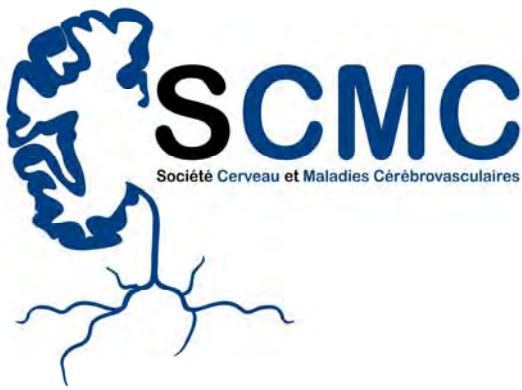


L'HYPOXIE



© Guichard / Office de Tourisme de Caen

Caen | 20 et 21 janvier 2011



CAEN – 20 et 21 Janvier 2011

**COLLOQUE ANNUEL DE LA SCMC
- HYPOXIE -**

JEUDI 20 JANVIER

Lieu : Auditorium du Musée des Beaux-arts de Caen, Le château, 14 000 Caen
Tel : 02 31 30 47 70 / Fax : 02 31 30 47 80 / Parking gratuit-accès par les portes côté Café Mancel

- 13h00 - 14h00 Visite guidée du Musée (groupe de 30 personnes)
- 14h00 - 14h20 Accueil
- 14h20 - 14h30 Mot de Vincent Berezowski, *Président de la SCMC*
- Modérateurs : Daval JL & Schumann-Bard P*
- 14h30 - 15h15 **Lésions excitotoxiques périnatales : rôle de la microglie**
Pr Pierre Gressens (Paris, France)
- Communications orales – session 1
- 15h15 - 15h30 **Heme oxygenase-1 induction does not prevent but worsens cerebral injury in rat exposed to a striatum excitotoxic inflammation**
Tronel C (Tours, France)
- 15h30 - 15h45 **Lactate excites cortical neurons via ATP sensitive K⁺ channels closure**
Karagiannis K (Paris, France)
- 15h45 - 16h00 Pause
- Communications orales – session 2
Modérateurs : Pellerin L & Schroeder H
- 16h00 - 16h15 **Exposition à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez la rate gestante et allaitante : neurotoxicité juvénile à court et à long terme**
Crépeaux G (Nancy, France)
- 16h15 - 16h30 **A role for caspase-2 during Hypoxic-Ischemic Neonatal Brain Injury**
Jacotot E (Paris, France)
- 16h30 - 16h45 **Evaluation of caspase inhibitor loades-nanomedicine in an ischemia model**
Andrieux K (Châtenay-Malabry, France)
- 16h45 - 17h00 **Effets à long terme d'une néo-neurogenèse induite par une hypoxie néonatale chez le rat**
Martin N (Nancy, France)
- 17h00 - 17h15 **Effets d'une hypoxie chronique intermittente sur les performances cognitives chez la souris adulte**
Leconte C (Caen, France)
- 17h15 - 18h15 Nouvelles de la SCMC : présentation du site internet & AG
- 19h30 Dîner de gala (Café Mancel, Musée des Beaux-Arts)

Lieu : **Campus Jules Horowitz**, Maison d'hôtes du GANIL, Bd Henri Becquerel, 14 000 Caen

9h00 - 9h30 Accueil et installation des posters

Modérateurs : *Bernaudin M & Berezowski V*

9h30 - 10h15 **Tumor adaptation to hypoxic and acidic stress**
Pr Jacques Pouysségur (Nice, France)

Communications orales – session 3

10h15 - 10h30 **Caractérisation multimodale de la microvascularisation et de l'hypoxie sur deux modèles de tumeurs cérébrales chez le rat**
Valable S (Caen, France)

10h30 - 10h45 **L'hypoxie : un régulateur de l'expression tumorale de la molécule HLA-G**
Yaghi L (Paris, France)

10h45 - 11h00 **Urotensin II regulates migration and cell-cell adhesion during glioma development**
Lecointre C (Rouen, France)

11h00 - 11h15 **EPO and its receptor expressed by glioma cells contribute to brain tumor growth**
Peres E (Caen, France)

11h15 - 11h45 Pause & visite des posters

11h45 - 12h30 **Remise du prix de la SMC : Annelise Letourneur** « Effet de l'hypertension artérielle chronique sur l'évolution de la lésion cérébrale d'origine ischémique chez le rat adulte et nouveau-né : études séquentielles en imagerie par résonance magnétique »

12h30 - 14h00 Déjeuner & visite des posters (hall de la Maison d'hôtes du GANIL)

Modérateurs : *Besson V & Hevor T*

14h00 - 14h45 **EPO et œdème cérébral post-traumatique**
Pr Jean-François Payen (Grenoble, France)

Communications orales – session 4

14h45 - 15h00 **Etude de l'unité neuro-vasculaire à l'aide de modèles in vitro de la barrière hémato-encéphalique : focus sur les péricytes**
Vandehaute E (Lens, France)

15h00 - 15h15 **Reduction of the long-term consequences of traumatic axonal injury by minocycline following closed head injury in mice: the potential neuroprotective role of sAPP**
Siopi E (Paris, France)

15h15 – 15h30 **Nanoparticles for Alzheimer's disease**
Brambilla D (Châtenay-Malabry, France)

15h30 - 16h00 Clôture de la réunion

Résumés des conférences et des communications

C1

Lésions excitotoxiques périnatales : rôle de la microglie, Pr Pierre Gressens (Paris, France)

C2

Tumor adaptation to hypoxic and acidic stress, Pr Jacques Pouyssegur (Nice, France)

C3

EPO et œdème cérébral post-traumatique, Pr Jean-François Payen (Grenoble, France)

Prix SCMC

Effet de l'hypertension artérielle chronique sur l'évolution de la lésion cérébrale d'origine ischémique chez le rat adulte et nouveau-né : études séquentielles en imagerie par résonance magnétique

Annelise Letourneur, Caen, France

UMR CI-NAPS 6232 , Equipe CERVOxy: « Hypoxie et Physiopathologie Cérébrovasculaire »; Université de Caen-Basse-Normandie, Centre Cyceron, Bd Henri Becquerel, BP5229 14074 CAEN cedex, France.

Les conséquences, en termes de santé publique, des accidents vasculaires cérébraux ischémiques survenant chez l'adulte et le nouveau-né soulignent la nécessité de trouver des stratégies thérapeutiques et expliquent l'intensité des recherches menées dans ce domaine. Les études expérimentales proposant des stratégies thérapeutiques se sont multipliées sans, pour autant, pouvoir transposer leurs résultats lors des tests cliniques. La situation nécessite d'évoluer. Le design des études précliniques et surtout la pertinence des modèles animaux utilisés, est potentiellement, mis en cause chez l'adulte pour expliquer ces échecs. Ce travail nous permet de soutenir l'idée que l'hypertension artérielle chronique devrait être intégrée dans les études précliniques sur la physiopathologie et le traitement de la lésion ischémique cérébrale. L'hypertension artérielle induit une aggravation de la lésion ischémique résultante et entraîne une quasi inexistence de la pénombre ischémique, cible de toute stratégie thérapeutique de l'ischémie cérébrale. Chez le nouveau-né, inhiber spécifiquement la caspase-2 est une stratégie inefficace dans le cas de lésions hypoxique-ischémiques sévères mais qui doit être plus précisément explorée dans le cadre de lésions ischémiques focales. L'hypertension artérielle maternelle induit une neuroprotection du cerveau immature vis-à-vis de la lésion hypoxique-ischémique qui semble être attribuable à un phénomène de préconditionnement occasionné par le stress prénatal induit par l'hypertension maternelle.



O1

Heme oxygenase-1 induction does not prevent but worsens cerebral injury in rat exposed to a striatum excitotoxic inflammation

C. Tronel¹, N. Arlicot¹, G. Rochefort², S. Bodard¹, S. Chalon¹, D. Antier¹.

¹INSERM U930, Equipe 3 – Université François Rabelais, Tours

²INSERM U698 – IPROS, Orléans

Background: Neuroinflammation process is involved in most of neurodegenerative diseases. The inducible heme oxygenase 1 (HO-1) turns heme into biliverdin, carbon monoxide and Fe²⁺. Authors have reported its anti-inflammatory properties in different rodent models. In this study, we aimed to assess the effect of HO-1 activation on microglia activation in an *in vivo* model of excitotoxic neuroinflammation in rat.

Materials and methods: A preliminary study by Western Blot analysis was performed to check out the impact of hemin i.p. treatment on brain HO-1 protein level in rat treated by 50 mg/kg of hemin (H50) vs control. Twenty-two male Wistar rats were exposed to intrastriatal injection (bregma +0,7 mm) of 150 nmol of quinolinic acid (QA), an agonist of NMDA receptors or vehicle (PBS) at J0. Animals received either an inductor of HO-1 (hemin, 50 mg/kg [H50]; i.p.; n=11) or vehicle (DMSO; i.p.; n=11) every day from J0-24h to J0+48h. Rats were sacrificed at J0+72h, their brains fixed and removed for immunohistochemistry examination of the Cd11b as index of microglial activation;

Results: Chronic treatment with hemin significantly induced cerebral HO-1 expression (+38 ± 2%, p<0.05). Tissue processing for immunohistochemistry showed a significantly different loss of tissue in ipsilateral hemisphere of QA/H50 (51% ± 9%) rats vs QA animals (17 ± 6.5%). Cerebral damage was limited to the striatum in QA whereas it concerned both striatum and cortical regions in QA/H50 rats. The integrin marker of microglial activation Cd11b level was significantly (p<0.05) increased in further cortex areas (bregma +3,1 mm) of ipsilateral hemisphere in both QA (+71 ± 5%) and QA/H50 (+541 ± 3%) rats vs control (+2%). Moreover, Cd11b level was significantly (p<0.05) higher in QA/H50 vs QA animals

Conclusion: HO-1 cerebral induction has been reported for its potential neuroprotective role in various rodent models. However, this ubiquitously distributed enzyme appeared to worsen brain injury in our excitotoxic model. Destruction of brain structures in the cerebral hemisphere exposed to striatal injection of QA and microglial activity were both massively increased in animals receiving HO-1 inducer hemin. Such tissue destruction could be linked to ROS production but this remains to be proven. Therefore, we project to measure the HO-1 expression and ROS levels in cerebral structures (cortex, striatum, hippocampus) in our neuroinflammation rat model when exposed to chronic hemin treatment.

02

Lactate excites cortical neurons via ATP sensitive K⁺ channels closure

Anastassios Karagiannis¹, Fabrice Plaisier¹, Thierry Gallopin², Csaba David³, H el ene Geoffroy², Jochen F. Staiger³, Jochen Roeper⁴, Elizabeth Hillman⁵, and Bruno Cauli¹.

(1) Lab. Neurobiology of Adaptive Processes UMR7102 CNRS/UPMC, Paris, France ; (2) Lab. neurobiology UMR7637 ESPCI/CNRS, Paris, France ; (3) Institute for Anatomy and Cell Biol. Department of Neuroanatomy, Freiburg, Germany ; (4) Institute of Neurophysiology, Neuroscience Center, Goethe-University Frankfurt, Frankfurt 60590, Germany ; (5) Department of Biomedical Engineering, Columbia University, New York, USA

Tight coupling between neuronal activity, local cerebral blood flow and metabolism is at the basis of contemporary brain imaging techniques, but the precise mechanisms, or even the functional consequences, of this coupling remain poorly understood. During neuronal activity, local increase of blood perfusion is accompanied by a surrounding reduction of cerebral blood flow and is associated with a transient rise of extracellular lactate. To evaluate the physiological significance of these changes of energy supply we studied, in the rat neocortex, the influence of metabolism on neuronal activity paying particular attention to ATP sensitive K⁺ (K-ATP) channels, which couple energetic states with membrane potential. These channels are closed when intracellular ATP/ADP ratio is high and opened when it is low. Using perforated patch recordings, which preserve intracellular metabolism, we found that increasing glucose concentration had no effect on evoked neuronal activity. In contrast iso-energetic application of lactate doubled the firing rate of neurons, an effect that was blocked by a lactate uptake inhibitor. This lactate effect also occluded the action of tolbutamide, a K-ATP channel blocker, and was reversed by diazoxide, a K-ATP channel opener, indicating that lactate uptake and K-ATP channel closure act sequentially to enhance neuronal activity. Molecular and pharmacological characterization of cortical neurons by single cell RT-PCR and whole cell patch-clamp recordings revealed a promiscuous expression of Kir6.2 and SUR1 K-ATP channels subunits which are the ones most sensitive to intracellular ATP levels. Consistently, neurons expressed also lactate transporters and lactate dehydrogenase subunits. These observations strongly suggest that *in vivo* the increase of lactate levels would substantially enhance neuronal activity through ATP production and K-ATP channels closure, thereby providing a physiological significance for the surround reduction of blood perfusion.

03

Exposition à un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques chez la rate gestante et allaitante : neurotoxicité juvénile à court et à long terme

Guillemette Crépeaux, Nurgul Kinzhebayeva, Jean Luc Perrin, Guido Rychen, Rachid Soulimani, Henri Schroeder

Unité de Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux, INRA UC340, Nancy Université, Vandoeuvre, France

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des polluants ubiquitaires produits lors de réactions de combustion incomplète et présentant un risque avéré pour la santé humaine. Parmi les différentes voies de contamination possibles, l'alimentation est la voie d'exposition majoritaire pour l'Homme, l'ingestion quotidienne de HAP étant estimée à 10 µg/jour/personne en moyenne. Par ailleurs, des études récentes ont montré l'existence d'un transfert de ces composés de la mère à l'enfant tant par voie placentaire que via le lait maternel, posant la question du risque pour le développement du fœtus et du nouveau-né, en particulier sur le plan neurocomportemental.

