

Mécanismes mis en jeu dans la libération d'endozépines induite par le peptide bêta amyloïde, rôle du gliopeptide ODN dans l'activité astrocytaire

Raya Hachem

▶ **To cite this version:**

Raya Hachem. Mécanismes mis en jeu dans la libération d'endozépines induite par le peptide bêta amyloïde, rôle du gliopeptide ODN dans l'activité astrocytaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rouen, 2010. Français. NNT : . tel-02295797

HAL Id: tel-02295797

https://normandie-univ.hal.science/tel-02295797

Submitted on 24 Sep 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Rouen

en vue de l'obtention du Doctorat en Sciences

Spécialité : Biologie Cellulaire

Option : Neurosciences

Mécanismes mis en jeu dans la libération d'endozépines induite par le peptide bêta amyloïde, rôle du gliopeptide ODN dans l'activité astrocytaire

par ***Raya HACHEM***

Soutenue le 17 novembre 2010 devant le jury composé de :

Mme A. Carrier	Chargée de Recherche au CNRS, Marseille	Rapporteur
Mr M. Naassila	Professeur à l'Université Jules Verne, Amiens	Rapporteur
Mr A. Coquerel	Professeur à l'Université de Caen	Examinateur
Mr M. Amri	Professeur à l'Université El Manar II, Tunis	Co-directeur
Mme M.C. Tonon	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Co-directeur

THESE

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Rouen

en vue de l'obtention du Doctorat en Sciences

Spécialité : Biologie Cellulaire

Option : Neurosciences

Mécanismes mis en jeu dans la libération d'endozépines induite par le peptide bêta amyloïde, rôle du gliopeptide ODN dans l'activité astrocytaire

par ***Raya HACHEM***

Soutenue le 17 novembre 2010 devant le jury composé de :

Mme A. Carrier	Chargée de Recherche au CNRS, Marseille	Rapporteur
Mr M. Naassila	Professeur à l'Université Jules Verne, Amiens	Rapporteur
Mr A. Coquerel	Professeur à l'Université de Caen	Examinateur
Mr M. Amri	Professeur à l'Université El Manar II, Tunis	Co-directeur
Mme M.C. Tonon	Directeur de Recherche à l'Inserm, Rouen	Co-directeur

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé dans l'unité Inserm U413 dirigée par le Dr Hubert Vaudry, puis dans l'Inserm U982 dirigée par le Dr Youssef Anouar au sein de l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides (IFRMP 23), et en co-tutelle avec le laboratoire de Neurophysiologie Fonctionnelle et Pathologies (Unité de recherche 00/UR/08-01, Université de Tunis) dirigé par le Pr Mohamed Amri.

Durant la préparation de ma thèse, j'ai bénéficié de l'aide financière du Ministère de l'Education Nationale Tunisienne.

Ce travail a été soutenu par un projet de collaboration CMCU-Utique entre l'Inserm U413 (Rouen) et l'Unité de recherche 00/UR/08-01 (Tunis).

Remerciements

*Le Dr. **Alice CARRIER**, Chargée de Recherche au CNRS, a accepté volontiers la charge d'être rapporteur de ce travail malgré ses nombreuses responsabilités. Consciente de la faveur qu'elle m'accorde, je souhaite lui témoigner ma sincère gratitude.*

*Le Pr. **Mickael NAASSILA**, Professeur à l'université Jules Verne d'Amiens, me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je le remercie sincèrement pour l'intérêt qu'il porte à ces travaux et je le prie de trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Le Pr. **Antoine COQUEREL**, Professeur à l'université de Caen, me fait le privilège de siéger dans ce jury en tant qu'examinateur. Je lui sais gré d'avoir accepter de juger les travaux présentés dans ce manuscrit.*

*Le Dr. **Hubert VAUDRY**, Directeur de Recherche à l'Inserm, m'a accordé sa confiance en m'accueillant dans son laboratoire pour le début de ma thèse. Qu'il me soit permis de dire combien j'admire son enthousiasme, son immense connaissance scientifique et son dynamisme. Il restera un exemple pour moi.*

*Le Dr. **Youssef ANNOUAR**, Directeur de Recherche à l'Inserm, m'a accueilli au sein de son unité pour la fin de ma thèse. Je le remercie pour sa confiance et ses encouragements. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.*

*Je remercie chaleureusement le Dr. **Marie-Christine TONON**, Directeur de Recherche à l'Inserm, qui m'a prise sous son aile et a bien voulu diriger mes travaux. Pendant toutes ces années, j'ai pu apprécier sa rigueur scientifique, son efficacité et son dynamisme. Pour le temps consacré à me faire partager l'ensemble de ses connaissances, pour sa patience et sa disponibilité, qu'elle trouve ici l'expression de mon respect et de ma sincère reconnaissance.*

*Je remercie vivement le Pr. **Mohamed AMRI**, Professeur à l'université de Tunis El Manar, d'avoir cru en moi. Il m'a accueilli dans son laboratoire pour un master et m'a suivi jusqu'en thèse avec un soutient sans faille malgré la distance qui nous sépare. Les mots ne seront jamais suffisants pour exprimer ma très sincère gratitude et mon profond respect.*

*La réalisation de ce travail n'aurait pas pu aboutir sans l'aide que m'ont apporté les « cultivateurs » d'astrocytes, **Mickael Diallo** qui m'a appris la culture cellulaire, **Damien Lanfray** pour ces précieux conseils et **Marie Jarry**, copine de galère de contamination et tous les autres membres de l'équipe **Hélène Castel**, **Laurence Desrues** (avec qui j'ai plaisir de prendre mon café le*

*matin), **Pierrick Gandolfo**, **Nicolas Lapinte**, **Céline Lecointre**, **Vadim Le Joncour**, **Fabrice Morin** et **Marie-Thérèse Schouft**.

Une thèse, c'est aussi des rencontres et la naissance d'amitiés. Je voudrais remercier chaleureusement **Nicolas Lapinte** (Miaouw, tiens moi au courant de tes disparitions), **Donovan Liot** (Dono, mon super collègue de bureau, j'espère que tu ne te sentiras pas trop seul) et **Colas Calbrix** (Colasse la …) pour leur aide précieuse, leur soutient sans faille et surtout leur bonne humeur qui m'a permis de tenir dans les moments les plus dures.

Etant la dernière de la bande à partir, je tiens à remercier mes anciennes collègues de bureau et copines, **Aurélia**, **aurélie**, **Béa**, **Valérie** (qui continue à m'écouter me plaindre même en étant en Allemagne) ainsi que **Alice**, **Emilie**, **Nathalie**, **Cindy**, **Yosra** et ma petite **Mimie**, qui m'ont soutenue à distance.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui m'ont fait profiter de leurs connaissances et expériences : **Magali**, **Maïté**, **Alex**, **Delphine**, **Dorthe**, **Anthony**, **Christophe** et **Jérôme**. Déjeuner ne sera plus pareil sans les habituées de la salle à café : **Laurence**, **Magalie**, **Catherine**, **Marjo**, **Céline** et **Coralie**, merci pour toutes les histoires bizarres et les fous rires le midi.

Je voudrais aussi remercier **Laurence Matéo** et **Sabrina Moreau**, **Huguette Lemonnier**, **Gérard Cauchois**, **Nathalie Helloin** et **Josiane Molinari** pour leur gentillesse et pour tous les services qu'ils m'ont rendus pendant ma thèse.

Enfin, un grand merci à mes parents pour leur soutien sans égal et leur encouragement, et plus particulièrement mon père qui m'a transmis la fibre scientifique, à **mes frères**. Pour terminer, je remercie **Olivier** qui m'a toujours soutenue, encouragée et surtout pour avoir supporter mes mauvaises humeurs durant mes années de thèse.*

Sommaire

Liste des publications relatives à ma formation doctorale *11*

Résumé *13*

Summary *17*

Liste des abbréviations *21*

Liste des figures *27*

Liste des tableaux *29*

INTRODUCTION

I. Les endozépines *33*

1. Historique *33*

2. Structure du gène *34*

3. Séquence, maturation et structure tridimensionnelle du DBI *36*

4. Localisation tissulaire et cellulaire des EZ dans le SNC *39*

5. Récepteurs des EZ *41*

5.1. Récepteurs des BZ de type central *41*

5.2. Récepteurs des BZ de type périphérique *43*

5.3. Récepteur métabotropique *45*

6. Rôles physiopathologiques des EZ *46*

6.1. Effets comportementaux des EZ *46*

6.2. Effets des EZ sur la synthèse des stéroïdes *47*

6.3. Effets des EZ sur le métabolisme lipidique *47*

6.4. Autres effets biologiques des EZ *48*

6.5. Implication des EZ en pathologie *50*

II. Les Astrocytes 52

1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des astrocytes ... ...

II. Mesure de la prolifération astrocytaire 78
III. Mesure de la survie cellulaire 78
IV. Dosage des polyphosphoinositides 79
V. Dosage radioimmunologique de l'AMPc 79
VI. Dosage radioimmunologique des EZ 80
VII. Dosage de l'IL-1β 81
VIII. Réactions en chaîne par polymérase 81
IX. Mesure de l'activité glioprotectrice de l'ODN 82

RESULTATS

I. Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of formyl peptide receptors... 87
II. Mechanisms involved in the effects of beta-amyloid peptide on endozepine release and astrocyte proliferation 99
III. Protective effect of the octadecaneuropeptide ODN on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes 107

DISCUSSION

I. Mécanismes mis en jeu dans l'effet du βA sur la libération d'EZ 159
II. Rôle de l'EZ ODN sur la prolifération et l'activité astrocytaire 163

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES *171*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES *177*

Liste des publications relatives à la formation doctorale

Articles dans des revues avec comité de lecture

1. Tokay, T., **Hachem, R**., Masmoudi-Kouki, O., Gandolfo, P., Desrues, L., Leprince, J., Castel, H., Diallo, M., Amri, M., Vaudry, H. and Tonon, M.C. Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia* **56** :1380-1389 (2008). (IF = 5,4)
2. Masmoudi-Kouki, O., Hamdi, Y., Kaddour, H., Jenhani, F., Gandolfo, P., Vaudry, D., Mokni, M., Leprince, J., **Hachem, R.,** Vaudry, H., Tonon, M.C. and Amri, M. Protective effect of the octadecaneuropeptide ODN on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine (Soumis)*

Présentations

1. **Hachem, R.,** Tokay, T., Masmoudi-Kouki, O., Gandolfo, P., Desrues, L., Leprince, J., Castel, H., Diallo, M., Amri, M., Vaudry, H. and Tonon, M.C.: Mechanisms involved in beta-amyloid peptide-induced endozepine release and astrocyte proliferation. 12ème Journée de l'EdNBISE, Rouen, 20 mars 2009. *Présentation orale - Prix de la meilleure présentation*
2. **Hachem, R.**, Tursonjon, T., Masmoudi-Kouki, O., Gandolfo, P., Desrues, L., Leprince, J. Castel, H., Diallo, M., Amri, M., Vaudry, H. and Tonon, M.C. Effects of beta-amyloid peptide on astrocytes: stimulation of endozepine release and cell proliferation. 9th European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Paris, September 8-12, 2009. *Glia* **57:** S65 (2009).

Résumé

Le terme endozépine (EZ) désigne une famille de peptides, considérés comme les ligands naturels des récepteurs des benzodiazépines, qui inclut le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) et ses dérivés dont l'octadécaneuropeptide (ODN). Dans le système nerveux central (SNC) des mammifères, les EZ sont essentiellement localisées dans les cellules astrogliales. Bien que le DBI soit dépourvu de séquence signal, les EZ sont libérées dans les surnageants de culture. Les EZ sont également présentes dans liquide céphalo-rachidien et leur concentration est augmentée notamment chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA). Cette maladie se caractérise par des dépôts de peptide bêta-amyloïde (βA), ou plaques séniles, une astrogliose importante, ainsi qu'une production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'interleukine 1β (IL-1β), et de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Des travaux menés sur des astrocytes en culture démontrent que le βA_{25-35} stimule la synthèse et la libération d'EZ. Néanmoins, les mécanismes mis en jeu dans la libération d'EZ induite par le βA, ainsi que le rôle de cette production d'EZ dans l'activité astrocytaire sont inconnus. Nous nous sommes donc intéressés aux systèmes de transduction activés par le βA, aux récepteurs mis en jeu, ainsi qu'aux processus impliqués dans la libération d'EZ induite par le βA. Ensuite, nous avons recherché les conséquences de cette libération d'EZ sur l'activité astrocytaire.

