell specific functional switch in glutamate operated channels of the CNS.

Science, 1990, 249 : 1580-1585.

98 - SPENCER PS, SCHAUBURG HH, COHN DF, SETH PK.

Lathyrism : a Useful model of primary lateral sclerosis.

Research progress in motor Neuron Disease.

Rose FC Eds, 1984 : 312-327, Pitman London.

99 - SPENCER PS, NUNN PB, HUGON J, LUDOLPH A, ROY DN.

Motoneuron disease on Guam : Possible role of a food neurotoxin.

Lancet, 1986, 1 : 965.

100 - SPENCER PS, LUDOLPH A, DWIVEDI MP, ROY DN,  
HUGON J, SCHAUMBURG HH.

Lathyrism : evidence for role of the neuro excitatory amino acid BOAA.

Lancet, 1986, 2 : 1066-1067.

- 101 - SPENCER PS, NUNN PB, HUGON J, LUDOLPH AC,  
ROSS SM, ROY DN, ROBERSTON RC.  
Guam amyotrophic lateral sclerosis - Parkinsonism - dementia  
linked to a plant excitant neurotoxin.  
Science, 1987, 237 : 517-522.
- 102 - STORM-MATHISEN J, LEKNES AK, BORE AT, VAALAND JL,  
EDMINSON P, HAUG FMS, OTTERSEN OP.  
First visualization of glutamate and GABA neurons by immuno-  
cytochemistry.  
Nature, 1983, 301 : 517-520.
- 103 - SUGIYAMA H, ITO I, HIRONO C.  
A new type of glutamate receptor linked to inositol phospholipid  
metabolism.  
Nature, 1987, 325 : 531-533.
- 104 - TANG CM, MORAD M, DICHTER M.  
Modulation of the NMDA channel by extracellular H<sup>+</sup>.  
Proc Natl Acad Sci, 1990, 87 : 6445-6449.
- 105 - TANDAN R, BRADLEY WG.  
Amyotrophic lateral sclerosis.  
Part 1. Clinical features, Pathology  
and ethical issues in management.  
Ann Neurol, 1985, 18 : 271-280.

- 106 - TANDAN R, BRADLEY WG.  
Amyotrophic lateral sclerosis.  
Part 2. Etiopathogenesis.  
Ann Neurol, 1985, 18 : 419-431.
- 107 - TEITELBAUM JS, ZATORRE RJ, CARPENTIER S,  
GENDRON D, EVANS AC, GIEDDE A, CASHMAN NR.  
Neurologic sequelae of Domoic acid intoxication due to the  
ingestion of contaminated mussel  
N Engl J Med, 1990, 322 : 1781-1787
- 108 - TREMBLAY B, REPRESSA A, BEN ARI Y.  
Autoradiographic localization of kainic acid binding sites in the  
human hippocampus.  
Brain Res, 1985, 343 : 378-384.
- 109 - TRICKLEBANK MD, SINGH L, OLES RJ, PRESTON C,  
IVERSEN SD.  
The behavioral effects of MK 801 : A comparison with antagonists  
acting non competitively and competitively at the NMDA receptor.  
Eur J Pharmacol, 1989, 167 : 127-135.
- 110 - WATKINS JC, EVANS RH.  
Excitatory amino acid transmitters.  
Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1981, 21 : 165-204.

- 111 - WATKINS JC, KROGSGAARD-LARSEN P, HONORE T.  
Structure - activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists.  
T I P S, 1990, 11 : 25-33.
- 112 - WATSON BD, DJETRICH WD, BUSTO R, WACHTEL MS, GINSBERG MD.  
Induction of reproducible brain infarction by photo-chemically initiated thrombosis.  
Ann Neurol, 1985, 17 : 497-504.
- 113 - WAUQUIER A, ASHTON D, CLINCKE G, NIEMEGEERS CJE.  
Anti-hypoxic effects of Etomidate, Thiopental and Methohexital.  
Arch Int Pharmacodyn Ther, 1981, 249 : 330-334.
- 114 - WESTBROOK GL, MAYER ML.  
Micromolar concentrations of  $Zn^{2+}$  antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons.  
Nature, 1987, 328 : 640-643.
- 115 - WILLETTS J, BALSTER RL, LEANDER JD.  
The behavioral pharmacology of NMDA receptor antagonists.  
T I P S special report, 1991 : 62-67.
- 116 - WILLIAMS K, ROMANO C, DICHTER M, MOLINOFF P.  
Modulation of the NMDA receptor by polyamines.  
Life Sci, 1991, 48 : 469-498.