Le but de cette étude a été d'évaluer les effets de l'ingestion quotidienne d'un aliment contaminé avec un mélange de 16 HAP par la mère pendant la gestation et l'allaitement sur le développement neurocomportemental à court et à long terme du jeune rat. Trois groupes expérimentaux contenant chacun 7 rates ont été constitués : un groupe témoin recevant un aliment non contaminé, et deux groupes exposés à des concentrations différentes du mélange, la première correspondant à l'ingestion journalière de 2,14 µg/kg de HAP pendant la gestation et 1,45 µg/kg pendant la période d'allaitement, et la deuxième à des quantités ingérées 100 fois plus élevée, soit 214 et 145 µg/kg/jour. La dose la plus faible a été calculée de manière à modéliser l'exposition réelle aux HAP par voie alimentaire d'une femme enceinte puis allaitante alors que la deuxième se veut représentative d'une concentration plus toxique.

Au cours des 3 premières semaines de vie postnatale, le développement neuromoteur et sensoriel de chaque jeune a été évalué par la mise en place de plusieurs tests (tests de retournement et d'agrippement, *cliff avoidance test*, tests de réaction anti-gravitaire, de suspension et de coordination locomotrice). L'évolution du poids corporel de chaque animal a également été observée. A l'âge adulte, soit 40 jours après la fin de l'exposition aux HAP, le comportement des animaux a été évalué au plan de l'activité dans l'open-field, de l'anxiété dans le labyrinthe en croix surélevé et l'open-field, et de la mémoire spatiale dans le labyrinthe en Y.

Aucune variation significative du poids corporel n'a été observée entre les groupes à tous les stades étudiés. De plus, aucun effet sur le développement neuromoteur à court terme n'a été observé dans les 2 groupes exposés aux HAP par rapport aux témoins. A l'âge adulte, les résultats obtenus avec l'open-field ont montré des augmentations significatives de l'activité et de l'anxiété pour les deux groupes exposés aux HAP. Par ailleurs, une augmentation significative de l'anxiété des animaux du groupe exposé à la dose la plus faible a été mise en évidence dans le labyrinthe en croix surélevé. Dans le labyrinthe en Y, aucune modification des capacités d'apprentissage des animaux n'a été observée.

En conclusion, ces résultats confirment le potentiel neurotoxique à long terme de l'ingestion d'un mélange de HAP par la mère pour le jeune, confirmant que cette famille de contaminants alimentaires est à même de présenter un risque pour l'individu en développement.

04

A role for caspase-2 during Hypoxic-Ischemic Neonatal Brain Injury

Leslie Schwendimann^{1,2}, Ylva Carlsson^{3,4}, Regina Vontell⁵, Catherine Rousset^{3,5}, Xiaoyang Wang³, Sophie Lebon^{1,2}, Christiane Charriaut-Marlangue^{1,2}, Veena Supramaniam⁶, Henrik Hagberg^{1,4,5}, Pierre Gressens^{1,2,5}, and **Etienne Jacotot**^{1,2,5}

¹ Inserm, U676, Paris F-75019, France; ² Université Paris 7, Faculté de Médecine Denis Diderot, Paris, France; ³ Perinatal Center, Department of Neuroscience and Physiology, Sahlgrenska Academy at University of Gothenburg, Gothenburg S-405 30, Sweden; ⁴ Department of Obstetrics and Gynaecology, Sahlgrenska University Hospital, Gothenburg, Sweden; ⁵ Perinatal Brain Injury Group, *Centre for the Developing Brain*, Department of Reproductive Biology, IRDB, Imperial College, Du Cane Road, London W12 0NN, United Kingdom; ⁶ Perinatal Imaging Group, *Centre for the Developing Brain*, Robert Steiner MR Unit, MRC Clinical Sciences Centre, Imperial College, Hammersmith Hospital, Du Cane Road, London W12 0HS, United Kingdom

Abstract

Perinatal brain injury is a major cause of neurodevelopmental handicap. Multiple pathways of oxidant stress, inflammation, and excitotoxicity lead to cell damage and death. Apoptotic mechanisms play a more prominent role in the evolution of ischemic brain injury in neonatal rodents and humans than in adult brain ischemia; and apoptosis involves the mitochondrial release of cytochrome *c* and apoptosis-inducing factor which activate caspase-dependent and independent execution pathways, respectively. Caspase-2 (Casp2; Nedd-2, Ich-1) is a highly conserved and developmentally regulated initiator caspase which poorly cleaves other caspases but can initiate mitochondrial outer membrane permeabilization. We have found that newborn human, rat, and mouse brains do express Casp2 in cortical neurons, hippocampus, hypothalamus, and white matter. Casp2 deficient mice subjected to hypoxia-ischemia at postnatal day 9 present significantly lower cerebral infarction and reduced white matter injury. Moreover, both Casp2 null mice and siRNA-administered wild-type mice presented strongly reduced grey and white matter injury after excitotoxic insult at postnatal day 5. These data suggest that Casp2 is implicated in the pathophysiology of hypoxic-ischemic neonatal brain damage.

EVALUATION OF CASPASE INHIBITOR LOADED-NANOMEDICINE IN AN ISCHEMIA MODEL

Y. Aktaş^{1,2}, K. Andrieux², T. Dalkara³, Y. Çapan¹ and P. Couvreur²

¹Department of Pharmaceutical Technology, Hacettepe University, Ankara, Turkey, ²UMR CNRS 8612, Univ. Paris-Sud, 92296 Châtenay-Malabry, France, ³Department of Neurology, Faculty of Medicine, and Institute of Neurological Sciences and Psychiatry, Hacettepe University, Ankara, Turkey.

The inhibition of the caspase-3 enzyme is reported to increase neuronal cell survival following cerebral ischemia. The peptide Z-DEVD-FMK is a specific caspase inhibitor, which significantly reduces vulnerability to the neuronal cell death. However, this molecule is unable to cross the blood brain barrier (BBB). Thus, the development of an effective delivery system is needed.

Using the avidin (SA)-biotin (BIO) technology, we describe here the design of chitosan (CS) nanospheres conjugated with polyethyleneglycol (PEG) bearing the OX26 monoclonal antibody whose affinity for the transferrin receptor may trigger receptor-mediated transport across the BBB [1]. These functionalized CS-PEG-BIO-SA/OX26 nanoparticles (NPs) were characterized for their particle size, zeta potential, drug loading capacity and release properties. Fluorescently labeled NPs were administered systemically to mice in order to evaluate their efficacy for brain translocation. The results showed that an important amount of NPs were located in the brain, outside of the intravascular compartment [2]. More recently, a clear decrease of infarct volume and neurological score were observed after administration of NPs into a model of ischemia [3].

References: [1] Pardridge W. M. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 1995; 15:109-146. [2] Aktaş Y., et al. *Bioconjugate Chemistry*. 2005, 16(6):1503-11. [3] Karatas H., et al. *J. Neurosci.* 2009 29: 13761-13769.

06

Effets à long terme d'une néo-neurogenèse induite par une hypoxie néonatale chez le rat

Nicolas Martin; Grégory Pourié; Carine Bossenmeyer-Pourié; Jean-Louis Guéant; Jean-Luc Daval

Inserm U954, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-lès-Nancy

L'hypoxie est un processus clé de la physiopathologie de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique du nouveau-né, source de graves lésions neurologiques. Or, il a été montré que l'application d'un stimulus délétère en dessous du seuil dommageable pouvait activer des mécanismes intrinsèques de plasticité capables de prévenir les conséquences néfastes de ce stimulus. Ainsi, nous avons exposé des rats nouveau-nés à une hypoxie brève (5 minutes sous 100% N₂). Alors qu'aucune perte cellulaire secondaire n'était apparente, nous avons mis en évidence une forte augmentation de la prolifération cellulaire, principalement dans la zone subventriculaire, connue pour être le siège d'une neurogénèse persistant tout au long de la vie. Les cellules néoformées présentaient un phénotype neuronal et étaient capables de migrer vers l'hippocampe, engendrant une augmentation de densité cellulaire dans plusieurs régions sans altérations des capacités d'apprentissage. Les données montrent que la stimulation de la neurogénèse fait intervenir une augmentation d'Akt et qu'elle est couplée à une diminution de l'apoptose liée notamment à la Death-associated protein (DAP) kinase et à la p38 MAP kinase. Afin d'identifier les effets à long terme, nous avons procédé à un suivi des animaux jusqu'au stade de sénescence. Les résultats mettent en évidence des différences en fonction du sexe. Ainsi, la neurogénèse réactionnelle à l'hypoxie néonatale est associée à des effets bénéfiques sur la mémoire qui apparaissent plus précocement chez les femelles (40 jours) que chez les mâles (100 jours), tandis qu'elle atténue significativement les effets de la sénescence sur les processus mnésiques uniquement chez les mâles, suggérant un décalage temporel de la survenue des premières conséquences du vieillissement cérébral en lien avec l'hypoxie. Les investigations histopathologiques cérébrales montrent que, par rapports aux témoins du même âge, les rats mâles qui avaient été exposés à l'hypoxie conservent une meilleure architecture de l'hippocampe, avec une densité cellulaire plus élevée dans certaines zones. Ceci suggère que ces zones spécifiques resteraient plus longtemps au-dessus d'un seuil structural et fonctionnel optimal, conférant ainsi une plus grande résistance aux effets du vieillissement.

Effets d'une hypoxie chronique intermittente sur les performances cognitives chez la souris adulte.

Claire Leconte^{1,2}, Marianne Léger², Emmanuelle Tixier¹, Thomas Freret², Michel Boulouard², Pascale Schumann-Bard^{2*}, Myriam Bernaudin^{1*}.

1 : CERVOxy team « Hypoxia and cerebrovascular pathology », UMR 6232 CI-NAPS, Université de Caen Basse-Normandie, Université Paris-Descartes, CNRS, CEA, Centre CYCERON, 14074 Caen, France ; 2 : Groupe Mémoire et Plasticité comportementale, GMPc, EA 4259, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Caen Basse-Normandie, IFR ICORE, 14000 Caen, France.

* Both authors contributed equally to this work

Si l'hypoxie est connue pour entraîner un certain nombre de pathologies, elle peut également entraîner des effets bénéfiques, probablement *via* l'activation de mécanismes adaptatifs de l'organisme. Il a été en effet rapporté qu'une hypoxie modérée appliquée chez le rongeur nouveau-né augmente la neurogenèse et améliore les performances de mémoire spatiale (Daval et al., 2004 ; Gozal et al., 2003 ; Wittner et Riha, 2005 ; Pourié et al., 2006). Toutefois, aucune étude n'a, à ce jour, été réalisée chez le rongeur adulte afin de déterminer les effets d'une hypoxie modérée sur les différents processus cognitifs.

Des souris Swiss mâles adultes sont soumises à un protocole d'hypoxie chronique intermittente (Leconte et al., 2009) (8% d'O₂, 1 heure, 3 fois par semaine) pendant 6 semaines consécutives (Hypoxie, n=14), ou non (Normoxie, n=15). L'hypoxie n'induit aucune modification des performances de mémoire de reconnaissance non-spatiale mesurée au test de la reconnaissance d'objet effectué à J33, ni de perturbations de l'apprentissage et de la mémoire spatiales évaluées par mise en œuvre du test du labyrinthe aquatique de Morris effectué de J36 à J40. En revanche, dans deux modèles mesurant le comportement de type anxieux, l'hypoxie induit un effet de type anxiolytique. En effet, dans le test de la croix surélevée effectué à J25, les souris « Hypoxie » réalisent plus d'exploration à l'extrémité des bras ouverts. De même, dans le test de la boîte noire et blanche effectué à J37, les souris du groupe « Hypoxie » passent significativement plus de temps dans le compartiment blanc éclairé. Par ailleurs, sur des animaux satellites soumis au même traitement, nous avons prélevé les cerveaux des souris à la fin de certaines séances d'hypoxie (J0, J24 et J40, n=4 par groupe et par jour), afin de déterminer l'expression des ARNm de certains gènes cibles du facteur de transcription *Hypoxia Inducible Factor-1* (HIF-1), connus pour être activés par l'hypoxie. Ainsi l'hypoxie chronique intermittente augmente l'expression des ARNm de l'adrénomédulline (AM) et du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF).

En conclusion, cette étude décrit pour la première fois que l'hypoxie chronique intermittente est capable de diminuer le comportement de type anxieux chez le rongeur adulte, et propose l'AM et le VEGF comme potentiels médiateurs de cette modulation cognitive (Zhu et al., 2010 ; Fernandez et al., 2008).

- Daval JL, Vert P. (2004) Apoptosis and neurogenesis after transient hypoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol.* 28(4):257-63.
- Fernández AP, Serrano J, Tessarollo L, Cuttitta F, Martínez A. (2008) Lack of adrenomedullin in the mouse brain results in behavioral changes, anxiety, and lower survival under stress conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(34):12581-6.
- Gozal D, Row BW, Gozal E, Kheirandish L, Neville JJ, Brittan KR, Sachleben LR Jr, Guo SZ. (2003) Temporal aspects of spatial task performance during intermittent hypoxia in the rat: evidence for neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 18(8):2335-42.
- Leconte C, Tixier E, Freret T, Toutain J, Saulnier R, Boulouard M, Roussel S, Schumann-Bard P, Bernaudin M. (2009) Delayed hypoxic postconditioning protects against cerebral ischemia in the mouse. *Stroke.* 40(10):3349-55.
- Pourié G, Blaise S, Trabalon M, Nédélec E, Guéant JL, Daval JL. (2006) Mild, non-lesioning transient hypoxia in the newborn rat induces delayed brain neurogenesis associated with improved memory scores. *140(4):1369-79.*
- Wittner M, Riha P. (2005) Transient hypobaric hypoxia improves spatial orientation in young rats. *Physiol Res.* 54(3):335-40.
- Zhu XH, Yan HC, Zhang J, Qu HD, Qiu XS, Chen L, Li SJ, Cao X, Bean JC, Chen LH, Qin XH, Liu JH, Bai XC, Mei L, Gao TM. (2010) Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats. *J Neurosci.* 30(38):12653-63.

08

Caractérisation multimodale de la microvascularisation et de l'hypoxie sur deux modèles de tumeurs cérébrales chez le rat

Valable Samuel, Toutain Jérôme, Divoux Didier, Sobrio Franck*, Delamarre Jérôme*, Roussel Simon, Barre Louisa*, Petit Edwige et Bernaudin Myriam.