La première étape de ce travail a consisté à rechercher les voies de transduction et les récepteurs activés suite à l'administration de βA, sur des astrocytes de rat en culture. Nous avons ainsi montré que le βA induit une augmentation rapide et transitoire (10 min) de la production d'AMPc et stimule de façon temps- et dose-dépendante l'incorporation de l'[^{3}H]inositol dans les polyphosphinositides (PIPs). L'action du βA sur le métabolisme des PIPs est totalement abolie par un inhibiteur de PLC, l'U73122, et elle est mimée par le fMLF, un agoniste des récepteurs des peptides N formylés (FPRs). Les actions du βA et du fMLF sont bloquées par le N-t-Boc-FLFLF, un antagoniste de ces mêmes récepteurs, suggérant que le peptide βA peut

moduler certaines activités astrocytaires en interagissant avec des FPRs fonctionnels. De fait, nous montrons que la libération d'EZ induite par le βA est reproduite par deux agonistes de ces récepteurs, et qu'elle est totalement abolie par le N-t-Boc-FLFLF. De plus, la faible affinité (μM) des FPRs astrocytaires poue les deux agonistes fMLF et fMMM, suggère la mise en jeu de récepteurs FPR-*like 1* (FPRL1). L'activation des protéines kinase A (PKA) et C (PKC), qui fait suite à l'interaction du βA avec les FPRL1, ainsi qu'un influx calcique sont indispensables à la libération d'EZ induite par le βA. Enfin, nous avons montré que l'exportation des EZ vers le milieu extracellulaire induite par le βA, s'effectue *via* des transporteurs du type *ATP-binding cassette* (ABC) sensibles au glyburide.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons recherché l'implication des EZ libérées dans les effets du βA sur l'activité astrocytaire. L'action du βA_{25-35} sur la prolifération astrocytaire, qui est reproduite par le fMLF, est totalement bloquée par le N-t-Boc-FLFLF indiquant la mise en jeu de FPRs. L'ODN stimule également la prolifération astrocytaire à 48 h en agissant probablement *via* un site de très haute affinité (10^{-12} M) et un site de haute affinité (10^{-8} M). Un effet stimulateur de l'ODN est retrouvé pour des temps plus courts (12 h) suggérant que les EZ peuvent également favoriser la survie des astrocytes.

La libération d'IL-1β induite par le βA, suit celle des EZ de quelques heures. Néanmoins, nos résultats préliminaires suggèrent que les EZ ne peuvent pas reproduire l'effet du βA sur la libération d'IL-1β car l'ODN (10^{-8} M) augmente les ARNm codant l'IL-1β que transitoirement, et exerce un effet majoritairement inhibiteur sur l'expression d'IL-1β dans les astrocytes. Enfin, l'IL-1β (2,5 ng) est sans effet sur l'expression du DBI. Ces données suggèrent donc que le βA stimule la libération d'IL-1β indépendemment de celle des EZ.

En accord avec un rôle de l'ODN sur la survie des astrocytes, nous montrons, qu'à la concentration de 10^{-9} M, le peptide réduit considérablement la production de ROS induite par le H_2O_2 (de 400 à 800 μM) en stimulant l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase. L'ODN est également capable de contrecarrer l'action du H_2O_2 sur le potentiel mitochondrial et l'activité de la caspase 3. Ainsi, la

présence de l'EZ ODN dans le milieu extracellulaire permet de réduire la mort par apoptose induite par le production de ROS. Néanmoins, les EZ ne peuvent protéger les astrocytes d'un stress oxydatif majeur.

L'ensemble de nos résultats indique donc que le βA stimule la libération d'EZ *via* l'activation des FPRs positivement couplés aux voies AC/PKA et PLC/PKC. La translocation des EZ vers milieu extracellulaire est PKA-, PKC- et Ca^{2+}-dépendante, et met en jeu des transporteurs ABC. Les EZ libérées peuvent à leur tour mimer l'effet du βA sur la prolifération astrocytaire et contrecarrer certains effets délétères du peptide amyloïde en favorisant notamment la survie cellulaire.

Summary

All members of the endozepine family (EZ), including the octadecaneuropeptide (ODN), derive from the *diazepam-binding inhibitor* (DBI), and are considered as the endogenous ligands of benzodiazepine receptors. In mammals, EZ are exclusively produced by astroglial cells of the CNS. The DBI sequence lacks a signal peptide, nevertheless EZ were found in extracellular medium. EZ have been also detected in human cerebrospinal fluid and their concentrations are increased in Alzheimer's disease (AD). AD is a neurodegenerative disorder characterized by beta-amyloid (βA) deposits, an intense astrogliosis, and a production of proinflammatory cytokines, such as interleukin 1β (IL-1β), and reactive oxygen species (ROS). It has been shown that βA stimulates the production of EZ from cultured astrocytes, but the mechanisms involved in βA-induced EZ release, and the role of EZ released on astrocyte activity are totally unknown. The aim of this work was to study the effect of βA on transduction pathways, to identify the receptors and the mechanisms involved in the process of EZ release, and to determine the role of EZ release induced by βA on astrocyte activity.

The first step consisted in the determination of transduction pathways and receptors activated by βA in cultured rat astrocytes. We observed that βA induced a transient stimulation of cAMP formation (10 min) and a time- and dose-dependent sustained activation of polyphosphoinositide (PIPs) turnover. The stimulatory effect of βA on [^{3}H]inositol incorporation into PIPs was totally blocked by the PLC inhibitor, U73122. The stimulatory effects of βA were mimicked by the agonist of formyl peptide receptors (FPRs) fMLF, and abrogated by the FPRs antagonist N-t-Boc-FLFLF. These results suggest that βA can modulate astrocyte activities by interacting with functional FPRs. In fact, the stimulatory effect of βA on EZ release was mimicked by two FPRs agonists. Effects of both FPRs agonists and βA peptide were totally suppressed by N-t-Boc-FLFLF. The FPRs agonists, fMLF and fMMM, stimulated EZ release in a micromolar range of concentrations, suggesting that βA

might act through the low affinity receptor FPR-like 1, in rat astrocytes. Activation of protein kinases A (PKA) and C (PKC), and a calcium influx are necessary for βA-induced EZ release. Finally, EZ secretion occurs through glyburide-sensitive ATP-binding cassette transporters.

In the second part of the study, we investigated if EZ could mimic some effects of βA on astrocyte activity. First, we showed that the stimulatory effect of βA on astrocyte proliferation can be reproduced by the FPRs agonist fMLF, and that effects of both fMLF and βA were suppressed by the FPRs antagonist, N-t-Boc-FLFLF. Similarly, ODN stimulated astrocyte proliferation after 48 h of treatment, probably by acting through two types of binding sites, one of very high-affinity (10^{-12} M) and the other of high-affinity (10^{-8} M) for ODN. In addition, ODN increased the cell number after a 12 h-period of incubation, indicating that EZ may also affect astrocyte survival.

The kinetics of the effects of βA on EZ and IL-1β release indicate that the βA stimulates first EZ release and IL-1β release few hours later. Nevertheless, preliminary results indicated that EZ could not be involved in IL-1β release since ODN (10^{-8} M) induced only a transient increase of IL-1β mRNA levels which was followed by an inhibition of IL-1β expression. In addition, IL-1β (2,5 ng) had no effect on DBI expression. These data indicate that βA independently stimulates EZ and IL-1β release.

According to the positive effect of ODN on astrocyte survival, we showed that incubation of cells with ODN (10^{-9} M) significantly reduced H_2O_2-induced ROS accumulation in cultured astrocytes, probably through an increase of both superoxyde dismutase (SOD) and catalase activities. In addition, ODN abolished the effects of H_2O_2 on mitochondrial membrane potential and caspase 3 activation. In fact, ODN reduces apoptotic cell death induced by ROS accumulation and protects astrocytes from oxidative stress damages.

In conclusion, our results indicate that βA stimulates EZ release through activation of FPRs positively coupled to AC/PKA and PLC/PKC pathways. The release of EZ from astrocytes is PKA-, PKC- and Ca^{2+}-dependant and ABC

transporters are involved in the secretory process. EZ in turn might mimic the effect of βA on astrocyte proliferation and prevent βA-induced cell death.

Liste des abréviations

ABC : *ATP Binding cassette transporter*
AC : adénylyl cyclase
ACBP : *acyl-coenzyme A-binding protein*
ADAM : *α disintegrin and metalloproteinase*
ADC : *adenine nucleotide carrier*
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNF : *activity dependent neurotrophic factor*
AICD : *APP intracellular domain*
AMPA : *2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor*
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
APH1 : α-protéine 1
APLP : *amyloid precursor like proteins*
ApoE4 : forme allélique ε4 de l'ApoE
APP : *amyloid precursor protein*
ARN : acide ribonucléique
ARNm : acide ribonucléique messager
ATP : adénosine triphosphate

βA : peptide β-amyloïde
BACE : *β-site APP cleaving enzyme*
β-CCE : β-carboline-3-carboxylate d'éthyle
BHE : barrière hémato encéphalique
BZ : benzodiazépines

$[Ca^{2+}]_i$: concentration intracellulaire de calcium
CBR : *central type benzodiazepine receptor*, récepteur des BZ de type central
CCK : cholécystokinine
CDCA : *chenodeoxycholic acid*
CHIPS : *chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus*
c-JNK : *c-Jun N-terminal Kinase*
CRH : *corticotropin-releasing hormone* ou corticolibérine
CTF/NF1 : *CAAT-binding transcription factor/nuclear factor 1*

DAG : diacylglycérol
DBI : *diazepam-binding inhibitor*
DCG : granules à corps dense
DCFH : 2',7'-dichlorofluorescein
DCFH2-DA : 5-6-Chloromethyl 2'-7'dichlorodihydrofluorescein
DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

ECE : *endothelin-converting enzyme*
ED_{50} : *effective dose at 50%*
ELP : *endozepine-like peptide*
ENP : eicosaneuropeptide (DBI_{51-70})
EPN : eicosapentaneuropeptide (DBI_{26-50})
ERK1/2 : *extracellular signal-regulated kinases 1 et 2*
EZ : endozépines

FDA : diacétate de fluoresceine
FGF-β : *fibroblast grouth factor β*
FLIPr : *FPRL1 inhibitory protein*
fMLF: *N-fomyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine*
FPRs : famille des *formyl peptide receptor*
FPRL1/2 : *formyl peptide receptor like 1 / 2*

GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GABA : acide γ-aminobutyrique
GDNF : *glial-derived neurotrophic factor*
GDP: Guanosine diphosphate
GFAP : *glial fibrillary acidic protein*
GnRH : *gonadotropin-releasing hormone* ou gonadolibérine
GPCR : *G protein-coupled receptor*
GRE : *glucocorticoid-response element*
GTP : Guanosine triphosphate

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HEPES : acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
HNF : *hepatocyte nuclear factor*

IBMX : isobutylméthylxanthine
icv : intracérébroventriculaire
IDE : *insulin degrading enzyme*
IFN-γ : *interferon-γ*
IL-1β : interleukine 1β
IL-8 : interleukine 8
IP3 : inositol triphosphate

LCR : liquide céphalo-rachidien
LDH : lactate déshydrogénase

MA : maladie d'Alzheimer
MA-DBI : *membrane-associated protein-DBI*
MAPK : *mitogen-activated protein (MAP) kinase*
mGlu : *G protein-coupled metabotropic glutamate receptor*

NH_4^+ : ion ammonium
NMDA : *N-methyl-D-aspartate glutamate*
NF-κB : *nuclear factor-κB*
NO : *nitric oxide ou* monoxyde d'azote
NOS : *nitric oxide synthase*
N-t-Boc-FLFLF : *N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-leucyl phenylalanine*

ODN : *octadecaneuropeptide*, DBI_{33-50}
OP : octapeptide
ODN-LI : *ODN-like immunoreactivity*

PACAP : *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide*
PAP7 : *peripheral-type benzodiazepine receptor- and protein kinase A-associated protein 7*
PBS : *Phosphate Buffered Saline,* tampon phosphate
PBP10 : *cell-permeable rhodamine B-coupled polyphosphoinositide-binding peptide*
PEG : polyéthylène glycol
PEN2 : *presenilin enhancer-2*
PEP: prolyl-endopeptidase
PIPs : polyphosphoinositides

PIP2 : phosphoinositol-4,5-bisphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PIP3Kγ : phosphoinositide 3 kinase γ
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLA2 : phospholipase A2
PLC : phospholipase C
PLCβ2 : phospholipase C béta 2
PLD : phospholipase D
POMC : proopiomélanocortine
PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*
PRAX-1 : *peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1*
PrP106-126 : protéine prion
PS1 et 2 : présénilines 1 et 2
PTx : toxine pertussique
QPCR : *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

R-A1 : récepteurs A1 de l'adénosine
RAGE : *receptor for advanced glycation end products*
R-BZ : récepteurs des BZ
R-GABA$_A$: récepteur de l'acide γ-aminobutyrique de type A
RIA : *radio immunologic assay* ou dosage radioimmunologique
ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
R-P2X et Y : récepteurs purinergiques 2X et 2Y

SAA : *serum amyloid A*
SDF1 : *stromal cell-derived factor 1*
SDS : *sodium dodecyl sulfate solution*
siRNA : *short interfering RNA*
SLMV : *synaptic-like microvesicles*
SNARE : *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*
SNC : système nerveux central
SOD : superoxyde dismutase
SP1 : *specific protein 1*
SR : *scavenger receptor*
SR-A : *scavenger receptor type A*
SR-B : *scavenger receptor type B*

SRCL : *scavenger receptor with C-type lectin*
SRE : *sterol regulatory element-like*
SREBP-1 : *sterol regulatory element-binding protein 1*
SR-MARCO : *macrophage receptor with collagenous structure*
STAT3 : *signal transducer and activator of transcription 3*
SVF : sérum de veau foetal

TACE : *tumor necrosis factor α converting enzyme*
TCA : acide trichloroacétique
TFA : acide trifluoroacétique
TGF-α : *transforming growth factor-α*
TGF-β : *transforming growth factor-β*
TNF-α : *tumor necrosis factor-α*
TSPO : *translocator protein*
TTN : triakontatétraneuropeptide, DBI_{17-50}