117 - WONG EH, KEMP JA, PRIESTLEY T, KNIGHT AR,  
WOODRUFF GN, IVERSEN LL.

The anticonvulsivant MK 801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist.

Proc Natl Acad Sci, USA, 1986, 83 : 7104-7108.

118 - WROBLEWSKI F, LADUE JS.

Lactic dehydrogenase activity in blood.

Proc Soc Exp Biol Med, 1955, 90 : 210-213.

119 - YOUNG AB, GREENAMYRE JT, HOLLINGSWORTH Z,  
ALBIN R, D'AMATO C, SHOULSON J, PENNEY JB.

NMDA receptors losses in putamen from patients with Huntington disease.

Science, 1988, 241 : 981-983.

120 - YOUNG AB, FAGG GE,

Excitatory amino acid receptor in the brain : membrane binding and receptor autoradiographic approaches.

T I P S special report, 1991 : 18-24.

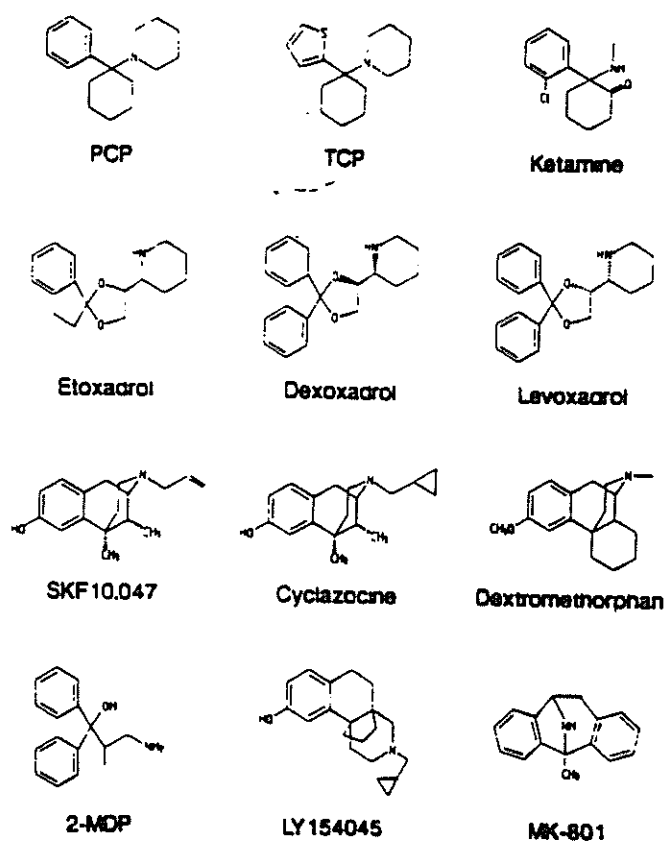


FIG. 7. NMDA antagonists that act via the PCP receptor (i.e., probably blockers of the NMDA receptor-operated ion channel). Abbreviations: PCP, phencyclidine; TCP, *N*-[1-thienyl]-cyclohexyl-3,4-piperidine; SKF 10,047, *N*-allylnormetazocine; 2-MDP, 2-methyl-3,3-diphenyl-3-propanoic acid; MK-801, (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[*a,d*]cyclohepten-5,10-imine maleate.