UMR 6232 CINAPS, équipe CERVOxy, * équipe GDM-TEP, Centre CYCERON, Caen.

valable@cyceron.fr

Introduction : L'hypoxie représente un élément majeur de la croissance des tumeurs cérébrales et notamment des glioblastomes (GBM). En effet, l'hypoxie est à l'origine de la formation de nouveaux vaisseaux ainsi qu'un élément déterminant de la réponse à la radiothérapie et la chimiothérapie. A ce titre, pouvoir évaluer l'hypoxie d'une manière atraumatique permettrait non seulement d'orienter la prise en charge thérapeutique mais aussi le suivi de l'efficacité de thérapies ciblant la vascularisation. L'objectif de notre étude a donc été de mettre en place une approche de suivi de l'hypoxie par tomographie par émission de positons (TEP) sur deux modèles orthotopiques de tumeurs cérébrales et de confronter ces résultats avec des analyses de la vascularisation obtenues par IRM et immunohistochimie.

Méthodes : Les modèles de tumeur C6 et 9L ont été utilisés après implantation des cellules (1.10^5 cellules C6 et 5.10^4 cellules 9L/3 μ l) chez des rats Wistar et Fischer 344. Les IRM ont été réalisées sur un aimant IRM 7 Tesla (Bruker, Pharmascan) pour suivre les tumeurs (T2w, RARE). Des cartes T2* (MGE) ont été calculées avant et après injection de Sinerem® (200 μ mol/kg, Guerbet SA) pour mesurer le Volume Sanguin Cérébral (VSC). L'hypoxie a été étudiée sur un appareil microTEP (Inveon, Siemens) après injection de [18 F]-FMISO ($\approx 600\mu$ Ci/rat). Les tumeurs ont aussi été étudiées par microTEP après injection de [18 F]-FDG ($\approx 600\mu$ Ci/rat). Après euthanasie des rats, les vaisseaux ont été analysés par immunohistochimie après marquage avec un anticorps anti-RECA (Serotec).

Résultats : Bien que les tumeurs C6 et 9L soient bien détectables en IRM ainsi qu'en TEP [18 F]-FDG, nous montrons que seul le modèle C6 présente une forte captation de [18 F]-FMISO. L'étude de la vascularisation par IRM et par immunohistochimie montre que le modèle C6 présente un VSC stable (controlatéral = 4.56 ± 0.65 %; tumeur = 4.62 ± 0.63 %) avec toutefois des vaisseaux moins nombreux mais plus gros, ceci induisant une augmentation importante de la distance entre les vaisseaux. En revanche, le modèle 9L est lui caractérisé par une forte augmentation du VSC (controlatéral = 3.03 ± 0.71 %; tumeur = 7.73 ± 2.39 , $p < 0.05$). Sur le modèle C6, nous avons ensuite analysé le signal hypoxique et montré qu'il est possible de seuiller automatiquement le signal hypoxique pour en extraire un Volume Hypoxique ou encore une mesure de l'hypoxie. De plus, nous avons montré qu'il est possible de recalibrer les données issues de l'IRM avec les images issues de la TEP pour analyser le signal hypoxique directement dans la tumeur.

Conclusions : Nous montrons qu'il est possible d'analyser *in vivo* l'hypoxie sur des modèles orthotopiques de tumeurs cérébrales puisque nos résultats sont en accord avec des résultats obtenus de façon invasive montrant que le modèle C6 est très hypoxique par rapport au 9L (Khan *et al.*, 2010). Sur ces modèles, il est aussi possible d'exploiter le signal hypoxique par lui-même pour en extraire des informations telles que le Volume Hypoxique mais aussi la valeur moyennes ou maximales de l'hypoxie. Il est aussi possible de situer l'hypoxie tumorale à partir d'informations anatomiques ou de vascularisation provenant de l'IRM. Cette étude préliminaire apporte une preuve de concept et nous permet donc désormais d'envisager de tester l'efficacité de molécules thérapeutiques (anti-angiogéniques) et d'assurer un transfert rapide de ces connaissances obtenues en imagerie pré-clinique vers la clinique.

Remerciements : Nous remercions l'INCa et l'Institut Lilly pour leur soutien financier ainsi que la Société Guerbet SA pour la fourniture des agents de contraste.

09

L'hypoxie : un régulateur de l'expression tumorale de la molécule HLA-G

Layale YAGHI, Eduardo DONADI, Gustavo PALOMINO, Isabelle PORAS, Edgardo CAROSELLA, Philippe MOREAU

CEA/Université Paris VII, I2BM, Service de Recherches en Hémato-Immunologie, Hôpital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris

HLA-G est une molécule HLA de classe I non classique jouant un rôle clé dans l'acquisition de la tolérance immunitaire par interaction avec des récepteurs inhibiteurs (ILT-2, ILT-4, KIR2DL4) présents sur les cellules immunocompétentes. Elle est exprimée dans les cytotrophoblastes du placenta ce qui protège le fœtus « semiallogénique » du rejet maternel. En dehors du contexte de la grossesse, son expression tissulaire est très restreinte mais elle est induite dans de nombreuses tumeurs cancéreuses, participant ainsi à l'échappement tumoral. Afin d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation d'expression tumorale de HLA-G nous nous sommes focalisés sur l'hypoxie, microenvironnement commun à ces deux contextes d'expression de la molécule. Nous montrons par qRT-PCR l'activation transcriptionnelle de HLA-G dans des lignées de mélanome M8 et de glioblastome U251MG après traitement à la déferroxamine, au CoCl₂, ou placées en conditions d'hypoxie réelle à 0.3% O₂. Cette induction met en jeu le facteur HIF-1. L'analyse *in silico* du locus de HLA-G a permis d'identifier différents sites HRE (Hypoxia Responsive Elements) de fixation du facteur HIF-1. La fonctionnalité des sites HRE étudiée par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) révèle de très bons candidats à -966pb dans le promoteur, et à +274pb dans l'exon 2. Nous observons également par microarrays de miRNAs réalisés avec les cellules M8 et U251MG que l'expression de miRNAs ciblant HLA-G (et/ou candidats) est modulée en situation d'hypoxie. L'ensemble de ces données suggèrent qu'une situation d'hypoxie au sein d'une tumeur peut favoriser l'émergence de la molécule HLA-G, un rempart contre l'immunité antitumorale.

Urotensin II regulates migration and cell-cell adhesion during glioma development

¹C. Lecointre, ¹F. Morin, ¹M. Jarry, ¹V. Le Joncour, ¹L. Desrues, ¹M-T. Schouft, ^{1,2}O. Langlois, ^{1,2}F. Proust, ^{1,2}V. Compère, ¹P. Gandolfo and ¹H. Castel.

¹Lab DC2N, Inserm U982, IFRMP23, University of Rouen, Normandy, France. ²Neurosurgery, neuroradiology and anesthesiology and critical care Departments, Rouen University Hospital, France.

Urotensin II (UII) is considered as the most potent vasoactive peptide. UII and its receptor UT are highly expressed in cardiac and vascular tissues, and UII has been found to exert a potent vasoconstrictor effect in various species. Although the genes encoding UII and its receptor UT are expressed in central nervous system, little is known regarding the function of the urotensinergic system in the brain. It has been shown that UII stimulates neoangiogenesis from brain microvessels and acts as a chemoattractant stimulating migration of human monocytes and endothelial progenitor cells. We have demonstrated the presence of functional UT in cortical glial cells and mRNA expression of UII and its receptor has been reported in human glioblastoma cell lines. The aim of the present study was to identify the UT-associated pathways involved in the UII-mediated effects in glioma development. By means of Western blot, cytometry and immunohistochemistry, we showed that UT is expressed in both cytosolic and plasma membrane compartments in glioma cell lines and fresh glioma explants. In an astrocytoma cell line, UII did not modify the proliferation rate and the cell cycle. In Boyden chamber, UII exhibited chemoattraction and dose-dependently stimulated cell migration. To investigate the effect of homogenous UII concentrations on collective cell migration, we used the cloning ring assay. We demonstrated by time-lapse video microscopy and cell tracking that, in this system, UII strongly inhibited cell motility of glioma cell lines and UT-expressing HEK293 cells likely reinforcing cell-cell adhesion. This phenomenon is abolished in HEK293 expressing a truncated UT receptor lacking the 332-370 UT cytosolic C-terminal domain. Together, these observations suggest a differential UII-evoked mechanism, *i.e.*, a gradient-induced directional cell migration (low concentration) and an homogenous UII high concentration responsible for cell-cell adhesion. To identify the mechanism of action of UT different couplings on glioma migration, we investigated UT protein partners by using the yeast two-hybrid strategy. Until now, several proteins have been clearly characterized as interacting UT partners, including the Filamin A, a protein known to be involved in cell migration. This work is currently extended through the comprehension of the exact mechanism of UII-mediated effect on migration and cell-cell adhesion *via* interaction with Filamin A in recombinant systems and tumoral glial cells.

EPO and its receptor expressed by glioma cells contribute to brain tumor growth

Elodie PERES¹, Samuel VALABLE¹, Jean-Sébastien GUILLAMO^{1,2}, Jean-François BERNAUDIN³, Simon ROUSSEL¹, Myriam BERNAUDIN¹, Edwige PETIT¹

Equipe CERVOxy "Hypoxie et physiopathologie cérébrovasculaire", UMR 6232 CI-NAPS; Université de Caen Basse-Normandie; Université Paris-Descartes; CNRS; CEA. Centre Cyceron, CAEN, France.

²Département de Neurologie, CHU de Caen, France.

³Service d'Histologie-Biologie Tumorale; Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur EA 3499, Université Paris 6, Hôpital Tenon, Paris, France.

Background. Tumor hypoxia and high HIF protein levels are frequently associated with aggressive disease. Accordingly, in recent years, oxygen sensitive HIF-1 α subunit has been shown to be highly expressed in glioblastoma (GBM), which is known to be the most aggressive types of primary brain tumors in humans. GBM are also characterized by extensive angiogenesis that is also mostly orchestrated by HIF-1 activation which in turn leads to an induction of VEGF (vascular endothelial growth factor) expression¹. More recently, following the discovery of its receptor (EPOR) on numerous cancer cells², including brain tumors, EPO, another key gene regulated by HIF-1 α , has been suspected to play a role in glioma. However, although EPOR expression has been described on glioma cells³, data from the literature remain descriptive and controversial⁴ and to date no clear demonstration of a potential effect of EPO on controlling brain tumor growth has been described. Accordingly, the aim of this study was to explore both *in vitro* and *in vivo* the biological role of each EPO and EPO-R in glioma cells using RNA interference-mediated knock-down of this cytokine and its receptor.

Material and methods. Human U87 glioma cells (ATCC, HTB-14) were genetically modified by RNAi to stably invalidate EPO or EPOR expression after infection with shRNA-lentivirus (Mission RNAi, Sigma-Aldrich) and a clonal selection was performed thereafter. The effects of inhibition of EPO and EPOR expression in these cells were studied *in vitro* on cell proliferation and ERK signaling pathway and *in vivo* on tumor growth by MRI and a survival study after intrastriatal implantation of these cells into nude mice.

Results. The invalidation of EPO expression on U87 human glioma cell line led to a sustained decrease in cell proliferation over time from day 1 to day 3 (at day 3, U87-shEPO: 40% \pm 7% versus U87-scrambled shRNA, $p < 0.05$). Interestingly, the invalidation of EPOR expression also induced a reduction of glioma cells number *in vitro*. Accordingly, a significant decrease in ERK phosphorylation, one of the most signaling pathways known to be activated by the EPO/EPOR system⁵, by around 50% was observed in both EPO and EPOR shRNA cells relative to control and scrambled cells. Moreover, *in vivo*, we observed on day 18 a decrease in tumor volume for the mice bearing U87-shEPOR (30 \pm 19 mm³) as compared to U87-scrambled mice (117 \pm 61 mm³, $p < 0.05$). The same results were found for U251, another human cell line.

Conclusions. Collectively, using inhibition of EPO or EPOR expression on glioma cells, our results support that the endogenous EPO/EPOR loop on tumor cells might be a critical mediator of glioma growth.

1. Jensen, RL. et al. (2006) J. Neurooncol. 78, 233-247

2. Hardee, ME. et al. (2006) Clin Cancer Res. 12, 332-339

3. Mohyeldin, A. et al. (2007) J. Neurosurg. 106, 338-3504

4. Sinclair, AM. et al. (2007) Cancer. 110, 477-488

5. Shi Z, et al. (2010) Mol Cancer Res. 8:615-26.

Supported by a grant from INCa (Institut National du Cancer) and the Institut Lilly.

O12

Etude de l'unité neuro-vasculaire à l'aide de modèles *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique : focus sur les péricytes

Elodie Vandenhoute^{1,2*}, Lucie Dehouck^{1,2}, Marie-Magdeleine Ruchoux^{1,2}, Roméo Cecchelli^{1,2}, Marie-Pierre Dehouck^{1,2}

¹ Univ Lille Nord de France, 59000 Lille, France

² UArtois, Laboratoire de la Barrière Hémato-Encéphalique, EA 2465, IFR114/IMPRT Faculté Jean Perrin, Rue Jean Souvraz – SP 18, 62307 Lens, France

La barrière hémato-encéphalique (BHE), localisée au niveau des capillaires cérébraux, se compose de cellules endothéliales, de péricytes et de pieds astrocytaires. Grâce à ses propriétés, elle est responsable du maintien de l'homéostasie du système nerveux central. Alors que les cellules endothéliales et les astrocytes sont très étudiés dans le cadre de l'étude de la BHE, les péricytes cérébraux commencent seulement à livrer leurs secrets.

La difficulté d'étudier les péricytes réside en particulier dans le fait qu'aucun marqueur spécifique n'a pas été décrit pour ce type cellulaire. Pour mieux les caractériser, nous nous sommes d'abord attachés à étudier les propriétés de ces cellules *in vitro*. Une comparaison avec des cellules phénotypiquement proches d'elles - les cellules musculaires lisses - a révélé des différences en terme d'expression de la P-glycoprotéine et d'activité de la α -Glutamyltranspeptidase.