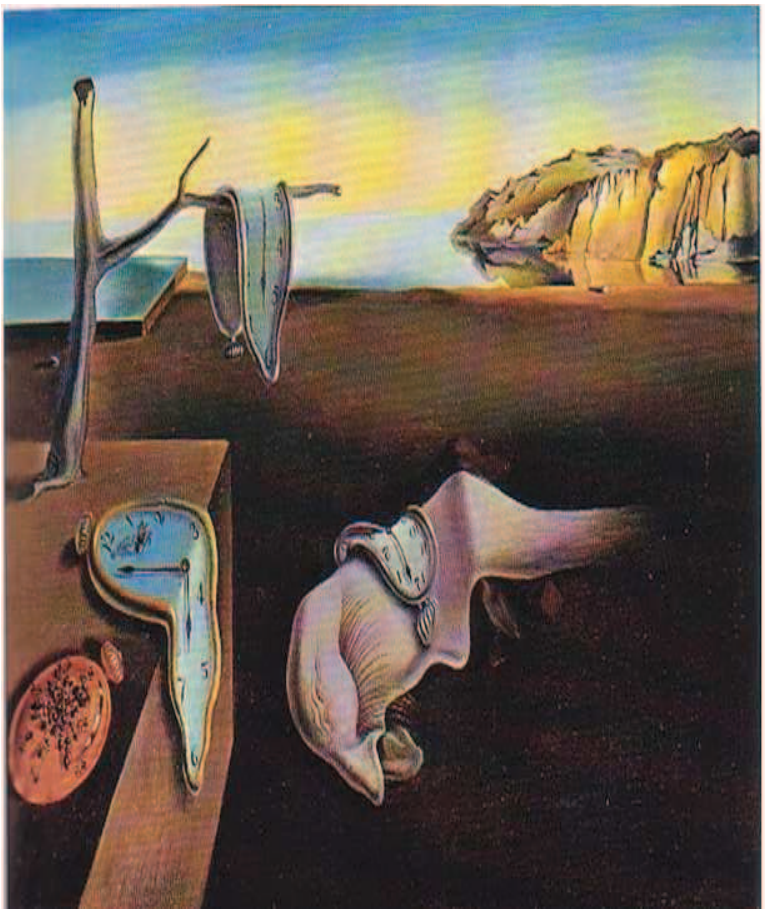
VDAC : *voltage-dependent anionic channel*

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la structure du gène codant le DBI chez le rat ... ...

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des gliotransmetteurs ... ...



La Persistance de la mémoire (1931)

Introduction

I. Les endozépines

1. Historique

La découverte des endozépines (EZ) commence par celle des benzodiazépines (BZ) qui sont des molécules de synthèse dont les propriétés sédatives, myorelaxantes, anticonvulsivantes ont été fortuitement découvertes par Randall dans les années 60 (Randall 1960). Par la suite, la présence de sites de liaison spécifiques des BZ a été mis en évidence dans le SNC (Mohler & Okada 1977) et a conduit tout naturellement plusieurs équipes à rechercher le(s) ligand(s) naturel(s) des récepteurs des BZ (R-BZ). Plusieurs composés ont été proposé dont les bases puriques (Asano & Spector 1979), la nicotinamide (Mohler *et al.* 1979) et la tribuline (Clow *et al.* 1983, Glover *et al.* 1983) mais elles ont été rapidement écartées du fait de leur affinité millimolaire pour les R-BZ et de leur faible concentration tissulaire. La β-carboline-3-carboxylate d'éthyle (β-CCE), isolée à partir d'urine et de cerveau humain, (Tenen & Hirsch 1980, Braestrup *et al.* 1980) présente une affinité nanomolaire pour les R-BZ ; cependant, il a été démontré ultérieurement qu'elle n'était qu'un artéfact généré au cours du processus d'extraction. Enfin, le diazépam et le N-desméthyldiazépam, principal métabolite des BZ, ont été retrouvé dans le cerveau (Medina *et al.* 1993), la surrénale (Wildmann *et al.* 1987) ainsi que dans le plasma et le lait des mammifères (Wildmann *et al.* 1986, Dencker & Johansson 1990, Avallone *et al.* 1998), suggérant que des BZ pourraient être naturellement produites dans le règne animal, mais ceci n'a pas pu être démontré jusqu'à présent. De plus, le fait que des BZ puissent être synthétisées par les bactéries et les champignons (Klotz 1991) d'une part, et qu'elles soient présentes dans de nombreux végétaux utilisés dans l'alimentation humaine d'autre part, serait plutôt en faveur d'un apport nutritionnel de ces molécules (Wildmann 1988). Depuis sa découverte en 1983 par Costa et ses collaborateurs, à partir d'homogénats de cerveau de rat (Guidotti *et al.* 1983, Costa *et al.* 1983), le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) reste le seul candidat au titre de ligand endogène des R-BZ. Le DBI et ses dérivés sont actuellement regroupés sous le nom d'endozépines ou EZ.

2. Structure du gène

Le clonage et le séquençage de l'ADN complémentaire (ADNc) codant le DBI a été réalisé pour la première fois à partir du cerveau de rat par Mocchetti et ses collaborateurs en 1986 (Mocchetti *et al.* 1986). Depuis, le DBI a été cloné dans plusieurs tissus et chez divers mammifères à savoir le cerveau, la surrénale, le foie et les testicules chez l'homme (Gray *et al.* 1986, Gersuk *et al.* 1995), le foie et le cerveau chez le bœuf (Webb *et al.* 1987), le foie chez le chien (Chen & Liu 1998) ou encore le cerveau, le foie et les reins chez les rongeurs (Owens *et al.* 1989, Mocchetti & Santi 1991). Le séquencage de l'ADNc codant le DBI a également été réalisé chez plusieurs vertébrés infra mammaliens tels que la grenouille (Lihrmann *et al.* 1994), le canard (Rose *et al.* 1994) et la carpe (Chang & Tsai 1996), et chez des invertébrés comme la drosophile (Kolmer *et al.* 1994), les chenilles de papillon (Snyder & Feyereisen 1993, Matsumoto *et al.* 2001, Liu *et al.* 2005, Wang *et al.* 2008) et le moustique (Sieglaff *et al.* 2005). Le DBI a également été cloné chez deux végétaux, l'agave et l'arabidopsis (Leung *et al.* 2004, Guerrero *et al.* 2006), ainsi que chez des levures (Rose *et al.* 1992, Knudsen *et al.* 1994). La présence du gène DBI dans l'ensemble du monde vivant indique donc qu'il joue un rôle biologique important.

L'analyse par *Southern-blot* de l'ADN génomique chez l'homme (Gray *et al.* 1986), le rat (Mocchetti *et al.* 1986) et la souris (Owens *et al.* 1989), révèle l'existence de plusieurs gènes codant le DBI dont un seul est fonctionnel. Chez l'homme, le gène actif est localisé sur le bras long du chromosome 2 (2q12-21) et les gènes inactifs ou pseudogènes sont situés sur les chromosomes 5, 6, 11 et 14 (DeBernardi *et al.* 1988, Todd & Naylor 1992). Le gène du DBI chez l'homme, le rat et le canard est organisé en quatre exons (Mandrup *et al.* 1992, Rose et al. 1994, Nitz *et al.* 2005) (Fig. 1), alors que chez la drosophile, il ne comporte que trois exons (Kolmer *et al.* 1994) et que chez la levure, il est dépourvu d'intron (Rose *et al.* 1992).

L'analyse de la région promotrice révèle qu'elle est localisée au sein d'îlots riches en nucléotides C et G, qu'il existe plusieurs sites d'initiation et qu'elle ne possède pas de boîtes TATA et CCAAT (Mandrup et al. 1992, Swinnen *et al.* 1996a, 1996b), sites classiques d'initiation de la transcription. De plus, le DBI présente plusieurs sites consensus pour des facteurs de transcription constitutivement actifs tels

que la *specific protein 1* (SP1) ou le *CAAT-binding transcription factor/nuclear factor 1* (CTF/NF1) (Mandrup et al. 1992, Kolmer *et al.* 1993, Elholm *et al.* 1996).

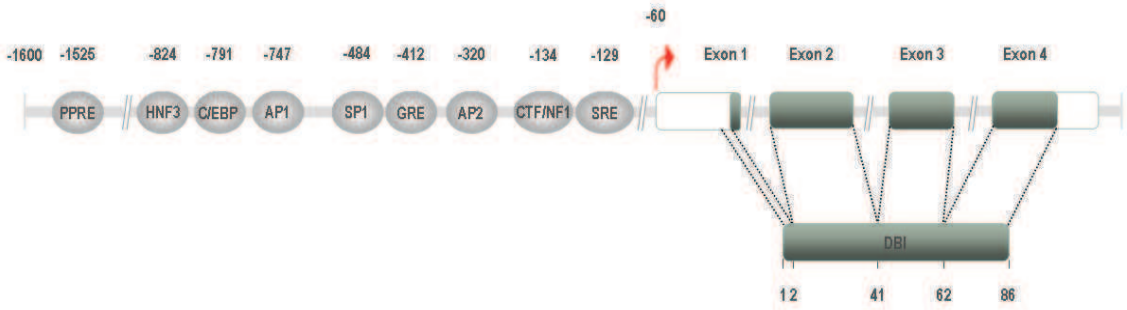


Figure 1 : Représentation schématique de la structure du gène codant le DBI chez le rat. Les régions régulatrices de la transcription sont représentées en gris avec leur position respective par rapport au site d'initiation de la transcription symbolisée par la flèche rouge. Les régions codant le DBI sont indiquées en gris.

Tous ces éléments ont conduit à classer initialement le DBI comme un gène domestique. Toutefois, d'autres sites susceptibles de lier des facteurs de transcription, dont l'expression est régulée et/ou tissu spécifique, ont été identifiées dans la région promotrice du gène, à savoir des séquences de type *glucocorticoid-response element* (GRE) (Kolmer *et al.* 1993), *sterol regulatory element-like* (SRE) (Swinnen *et al.* 1998), *hepatocyte nuclear factor* (HNF) et *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) (Elholm et al. 1996, Sandberg *et al.* 2005) (Fig. 1). De plus, le niveau d'expression du DBI varie d'un type cellulaire à un autre (Mocchetti *et al.* 1986). Enfin le taux des ARN messagers (ARNm) codant le DBI est diminué par la privation de nourriture et la castration (Bhuiyan *et al.* 1995, Compère *et al.* 2006, Compère *et al.* 2010), alors qu'il est augmenté suite à une stimulation vestibulaire (Barmack *et al.* 2004). Il a également été démontré que l'insuline stimule l'expression du gène codant le DBI dans une lignée d'adipocytes murins, les cellules 3T3-L1 (Hansen *et al.* 1991) et dans les adipocytes de rat en culture primaire (Sandberg *et al.* 2005), et que les androgènes augmentent les ARNm du DBI dans la lignée cellulaire LNCaP issue d'adénocarcinome humain (Swinnen *et al.* 1994, 1996b). L'ensemble de ces observations indique donc que le gène du DBI ne peut plus être rangé dans la catégorie des gènes domestiques.

3. Séquence, maturation et structure tridimensionnelle du DBI

La séquence complète du DBI, déterminée par séquençage peptidique et/ou clonage, révèle que selon les espèces, la taille de cette protéine hydrophile varie entre 86 et 104 acides aminés. Chez l'homme, il existe 3 formes de 86, 88 et 104 acides aminés (Nitz *et al.* 2005). La protéine de 88 acides aminés diffère de la forme la plus courte par ses 4 acides animés N-terminaux et résulte de la transcription du gène à partir d'un promoteur alternatif (Nitz *et al.* 2005), tandis que la forme longue, qui présente une extension de 18 résidus en position N-terminale, résulte d'un épissage alternatif du transcrit primaire (Kolmer *et al.* 1995). Les ARNm codant ces deux protéines sont majoritairement exprimés dans le foie et/ou le tissu adipeux (Nitz *et al.* 2005).

La comparaison des séquences peptidiques de différents isoformes montre que le DBI a été relativement bien conservé au cours de l'évolution (Fig. 2). On retrouve ainsi, chez plusieurs espèces de vertébrés, des homologies de séquence allant de 65 à 93% d'identité. Le taux d'homologie entre le DBI de rat et celui de la levure, bien que plus faible, est néanmoins de 48%. Par ailleurs, le DBI de rat présente 92% d'homologie de structure avec l'*endozepine-like-peptide* (ELP) dont l'ADNc a été cloné à partir des testicules de rongeurs (Pusch *et al.* 1999) et de primates (Ivell *et al.* 2000), 53% avec la partie C-terminale de la *membrane-associated protein-DBI* (MA-DBI), un polypeptide transmembranaire de 533 acides aminés identifié dans le cerveau de bœuf (Todaro *et al.* 1991), et 30% avec la *peripheral-type benzodiazepine receptor- and protein kinase A-associated protein 7* (PAP7), une protéine récemment clonée chez l'homme (Liu *et al.* 2003b) et la souris (Liu *et al.* 2003a) à partir de testicules.

La séquence du DBI de rat comporte de nombreux résidus lysine (positions 16, 32, 50, 52, 54, 62, 66, 67 et 83) et seulement deux doublets/triplets basiques, localisés aux extrémités N- (13-14) et C-terminale (81-82-83).