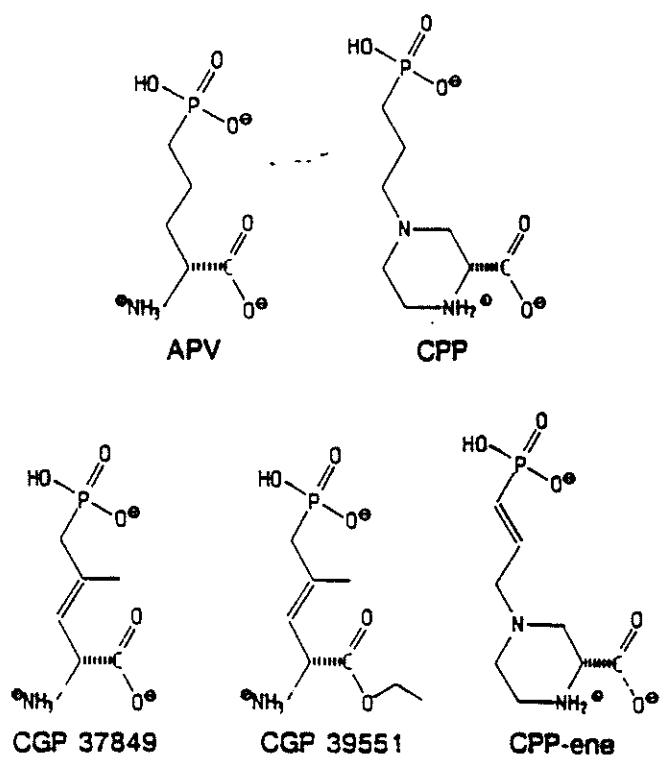
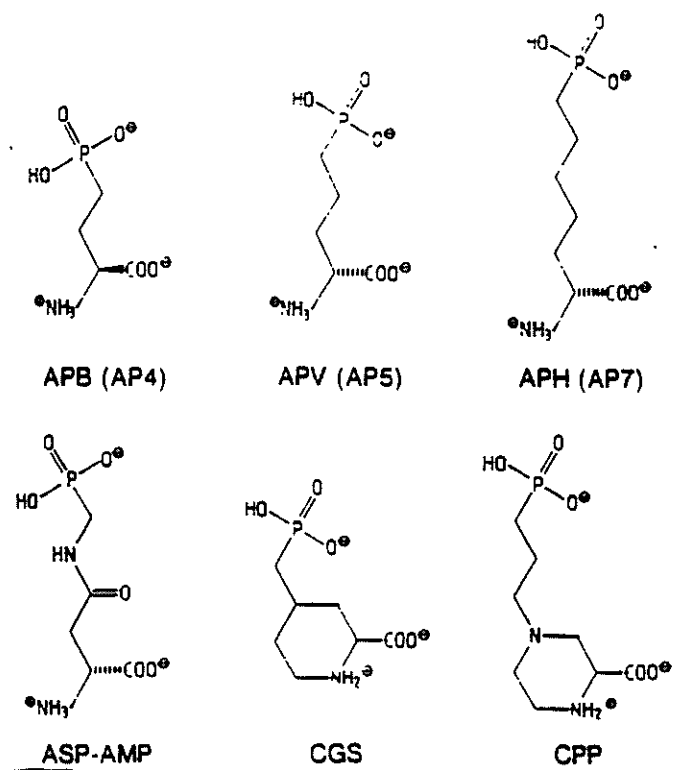
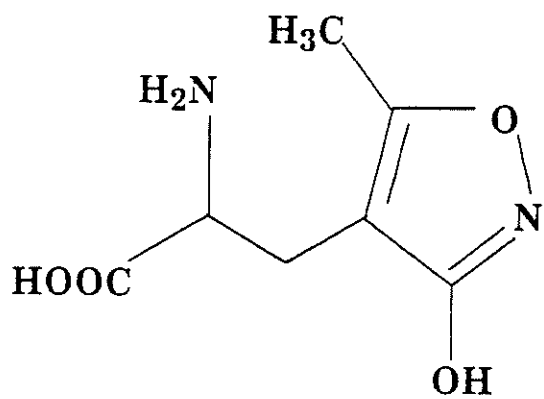
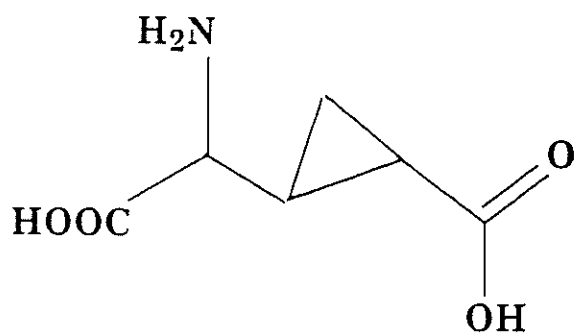


FIG. 5. Some new orally active NMDA antagonists based on the structures of APV and CPP. (For full chemical names see text).