Afin d'étudier le rôle des péricytes au sein de la BHE, ils ont été intégrés au modèle *in vitro* de BHE originel selon différentes configurations. Dans ces modèles de triculture, la faible perméabilité et l'expression de transporteurs spécifiques de la BHE sont retrouvées. Des études en microscopie électronique, en RT-PCR et en Western blot ont permis et permettront de comparer leurs caractéristiques à celle du modèle de coculture de base.

Ces modèles s'avèrent utiles pour comprendre les mécanismes cellulaires mis en jeu au sein de l'unité neuro-vasculaire, dont fait partie la BHE. Ces modèles seront utilisés dans le cadre d'études en conditions pathologiques (en particulier en ischémie), afin de comprendre le rôle des péricytes dans la réponse de la BHE dans ces conditions.

O13

Reduction of the long-term consequences of traumatic axonal injury by minocycline following closed head injury in mice: the potential neuroprotective role of sAPP α

Eleni Siopi, Angelo H Cho, Shadi Homsy, Nicole Croci, Michel Plotkine, Catherine Marchand-Leroux, Mehrnaz Jafarian-Tehrani

EA4475 Pharmacologie de la circulation cérébrale,
Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, 4 av de l'Observatoire, 75006 Paris
mehrnaz.jafarian@parisdescartes.fr

Traumatic axonal injury (TAI) is a detrimental consequence of traumatic brain injury (TBI) that refers to extensive lesions in white matter tracts and for which no treatment is available. It has been recently reported that an endogenous neuroprotector, the soluble form α of the amyloid precursor protein (sAPP α) is able to reduce TAI. However, the emergent post-traumatic neuroinflammatory environment compromises sAPP α production and may promote TAI development and subsequent white matter atrophy. Hence, the aim of this study was to examine the effects of an anti-inflammatory drug, minocycline, on post-TBI sAPP α production as well as on the long-term TAI consequences. The mouse model of TBI by mechanical percussion was applied on anesthetized Swiss mice, as previously described^{1,2}. The treatment protocol included three injections of minocycline (i.p.) at 5 min (90 mg/kg), 3h and 9h (45 mg/kg) post-TBI^{1,2}. The ELISA method was used to measure sAPP α production, the cresyl violet method was used to evaluate the TAI-induced atrophies and immunohistochemistry of GFAP and CD11b was applied to measure glial scar formation. Our results revealed a post-TBI sAPP α decrease that was significantly attenuated by minocycline. Additionally, our results at 3 months post-TBI, demonstrated the existence of corpus callosum atrophy, striatal atrophy and ventriculomegaly, accompanied by the presence of a glial scar. All the above consequences were significantly reduced by minocycline. In conclusion, inhibition of the acute phase of post-TBI neuroinflammation by minocycline allowed the sparing of sAPP α and protected the white matter tracts in the long term, emphasizing the potential role of minocycline as a promising neuroprotective treatment in TBI³, and highlighting sAPP α as a therapeutic target.

(1) Homsy et al. Brain Res. 2009; 1291:122-132

(2) Homsy et al., J Neurotrauma 2010; 27:911-921

(3) www.clinicaltrials.gov clinical trial with minocycline in head injured patients (USA, février 2010)

O14

NANOPARTICLES FOR ALZHEIMER'S DISEASE

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive loss of cognitive functions and specific pathological changes in the brain: the formation of extracellular β -amyloid ($A\beta$) peptide aggregates and tangle of hyperphosphorylated τ protein inside neurons.

Especially $A\beta$ peptide aggregates are widely considered the main cause of neuronal cells degeneration. Despite all scientific efforts, at the moment, effective pharmacotherapeutic options for prevention and treatment of dementia are lacking. One of the highest borderline toward the development of an effective drug is represented by the Blood-Brain Barrier (BBB) that strongly decreases the molecules brain reaching. A possible solution could come from PEGylated Poly-Hexadecylcyanoacrylate (p(HDCA-co-PEGCA)) nanoparticles, developed in our laboratories, that have shown *in vivo* great result of stability in bloodstream and good ability to join the CNS.¹⁻²

AIM: The aims of the project are to prepare functionalized p(HDCA-co-PEGCA) NPs and to study their ability to link the $A\beta$ peptide₁₋₄₂ influencing its aggregation kinetic.

EXPERIMENTAL: The interaction between the NPs and the $A\beta_{1-42}$ is studied by Capillary Electrophoresis (CE) coupled with LIF detector, Surface Plasmon Resonance (SPR) (in collaboration with Mario Negri Institute, Milano) and Thioflavin spectroscopy (ThT) (in collaboration with Neurogenetics Laboratory, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands).

RESULTS: A Capillary Electrophoresis method has been applied for the first time to study the interaction of the nanoparticles with $A\beta_{1-42}$ up to physiological concentrations. The experiments showed that the kinetic of interaction is concentration dependent and allow us to calculate an affinity constant value.³ Moreover these nanoparticles seem to inhibit the oligomers formation allowing us to hypothesize an influence/retardation on the aggregation kinetic. Preliminary and unexpected results were obtained employing Selegiline functionalized nanoparticles.⁴

FUTURE PERSPECTIVES: The future experiments are oriented toward the evaluation of 3rd generation NPs, developed by our laboratory, purpose-made to capture the peptide and inhibit its aggregation.

REFERENCES:

- (1) Calvo, P.; Gouritin, B.; Chacun, H.; Desmaele, D.; D'Angelo, J.; Noel, J. P.; Georgin, D.; Fattal, E.; Andreux, J. P.; Couvreur, P. *Pharm Res* **2001**, *18*, 1157.
- (2) Brigger, I.; Morizet, J.; Aubert, G.; Chacun, H.; Terrier-Lacombe, M. J.; Couvreur, P.; Vassal, G. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, *303*, 928.
- (3) Brambilla, D.; Verpillot, R.; Taverna, M.; De Kimpe, L.; Le Droumaguet, B.; Nicolas, J.; Mantegazza, F.; Canovi, M.; Gobbi, M.; Salmona, M.; Nicolas, V.; Scheper, W.; Couvreur, P.; Andrieux, K. *Anal. Chem.* **2010**, *submitted*.
- (4) Le Droumaguet, B.; Souguir, H.; Brambilla, D.; Verpillot, R.; Nicolas, J.; Taverna, M.; Couvreur, P.; Andrieux, K. *International Journal of Pharmaceutics* **2010**, *Submitted*.

P1

Caractérisation d'un modèle d'ischémie cérébrale globale transitoire induit par asphyxie chez le rat :

Etude de la mort neuronale retardée.

Lemarchand E^{1,2*}, Chazalviel L^{2*}, Montagne A^{1,2}, Halloween B³, Massetti M.^{1,2}, Vivien D¹
et Maubert E^{1,2}.

(*) : co-premier auteur (1) INSERM U 919, serine proteases et physiopathologie de l'unité neurovasculaire ; (2) UMR 6232 CNRS/CEA/UCBN/Univ.Paris V, "CI-NAPS" Centre for Imaging-Neuroscience and Applications to Pathologies, GIP Cycleron / Université de Caen Bd Henri Becquerel, 14074 Caen, France. (3) CURB, Université de Caen Bd Henri Becquerel, 14074 Caen, France.

Dans nos sociétés industrialisées, la multiplication de défibrillateurs facilement accessibles permet de lutter efficacement contre les arrêts cardiaques et d'augmenter le nombre de patients « ressuscités ». Une proportion non négligeable de ces patients présente des déficits neurologiques dont la gravité dépend de la durée de l'ischémie cérébrale globale (ICG). Une ICG de courte durée induit une mort neuronale caractéristique, dénommée mort neuronale retardée (MNR), qui touche les neurones hippocampiques de la région CA1. Ces neurones sont reconnus comme les plus vulnérables à ce type d'ischémie.

La compréhension de cette vulnérabilité et des mécanismes neurophysiologiques et moléculaires impliqués sont des préoccupations fondamentales pour espérer comprendre et « combattre » efficacement la MNR. Dans cette optique, nous avons introduit, avec un paramétrage rigoureux, et caractérisé un modèle d'ICG étonnamment peu utilisé dans la littérature.

A l'aide de critères d'exclusion strictes prenant en considération la T° corporelle, l'électrocardiogramme, la mesure de la pression artérielle, la durée d'ischémie et le temps de ressuscitation ce modèle présente l'avantage d'affecter l'ensemble du corps, d'être peu invasif et reproductible. Les caractérisations histologiques réalisées, entre 24 h et 7 jours après ICG, à l'aide de colorations signalétiques, de différents marqueurs cellulaires (NeuN, MAP 2, GFAP, Iba1,...), de marqueurs de dégénérescence neuronale (Fluoro Jade C), de marqueurs d'altération neuronale (caspase 3 activée, survivine, Bcl2, LC3B,...) confirment et illustrent que la MNR hippocampique diffère singulièrement des processus de morts neuronales classiquement étudiés dans le cadre de l'ischémie focale corticale. Par ailleurs, l'étude biochimique de l'activité de différentes caspases (1,2,3,8) suggère une forte implication de la caspase 8 dans le processus de MNR. L'ensemble de nos observations est en faveur du fait que la vulnérabilité des neurones de la région CA1 dépend de l'existence d'une unité neurovasculaire spécifique pour ces neurones.

P2

Identification de nouveaux agents de contraste pour la détection par IRM à haut champ de biomarqueurs dans l'ischémie cérébrale.

Fréchou M.,^a Beray-Berthaut V.,^a Louin G.,^b Raynaud J-S.,^b Mériaux S.,^c Plotkine M.,^a Marchand-Leroux C.,^a Lancelot E.,^b Margaill I.^a

^aPharmacologie de la Circulation Cérébrale EA 44 75, Université Paris Descartes 75006 Paris - FRANCE.

^bUnité de Recherche Biologique - Division Recherche, Guerbet 95943 Roissy CDG - FRANCE.

^cDirection des Sciences du Vivant, CEA - NeuroSpin 91400 Saclay - FRANCE

INTRODUCTION

L'ischémie cérébrale est une pathologie multifactorielle pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement. L'inflammation joue un rôle important dans l'évolution de la lésion et des biomarqueurs de ce processus permettraient d'adapter les stratégies thérapeutiques. Des agents de contraste spécifiques nanoparticulaires, USPIO (ultrasmall particle of iron oxide), ont été développés pour imager des composants de la réponse inflammatoire tels que VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) au niveau cérébral. L'objectif de cette étude est de déterminer le potentiel de ces USPIO en IRM dans un modèle d'ischémie cérébrale.

MATERIELS ET METHODES

L'ischémie cérébrale, réalisée chez des souris mâles Swiss, consiste en une occlusion d'une heure de l'artère cérébrale moyenne (ACM) gauche. L'expression de VCAM-1 a été étudiée par immunohistochimie 6, 24 et 72h après l'ischémie (n=4-5 selon les temps). Des animaux ischémiés ont reçu une injection d'USPIO qui cible VCAM-1 (100µmol de fer/kg) par voie intraveineuse 5h après l'ischémie et imagés 6h (n=6) et 24h (n=6) après l'ischémie. Des animaux témoins ischémiés, n'ayant pas reçu d'USPIO, ont été imagés 6h (n=6) et 24h (n=5) après l'ischémie. Après la dernière séance d'IRM, les animaux ont été euthanasiés et leurs cerveaux prélevés afin de rechercher d'une part l'expression de VCAM-1 par immunohistochimie et d'autre part la présence de particules de fer (correspondant à l'USPIO) par la méthode de Perls.

RESULTATS

L'expression cérébrale de VCAM-1 est maximale 24h après l'ischémie dans les deux hémisphères au niveau du cortex et du striatum. Les images IRM d'animaux ischémiés ayant reçu l'USPIO qui cible VCAM-1 montrent à 6h et 24h après l'ischémie des zones d'hypointensités correspondant à la présence de l'USPIO. L'analyse histologique post-mortem des cerveaux montre la co-localisation de l'USPIO et de sa cible VCAM-1. Les animaux ischémiés n'ayant pas reçu d'USPIO ne présentent pas d'hyposignaux en IRM (image homogène dans tout le cerveau) à 6h comme à 24h. Chez ces animaux, seule la présence de VCAM-1 est détectée en histochimie.

CONCLUSION.

Nos résultats montrent que le ciblage de biomarqueurs d'intérêt dans l'ischémie cérébrale est réalisable par des USPIO et pourrait permettre de personnaliser les stratégies thérapeutiques pour chaque patient.

P3

DTI-MRI reveals chronic alterations in white matter despite the absence of a visible ischemic lesion on conventional MRI: a non-human primate study

Ebeline Bihel, Simon Roussel, Jérôme Toutain, Myriam Bernaudin, and Omar Touzani, *CERVOxy team, Hypoxia and Cerebrovascular Pathophysiology, CI-NAPS UMR-6232, CNRS, CEA, Université de Caen Basse-Normandie, Université Paris Descartes. France*

The impact of stroke on white matter is poorly described in preclinical investigations mainly based on rodents in which the white to gray matter ratio is low. With diffusion tensor imaging (DTI), we have evaluated white matter alterations and sensorimotor deficits following focal cerebral ischemia in the marmoset, a non human primate that displays a white to gray matter ratio closer to that of man. Eight marmosets underwent transient occlusion (3 hours) of the middle cerebral artery (MCAO). Serial magnetic resonance imaging (MRI) examinations were made 30min, 60min, 120min and 180min of MCAO and 5min, 30min, 8 days and 45 days after reperfusion.