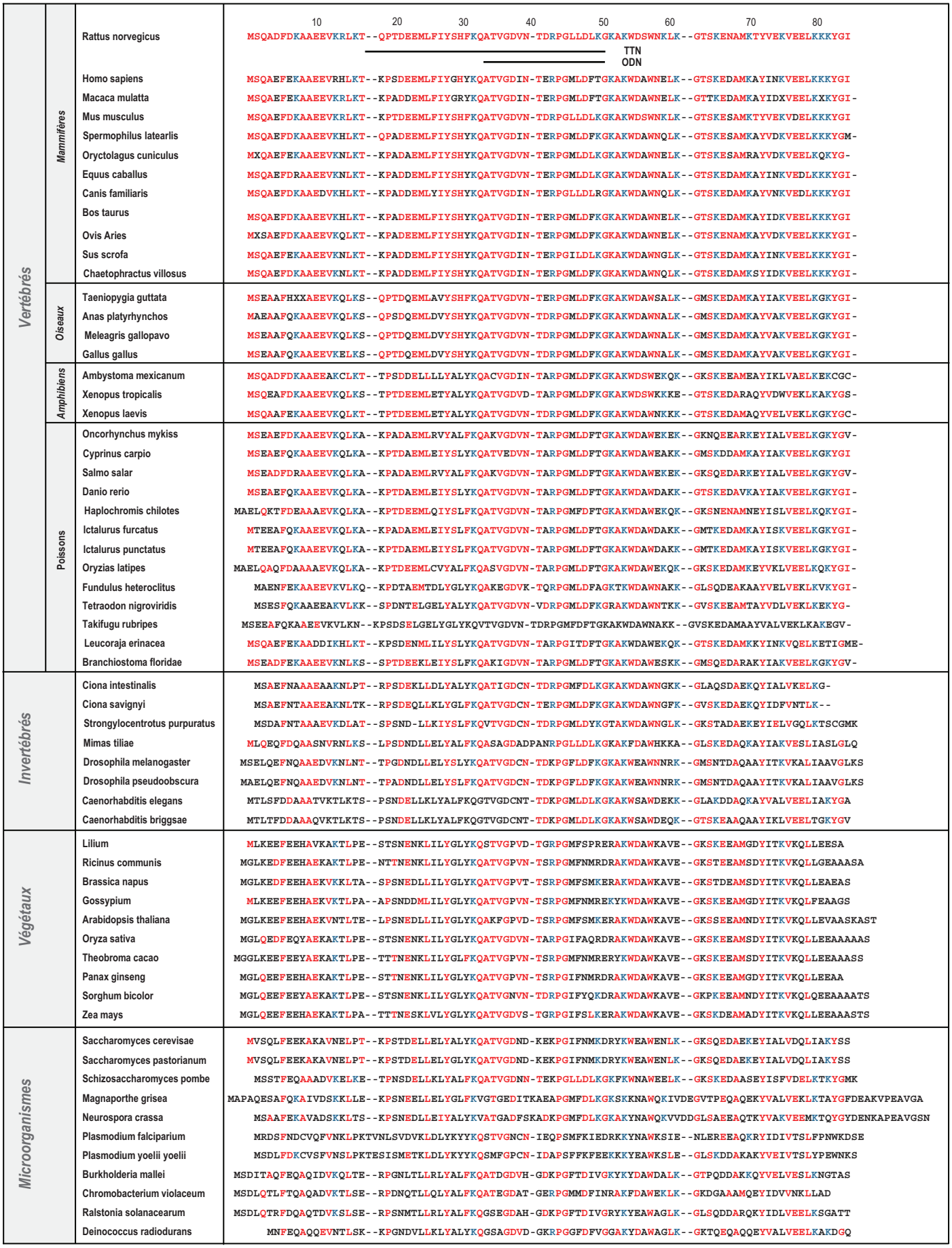


Figure 2 : Comparaison des séquences de DBI de plusieurs espèces. Les acides aminés conservés par rapport à la séquence de rat sont représentés en rouge et les résidus basiques conservés en bleu. La séquence correspondant au TTN (DBI_{17-50}) et à l'ODN (DBI_{33-50}) est indiqué sur la figure.

Plusieurs fragments du DBI ont été identifiés à partir du cerveau de rat et notamment le triakontatétraneuropeptide (TTN, DBI_{17-50}) et l'octadécaneuropeptide (ODN, DBI_{33-50}) (Ferrero *et al.* 1986, Slobodyansky *et al.* 1989) résultant de clivage au niveau des lysines en position 16, 32 et 50.

Les lysines isolées sont peu accessibles aux prohormones convertases (Seidah *et al.* 1998) et la nature des enzymes impliquées dans cette maturation est actuellement inconnue. D'autres fragments ont également été isolés : le triakontaseptaneuropeptide (DBI_{39-75}) et l'eicosapentaneuropeptide (EPN, DBI_{26-50}) à partir de cerveaux de rat (Slobodyansky et al. 1989, 1994), l'eicosaneuropeptide (ENP, DBI_{51-70}) dans le cerveau humain (Guarneri *et al.* 1990), ainsi que les fragments DBI_{32-86} et DBI_{35-86} à partir d'extraits d'intestins de porc (Agerberth *et al.* 1993) et de poulet (Chen *et al.* 1997). Tous ces fragments sont obtenus par clivage au niveau de résidus autres que les résidus lysine ce qui suggère l'implication de plusieurs types d'enzymes dans la maturation du DBI. A l'inverse, une étude récente suggère que la prolyl-endopeptidase (PEP) est impliquée dans la dégradation de l'un des fragments du DBI, ainsi en agissant au niveau des séquences Ala^2-Thr^3 et Val^4-Gly^5 de l'ODN, la PEP conduit à deux produits inactifs, l'ODN_{3-18} et l'ODN_{5-18} (Leprince *et al.* 2006).

La structure tridimensionnelle du DBI de bœuf, obtenue par résonance magnétique nucléaire, montre l'existence de quatre hélices α : H1 (Glu^4-Leu^{15}), H2 (Glu^{22}-Thr^{35}), H3 (Lys^{52}-Glu^{60}) et H4 (Asp^{68}-Gly^{85}) (Andersen & Poulsen 1993) (Fig. 3). Le TTN conserve l'hélice H2 du DBI (Berkovich *et al.* 1990) alors que l'ODN, correspond à une région non structurée du précurseur située entre les hélices H2 et H3. Enfin, l'EPN, dont les dix résidus N-terminaux correspondent à l'extrémité C-terminale de l'hélice H2, ne présente aucune structure hélicoïdale (Berkovich *et al.* 1990). Des expériences de modélisation moléculaire ont montré l'importance de certains résidus, neuf résidus situés dans les régions hélicoïdales et six dans les zones de jonction, dans le maintien de la structure et des fonctions du DBI (Kragelund *et al.* 1999).

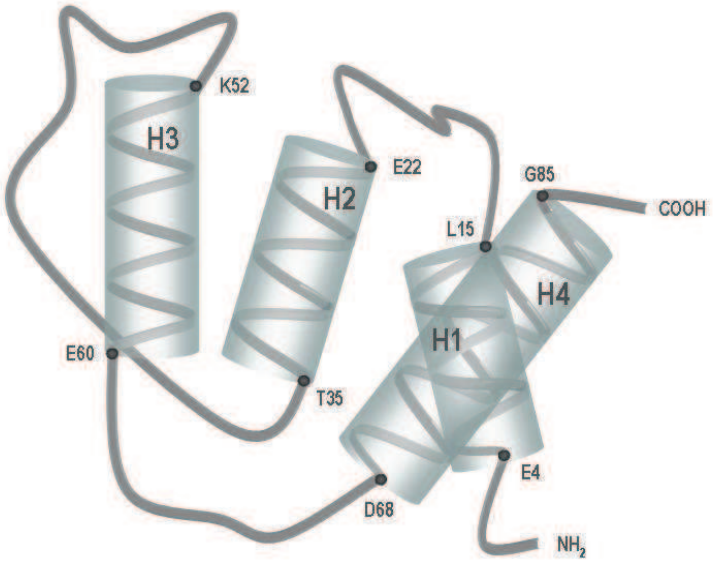


Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle du DBI de bœuf. H1, H2, H3 et H4 représentent les 4 hélices α. La position des acides aminés dont la présence est indispensable à la structuration du DBI est indiquée par un point.

4. Localisation tissulaire et cellulaire des EZ dans le SNC

Des études immunohistochimiques et d'hybridation *in situ* ont montré que les EZ sont largement distribuées dans le SNC des tétrapodes, néanmoins les concentrations les plus importantes ont été mesurées dans l'hippocampe, le cortex, le cervelet et le bulbe olfactif de rat (Alho *et al.* 1985) (Fig. 4). L'analyse de l'immunoréactivité par chromatographie suggère la présence d'EZ, majoritairement sous forme d'ODN et de TTN, dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le striatum, et sous forme de DBI dans l'hypothalamus (Malagon *et al.* 1993). Quelques travaux indiquent la présence d'EZ dans les neurones de l'hippocampe, du cervelet et du cortex de rat (Alho et al. 1985, Ferrarese *et al.* 1987). Néanmoins, la grande majorité des travaux indiquent que les EZ sont spécifiquement produites par les cellules astrogliales. Ainsi, chez les mammifères, les EZ ont été détectées dans les astrocytes dans de nombreuses régions incluant le cortex, l'hippocampe, l'amygdale et le bulbe olfactif (Tonon *et al.* 1990, Alho *et al.* 1994, Yanase *et al.* 2002). On les retrouve également dans d'autres cellules astrogliales dans l'hypothalamus (Tonon et al. 1990, Malagon et al. 1993, Young 1994), l'hypophyse (Tong et al. 1991) et le cervelet (Tonon et al. 1990, Vidnyanszky *et al.* 1994, Yanase et al. 2002). Les EZ sont également exprimées dans les tissus périphériques par des cellules spécialisées et

notamment les cellules gliales et les cellules stéroïdogènes. En effet, les EZ sont retrouvées au niveau des cellules de Schwann du nerf olfactif, du nerf optique, du nerf vague et du nerf sciatique (Lacor *et al.* 1996, Yanase et al. 2002). Des composés apparentés aux EZ ont aussi été détectés dans les cellules stéroïdogènes de la surrénale (Alho *et al.* 1991), de l'ovaire (Toranzo *et al.* 1994) et du testicule (Duparc *et al.* 2003). Enfin, des quantités assez importantes ont été mesurées dans les cellules exocrines des glandes mammaires (Tong *et al.* 1991a, Hansen *et al.* 2008), dans les cellules sécrétrices de la prostate (Pelletier et al., 1991), dans les hépatocytes du foie ainsi que dans les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal (Yanase *et al.* 2001) et du rein (Schoemaker *et al.* 1983). Néanmoins, les concentrations détectées dans les tissus périphériques restent nettement inférieures à celles mesurées au niveau du SNC.

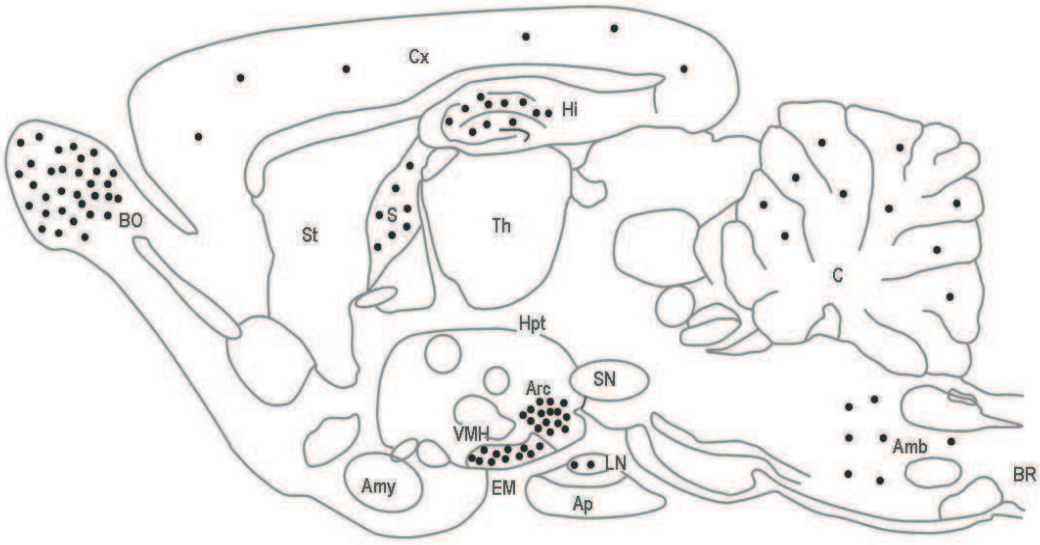


Figure 4 : Représentation schématique d'une section parasagitale d'un cerveau de rat indiquant la distribution cellulaire des EZ. La densité des points (•) est proportionnelle à la concentration des EZ. Amb, noyau ambigu - Amy, amygdale - Ap, antéhypophyse - Arc, noyau arqué de l'hypothalalmus - BR, bulbe rachidien - BO, bulbe olfactif - C, cervelet - Cx, cortex cérébral - EM, éminence médiane - Hi, hippocampe - Hpt, hypothalamus - LN, lobe neural de l'hypophyse - S, septum - SN, substance noire - St, striatum - Th, thalamus - VMH, noyau ventromédian de l'hypothalamus. D'après Tonon *et al.* 2006.