**Agonistes QUI<sub>S</sub><sub>m</sub>****ACPD****L-CCG**

## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b>	p.12
<b>ETAT ACTUEL DE LA QUESTION</b>	p.13
1ère partie : Pharmacologie du glutamate	p.14
1 - Introduction	p.14
2 - Neurotransmetteur	p.15
2.1 - Synthèse et métabolisme	p.15
2.2 - Localisation présynaptique	p.16
2.3 - Libération et recapture synaptique	p.16
2.4 - Récepteurs au glutamate	p.16
2.4.1 - Récepteur N méthyl D Aspartate (NMDA)	p.18
2.4.2 - Récepteur AMPA	p.26
2.4.3 - Récepteur Kainate	p.26
2.4.4 - Récepteur L AP4	p.27
2.4.5 - Récepteur métabotrope	P.28
2.4.6 - Données de biologie moléculaire	p.29
3 - Relations glutamate - affections neurodégénératives	p.30
3.1 - Généralités	p.30
3.2 - Etude pharmacologique de la toxicité du glutamate	p.31
3.2.1 - Mécanismes impliqués dans la toxicité du glutamate	p.32
3.3 - Affections neurologiques et excitotoxicité	p.33
3.3.1 - Affections neurodégénératives aiguës	p.34
3.3.2 - Affections neurodégénératives chroniques	p.43

2ème partie : Le RP 54274 ou Riluzole	p.51
2.1 - Pharmacologie comportementale	p.51
2.1.1 - Effet anticonvulsivant	p.51
2.1.2 - Effet antiischémique	p.52
2.1.3 - Modification de l'utilisation du glucose cérébral après administration du Riluzole chez le rat.	p.55
2.2 - Neurobiochimie	p.56
2.3 - Protocole de pharmacologie clinique	p.57
<b>PROTOCOLE DE PHARMACOLOGIE EXPERIMENTALE</b>	p.60
1 - Modèle d'étude pharmacologique	p.61
1.1 - Généralités	p.61
1.2 - Cultures primaires de neurones corticaux d'embryons de rat	p.61
1.2.1 - Dissection	p.62
1.2.2 - Dissociation mécanique	p.63
1.2.3 - Supports	p.63
1.2.4 - Milieux de culture	p.64
1.2.5 - Ensemencement	p.65
1.2.6 - Suivi des cultures	p.66
1.2.7 - Tests de viabilité cellulaire	p.66
1.3 - Etude pharmacologique	p.67
1.3.1 - Neurotoxicité induite par le glutamate	p.67
1.3.2 - Modèle d'hypoxie in vitro	p.71
1.4 - Analyse statistique des résultats	p.71

<b>RESULTATS</b>	p.72
1 - Survie des neurones corticaux en culture primaire	p.73
2 - Neurotoxicité du glutamate : Relation concentrations effets	p.74
3 - Effet neurotoxique du RP 54274	p.75
4 - Effet neuroprotecteur du RP 54274 vis à vis de la toxicité induite par le glutamate	p.75
4.1 - Toxicité calcium-dépendant	p.75
4.2 - Toxicité aiguë	p.77
5 - Effet neuroprotecteur du RP 54274 dans un modèle d'hypoxie expérimentale	p.77
<b>DISCUSSION</b>	p.91
<b>CONCLUSION</b>	p.97
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	p.99
<b>ANNEXES</b>	p.121

## SERMENT D'HIPPOCRATE

---

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Reconnaissant envers mes maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères et s'ils devaient entreprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné à jamais de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole, et que je me parjure, puissè-je avoir un sort contraire.