To assess WM alterations, the standard deviation of the angle of the first eigenvector projection was calculated in the temporal cortex, and in the internal and external capsules. The fiber tracking approach was used to measure the number and the length of fibers. Based on battery of behavioural tests, the sensorimotor functions were evaluated weekly over 45 days. The analysis of the evolution of apparent diffusion coefficient (ADC) and the fractional anisotropy (FA) showed a similitude of the temporal evolution of the brain lesion in the model of transient ischemia in the marmoset to the known evolution in stroke patients. Despite an absence of visible lesions on T2-weighted imaging and diffusion-weighted imaging at the chronic stage (45 days post-MCAO), DTI evidenced alterations in white matter by the increase in the standard deviation of the angle of the first eigenvector projection (22.2 ± 4.3 ; 23.1 ± 4.6 ; 50.8 ± 9.4 , and 9.0 ± 0.9 ; 11.2 ± 1.5 ; 6.9 ± 0.8 respectively for ipsi- and contralateral temporal cortices, internal and external capsules) and the decrease in the number of bundles of fibers tracked (numbers of bundles $< 20\text{mm} = 21\pm 6$ and 46 ± 11 respectively for ipsi- and contralateral internal capsules; 53 ± 11 and 104 ± 12 for ipsi- and contralateral external capsules). These alterations of bundles orientation were confirmed by Luxol Fast Blue staining. Of interest, the disorganization of white matter was strongly correlated with the chronic contralateral sensorimotor deficits. This study demonstrates that despite an absence of visible ischemic lesion at the chronic stage, DTI-MRI was able to reveal disorganization of white matter which probably underlies the persistence of functional deficits. The data strongly support the importance of the inclusion of white matter analyses as ancillary investigations not only in stroke patients but also in animal models of ischemic brain damage.

P4

Interest of the association of mesenchymal stem cells with pharmacologically active microcarriers for the treatment of cerebral ischemia: a preliminary pre-clinical study in a rat transient cerebral ischemia model.

Emmanuelle Tixier* (1), Fabien Fillesoye* (1), Jean-Pierre Karam (2) Jérôme Toutain (1), Didier Divoux (1), Simon Roussel (1), Claudia Montero-Menei (2) and Myriam Bernaudin (1)
(1) CERVOxy team, UMR CI-NAPS 6232, CYCERON Center, Bd Henri Becquerel, 14 074 CAEN cedex, FRANCE
(2) INSERM U 646 ; Université d'Angers, 10 rue André Boquel, 49100 Angers, FRANCE

* These Authors equally contributed to this work

To date, no effective therapy is available to treat brain neurological disorders consecutive to stroke. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells (MSC) has shown promising results in human, but growing evidences suggest that MSC need to be implanted with a carrier to improve their survival and their differentiation abilities. Therefore, the aim of this study was to associate MSC with Pharmacologically Active Microcarriers (PAMs), a cellular biomimetic support capable of delivering trophic molecules, and evaluate their effect when administrated into the ischemic lesion 24 hours after cerebral ischemia in rats.

Twenty-four hours after a transient focal cerebral ischemia, animals received rat MSC, with or without laminine-coated PAMs, into the striatum. Adhesion of MSC on PAMs was previously performed and verified *in vitro*. To identify MSC within the rat cerebral tissue, cells were labelled with BrdU prior to administration. The lesion volume was determined using MRI analysis at 2 and 22 days after surgery. Immediately after the second MRI exam, animals were euthanatized to perform immunohistochemical studies.

MRI analysis revealed that association of MSC with PAMs significantly reduced the lesion volume in the striatum compared to control ($37.59 \pm 5.12 \text{ mm}^3$ vs. $61.82 \pm 6.55 \text{ mm}^3$, $p < 0.05$, HSD Tukey's test). In addition, the percentage of BrdU-labelled MSC in the striatum expressing the NeuN neuronal marker was significantly greater in the MSC/PAM-treated group compared to that observed in the MSC-treated group ($10.31 \pm 1.62\%$, $p < 0.05$, Student's test).

This preliminary study suggests that association of MSC with PAMs may be an interesting regenerative strategy for the treatment of cerebral ischemia.

P5

Effect of cyclooxygenase type 2 inhibition in traumatic brain injury and cerebral ischemia in mice

H Girgis ¹; D Lerouet ² ; M Lechaftois; I Popescu; B Palmier; N Croci; B Coqueran; M Plotkine; I Margail; C Marchand-Leroux

¹ and ² contribute equally

Introduction: The role of cyclo-oxygenase type 2 (COX2) in acute cerebral injuries is still controversial. COX2 inhibition is neuroprotective or has no effect in experimental models of traumatic brain injury (TBI) ^[1, 2, 3] and cerebral ischemia (CI) ^[4, 5, 6, 7]. Therefore, we investigated the role of COX2 in deleterious consequences of both TBI and CI.

Methods: Both models were realized in anaesthetized male Swiss mice. Closed head injury was performed by weight drop ^[8] and ischemia was induced by intravascular occlusion of the left middle cerebral artery for 1h ^[9].

For the time-course studies, COX2 protein expression was evaluated by Western Blot and brain prostaglandin E2 (PGE2) production was measured by Radioimmunoassay.

Nimesulide at 12 mg/kg was administered intraperitoneally 30 minutes, 3, 6 and 9h after TBI or just after the onset of ischemia, then 4 and 8h later, protocols which have been shown to inhibit COX2 ^[4, 5, 6].

After TBI, neurological deficit was evaluated by string and grip tests and cerebral oedema by the determination of brain water content. Infarct volume was assessed by triphenyltetrazolium chloride technique 24h after CI.

Results: Despite its COX2 induction 6 and 12h after injury, TBI had no impact on PGE2 production. On the other hand, CI induced an increase of COX2 protein expression 6 and 24h after reperfusion associated with an increase in PGE2 production. However, treatment with nimesulide had no effect either on neurological deficit or on cerebral oedema 6 and 24h after TBI. In addition, it did not modify the infarct volume 24h after CI.

Conclusion: These results show that COX2 induction with or without PGE2 production may not play a crucial role in our murine models of TBI and CI. Thus COX2 inhibition might not be a relevant strategy in every model of acute cerebral injury.

1) Cernak et al. Exp Brain Res. 2002; 147: 193-199.

2) Gopez et al. Neurosurgery. 2005; 56: 590-604.

3) Ahmad et al. J Neurosci Res. 2008; 86: 3605-3612.

4) Candelario-Jalil et al. Eur J Pharmacol. 2002; 453: 189-195.

5) Candelario-Jalil et al. J Neuroinflammation. 2005; 2: 3.

6) Candelario-Jalil et al. J Neurochem 2007; 100: 1108-1120.

7) Hara et al. Neurosci Lett. 1998; 256: 53-56.

8) Hellal et al. J Neurotrauma. 2003; 20: 841-851.

9) Haddad et al. Br J Pharmacol. 2006; 149: 23-30.

P6

LES AGONISTES DES RECEPTEURS 5-HT₄ DANS LE TRAITEMENT DE LA MALADIE D'ALZHEIMER

Cédric Lecoutey, David Genest, Christophe Rochais, Sabrina Butt-Gueulle, Patrick Dallemagne, Emmanuelle Dubost, Thomas Cailly, Frédéric Fabis, Alban Lepailleur, Jana Sopkova de Oliveira Santos, Ronan Bureau, Sylvain Rault

Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN)
UPRES EA-4258, FR CNRS INC3M, Université de Caen – Basse-Normandie
UFR des Sciences Pharmaceutiques, Boulevard Becquerel, 14032 Caen Cedex, FRANCE

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative chronique et évolutive. Les traitements actuels visent essentiellement la restauration de la transmission cholinergique, *via* l'inhibition réversible de l'acétylcholinestérase (AChE), ce qui n'a pour l'heure que des effets symptomatiques modérés.

Par ailleurs, il a été prouvé que l'activation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT₄ par des agonistes permet la promotion d'une protéine neuroprotectrice, sAPP α , formée au détriment de la protéine β -amyloïde dont l'agrégation est à l'origine des plaques séniles jouant un rôle important dans la pathogenèse de la MA. Cela se manifeste *in vivo* par une amélioration des fonctions cognitives et mnésiques (Meneses *et al.*).

Le présent programme vise donc en premier lieu à mettre au point, sur le modèle d'un pharmacophore défini au laboratoire, de nouveaux agonistes puissants vis-à-vis de ces récepteurs 5-HT₄.

Dans un second volet et sur la base d'une étude qui a démontré l'intérêt synergique lié à l'administration simultanée d'inhibiteurs de l'AChE et d'agonistes des récepteurs 5-HT₄ (Lamirault *et al.*), le programme vise également à la mise au point de molécules à dualité d'action agoniste 5HT₄/ inhibitrice AChE. L'accès à ces "Multi-Target Directed Ligands" (MTDL) (Cavalli *et al.*), pourrait permettre de développer en même temps une approche curative et symptomatique de la maladie et donc d'améliorer d'autant plus l'efficacité thérapeutique potentielle.

Les premiers résultats portant sur les deux volets du programme sont particulièrement encourageants.

Références :

- Cavalli A *et al.* (2008), *Journal of Medicinal Chemistry*, 51, 347 – 372.
Lamirault L *et al.* (2003), *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 27, 185 – 195.
Lemaître S *et al.* (2009), *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17, 2607 – 2622.
Meneses A *et al.* (1997), *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 56, 347 – 351.
Omran Z *et al.* (2005), *European Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 1222-1245.

P7

Etude pluridisciplinaire d'inhibiteurs de la NO Synthase neuronale présentant un intérêt potentiel dans le traitement de la maladie d'Alzheimer et la prévention des dommages cérébraux liés à l'ischémie

Elodie LOHOU,^(a) Valérie COLLOT,^(a) Michel BOULOUARD,^(b) Pascale SCHUMANN-BARD^(b) Jana SOPKOVA-DE OLIVEIRA SANTOS,^(a) Silvia STIEBING^(a) et Sylvain RAULT^(a)

^(a) Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN), UPRES EA-4258, FR CNRS INC3M, Université de Caen Basse-Normandie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Boulevard Becquerel - 14032 Caen Cedex

^(b) Groupe Mémoire et Plasticité comportementale (GMPC), UPRES EA-4259, Université de Caen Basse-Normandie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, 5 rue Vaubénard - 14032 Caen Cedex
valerie.collot@unicaen.fr

Le monoxyde d'azote (NO) apparaît surtout comme un neurotransmetteur essentiel à l'origine notamment de la transmission de la douleur, de la régulation des fonctions glutamatergiques, mais aussi du processus de mémorisation. Il est synthétisé à partir de la L-arginine par trois isoformes de NO Synthase (NOS) présentes dans des types cellulaires très variés. Ainsi, le développement d'inhibiteurs sélectifs de la NOS neuronale (nNOS) pourrait présenter un intérêt nouveau dans le traitement des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (cytotoxicité radicalaire en cas de production excessive de NO) ou dans la prévention des dommages cérébraux liés à l'ischémie dans le cadre des AVC (Accidents Vasculaires Cérébraux) (exacerbation de l'excitotoxicité glutamatergique liée à un excès de NO).

Dans ce contexte, sachant que le 7-Nitro-Indazole (7-NI) apparaît comme l'un des chefs de file les plus prometteurs de ces inhibiteurs⁽¹⁾, nous avons cherché à développer une **nouvelle chimiothèque de dérivés de l'indazole** afin de mieux apprécier leurs relations structure/activité en tant qu'inhibiteurs de la nNOS^{(2), (3)}. Une étude pluri-disciplinaire vise maintenant à élucider leur mode de fixation dans le site actif de l'enzyme.

⁽¹⁾ Babbedge *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, **1993**, *110*, 225. ⁽²⁾ Schumann *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, *11*, 1153.

⁽³⁾ Boulouard *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 3177.

P8

CARACTERISATION ULTRASTRUCTURALE DES PAROIS VASCULAIRES DANS LES MALADIES DES PETITES ARTERES CEREBRALES

C. Debout¹, M. Coquemont¹, D. Goux², B. Courteille¹, M.M. Amador³, E. Tournier-Lasserre³, F. Chapon^{1,4,5}

Introduction : les maladies des petites artères cérébrales sont responsables de 20% des accidents vasculaires cérébraux (AVC). Plusieurs formes héréditaires ont été individualisées sur la base de leurs caractéristiques clinico-radiologiques et moléculaires :

- le CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leucoencephalopathy) à transmission autosomique dominante est lié à des mutations connues du gène Notch 3, toutes impliquant un résidu cystéine.

- D'autres formes présentent des mutations sur ce même gène différentes de celles caractérisant le CADASIL (mutation codon-stop ou mutation « non -cystéine », n'impliquant pas le résidu cystéine).

L'expression clinique de ces maladies est limitée au SNC mais dans le CADASIL l'altération morphologique des parois vasculaires [avec présence de matériel granulaire osmiophile pathognomonique (GOM)] est systémique, ce qui permet l'étude des vaisseaux sur biopsies cutanées.

Objectifs : comparer la structure des parois des vaisseaux cutanés dans des cas de CADASIL et des cas non CADASIL

Matériel et Méthode : Les biopsies cutanées proviennent de patients pour lesquels une analyse génétique a été réalisée au Centre de Référence des maladies vasculaires rares du cerveau (CERVCO). Les biopsies sont traitées pour étude en microscopie électronique à transmission. Nous avons analysé 5 patients porteurs d'une mutation codon-stop, 16 patients porteurs d'une mutation « non-cystéine », 3 patients porteurs de mutations typiques de CADASIL qui font fonction de témoins positifs (présence de GOM) et enfin 2 cohortes de patients ne présentant pas de maladie liée aux petites artères cérébrales utilisés comme témoins négatifs.

Résultats : Un seul de nos patients présente des GOM typiques dans la cohorte des variants non-cystéine. Les autres anomalies sont des épaississements des lames basales accompagnées de dégradation de la lame élastique et une altération des cellules musculaires, que nous comparerons à l'aspect ultrastructural des vaisseaux de nos patients témoins. Il n'a pas été trouvé de GOM chez les patients porteurs d'une mutation codon-stop.

1 : Laboratoire d'Histologie, UFR de Médecine, CHU, Caen

2 : CMABio, IFR146, ICORE, UCBN, Caen

3 : CERVCO, INSERM UMR-S-740, Hôpital Lariboisière, Paris

4 : Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU, Caen

5 : INSERM ERI27 - UCBN EA 3917 - CHU, Caen

P9

Réponses de la barrière hémato-encéphalique à l'ischémie/reperfusion : modélisation *in vitro*.