5. Récepteurs des EZ

Initialement, les EZ ont été considérées comme les ligands endogènes des R-BZ. Néanmoins, des travaux plus récents montrent que les EZ sont capables d'interagir avec un autre récepteur de type métabotropique.

5.1. Récepteurs des BZ de type central

Les premières études de liaison visant à caractériser le R-BZ au niveau du SNC montrent que leur site de fixation est étroitement associé à celui de l'acide γ-aminobutyrique de type A (R-$GABA_A$) et lie spécifiquement des BZ telles que le clonazepam et le flumazénil (Asano & Ogasawara 1980, Sieghart & Moehler 1982). Ces récepteurs sont appelés ***récepteurs des BZ de type central (CBR).*** Une étude réalisée sur des cellules granulaires de cervelet a montré que l'ODN pouvait déplacer la liaison du [^{3}H]flumazénil, et que son affinité est 20 fois plus élevée que celle du TTN (Ferrero et al. 1986). Le clonage du R-$GABA_A$ confirme que ce dernier et le CBR font partie d'un complexe pentamérique de 300 kDa formant un canal chlore (Schofield *et al.* 1987, Sieghart 2000). Actuellement, 8 classes de sous unités ont été identifiées chez les mammifères (α, β, γ, δ, ε, π, θ, ρ) et différents isoformes du récepteur ont pu être clonés (α1-6, β1-3, γ1-3, ρ1-3) (Schofield et al. 1987, Sieghart 2000). Parmi toutes les combinaisons possibles, celles de type 2α2β1γ sont les plus représentées dans le SNC (Tretter *et al.* 1997) (Fig. 5). La présence des sous-unités α et γ est indispensable à la liaison des BZ au CBR (Amin *et al.* 1997), mais en fonction de la nature de ces sous-unités le profil pharmacologique du récepteur et son affinité pour les BZ peut varier. Ainsi, la présence de la sous unité α1 engendre un récepteur de haute affinité pour les BZ alors que les sous unités α2, α3 ou α5 caractérisent des récepteurs de basse affinité (Pritchett *et al.* 1989, Sieghart 1989). Les sous unités α4 et α6 quant à elles confèrent une insensibilité au diazépam et au clonazepam (Hadingham *et al.* 1996, Khan *et al.* 1996). A l'inverse des BZ, les EZ atténuent la réponse des cellules au GABA (Tonon *et al.* 1989, Bormann 1991, Louiset *et al.* 1993), indiquant que ces molécules, à la manière des β-carbolines, se comportent comme des agonistes inverses des CBR (Mehta & Ticku 1989, Rogers *et al.* 1994).

Néanmoins, sur les complexes possédant une sous-unité γ_1, le diazépam et les β-carbolines se comportent comme des agonistes au même titre que le clonazépam (Bormann & Kettenmann 1988, Puia *et al.* 1991). De même, sur les astrocytes en culture qui expriment principalement l'isoforme γ_1 (Laurie *et al.* 1992, Bovolin *et al.* 1992), l'ODN potentialise l'effet du GABA sur la réplication de l'ADN (Gandolfo *et al.* 1999). Outre les BZ et les EZ, l'éthanol, les barbituriques, divers stéroïdes ainsi que certains cations di- ou trivalents peuvent moduler l'activité des R-$GABA_A$/CBR (Asano & Ogasawara 1980, Hevers & Luddens 1998) (Fig. 5).

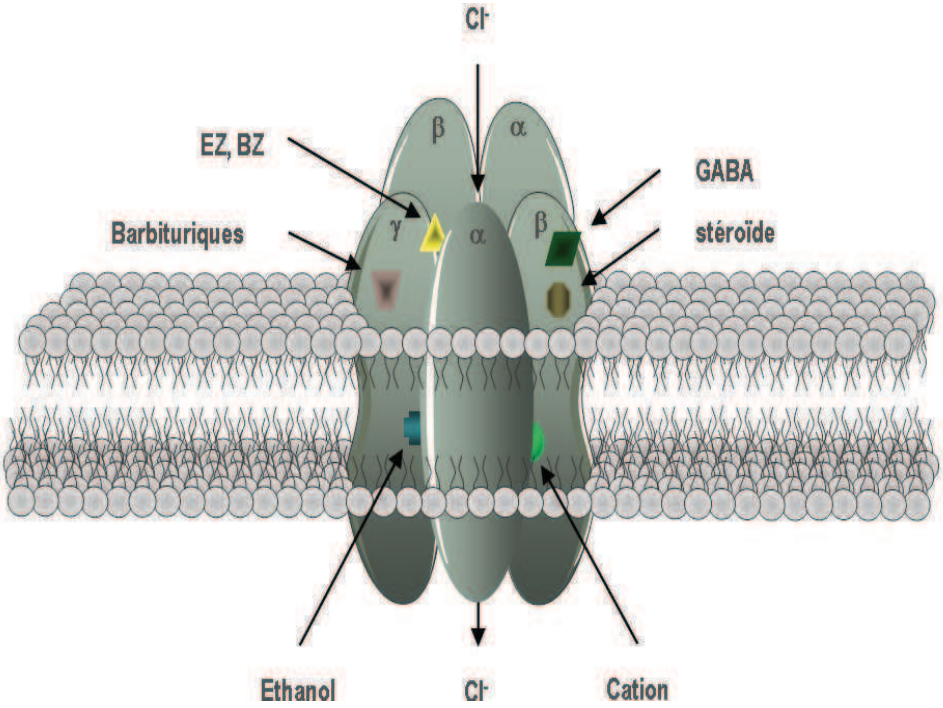


Figure 5 : Représentation schématique du complexe macromoléculaire R-$GABA_A$/CBR/canal chlore. Les sites de liaison du GABA ( ), des BZ/EZ ( ) et des autres agents modulateurs du R-$GABA_A$ sont indiqués.

Des études de liaison sur coupes de tissus ont montré que les CBR sont largement distribués dans le SNC (Benavides *et al.* 1993). Une forte densité des récepteurs a notamment été détectée dans le cortex (Niddam *et al.* 1987, Duncan *et al.* 1995), le striatum (Waldvogel *et al.* 1999), le système limbique (Onoe *et al.* 1996), dans l'hypothalamus (Tavolaro *et al.* 1993) et dans le cervelet (Benavides *et al.* 1993). Au niveau cellulaire, ces récepteurs sont majoritairement exprimés par les neurones (Nicholson *et al.* 1992) mais leur présence a également été décrite sur les cellules gliales et notamment sur les astrocytes (Talwar & Sher 1987, Bureau *et al.* 1995). En

dépit de leur appellation, les CBR sont également retrouvés dans certains tissus périphériques comme l'hypophyse (Berman *et al.* 1994), les glandes surrénales (Parramon *et al.* 1994), les glandes salivaires (Yamagishi & Kawaguchi 1998), les gonades et l'intestin (Akinci & Schofield 1999), néanmoins leur densité reste beaucoup plus faible que celle retrouvée au niveau du SNC.

5.2. Récepteurs des BZ de type périphérique

Plusieurs travaux ont montré l'existence de sites de liaison pour le diazépam dans les tissus périphériques (Braestrup *et al.* 1977), mais ceux-ci présentaient une pharmacologie différente de celle du CBR. Ainsi, ces récepteurs ne reconnaissent ni le flumazénil ni le clonazépam (Schoemaker *et al.* 1983) mais lient spécifiquement le 4'-chlorodiazépam (Ro5-4864) (Marangos *et al.* 1982) ainsi que des composés de classe chimique différente des BZ comme les isoquinolines carboxamides (PK11195 et PK14105) (Awad & Gavish 1991) et les imidazopyridines (Anzini *et al.* 1996). Cet autre récepteur des BZ dit ***de type périphérique*** a été récemment renommé *translocator protein* (TSPO) (Papadopoulos *et al.* 2006, pour revue). La structure du TSPO a été déterminée à partir de fractions mitochondriales de surrénales, de pancréas et d'ovaires de rat. Le récepteur a ensuite été cloné chez différentes espèces dont l'homme (Riond *et al.* 1991), le bœuf (Parola & Laird 1991) et la souris (Garnier *et al.* 1994b). Le TSPO est une protéine à 5 domaines transmembranaires formant un canal pour le cholestérol et pouvant être présente sous forme de di- ou multimères (Papadopoulos et al. 2006, Korkhov *et al.* 2010, pour revue). Il est également associé à un canal ionique voltage dépendant (*voltage-dependent anionic channel,* VDAC) de 32 kDa, nécessaire à la fixation des EZ sur les TSPO (Riond *et al.* 1989) et à un transporteur de nucléotides à adénine (*adenine nucleotide carrier*, ADC) de 30 kDa (McEnery *et al.* 1992). Deux autres protéines, clonées chez l'homme et les rongeurs, peuvent aussi s'associer au TSPO à savoir la *peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1* ou PRAX-1 (Galiegue *et al.* 1999) et PAP7 (Li *et al.* 2001) qui favorise la phosphorylation du TSPO par la protéine kinase A (PKA) (Lacapère & Papadopoulos 2003, Ostuni & Lacapère 2005) (Fig. 6). Le TTN est généralement considéré comme le ligand spécifique des TSPO (Berkovich *et al.* 1990). En effet, une

triade particulière d'acides aminés (Met30, Leu31 et Phe33), présente au niveau de la séquence du DBI et du TTN, et absente de la séquence de l'ODN, jouerait un rôle déterminant dans la liaison de ces peptides sur le TSPO (Cinone *et al.* 2000).

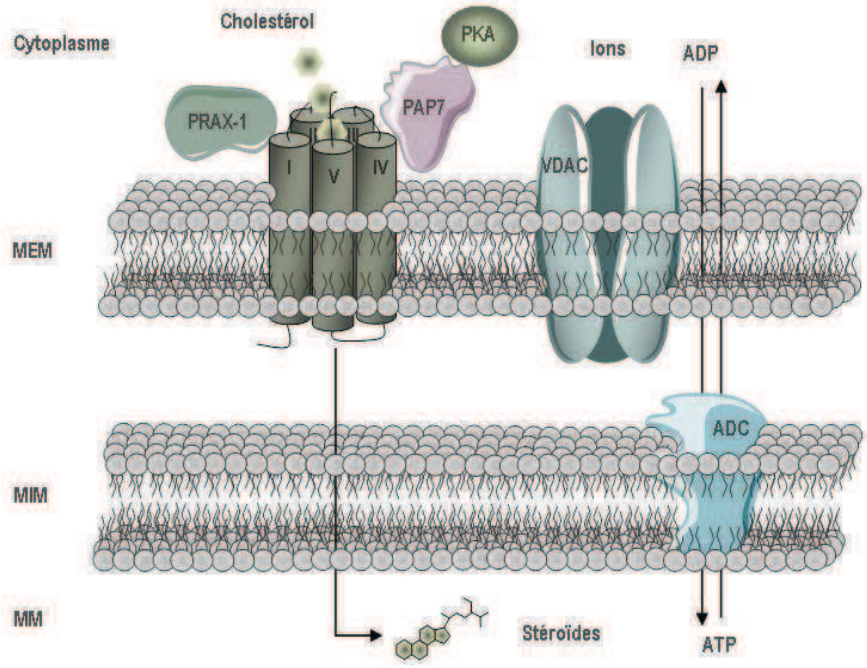


Figure 6 : Représentation schématique du TSPO. Le TSPO est une protéine à 5 domaines transmembranaires (I-V), pouvant être associée à des protéines membranaires ou cytosoliques. ADC, adenine nucleotide carrier - ATP : adénosine triphosphate - MEM, membrane externe mitochondriale - MIM, membrane interne mitochondriale - MM, matrice mitochondriale - PAP7, *peripheral-type benzodiazepine receptor and protein kinase A-associated protein 7* - PRAX-1, *peripheral benzodiazepine receptor-associated protein 1* - VDAC, *voltage-dependent anionic channel*.

Les TSPO sont fortement exprimés dans de nombreux tissus et organes périphériques tels que les glandes salivaires, la surrénale, les gonades, le cœur, les poumons, la rate, le foie et le pancréas (De Souza *et al.* 1985, Anholt *et al.* 1985), néanmoins, ils sont également présents dans plusieurs régions du SNC incluant notamment le bulbe olfactif, l'hypothalamus, le cervelet et les plexus choroïdes (Benavides *et al.* 1983, Anholt *et al.* 1984) mais leur niveau d'expression est bien inférieur à celui mesuré au niveau des organes et tissus périphériques (Braestrup & Squires 1977, Gallager *et al.* 1981). En périphérie, les TSPO sont exprimés par plusieurs types cellulaires, les cellules corticosurrénaliennes (Krueger & Papadopoulos 1990), les cellules de Leydig (Papadopoulos *et al.* 1990) et les cellules de Schwann

(Lacor *et al.* 1996). Inversement, les TSPO sont exclusivement retrouvés dans les cellules gliales du SNC (Itzhak *et al.* 1993). Dans tous les cas, les TSPO sont principalement présents au niveau de la membrane mitochondriale externe où ils joueraient un rôle certain dans le transport de cholestérol et la biosynthèse de stéroïdes. Leur présence a aussi été détectée au niveau de la membrane plasmique des cellules surrénaliennes (Oke *et al.* 1992, Woods *et al.* 1996) et des cellules hépatiques (Woods *et al.* 1996), ainsi que dans le noyau des lymphocytes (Rago *et al.* 1990), des cellules cardiaques tumorales MDA-231 (Hardwick *et al.* 1999) et des cellules gliales au cours de l'astrogliose réactionnelle (Kuhlmann & Guilarte 2000).