Auteurs: Mélanie Kuntz^a, Alejandra Rodriguez Celin^{a,b}, Roméo Cecchelli^a, Vincent Berezowski^a
a Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato Encéphalique, Université d'Artois, EA 2465 –
IMPRT-IFR 114,

Faculté Jean Perrin, Rue Jean Souvraz, SP 18 62307 Lens, France *b* Interdisciplinary Group in Theoretical
Biology, Department of Biostructural Sciences, Favaloro University, 1078, Buenos Aires, Argentina

L'hyperperméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) au cours d'une ischémie cérébrale est un évènement critique de cette pathologie. Pourtant bien décrite de la communauté scientifique, l'origine et la chronologie de cette atteinte vasculaire demeurent approximatives et confrontent encore aujourd'hui les données expérimentales et les observations cliniques. Une approche *in vitro* de l'ischémie /reperfusion (IR) a été entreprise afin d'observer, dans ces conditions, les communications intercellulaires et la réponse endothéliale en termes de perméabilité. Deux méthodes de privation en oxygène et en glucose (OGD) caractérisées par leur différence de « sévérité », ont été testées sur un modèle *in vitro* de BHE. Ce dernier consiste en une co-culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf et de cellules gliales issues du cortex de rats nouveau-nés. Après une augmentation de la perméabilité suite à l'OGD, la première méthode permet une récupération des fonctions de barrière endothéliale lors de la ré-oxygénation. En revanche, l'ouverture de la BHE persiste avec la seconde méthode d'OGD. Ces résultats suggèrent que deux réponses endothéliales à l'IR pourraient être attribuées à des différences de sévérité d'ischémie (modélisée *in vitro* par une différence de privation en oxygène). A l'aide de ces modèles pathologiques, l'étude des mécanismes d'ouverture est en cours pour apporter une meilleure compréhension des phénomènes microvasculaires à l'origine de l'œdème cérébral *in vivo*. Les effets d'agents pharmacologiques sur ces mécanismes pourraient être évalués dans le but d'identifier les protecteurs potentiels.

P10

In vitro study of cellular intercommunications in the developing neurovascular unit: focus on angiopoietins and VEGF systems under hypoxia

Alejandra Rodriguez Celin^{a,b}, Mélanie Kuntz^a, Lucie Dehouck^a, Roméo Cecchelli^a, Vincent Berezowski^a

^a Laboratoire de Physiopathologie de la Barrière Hémato Encéphalique, Université d'Artois, EA 2465 IMPRT-IFR 114, Faculté Jean Perrin, Rue Jean Souvraz, SP 18 62307 Lens, France

^b Interdisciplinary Group in Theoretical Biology, Department of Biostructural Sciences, Favaloro University, 1078, Buenos Aires, Argentina

ABSTRACT

Few therapeutical options exist in the treatment of neurodegenerative diseases because of lack of knowledge of the neurovascular unit (NVU) (Endres et al, 2008) not only in adults but also in embryos. Literature reports increasing interest in cellular intercommunication in this field (Culot et al, 2008). In vitro strategies need to be described and characterized in order to represent valuable tools to investigate such mechanisms. Working with the developing chick optic tectum (OT), we aim to carry out a co-culture of the complete tissue and a culture of the vascular compartment in order to describe and quantify the modifications suffered by the different cell types during hypoxia. Preliminary studies allow us to estimate the population of several cell types in a complete culture after 15 days of incubation by immunoassays. We have found a majority of neurons (53%), followed by 22% of glial cells. There were also 9% of pericytes and smooth muscle cells (CML), 7% of oligodendrocytes, 6% of endothelial cells and 2% of microglial cells and macrophages. As no data about the proportions of these different cell types have yet been reported in the embryo at this stage, a further characterization needs to be done in order to better understand future results regarding the stimulation received by the vascular compartment in this NVU environment. A preliminary experiment applying a hypoxic stress on OT cultures revealed a typical regulation of angiopoietins and VEGF systems transcriptional expression when the vascular extract was cultivated alone. Instead, when the vascular extract was co-cultivated with the complete extract, an up-regulation of Angiopoietin-1 was observed, suggesting the involvement of neuroglial tissue in the modulation of vascular expression of the angiopoietins and VEGF systems. Our results could advantageously help to analyze the signaling networks involved in regulating the cortico-angiogenesis under hypoxia.

P11

Cell-autonomous and non-cell-autonomous neuroprotective effects of the nuclear receptor RORalpha during cerebral hypoxia in cortical neurons and astrocytes.

S. JOLLY¹, N. JOURNIAC¹, F. NAUDET¹, O. CASES², V. GAUTHERON¹, J. MARIANI^{1,3}, B. VERNET-DER GARABEDIAN¹;

¹Lab. NPA, CNRS UPMC, Paris, France; ²Inst. de la vision, Dept. of Neural development, Paris, France; ³Hôpital Charles Foix, 94205 Ivry-Sur-Seine, France

The brain is the main consumer of energy and therefore is particularly sensitive to variations in oxygen level. Hypoxia, i.e. a deficiency in available oxygen, can cause severe brain damage and especially leads to neuronal death. Although astrocytes are intimately involved in the neuronal response to hypoxia, their roles during hypoxia are only beginning to be delineated. We are interested in hypoxia-induced molecular mechanisms within astrocytes that influence neuronal death and damage. Previous experiments demonstrated that RORalpha, a transcription factor which belongs to the nuclear receptor family, is regulated by hypoxia and has neuroprotective properties. Moreover, we recently demonstrated that RORalpha is expressed in astrocytes in addition to its neuronal expression. Together, this raises the question whether neuronal and astrocytic RORalpha could be implicated in neuroprotective mechanisms during hypoxia in the central nervous system.

To investigate the function of RORalpha in neurons and astrocytes after hypoxia, we have developed an in vitro approach with RORalpha-deficient cortical cultures and cocultures of neurons and astrocytes. First we showed that RORalpha is a target of hypoxia because it is transcriptionally activated in neurons and astrocytes after hypoxia. Then, we demonstrated that neuronal RORalpha has a neuroprotective function during hypoxia. Moreover, its neuroprotective function is not restricted to neurons as loss of RORalpha in astrocytes increases neuronal susceptibility to hypoxia-induced death. Therefore, RORalpha is neuroprotective at least partly in a non cell autonomous manner. Finally, we looked at the molecular mechanism responsible for the non-cell autonomous function of RORalpha. Several experiments suggest that HIF-1alpha, a key transcription factor induced by hypoxia, is the factor responsible for this neuroprotective function. Currently, we are investigating the function of RORalpha in the cellular response to hypoxia in vivo. We are analysing Rora-LoxP mice crossed with either FoxG1-Cre or Glast-CreERT2 mice to study the function of RORalpha after hypoxia in, respectively, neurons and astrocytes. Together these results demonstrate that RORalpha is a key molecular player during cerebral hypoxia and that its contribution to the hypoxic response not only implies cortical neurons but also astrocytes.

P12

Angiopoietin-2 plays a key role in the embryonic neurovascular niche

Léna Marteau¹, Emilie Pacary², Samuel Valable¹, Myriam Bernaudin¹, François Guillemot² and Edwige Petit¹

1 CERVOxy team « Hypoxia and cerebrovascular pathophysiology », UMR 6232 CI-NAPS; Université de Caen Basse-Normandie; Université Paris-Descartes; CNRS; CEA. Centre Cyceron, Caen, France.

2 National Institute for Medical Research, Division of Molecular Neurobiology, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom.

Background. Neurovascular niches have been well described in the adult neurogenic zones but it is still an emerging concept during embryonic neurogenesis^{1,2}. These niches provide a microenvironment for progenitors in which hypoxia plays a crucial role. Hypoxia, in part via HIF-1 activation, induces the expression of several regulators of angiogenesis and neurogenesis including the main angiogenic growth factor *vascular endothelial growth factor* (VEGF) but also another vascular specific growth factor, angiopoietin-2 (Ang2)³. Recently, Ang2 was suggested to play a role in adult neurogenesis, affecting migration and differentiation of adult neuroblasts *in vitro*⁴. However, to date, no data has reported an effect of Ang2 on neurogenesis during embryonic development. Accordingly, the present study assess the role of Ang2 in embryonic cortical neurogenesis.

Results. We first showed *in vitro* that Ang2 is expressed by embryonic cortical neural stem cells and is regulated by hypoxia. This result was confirmed *in vivo* as we observed that Ang2 and its receptors (Tie2 and β 1 integrin) are expressed in the developing cerebral cortex at embryonic day E14.5 and E16.5. Based on these observations, we used *in utero* electroporation to knock down Ang2 expression in neuronal progenitors located in the cortical ventricular zone to examine the role of Ang2 in cortical embryonic neurogenesis. Using this strategy, we showed that radial migration from the ventricular zone toward the cortical plate of Ang2 knocked down neurons is altered as well as their morphology. In parallel, we observed a perturbation of intermediate progenitor population concomitant with an alteration of the surrounding vasculature.

Conclusions. Taken together, our results show for the first time that, in addition to its role during brain vasculature setup, Ang2 is also involved in embryonic cortical neurogenesis and plays a key role in the neurovascular niche.

¹Stubbs *et al.* 2009, Cereb Cortex. 19 Suppl 1: i32-41.

²Javaherian *et al.* 2009, Cereb Cortex. 19 Suppl 1: i70-7.

³Simon *et al.* 2008, J Cell Physiol. 217(3):809-18.

⁴Liu *et al.* 2009, J Biol Chem. 284 (34): 22680-22689.

This work was partly supported by the Federation of the European Biochemical Societies (FEBS), the French *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) and the French *Ministère de l'Éducation, de la Recherche et de la Technologie*.

P13

Critical influence of previous alcohol consumption on ischemic stroke and thrombolysis

Rubio M.¹, Gauberti M.¹, Villain H.¹, Vivien D.¹, Ali C.¹
¹INSERM U919, UMR CNRS 6232, Caen

Thrombolysis (injection of recombinant tissue plasminogen activator, tPA, to dissolve the blood clot) is the only approved acute treatment for ischemic stroke. However, it is only given to <5% of stroke patients because of strict inclusion criteria and due to a short therapeutic window (<4.5h post symptoms onset). Nevertheless, although alcohol consumption is a risk factor for stroke, previous alcohol consumption is not an exclusion criterion for thrombolysis. Besides, the impact of alcohol consumption on the progression of ischemic lesions remains barely investigated.

OBJECTIVES + METHODS: We have first evaluated the influence of different patterns of alcohol consumption (chronic or binge drinking) on the progression of brain lesions after stroke. Adult mice were alcoholised (p.o., alcohol 10% diluted in drinking water) during 6 weeks uninterruptedly (chronic group) or by weekly periods of alcohol/water (4 days/3 days, respectively; binge group). Control mice received only water during the same period. Mice were then subjected to thromboembolic ischemia through direct injection of thrombin into the middle cerebral artery. Twenty min after the stroke onset, a subgroup of mice was thrombolysed (i.v. tPA), and another one was injected with saline.

RESULTS: We determined the time-course evolution of the lesions by first measuring the lesion volumes by MRI at early times (+2h30) post-ischemia. We observed higher lesion volumes after both types of alcohol consumption and a protective effect of thrombolysis in alcoholised animals at early times post-ischemia. We next measured final lesion volumes (+24h post-ischemia) by histological analysis. Mice receiving alcohol chronically showed higher final lesion volumes than control animals (+50%), possibly through an increase in reactive oxygen species production by NADPH oxidase in the brain. Binge-drinking animals showed final lesion volumes slightly higher to those of control animals (30% increase), although this difference was not statistically significant. As expected, thrombolysis reduced final lesion volume in control animals (-65%). Thrombolysis also reduced final lesion volumes in chronic animals, but still, brain damages were significantly bigger than in control-thrombolysed animals. Finally, tPA completely lost its beneficial effect in binge-drinking animals.

We observed a decrease in LRP and PAI-1 levels in the liver of alcoholised mice. Moreover, near-infrared fluorescence imaging showed higher levels of fluorescent tPA in the brain (iv injection) after alcohol consumption than in control mice. We thus hypothesize that alcohol could reduce the liver clearance of tPA and/or increase tPA's passage into the brain: tPA would then remain longer in the blood and could provoke deleterious effects on brain parenchyma.

CONCLUSION: Previous alcohol consumption has a deep impact on the progression and final extent of ischemic lesions, as well as on the efficiency of thrombolysis. Here we report the first evidence showing that different patterns of alcohol consumption represent specific sub-populations of stroke patients, for whom acute treatment must be adjusted accordingly.

P14

Enriched environment and consequences of binge drinking in adolescent mice: preliminary behavioral (recognition memory) and molecular data

Eleni PAIZANIS, Nadège NAUD, Pascale Schumann-Bard, Michel BOULOUARD

Groupe Mémoire et Plasticité comportementale (GMPC)

UPRES EA 4259 - UFR des Sciences Pharmaceutiques

Université de Caen Basse-Normandie

5, rue Vaubénard - 14000 Caen

Tel/Fax : 02 31 94 72 55

The extent of new alcohol modes consumption in teenagers like binge-drinking is quite alarming considering that adolescence is a critical time period, with high plasticity and therefore more susceptibility to addictive drugs, and furthermore neurobiological long-term effects are still unclear. First of all we wanted to characterized in an alcohol preferring mice (C57BL/6J) the early consequences of a chronic intermittent alcohol exposure (CIAE) on memory performances assessed in an a model of visual learning and memory, the object recognition task (1 min-inter-trial interval), and on an immediate early gene hippocampal expression, c-fos during the mnesic task. CIAE led to a significant deficit in recognition memory (discrimination index d_2 :~-90%, $p<0.001$). These effects were not linked to any changes in locomotor activity. However, a significant increase in c-fos expression was observed in the dorsal part of the hippocampus (~40%, $p<0.05$) suggesting an enhanced sensitivity of this region to repeated withdrawals. Reversibility or persistence in adulthood of these effects remained to be determined. Finally, regarding the beneficial effects of enriched environment on memory, we are currently studying the preventing effects of such conditions on mnesic deficits and neurobiological associated alterations.

P15

Neuronal toxicity of rt-PA is detectable using behavioural tests.

Virginie Beray-Berthat, Fei Teng, Michel Plotkine, Catherine Marchand-Leroux, Isabelle Margail.

EA4475 "Pharmacologie de la Circulation cérébrale", Université Paris Descartes, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris.

1- Background

Thrombolytic therapy with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) is the only treatment for clinical ischemic stroke. However rt-PA exhibits vascular and neuronal side effects. Neuronal death with rt-PA is in part mediated by potentiation of excitotoxicity *via* N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors.

2- Objectives

Our study focused on the neurotoxicity of rt-PA. We investigated a dose effect of an intrastriatal injection of NMDA on behavioural deficits, and whether these deficits were aggravated by rt-PA co-injection.

3- Methods

Male Swiss mice (29-39g) anaesthetised with chloral hydrate (500mg/kg ip) underwent stereotactic injection in the left striatum of either vehicle (0.5 µl PBS 0.1M), or NMDA (10, 15 or 20 nmol) alone or along with rt-PA (2µg), according to the following coordinates : 0.8 mm anterior, 2.4 mm lateral and 4 mm deep from the bregma. A battery of sensorimotor tests were assessed 4 hours after brain injection. The neurological score evaluates sensorimotor reflexes. The circle test values the ability and rapidity of the mouse to exit concentric circles of different diameters. The beam walking test assess the capacity of the mouse to walk on a 1cm-wide beam. The pole test values the capacity of the mouse to go down a vertical wooden pole. The grip test measures the time during which the mouse hangs on a horizontal string and the string test evaluates the way the mouse grips and moves on the string. For the chimney test, the mouse has to back up a vertical glass tube. Adhesive removal test measures the time to remove adhesives put on each forepaw.

4- Results

NMDA at 10 nmol led to a deficit on the neurological score and the circle test. Furthermore, NMDA induced a significant dose-effect on the neurological score, the circle test, the beam walking test and the pole test. The co-injection of rt-PA tended to enhance the deficits induced by the dose of 10 nmol of NMDA on the beam walking and the string tests, and increased significantly those observed with the dose of 15 nmol of NMDA on the neurological score.

5- Conclusion

In conclusion, we showed for the first time to our knowledge a dose effect of intrastriatal NMDA injection on behavioural tests. Furthermore, rt-PA aggravated those sensorimotor deficits. This will allow us to research therapies to counteract rt-PA neurotoxicity.

P16

Effets d'une administration répétée dose-dépendante de benzo(a)pyrène sur les mesures conjointes de l'activité régionale de la cytochrome oxydase et de l'acétylcholinestérase dans le cerveau de la souris adulte

Julie Peiffer¹, Pascaline Bouillaud-Kremarik¹, Catherine Strazielle², Henri Schroeder¹

¹ URAFPA, INRA UC340, Nancy Université, Vandoeuvre les Nancy, France

² INSERM U724, Nancy Université, Vandoeuvre les Nancy, France.

Julie.peiffer@sbiol.uhp-nancy.fr

Le benzo(a)pyrène (BaP) est un Hydrocarbure Aromatique Polycyclique ubiquitaire qui a été démontré comme étant toxique pour le cerveau tant chez l'adulte que chez le jeune en développement en réduisant le niveau d'anxiété des animaux, en augmentant leur activité et en induisant un comportement plus agressif. Dans le but de préciser le mécanisme d'action du BaP au niveau cérébral, l'objectif de ce travail a été de mesurer conjointement l'activité régionale de la cytochrome oxydase (CO) prise comme marqueur de l'activité fonctionnelle cérébrale, et de l'acétylcholinestérase (AChE) en tant que marqueur de différenciation neuronale dans le cerveau de souris adultes soumises à une exposition répétée dose-dépendante de BaP. Pour cela, 48 souris femelles adultes Balb/C ont été traitées quotidiennement par voie intrapéritonéale avec des doses croissantes de BaP (0,02, 0,2, 2, 20 et 200 mg/kg) pendant 10 jours. A l'issue du traitement, les animaux ont été euthanasiés, les cerveaux prélevés et fixés dans le 2-méthylbutane refroidi à -20°C. Les activités de la cytochrome oxydase et de l'acétylcholinestérase ont été révélées par histochimie sur des coupes sériées adjacentes de 20µm d'épaisseur en utilisant respectivement la 3,3' diaminobenzidine et l'iodure de S-actéylthiocholine comme substrats. L'activité régionale des deux enzymes a été mesurée par densitométrie dans 68 régions cérébrales par rapport à une gamme de calibration préétablie. Les résultats ont montré un accroissement significatif de l'activité CO chez les animaux traités au BaP par rapport aux témoins dans un nombre de régions cérébrales qui augmente avec la dose administrée (n=11 à 0,02 mg/kg, n=25 et 26 aux doses respectives de 20 et 200 mg/kg). Au plan de la localisation, les augmentations les plus significatives ont été observées dans les noyaux du complexe amygdalien, différentes régions de l'hippocampe, le septum latéral, certains noyaux de l'hypothalamus et du thalamus ainsi que des aires corticales comme les cortex entorhinal, périrhinal et piriforme. En ce qui concerne l'AChE, des baisses significatives de l'activité de cette enzyme ont été observées quelque soit la dose de BaP utilisée dans plusieurs régions du système limbique incluant le complexe amygdalien et l'hippocampe ainsi que dans le cortex endopiriforme. Par contre, son activité a été significativement augmentée dans plusieurs noyaux sensoriels ou moteurs du tronc cérébral, le noyau interpedonculaire, le striatum et la substance noire compacte. En conclusion, ces résultats montrent une sensibilité particulière du cerveau à une exposition répétée au B(a)P dans des régions impliquées dans le contrôle de l'anxiété, de l'activité et de l'agressivité telles que le complexe amygdalien confirmant ainsi le potentiel neurotoxique de ce contaminant très largement présent dans l'environnement.

P17

Duration of environmental enrichment exposure differentially affects long-term memory, anxiety- and depressive-like behaviour in mice.

Marianne Leger, Thomas Freret, Valentine Bouet, Pauline Delasalle, Eleni Paizanis, François Dauphin, Pascale Schumann-Bard, Michel Boulouard.

*EA 4259, Groupe Mémoire et Plasticité comportementale (GMPc),
UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France.*

Environmental enrichment (EE) stimulates brain functions and constitutes an interesting model to elicit brain plasticity¹. It improves learning and memory performances and decreases anxiety- and depressive-like behaviour. However, minimal duration of EE exposure to induce such beneficial effects is not well determined.

The aim of this study was to explore whether different durations of EE may differentially influence long-term memory (LTM) performances, anxiety- and depressive-like behaviour in male mice. To this end, adult mice were continuously housed in standard or enriched environment for 24 hours, 1 week, 3 weeks or 5 weeks before behavioural experiments (n=12 per group). LTM performances were tested in the passive avoidance task. Anxiety-like behaviour was assessed in the dark–light box and elevated plus maze tasks while depressive-like behaviour was assessed in the tail suspension and forced swimming tests.

An improvement of LTM performances was only found after a 3-week exposure to EE, whereas no modification of anxiety-like behaviour was observed in the dark–light box test whatever EE duration. Additionally, an anxiolytic-like effect, as shown in the elevated plus maze task, appeared after 3 weeks of EE; as for memory, this beneficial effects of a 3-week-long EE disappeared after longer exposure. Interestingly, EE led to an anti-depressive like effect in the tail suspension test, but not in the forced swim test, whatever its duration (*i.e.* from 1 day to 5 weeks).

The present findings reveal a major influence of EE exposure duration on memory and anxiety-like behaviour, with a particular efficiency for a 3-week duration. In contrast, the anti-depressive-like effects of EE seem to be independent of the duration. These findings suggest that the mechanisms underlying the behavioural effects of EE are different. It also suggests that the heterogeneity of the EE effects reported in the literature depends on the different EE exposure durations. Mechanisms of these differential effects of EE will be further assessed with a particular interest on neurogenesis.

¹ Van Praag H. et al. (2000) Nature reviews. Neuroscience, vol. 1, 191-198.

P18

Effets de l'hypoxie aiguë sur la mémoire chez le personnel navigant de l'aéronautique militaire

C. Malle(1)(2), C. Bourrilhon(1) , P. Liscia(1), M. Laisney(2), P. Quinette(2), B. Desgranges(2), J. Boissin(1), S. Samtmann(1), C. Tronche(1), D. Béracochéa(3), F. Eustache(2), C. Piérard(1)

(1) Institut de Recherche Biomédicale des Armées (IRBA) (2) U923 INSERM – EPHE – Université de Caen Basse Normandie (3) Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives UMR CNRS 5228 Université de Bordeaux

L'objectif de ce travail est d'étudier les effets de l'hypoxie aiguë sur la mémoire humaine afin de développer des outils adaptés à la formation des élèves pilotes. L'hippocampe, structure-clé de la mémoire, étant particulièrement sensible à l'hypoxie, nous formulons l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie perturberait principalement les fonctions hippocampiques telles que la mémoire épisodique et le passage des informations de la mémoire à court terme vers la mémoire à long terme. Au cours de leur formation, les élèves pilotes de l'Armée de l'Air sont confrontés à un épisode hypoxique en caisson hypobare (à une altitude simulée de 31 000 ft). Cette instruction leur permet de prendre conscience de leurs sensations et de leurs comportements lors d'un épisode hypoxique. La finalité de cette instruction est de leur permettre de détecter rapidement le manque d'oxygène en vol et d'y remédier.

Un groupe expérimental de 24 pilotes et un groupe contrôle de 23 pilotes (appariés en sexe, âge, niveau d'études et durée moyenne de sommeil par nuit) ont été constitués. La mémoire épisodique a été étudiée grâce à une série de tests informatisés de reconnaissance de visages effectués avant et après l'épisode hypoxique. Ces tests permettent de mettre en évidence à la fois la récupération implicite et explicite de l'information en mémoire. La mémoire de travail a été évaluée grâce à l'apprentissage de listes de mots avant et après l'épisode hypoxique. Enfin les pilotes ont été soumis à un test d'attention soutenue (PASAT) pendant l'épisode hypoxique.

Nos résultats montrent que les différentes composantes de la mémoire humaine ne sont pas affectées dans la même mesure par l'hypoxie hypobare. La récupération explicite d'une information en mémoire épisodique est perturbée, alors que la récupération implicite de l'information est préservée. Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence des modifications de l'humeur et une différence de traitement des informations en mémoire de travail en fonction de leur valence émotionnelle.

P19

GLUCOCORTICOÏDES ET SEROTONINE CENTRALE AU COURS DE L'EXERCICE PHYSIQUE

Rémi Thomasson¹, Katia Collomp¹, Tobias Hevor², Jean François Cloix²

¹AMAPP, EA 4248, Université d'Orléans, Orléans, France ; ²Laboratoire de Neurobiologie,
Université d'Orléans, Orléans, France.

E-mail du correspondant : remi.thom@wanadoo.fr

Au cours d'un exercice physique prolongé d'intensité modérée, une diminution de la glycémie due à une baisse du taux de glycogène hépatique affecte le système nerveux central. En dehors de cet aspect énergétique, l'exercice physique provoque également une altération de la neurotransmission monoaminergique. La prise de glucocorticoïdes par certains sportifs est supposée améliorer les performances physiques. Cette amélioration pourrait être due à l'effet de ces glucocorticoïdes sur les neurotransmetteurs centraux. Le but de cette étude est d'évaluer l'impact réel d'un glucocorticoïde sur la neurotransmission sérotoninergique. Pour cela, nous avons recherché les effets éventuels d'une administration intrapéritonéale de prednisone (glucocorticoïde de synthèse) sur la neurotransmission monoaminergique chez des souris Swiss mâles âgées de 8 semaines. Ces souris ont été soumises à un entraînement quotidien à la course de 1 h sur un tapis roulant pendant quatre semaines, puis, à une course jusqu'à épuisement. Les animaux ont été ensuite sacrifiés et les neurotransmetteurs ont été dosés par chromatographie liquide à haute performance et une détection électrochimique. La prednisone a été administrée à certains groupes d'animaux pendant les trois jours avant le sacrifice. Parmi les neurotransmetteurs étudiés, le taux de sérotonine tend à augmenter dans le cervelet à la suite de l'entraînement physique. Il en est de même du précurseur de la sérotonine, le tryptophane. L'administration de prednisone n'a pas d'influence sur les taux centraux de sérotonine et de tryptophane après l'entraînement. En revanche, le glucocorticoïde augmente significativement le taux du métabolite principal de la sérotonine, l'acide 5-hydroxyindole acétique après l'exercice. Il ressort de ces résultats que la prednisone augmente le turn-over de la sérotonine sans exercer un effet notable sur les taux du neurotransmetteur lui-même au cours de l'exercice physique. Des travaux complémentaires sont en cours pour préciser le rôle réel de la prednisone dans la « fatigue centrale ».

P20

Comparison of effects of X-Rays or carbon ion irradiation on human uveal normal and tumoral melanocytes.

Calipel A¹, Lux A-L¹ and Mouriaux F^{1,2}.

¹Equipe CERVOxy « Hypoxie et physiopathologie cérébrovasculaire », UMR CI-NAPS 6232 Centre CYCERON, Bd Henri Becquerel, BP5229, 14074 Caen Cedex France. ²CHRU, Avenue de la côte de Nacre, 14033 CAEN.

In France, uveal melanoma (UM) represents approximately 5 % of melanomas, touch for the greater part the persons of more than 50 years old, and have an incidence about 7/10⁶ persons a year. In spite of important progress in the local treatment, the rates of survival of UM remained stable with approximately 50 % of deaths by metastases in 15 years. The treatment proposed is in the majority of the cases the protontherapy or the radiotherapy of contact by patches, the rest of the patients being treated by surgery of ablation of the eye. Indeed, the hadrontherapy consists in treating some cancers with uncommon radiations, the hadrons which are proton and carbon ion which possess a Transfer of Linear Energy (LET) higher than the conventional radiotherapy (X-rays and γ). No extensive studies were performed to evaluate the impact of high LET exposure on the cellular and molecular mechanisms of tumoral uveal melanocytes and healthy ocular tissues. If a multitude of pathway is involved, the discovery of the major targets of the irradiation could allow the elaboration of alternative therapies, which would aim at targeting the tumor and at reducing the side effects on healthy tissues.