5.3. Récepteur métabotropique

Des travaux plus récents suggèrent que les EZ sont les ligands endogènes de récepteurs n'appartenant pas à la famille des R-BZ. Ainsi, dans les astrocytes de rat (Lamacz *et al.* 1996), les neutrophiles humains (Cosentino *et al.* 2000) et les cellules surrénaliennes de grenouille (Lesouhaitier *et al.* 2000), les effets des EZ ne sont bloqués ni par les antagonistes spécifiques des CBR ni par ceux des TSPO (Gandolfo *et al.* 1997, Lesouhaitier *et al.* 1998, Cosentino et al. 2000). D'autre part, l'ODN stimule le métabolisme des polyphosphoinositides (PIPs) dans les astrocytes de rat, *via* une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTx) (Patte *et al.* 1995), indiquant que dans ce modèle, l'ODN est le ligand naturel d'un récepteur couplé à une phospholipase C (PLC) *via* une protéine $G_{i/0}$. Le TTN quant à lui interagit avec des récepteurs positivement couplés à l'adénylyl cyclase (AC) *via* une protéine G_s (Lesouhaitier *et al.* 2000), dans les cellules médullosurrénaliennes de grenouille, ou à une PLC *via* une protéine $G_{i/0}$ (Marino *et al.* 2003) dans les neutrophiles humains. De plus, l'étude des relations structure-activité de l'ODN montre que l'octapeptide C-terminal de l'ODN (OP) est le plus court fragment capable de mimer les effets du peptide dans les astrocytes (Leprince *et al.* 1998). A l'inverse, l'OP n'a aucun effet ni sur la liaison du [^{3}H]flumazénil dans les cellules granulaires du cervelet ni sur la liaison du [^{3}H]PK11195 dans les astrocytes de rat (Guidotti 1991). L'ensemble de ces données suggèrent donc l'existence d'un troisième site de liaison pour les EZ

fonctionnellement, pharmacologiquement et probablement structuralement distinct des CBR et des TSPO.

6. Rôles physiopathologiques des EZ

6.1. Effets comportementaux des EZ

Les premières études comportementales menées avec les EZ révèlent que l'administration centrale de DBI, de TTN ou d'ODN entraîne des réactions ***pro-agressive*** (Kavaliers & Hirst 1986), ***pro-conflictuelle*** (Costa et al. 1983, Guidotti et al. 1983, Ferrero *et al.* 1986a) et induit un comportement d'***anxiété*** chez le rat (De Mateos-Verchere *et al.* 1998). Ces effets sont bloqués par le flumazenil (ODN et DBI) ou le PK11195 (TTN), indiquant que les EZ agissent *via* l'activation des R-BZ. Il a également été observé que l'interaction du DBI ou de l'ODN avec les CBR réduit la période de ***sommeil*** induite par une injection de pentobarbital (Dong *et al.* 1999). Injecté par voie intracérébroventriculaire (icv) chez la souris, l'ODN bloque la ***prise de boisson*** et augmente l'aversion des animaux pour les solutions salées (Manabe *et al.* 2001), effets qui mettent en jeu les CBR. Inversement, l'action inhibitrice de l'ODN sur les ***bâillements*** provoqués par l'administration d'un agoniste des récepteurs dopaminergiques, l'apomorphine, s'effectue indépendamment des R-BZ (Garcia de Mateos-Verchere *et al.* 1998). Enfin, des travaux plus récents, indiquent qu'une injection icv d'ODN inhibe la ***prise de nourriture*** à la fois chez les rongeurs (de Mateos-Verchere *et al.* 2001, do Rego *et al.* 2007) et chez le poisson rouge (Matsuda *et al.* 2007). Quelque soit l'espèce, l'effet de l'ODN est observé à des concentrations nanomolaires, et il est totalement bloqué par l'antagoniste du récepteur métabotropique développé au laboratoire, le cyclo(1-8)[DLeu^5]OP (Leprince *et al.* 2001). Administré de façon chronique (10 ng/h) durant 15 jours, l'ODN entraîne une perte de poids importante chez les rongeurs, en dépit d'une ré-alimentation normale après 4 jours de traitement (de Mateos-Verchere *et al.* 2001).

6.2. Effets des EZ sur la synthèse des stéroïdes

L'expression préférentielle des EZ et de leurs récepteurs dans les cellules stéroïdogènes des organes périphériques et du SNC (voir § 4. p39), a conduit plusieurs groupes à s'intéresser au rôle des EZ dans la ***synthèse*** des ***hormones stéroïdiennes*** et des ***neurostéroïdes***. Il est maintenant clairement établi que le DBI et/ou le TTN stimulent la production de prégnénolone à partir de mitochondries isolées, de cellules corticosurénaliennes (Papadopoulos *et al.* 1991), de cellules de Leydig (Garnier *et al.* 1993, 1994a) et de cellules astrocytaires natives ou tumorales (Papadopoulos *et al.* 1991a, Brown *et al.* 2000,). De même, le TTN augmente la sécrétion d'aldostérone et de corticostérone à partir d'explants de surrénales de grenouille (Lesouhaitier *et al.* 2000), ou de testostérone à partir d'explants de testicules humains (Duparc *et al.* 2003). Dans la grande majorité des cas, les effets du TTN sont bloqués par le flunitrazépam (Papadopoulos *et al.* 1991a, 1991b, Duparc *et al.* 2003). Les EZ, présentes au niveau intracellulaire pourraient donc interagir avec les TSPO et ainsi favoriser la translocation du cholestérol à l'intérieur des mitochondries (Yanagibashi *et al.* 1988, Papadopoulos *et al.* 1991a), ou stimuler directement l'activité du cytochrome $P450_{scc}$, responsable de la conversion du cholestérol en prégnénolone (Brown & Hall 1991). De plus, les EZ stimulent la synthèse des hormones stéroïdiennes *via* un mécanisme de type auto/paracrine qui met en jeu l'activation de TSPO (Duparc *et al.* 2003) ou d'un récepteur couplé à l'AC (Lesouhaitier *et al.* 2000). Enfin, il a été démontré que l'ODN, *via* l'activation des CBR, augmente la synthèse de prégnénolone, le précurseur commun de tous les neurostéroïdes, dans des explants de cerveaux de grenouille (Do-Rego *et al.* 2001).

6.3. Effets des EZ sur le métabolisme lipidique

Parallèlement à ces travaux, il a été démontré que le DBI présente une grande affinité pour les esters d'acyl-coenzyme A, et de ce fait il est également connu sous le nom *d'acyl-coenzyme A-binding protein* ou ACBP (Mogensen *et al.* 1987). La formation du complexe DBI/esters d'acyl-CoA permet de protéger ces derniers contre l'action des acyl-CoA hydrolases (Rasmussen *et al.* 1993) et favorise leurs transports de la membrane plasmique vers la mitochondrie où ils seront utilisés pour l'oxydation

et la synthèse des glycérolipides (Rasmussen *et al.* 1994, Yanase *et al.* 2001). La surexpression du DBI stimule ***la lipogenèse*** dans les hépatocytes normaux et tumoraux de rongeurs en culture primaire (Yang *et al.* 2001b, Huang *et al.* 2005) et chez les souris transgéniques (Oikari *et al.* 2008b). De plus, le DBI potentialise l'effet inhibiteur des esters d'acyl-CoA sur la lipolyse dans les adipocytes de rat (Hu *et al.* 2005). Inversement, la délétion du gène codant le DBI chez la levure augmente la concentration des esters d'acyl-CoA et par voie de conséquence réduit les taux d'acides gras (Schjerling *et al.* 1996). De même, des souris portant la mutation *mm1054* sur le chromosome 1 n'expriment plus le DBI, et présentent un métabolisme lipidique anormal au niveau de la peau et des poils (Lee *et al.* 2007). L'intervention du DBI dans le métabolisme lipidique s'effectuerait directement en tant que ACBP, ou indirectement *via* une diminution de l'expression de deux facteurs de transcription, la *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP-1) et le PPAR (Oikari *et al.* 2008a, 2008b), tous deux connus pour être impliqués dans le contrôle du métabolisme lipidique et l'expression du DBI (Sandberg *et al.* 2005). Le DBI interagit donc avec plusieurs autres cibles intracellulaires, autres que les TSPO, et pourrait participer à la régulation de ***l'expression de certains gènes***. A l'appuie de cette hypothèse, le DBI est présent non seulement au niveau du cytosol mais également dans le noyau et des travaux récents indiquent qu'il réduit l'activité transcriptionnelle du promoteur des gènes codant la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA synthase (HMG-CoA synthase) et la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoA réductase), codant pour deux enzymes impliquées dans la biosynthèse du cholestérol (Vock *et al.* 2008).

6.4. Autres effets biologiques des EZ

Outre les effets bien étudiés des EZ sur la stéroïdogenèse et le métabolisme lipidique, des travaux suggèrent que les EZ pourraient être impliquées dans plusieurs autres processus physiologiques.

En plus des surrénales et des gonades, les EZ sont capables de moduler l'activité d'autres ***glandes endocrines***. Sur des pancréas de rat perfusés ou des ilots de Langerhans isolés, les EZ (DBI et ODN) inhibent la ***sécrétion d'insuline*** induite par le glucose (Borboni *et al.* 1991, De Stefanis *et al.* 1995). Cet effet, qui ne semble pas

impliquer les R-BZ, nécessite une mobilisation de calcium à partir d'un pool intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) (De Stefanis *et al.* 1995). Administré par voie intra-duodénale, le DBI augmente le taux plasmatique de la ***cholécystokinine*** (CCK) (Herzig *et al.* 1996, Herzig 1998). Une étude menée sur la lignée tumorale d'origine intestinale STC-1, indique que l'action de l'ODN sur la libération de CCK n'est pas relayée par les récepteurs classiques des BZ (Yoshida *et al.* 1999).

L'ODN module positivement ou négativement l'expression des gènes codant pour des neuropeptides hypothalamiques tels que ***la proopiomélanocortine*** (POMC) (Compère *et al.* 2003), le ***neuropeptide Y*** (Compère *et al.* 2005), la *gonadotropin-releasing hormone* ou ***gonadolibérine*** (GnRH) (Li & Pelletier 1995, Compère *et al.* 2004) et la *corticotropin-releasing hormone* ou ***corticolibérine*** (CRH) (Givalois *et al.* 1998, Compère *et al.* 2003). Ainsi, en agissant sur les neurones à CRH et à GnRH, l'ODN, *via* l'activation du récepteur métabotropique sensible au cyclo(1-8)[$Dleu^5$]OP (Leprince *et al.* 2001), serait indirectement impliqué dans le contrôle des hormones corticotrope et gonadotrope hypophysaires.

Les EZ peuvent également agir sur le ***système immunitaire*** et stimuler la production des interleukines 1β et 8 (IL-1β et IL-8) en interagissant avec les TSPO dans les monocytes humains (Taupin *et al.* 1991, Taupin *et al.* 1993, Stepien *et al.* 1993), et un récepteur couplé à une PLC dans les neutrophiles humains *(Cosentino et al.* 2000, Marino *et al.* 2003). Enfin, une activité antibactérienne a également été décrite pour les EZ et plus précisément pour le fragment 32-86 du DBI, mais son spectre d'action reste limité (Agerberth *et al.* 1993).

Plusieurs études suggèrent que les EZ, produites par les cellules gliales pourraient exercer des ***effets prolifératifs***. En effet, le profil d'expression des EZ chez le rat durant l'ontogenèse coïncide avec la prolifération des cellules gliales dans le SNC (Malagon *et al.* 1993, Burgi *et al.* 1999). De plus, une augmentation de l'immunoréactivité de type ODN a été mise en évidence dans les cellules de Schwann au cours du processus de régénération nerveuse (Lacor *et al.* 1996, 1999). Enfin, des études *in vitro* montrent que les dérivés du DBI augmentent la prolifération de cellules astrocytaires normales et tumorales (Alho *et al.* 1994), et stimulent l'incorporation de la [^{3}H]thymidine dans les astrocytes en culture (Gandolfo *et al.* 1999, 2000).

Inversement, la transfection d'ARN antisens ou de *short interfering RNA* (siRNA) pour le DBI dans plusieurs lignées cellulaires de type endocrine bloque l'incorporation de [^{3}H]thymidine et provoque la mort des cellules par apoptose (Mandrup *et al.* 1998, Faergeman & Knudsen 2002). Ces effets sont le plus souvent relayés par les R-BZ (Gandolfo *et al.* 2000).