The purpose of our project is to investigate the positive and negative effects of the irradiation on the UM and healthy uveal melanocytes. In spite of a common embryological origin with the melanocytes of the skin, the neural crest, choroidal melanocytes have a different cellular behavior. The major deregulation found in more than 86 % of UM is the constitutive activation of the ERK1/2 pathway without either RAS or B-Raf mutations. Our previous findings highlight the key role of the ^{WT}B-Raf/MEK/ERK pathway in the control of proliferation of UM cells. A better understanding of mechanisms leading the stop of the cell proliferation after radiation (because clinically the tumor stops to proliferate and regress in several months or years) would allow to focus targeted therapies. It thus seems interesting to analyze the effects of the irradiation on ERK1/2 activation and the link between these pathways with the cell cycle.

By waiting for the flow of protons of the cyclotron C400 of the project Archade, we characterize on various cellular models the effects of X-rays (ORION 4-5 MV, Orion, Centre F. Baclesse, Caen) or to carbon ions (75 MeV/u on IRABAT D1 line, GANIL, Caen) radiations. We compared the radiosensibilities, after X-rays and carbon ion irradiation of six UM cell lines (92.1, Mel 270, SP6.5, MKT-Br, μ 2 and TP17) and two types of healthy cells: the human uveal melanocytes (NUM) and the epithelial cells of the human retina (ARPE19). We showed that carbon ion present with regard to the X-rays a relative biological effectiveness (RBE) of 1.86 to 2.46 at 10% survival. Then, we showed that the synchronization of cells in phase G0/G1 of the cell cycle does not influence the sensibility of these various cells. Interestingly, we demonstrated that the X-rays-radiosensibility of the UM cell lines is not influenced by the rate of oxygenation. We showed that X-Rays and carbon ions irradiation had the same effects by provoking a stop of the cellular cycle in phase G2/M until 120 hours. According to the type of irradiation, two mechanisms are observed on the ERK1/2 signaling pathway: X-rays induced a transitory suractivation of ERK1/2, whereas the ERK1/2 activation was constantly inhibited by carbon beam. In conclusion, these preliminary results show that the carbon beam presents a better biological efficiency than X-rays in uveal melanoma cells leading a sustain inhibition of ERK1/2 pathway.

P21

Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation (DC2N), Inserm U982, IFRMP 23, University of Rouen, France

Abstracts from the Team 3: Astrocytes and Organisation of the Vascular Niche in the Differentiation and Glial Tumorigenesis (Dr H el ene Castel)

Impact of a new class of cyclin dependent kinase inhibitors, on human glioma cell growth

M. Jarry¹, M.T. Schouft¹, S. Arthaud¹, V. Le Joncour¹, F. Liger², B. Marquet², B. Joseph², L. Meijer³, H. Castel¹ and P. Gandolfo¹

¹Lab. DC2N, INSERM U982, IFRMP23, University of Rouen, France; ²ICBMS, University of Claude Bernard - Lyon 1, Villeurbanne, France; ³Cell Cycle Group & UPS262, Biological Station, Roscoff, France.

Cerebral tumors represent 2% of human adult cancers with a constant incidence increase of 1 to 3% per year. Malignant glioma represent the most common primary brain tumors in adults and are considered incurable. The diversity of biomolecular mechanisms involved in glial tumoral cell proliferation and brain tissue invasion explains disease recur in most patients. Indeed, surgery, radiation and chemotherapy exert limited effectiveness in treatment of high grade glioma.

It is now clearly established that cyclin-dependent kinases (CDK) hyperactivity is one of the processes underlying hyperproliferation and tumoral growth. CDK inhibitors (CDKI) recently characterized present an inhibitory activity associated to cytotoxic effects. In order to improve both selectivity and efficiency of these CDK inhibitors, a series of hybrid compounds have been synthesized ^{a,b}. In the present study, we have tested the ability of these new CDKI to inhibit the proliferation of the human anaplastic astrocytoma (SW1088) and glioblastoma (U87) cell lines.

An *in vitro* approach showed that among the 36 compounds tested, 19 are efficient in a concentration range of 10⁻⁹ to 10⁻⁶ M and two are particularly potent with nanomolar IC₅₀ values. Flow cytometry studies with tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM), the fluorescent dye used for measuring mitochondrial membrane potential, showed that both CDKI 5 and 15 exhibited pro-apoptotic activities on SW1088 and U87 cells. Moreover, administrated on two glioblastoma cell lines U87 and GL15, CDKI 5 and 15 inhibited by 50% the proportion of cells in the S phase of cell cycle whereas the percentage of cells in G2/M phase was stimulated by 20%. It is now well established that tumoral stem cells represent the root of recurrence, and constitute one of the current therapeutic target in cancer treatment. Interestingly, we showed that CDKI 5 and 16 are also able to exert pro-apoptotic activities on tumoral stem cells (tumoral neurospheres).

Taken together, our data strongly suggest that this new class of CDKI represent a promising class which may deserve new therapeutic options in the treatment of glial tumors.

^a Bettayeb *et al.* (2007) Cancer Res. 67:8325-8334.

^b Echali er *et al.* (2008) J. Med. Chem. 51:737-751.

Urotensinergic vasoactive peptides as new chemotaxic factors involved in neoangiogenesis of high grade glioma

V. Le Joncour, C. Lecointre, M. Jarry, M.T. Schouft, S. Arthaud, H. Castel and P. Gandolfo

Lab. DC2N, Inserm U982, IFRMP 23, University of Rouen, France.

Malignant glioma represent in adults the most common primary brain tumors, mainly characterized by tumoral invasiveness of the normal brain tissue, intense proliferation of endothelial cells (neoangiogenesis), and a high degree of recurrence. High grade glioblastomas are characterized by a dense vascularization known to be dilated, tortuous, disorganized and leaky, opening the way for a specific targeting of tumoral new vessels in the context of glioma treatment. Growth factors but also vasoactive neuropeptides have been identified as regulators of recruitment and entrapping of diverse proangiogenic cells, promoting *in situ* neoangiogenesis. Urotensin II (UII) and its paralog urotensin II-related peptide (URP) are two potent vasoactive neuropeptides involved in the control of endothelial cell proliferation and migration. Recent data obtained in our team indicate that UII, URP and their receptor UT are expressed in human brain tumors, and that UII exerts potent chemotaxic effects on several human glioblastoma cell lines.

Therefore, by using an *in vivo* approach, we first investigated the ability of UII and URP to recruit different cell populations known to favor glioma development and neoangiogenesis. We injected in the right flank of *C57/Bl6* mice, a synthetic extracellular matrix *Matrigel* containing urotensinergic peptides UII or URP, vascular endothelial growth (VEGF) or endothelial growth (EGF) factors (50 ng, each). Our preliminary results showed that UII, and in a less extent URP stimulated macrophage, endothelial cell and vascular smooth muscle cell matrix invasion, as observed for VEGF and EGF. We also investigated the role of UII on glial tumorigenesis on heterotopic xenografts of the human glioblastoma cell line U87 in Nude mice. Tumor growth was followed daily in UII (10 μ L, 100 ng)- or PBS (10 μ L)-intratumorally injected mice. We observed that UII drastically stimulated tumor growth, accompanied by an enhanced angiogenesis at the site of UII injection.

Altogether, these data suggest that UII favors pro-angiogenic cell type recruitment, potentially involved in *in vivo* high grade glioma growth. Thus, blockade of circulating UII, and/or of urotensinergic receptor UT, combined with conventional cytotoxic, radiative and other antiangiogenic therapeutics may improve the efficacy of anti-brain cancer therapies.

P23

Real time in vivo 2-photon imaging of fluorescent glucose uptake by neurons and astrocytes.

Julien Chuquet^{1,2}, Pascale Quilichini¹, Esther A. Nimchinsky¹ and György Buzsáki¹

¹ Center for Molecular and Behavioral Neuroscience, Rutgers University, 197 University Avenue, Newark, NJ 07102, USA. ² Université de Rouen, INSERM-982, Place Emile Blondel, Mont-Saint-Aignan, 76821, France.
julien.chuquet@univ-rouen.fr

Glucose is the primary energetic substrate of the brain and measurements of its metabolism are the basis of major functional cerebral imaging methods. Therefore, a significant portion of our knowledge of intact brain function depends on an understanding of localized glucose processing by brain cells. However, the cellular fate of glucose in the intact brain, *in vivo*, has not yet been directly observed. *In vitro* and *ex-vivo* analyses report the paradox that despite a much lower energetic need than neurons, astrocytes take-up most of the glucose. We present a novel approach for studying glucose uptake in astrocytes and neurons *in vivo* in rats by imaging through a cranial window the trafficking of the non-metabolizable fluorescent glucose analog 6-NBDG using two-photon microscopy. We show for the first time that 6-NBDG can be visualized in the brain at a subcellular scale, seconds after its intravenous administration at physiologically relevant concentrations. We found that 6-NBDG homogeneously invades the parenchymal compartment and reaches astrocytes and neurons of the barrel cortex at same rate in the absence of triggered neuronal work. However, during intense neuronal activity triggered by whisker stimulation, astrocytes rapidly accelerated their uptake whereas neuronal uptake remained almost unchanged. Following the stimulation period, astrocytes returned to their pre-activation rates of uptake paralleling the neuronal rate of uptake. These observations support the hypothesis that neuronal energy expenditure must be met by different astrocyte-derived energy substrate and suggest that functional imaging experiments based on glucose analogs extraction (PET, 2-DG) may predominantly reflect the metabolic activity of the astrocytic network.

Liste des participants

Nom Prénom	Laboratoire
Ali Carine	INSERM U919, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Andrieux Karine	UMR CNRS 8612, Châtenay-Malabry
Antier Daniel	INSERM U 930, Tours
Arlicot Nicolas	INSERM U 930, Tours
Berezowski Vincent	EA 2465 - LBHE, Lens
Bernaudin Myriam	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Besson Valérie	EA 4475, Paris
Bihel Ebeline	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Bouet Valentine	GMPc, EA 4259, Caen
Boulouard Michel	GMPc, EA 4259, Caen
Brambilla Davide	CNRS UMR 8612, Paris
Calipel Armelle	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Chalon Sylvie	INSERM U 930, Tours
Chazalviel Laurent	INSERM U919, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Chuquet Julien	INSERM 982, Rouen
Collet Solène	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Collot Valérie	CERMN, EA 4258, Caen
Crépeaux Guillemette	INRA UC340, Nancy
Dallemagne Patrick	CERMN, EA 4258, Caen
Daval Jean-Luc	INSERM U954, Nancy
Debout Claire	Laboratoire d'Histologie, UFR Médecine, CHU de Caen, Caen
Fabis Frédéric	CERMN, EA 4258, Caen
Freret Thomas	GMPc, EA 4259, Caen
Genest David	CERMN, EA 4258, Caen
Gonzales Bruno	EA Neovasc 4309, Rouen
Gressens Pierre	INSERM U676, Paris
Hevor Tobias	AMAPP, EA 4248, Orléans
Jacotot Etienne	INSERM U676, Paris
Jarry Marie	INSERM U982, lab DC2N, IFRMP23, Rouen
Jolly Sarah	UMR 7102 CNRS/UPMC, NPA, Lab. DVSN, Paris
Karagiannis Anastassios	UMR 7102 CNRS/UPMC, Paris
Kuntz Mélanie	EA 2465 - LBHE, Lens
Le Joncour Vadim	INSERM U982, lab DC2N, IFRMP23, Rouen
Lecointre Céline	INSERM U982, lab DC2N, IFRMP23, Rouen
Leconte Claire	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Lecoutey Cédric	CERMN, EA 4258, Caen
Léger Marianne	GMPc, EA 4259, Caen
Lemarchand Eloïse	INSERM U919, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Leroux Philippe	EA Neovasc 4309, Rouen
Letourneur Annelise	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen

Malle Carine	IRBA/INSERM U923, EPHE, Caen
Margaill Isabelle	EA 4475, Paris
Marteau Léna	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Martin Nicolas	INSERM U954, Nancy
Maubert Eric	INSERM U919, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Paizanis Eleni	GMPc, EA 4259, Caen
Payen Jean-François	INSERM U836, Grenoble
Pellerin Luc	Dept Physiology, Univ Lausanne, Lausanne, Suisse
Peres Elodie	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Petit Edwige	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Petrault Olivier	EA 2465 - LBHE, Lens
Pfeiffer Julie	INRA UC340, Nancy
Pouysségur Jacques	CNRS UMR 6543, Nice
Quintin Jérôme	CERMN, EA 4258, Caen
Rochais Christophe	CERMN, EA 4258, Caen
Rodriguez Celin Alejandra	EA 2465 - LBHE, Lens
Roussel Simon	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Schroeder Henri	INRA UC340, Nancy
Schumann-Bard Pascale	GMPc, EA 4259, Caen
Siopi Eleni	EA 4475, Paris
Stiebing Sylvia	CERMN, EA 4258, Caen
Tixier Emmanuelle	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Thomasson Rémi	AMAPP, EA 4248, Orléans
Touzani Omar	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Tronel Claire	INSERM U 930, Tours
Valable Samuel	CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen
Vandenhautte Elodie	EA 2465 - LBHE, Lens
Yaghi Layale	SRHI, I2BM, CEA/Univ. Paris 12, Paris

Bordji Karim

CERVOxy, UMR 6232 CI-NAPS, Caen

Colloc'h Nathalie

ENF, UMR 6232 CI-NAPS, Caen

Mary Véronique

SANOFI-AVENTIS, Paris

Vivien Denis

INSERM U919, UMR 6232 CI-NAPS, Caen

2011 COLLOQUE ANNUEL

Société Cerveau et Maladies Cérébrovasculaires



© François Decaëns – Ville de Caen