6.5. Implication des EZ en pathologie

Une modification de la transmission GABAergique peut être responsable des troubles anxieux qui sont eux-mêmes associés à plusieurs états pathologiques du SNC (dépression, troubles alimentaires, toxicomanies, maladies neurodégeneratives…). Quelques études menées chez l'homme révèlent que les taux d'EZ dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) sont plus élevés chez des individus ***anxieux ou dépressifs*** que chez les sujets témoins (Barbaccia *et al.* 1986, Roy *et al.* 1989, Roy 1991). Le LCR de ces patients présente également de fortes teneurs en sulfate de déhydroépiandrostérone (Azuma *et al.* 1993, Brown *et al.* 2003b), un neurostéroïde pouvant moduler positivement l'activité du R-GABA$_A$ (Lan & Gee 1994, Lambert *et al.* 1995). Or, il a clairement été démontré que le TTN, en interagissant avec les TSPO, augmente la synthèse de prégnénolone, le précurseur commun de tous les neurostéroïdes, dans les cellules astrocytaires (Papadopoulos *et al.* 1991a, Brown *et al.* 2000). Ainsi, les EZ pourraient participer au développement d'états dépressifs et anxieux en modifiant la transmission GABAergique directement *via* les CBR, ou indirectement *via* les TSPO et la synthèse de neurostéroïdes. De plus, une étude récente a démontré que les familles présentant un polymorphisme au niveau du gène du DBI, changement de la valine 88 par une methionine, sont moins susceptibles de développer des états dépressifs et anxieux (Thoeringer *et al.* 2007) confirmant que le gène du DBI serait impliqué dans ces désordres neurologiques. Cependant dans la souche de rat F-344/N, qui présente un phénotype anxieux plus marqué que la souche WAG/G, le niveau des ARNm codant le DBI est plus faible, notamment dans l'hippocampe et le mésencéphale (Sudakov *et al.* 2001). De même, l'administration chronique de CRH, qui provoque chez la souris un comportement de type anxieux, réduit le niveau des ARNm codant le DBI au niveau de l'hippocampe (Sherrin *et al.*

2009). Inversement, la surexpression du gène DBI chez la souris entraîne une détérioration des fonctions cognitives et de l'apprentissage, mais aucun comportement d'anxiété (Siiskonen *et al.* 2007). Bien que ces résultats aillent à l'encontre de ceux obtenus chez l'homme, les travaux de Sudakov (Sudakov *et al.* 2001) suggèrent néanmoins que les EZ seraient impliquées dans la composante génétique de l'anxiété. La ***dépendance à certaines drogues*** (cocaïne, morphine ou héroïne et nicotine) et à ***l'alcool*** s'accompagne généralement d'anxiété et/ou de dépression suite à une interruption brutale de consommation (Kushner *et al.* 1990, Powell & Taylor 1992). Les travaux de Katsura ont montré que l'administration répétée *in vivo* de morphine par injections icv (Katsura *et al.* 1998) et d'éthanol par inhalation (Katsura *et al.* 1995b), ainsi que l'incubation de neurones de rat en culture primaire avec de fortes doses d'éthanol (Katsura *et al.* 1995a) augmentent significativement l'expression du gène du DBI et que ce phénomène disparait totalement après le sevrage de 14 jours (Katsura *et al.* 1995b). L'ensemble de ces données permet d'envisager l'intervention des EZ dans les comportements anxieux liés ou non à l'addiction, mais leur rôle exact et les mécanismes mis en jeu restent à déterminer.

L'expression des EZ a également été évaluée chez des patients atteints de pathologies psychiatriques et neurologiques. Des taux élevés d'EZ ont été retrouvés dans le LCR de patients atteints d'encéphalopathie d'origine hépatique (Rothstein *et al.* 1989), d'épilepsie (Ferrarese *et al.* 1996, 1998) ou de la maladie de Parkinson (Ferrarese *et al.* 1990). Les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) présentent eux aussi des concentrations élevées d'EZ dans le LCR (Ferrarese *et al.* 1990) et dans le plasma (Ferrero *et al.* 1988), ainsi qu'une augmentation du taux d'ARNm codant le DBI dans plusieurs aires cérébrales telle que le cortex préfrontal (Luchetti *et al.* 2009). Chez ces individus, la surexpression des EZ est associée à une augmentation de la densité des TSPO (Gulyas *et al.* 2009) et de la synthèse des neurostéroïdes (Papadopoulos 2003). De plus, un dysfonctionnement du système GABAergique est souvent associé aux troubles neuropsychiatriques (Rissman *et al.* 2007). Une modification de l'expression des EZ, *via* une modification de l'activité des R-BZ, pourrait donc participer au développement de ces maladies.

II. Les Astrocytes

1. Caractéristiques morphologiques et biochimiques des astrocytes

Le ratio entre le nombre d'astrocytes et celui des neurones est d'autant plus important que la structure cérébrale augmente en complexité (Nedergaard *et al.* 2003). Les astrocytes peuvent dériver soit de la glie radiaire, qui se transforme en astrocytes une fois la migration neuronale terminée (Rakic & Zecevic 2003, Rakic 2003), soit de cellules progénitrices localisées dans la zone sous-ventriculaire bordant les ventricules latéraux et la zone sous-granulaire de l'hippocampe, qui persistent même à l'âge adulte (Duan *et al.* 2008). Sur la base de critères anatomiques et morphologiques, on distingue deux types d'astrocytes. Les ***astrocytes protoplasmiques*** ou de type I, issus des cellules progénitrices 1A, sont localisés dans la substance grise et présentent de nombreux prolongements courts et ramifiés (Miller & Raff 1984). Les ***astrocytes fibrillaires*** ou de type II dérivent, comme les oligodendrocytes, des cellules progénitrices O-2A ; ils sont retrouvés dans la substance blanche et présentent des ramifications peu nombreuses mais qui s'étendent sur de grandes distances (Noble *et al.* 1992). Les prolongements astrocytaires se terminent le plus souvent par un épaississement ou pied astrocytaire qui est en contact avec des éléments neuronaux (neurites et synapses), des éléments épithéliaux (cellules endothéliales) et des éléments gliaux (oligodendrocytes et astrocytes) (Nedergaard *et al.* 2003) (Fig. 7).

Les cellules astrogliales n'établissent pas de contacts synaptiques entre elles ou avec d'autres types cellulaires. Des études en microcopie électronique ont permis de mettre en évidence la particularité des astrocytes à être connectés entre eux à l'aide de ***jonctions communicantes***, les *gap junctions* (Wolff *et al.* 1998). Ces jonctions intercellulaires permettent des échanges d'ions et de petites molécules. Plusieurs groupes ont clairement démontré que dans de nombreuses régions cérébrales, les astrocytes sont néanmoins étroitement associés aux contacts synaptiques, cette organisation structurelle est qualifiée de ***synapse tripartite*** (Perea *et al.* 2009) (cf § 4. p 55).

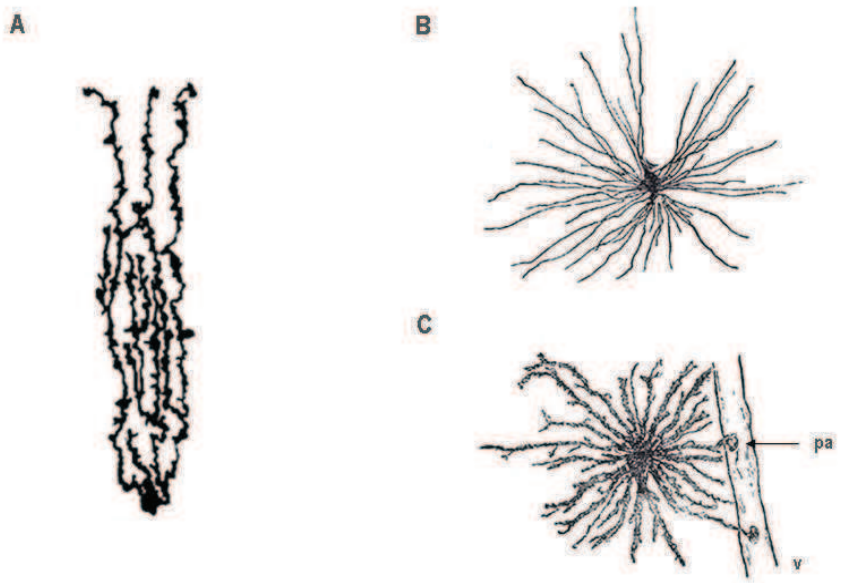


Figure 7 : Aspects des cellules astrogliales in vivo. A, cellules de Bergman - B, astrocytes fibrillaires - C, astrocytes protoplasmiques présentant des pieds astrocytaires (pa) au contact d'un vaisseau (v).

La *glial fibrillary acidic protein* (***GFAP***), qui est le principal constituant du cytosquelette astrocytaire (Eng *et al.* 2000, pour revue), est généralement considérée comme un marqueur spécifique des cellules astrogliales. La glutamine synthétase, majoritairement, voir exclusivement produite par les cellules gliales, peut être aussi considérée comme un marqueur métabolique des astrocytes (Okada *et al.* 2009). Enfin, la ***protéine S100***, présente dans de nombreux types cellulaires, semble être produite par les cellules astrogliales de façon quasi exclusive dans le SNC normal (Moore 1965).

2. Rôle des astrocytes dans la structure et l'organisation du SNC

Les cellules gliales ont longtemps été considérées comme des éléments passifs assurant avant tout la cohésion et la protection du tissu neuronal. Il est maintenant bien établi que les astrocytes participent à la structure et à l'organisation du SNC. Ainsi, sous le nom de glie radiaire, ils sont impliqués dans la migration des neuroblastes au cours de l'histogenèse du SNC (Nedergaard *et al.* 2003, McDermott *et al.* 2005). Des expériences de co-cultures astrocytes/neurones, ont clairement démontré que la population neuronale présente cinq fois plus de synapses en co-culture qu'en

monoculture, indiquant la participation des astrocytes dans la synaptogenèse (Ullian *et al.* 2001, Slezak & Pfrieger 2003). Les astrocytes contrôlent la synaptogenèse en produisant des facteurs trophiques tels que *l'activity dependent neurotrophic factor* (ADNF) et le *tumor necrosis factor-a* (TNF-α) (Blondel *et al.* 2000, Beattie *et al.* 2002). Enfin, les astrocytes sont impliqués dans la mise en place et le maintien de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Neuhaus *et al.* 1991), grâce à la production de facteurs tels que le *transforming growth factor-α* (TGF-α) et le *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Abbott 2002).

3. Rôles des astrocytes dans le métabolisme et l'homéostasie du SNC

Les astrocytes permettent d'établir une liaison entre les capillaires cérébraux et les neurones contribuant à l'approvisionnement énergétique du tissu nerveux. Ainsi, le passage du glucose du sang vers le parenchyme cérébral s'effectue grâce à des transporteurs actifs GLUT-1, principalement exprimés par les cellules endothéliales et les pieds astrocytaires qui entourent les capillaires cérébraux (Morgello *et al.* 1995). Au niveau des astrocytes, le glucose est métabolisé en lactate, un substrat directement utilisable par les neurones, ou stocké sous forme de glycogène lorsque la demande est réduite, et seule source d'énergie disponible en cas d'ischémie cérébrale ou d'hypoglycémie (Wender *et al.* 2000, Brown *et al.* 2003a).

Les astrocytes jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie des ions H^+ et K^+ grâce à un système de transport actif la pompe Na^+/K^+ ATPase (Clausen 1992, Silver & Erecinska 1997), et passif, le co-transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$ (Newman 1999), et qui assurent également leur redistribution grâce aux *gap junctions* (Rose & Ransom 1997). Les co-transporteurs astrocytaires $Na^+/HC03^-$ et $Cl^-/HC03^-$ participent à la restauration du pH (Katsura *et al.* 1994, Deitmer & Rose 1996) et à la régulation du volume extracellulaire (Ransom *et al.* 1985, 1986). Enfin, les astrocytes expriment des transporteurs spécifiques permettant la capture de neurotransmetteurs comme le glutamate, le GABA, la glycine et les monoamines (Chatton *et al.* 2003, Inazu *et al.*

2003) ainsi que les enzymes capables de les métaboliser (Vitalis *et al.* 2002, Schousboe 2003).

4. Rôles des astrocytes dans la communication cellulaire

Il est clairement admis depuis plusieurs années que les astrocytes, de part leur rôle dans la structuration et l'homéostasie du SNC, et leur plasticité, participent au contrôle de la neurotransmission (Halassa & Haydon 2010). Des études récentes montrent qu'ils sont également capables de produire et de libérer des substances neuroactives appelées gliotransmetteurs par analogie avec les neurotransmetteurs (Parpura *et al.* 2010). De nombreux travaux menés *in vitro* et *in vivo* montrent que les astrocytes libèrent des neurotransmetteurs et des neuropeptides (Torgner & Kvamme 1990, pour revue). Néanmoins, il a été récemment proposé qu'un composé d'origine astrocytaire peut être qualifié de gliotransmetteur à conditions de répondre à certains critères : *(i)* il doit être produit et/ou stocké par les cellules gliales, *(ii)* sa libération est régulée, *(iii*) il induit une réponse rapide de la part des neurones, et *(iv)* il est impliqué dans des processus physiopathologiques (Volterra & Meldolesi 2005, Parpura *et al.* 2010). Actuellement, seuls le glutamate, l'ATP et la D-sérine qui répondent à ces critères sont classés dans la famille des gliotransmetteurs (Tab. 1).

Tableau 1 : Caractéristiques des gliotransmetteurs.

Composé	Lieu de stockage (astrocytes)	Mode de libération (astrocytes)	Contrôle de la libération (astrocytes)	Site d'action (récepteur neuronal)	Références bibliographiques
Glutamate	Cytosol [?] (SLMV)[1,2,3]	Exocytose Ca^{2+}-dépendante[1,4] Canaux, transporteurs, R-P2X[5]	Glutamate (mGlu)[1] ATP (R-P2Y)[2,3] Bradykinine[4]	mGlu[6], AMPA[?], NMDA[4,3,6]	[1] Bezzi *et al.* 2004 [2] Domercq *et al.* 2006 [3] Jourdain *et al.* 2007 [4] Parpura *et al.* 1994 [5] Koizumi 2010, pour revue [6] Araque *et al.* 1999
ATP ↓ Adénosine (extracellulaire)	SNARE-associée vésicules[1] DCG[2] Lysosome[3]	Exocytose Ca^{2+}-dépendant[1,2] Canaux[2]		R-P2X[4] R-A1[1,5]	[1] Fellin 2009 [2] Coco *et al.* 2003 [3] Zhang *et al.* 2007 [4] Newman 2003 [5] Pascual *et al.* 2005, pour revue
D-sérine	SLMV[1]	Ca^{2+}-dépendant[2,3]	Glutamate (NMDA, AMPA)[2]	NMDA[3]	[1] Martineau *et al.* 2008 [2] Mothet *et al.* 2005 [3] Henneberger *et al.* 2010

AMPA, récepteur du *2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor* - DCG, granules à corps dense - mGlu, *G protein-coupled metabotropic glutamate receptor* - NMDA, *N-methyl-D-aspartate receptor* - R-A1, récepteurs A1 de l'adénosine - R-P2X et R-P2Y, récepteurs purinergiques 2X et 2Y - SLMV, *synaptic-like microvesicles* - SNARE, *soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*. D'après Volterra & Meldolesi 2005.

Parpura et collaborateurs ont montré que sur des co-cultures de neurones-astrocytes, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les astrocytes induite par la bradykinine, provoque la libération de glutamate. Celui-ci, en activant les récepteurs glutaminergiques de type N-methyl-D-aspartate (NMDA) stimule l'activité neuronale post-synaptique (Parpura *et al.* 1994). Par ailleurs, l'interaction du glutamate avec les récepteurs G protein-coupled metabotropic glutamate (mGlu) présynaptiques inhibe la neurotransmission (Araque *et al.* 1999). En conditions pathologiques, l'activation du récepteur astrocytaire du stromal *cell-derived factor 1* (SDF1) augmente la libération de glutamate, phénomène qui est potentialisé par la microglie réactive (Bezzi *et al.*

2001). Cette synergie entre les astrocytes et la microglie conduit à la mort neuronale par apoptose. Plusieurs travaux indiquent que le glutamate, l'ATP et la D-sérine sont stockés dans des vésicules et leur sécrétion est Ca^{2+}-dépendante (Tab. 1). Dans l'espace synaptique, l'ATP peut être transformé en adénosine. L'activation du récepteur A1 de l'adénosine (R-A1) est responsable du tonus inhibiteur excercé par les astrocytes sur l'élément post-synaptique de la zone CA1 de l'hippocampe (Pascual *et al.* 2005).

A l'inverse, le glutamate libéré par une stimulation à haute fréquence des neurones présynaptiques provoque la sécrétion de D-sérine astrocytaire, qui en interagissant avec le site de la glycine du récepteur NMDA, présent sur l'élément post synaptique, potentialise la transmission neuronale (Henneberger *et al.* 2010). L'adénosine en modulant l'activité électrique de l'hippocampe durant le sommeil lent participe à la consolidation de la mémoire (Wu *et al.* 2009), de même la D-sérine est impliquée dans les mécanismes cellulaires qui sous-tendent le processus de mémorisation (Panatier *et al.* 2006).

Plusieurs données obtenues notamment au laboratoire permettent de considérer les EZ comme de nouveaux membres de la famille des gliotransmetteurs (Tab. 2). La libération des précurseurs de l'ODN est régulée négativement par le GABA et la somatostatine (Patte *et al.* 1999, Masmoudi *et al.* 2005), et positivement par le *pituitary adénylate cyclase activating polypeptide* (PACAP) et le peptide β-amyloïde (βA) (Masmoudi-Kouki *et al.* 2006, Tokay *et al.* 2008). Le DBI étant dépourvu de séquence signal, les mécanismes mis en jeu dans le processus de libération est actuellement inconnu. Néanmoins, il n'est pas exclu que la libération des EZ puisse mettre en jeu les transporteurs du type ATP-Binding cassette (ABC) comme cela a été démontré pour la libération de l'IL-1β (Hamon *et al.* 1997).

En tant que ligand endogène des CBR, l'ODN peut moduler négativement la transmission GABAergique (Tonon *et al.* 1989, Bormann 1991, Louiset *et al.* 1993). *Via* l'activation d'un récepteur métabotropique, l'ODN module positivement ou négativement l'expression de plusieurs neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise de nourriture (Compère *et al.* 2003, Compère *et al.* 2005) et excerce un puissant effet anorexigène (de Mateos-Verchere *et al.* 2001, do Rego *et al.*

2007). Enfin, il a été démontré qu'un jeune de 18 h entraîne une chute des ARNm codant le DBI dans les cellules astrogliales hypothalamiques chez la souris (Compère *et al.* 2010). L'ensemble de ces données indiquent que le gliotransmetteur ODN participe à des processus physiologiques.

Tableau 2 : Caractéristiques des EZ.

Endozépines	Lieu de stockage	Mode de libération	Contrôle de la libération	Site d'action neuronale	Références bibliographiques
DBI, TTN ↓ **ODN**[1] **(extracellulaire)**	Cytosol[2]	Transporteur ABC ?	GABA↓[1] Somato↓[3] PAPCAP↑[4] βA↑[5]	CBR[6] (ODN, TTN) TSPO[7] (TTN) Récepteur métabotropique[8]	[1] Patte *et al.* 1999 [2] Tonon *et al.* 1990 [3] Masmoudi *et al.* 2005 [4] Masmoudi-Kouki *et al.* 2006 [5] Tokay *et al.* 2008 [6] Bormann 1991 [7] Slobodyansky *et al.* 1989 [8] Compère *et al.* 2005

βA, peptide β-amyloïde - CBR, récepteur des BZ de type central - DBI, *diazepam binding inhibitor* - GABA, acide γ-aminobutyrique - ODN, octadécaneuropeptide - PACAP, *pituitary adénylate cyclase activating polypeptide* - Somato, somastatine - Transporteur ABC, *ATP Binding cassette transporter* - TSPO, *translocator protein* - TTN, triakontatétraneuropeptide.

5. Rôles des astrocytes en conditions pathologiques

Outre leur rôle essentiel dans le fonctionnement du SNC en condition physiologique, les astrocytes participent activement à la réponse du cerveau aux agressions (infection, ischémie, maladies neurogénératives…) par un processus communément appelé astrogliose réactionnelle, et qui correspond à des changements morphologique et phénotypique importants (Sofroniew 2009) (Tab. 3).

Tableau. 3 : Quelques molécules dont la production est modifiée dans les astrocytes réactifs.

Fonctions	Changements	Références bibliographiques
Structure	GFAP ↑, vimentine ↑ et nestine ↑	Eddleston & Mucke 1993, Pekny & Nilsson 2005, pour revue
Transcription	NF-κB ↑ STAT3 ↑	Brambilla *et al.* 2005, Herrmann *et al.* 2008
Inflammation	Cytokines et facteurs de croissance ↑↓	John *et al.* 2003, Milligan & Watkins 2009, pour revue
Stress oxidatif	NO ↑↓, NOS ↑↓, SOD ↑↓, glutathion ↑↓	Hamby *et al.* 2006, Stridh *et al.* 2010

GFAP, *glial fibrillary acidic protein* - NF-κB, *nuclear factor-κB* - NO, *nitric oxide* - NOS, *nitric oxide synthase* - SOD, superoxyde dismutase - STAT3, *Signal transducer and activator of transcription 3*. Adapté de Sofroniew 2009

Il est généralement admis que les astrocytes jouent un rôle majeur dans le processus inflammatoire observé dans les maladies neurodégénératives *via* la production de cytokines telles que l'IL-1β et le TNFα (Dong & Benveniste 2001, Moynagh 2005). De plus, la prolifération astrocytaire et la surexpression de la GFAP, associées à tout traumatisme au niveau du SNC, vont conduire à la formation de la glie cicatricielle. Cette barrière protectrice, qui isole la zone endommagée du reste du cerveau, présente un effet délétère sur la régénération nerveuse (Rhodes *et al.* 2003, Desclaux *et al.* 2009). Néanmoins, les astrocytes réactifs peuvent également exercer des effets neuroprotecteurs en produisant par exemple des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-10 (Milligan & Watkins 2009, pour revue) et du glutathion qui réduit le stress oxydatif des neurones (Stridh *et al.* 2010), ou encore en participant à la clearance de composés neurotoxiques comme l'ammonium (NH_4^+) (Rao *et al.* 2005), produit dans le cadre d'encéphalopathie, ou le βA (Koistinaho *et al.* 2004) dans la MA. Quelques études menées chez l'homme indiquent que l'expression des EZ est augmentée dans le cerveau de patients atteints notamment de ces deux pathologies (Ferrarese *et al.* 1990), mais leur rôle exact dans le développement de la maladie est totalement inconnu. Il est actuellement admis que le degré de réactivité des astrocytes est fonction de l'intensité du traumatisme cérébral, et que leurs effets dans

des conditions pathologiques, qu'ils soient délétères ou bénéfiques, varient aussi dans le temps (Sofroniew & Vinters 2010).

III. Peptide bêta amyloïde et maladie d'Alzheimer

1. Synthèse et maturation du βA

Le peptide βA est un peptide issu du clivage d'un précurseur appelé *amyloid precursor protein* (APP). L'APP est une glycoprotéine transmembranaire ubiquiste localisée au niveau de la membrane plasmique et qui est exprimée dans toutes les cellules du SNC (Glenner & Wong 1984). L'APP est constituée d'un large domaine N-terminal extracellulaire et d'un court domaine C-terminal intracellulaire. Initialement clonée chez l'homme (Kang *et al.* 1987), l'APP est formée de 695 à 770 acides aminés (Duyckaerts *et al.* 2008). Le gène codant l'APP est localisé sur le chromosome 21q21 (Jenkins *et al.* 1988, Tanaka *et al.* 1989) et son transcript primaire peut subir un épissage alternatif conduisant à trois isoformes (Jenkins *et al.* 1988, Tanaka *et al.* 1989). L'isoforme APP695 est neuronale, elle est retrouvée principalement au niveau de la membrane des terminaisons présynaptiques (Kang & Muller-Hill 1990, Sandbrink *et al.* 1994) tandis que les deux autres isoformes, l'APP770 et l'APP751, sont préférentiellement localisées dans les cellules gliales (Rohan de Silva *et al.* 1997). Quelques travaux font également état d'une quatrième forme d'APP, l'APP714 (Kang *et al.* 1987, Zhao *et al.* 2004). Des homologues de l'APP humaine ont été identifiés chez plusieurs espèces de mammifères (singe, rat, souris) (Podlisny *et al.* 1991, Wasco *et al.* 1992), un amphibien (xénope) (Collin *et al.* 2004) et deux poissons (poisson zébre et raie electrique) (Iijima *et al.* 1998, Musa *et al.* 2001). La comparaison entre la séquence peptidique de l'APP humaine et celles de plusieurs espèces de mammifères révéle un un haut degré de conservation (Podlisny *et al.* 1991). Des ADNc codant des protéines apparentées à l'APP ont également été retrouvés chez la drosophile (Rosen *et al.* 1989) et *C. elegans* (Daigle & Li 1993). Enfin, deux autres gènes, l'*amyloid precursor like proteins 1* et *2* (APLP1 et APLP2), codant des protéines de 653 acides aminés, ont été clonés chez les mammifères (Wasco *et al.* 1992, Slunt *et al.* 1994) . Du fait de sa représentation dans l'ensemble du

règne animal, l'APP pourrait être le précurseur de peptides biologiquement actifs. L'APP peut être clivée selon deux voies, la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique qui est à l'origine de la formation du βA (LaFerla *et al.* 2007).

1.1. La voie non-amyloïdogénique

Elle met en jeu l'α-sécrétase, encore appelée *tumor necrosis factor α converting enzyme* (TACE), un enzyme de la famille des métalloendoprotéases de type *α disintegrin and metalloproteinase* (ADAM) (Buxbaum *et al.* 1998, Parvathy *et al.* 1998). L'α-sécrétase clive jusqu'à 90% de l'APP dans sa partie N-terminale, au sein de la séquence correspondant au βA, et génère deux fragments, le sAPPα, composé soluble libéré dans le milieu extracellulaire, et un fragment C-terminal, le C83, qui reste ancré dans la membrane plasmique (LaFerla *et al.* 2007) (Fig. 8). L'enzyme responsable de l'activité α-sécrétase n'est pas totalement caractérisée. Néanmoins, la surexpression de l'enzyme ADAM10 chez la souris conduit à une augmentation de la sécrétion du sAPPα, inversement la production du fragment soluble est considérablement réduite chez les animaux exprimant un dominant négatif de ADAM10 suggérant que cette protéine pourrait être l'α-sécrétase (Postina *et al.* 2004). Le sAPPα interviendrait dans plusieurs processus. Ainsi, il est capable de réduire, *in vitro*, la mort neuronale induite par le βA (Goodman & Mattson 1994) et de moduler la plasticité synaptique sur des tranches organotypiques d'hippocampe de rat (Ishida *et al.* 1997).

Par ailleurs, l'injection intracérébrale du fragment sAPPα restaure la mémoire et les capacités d'apprentissage chez les rats agés (Meziane *et al.* 1998), induit la prolifération des cellules progénitrices dans la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral (Caille *et al.* 2004) et augmente le nombre de terminaisons synaptiques de type cholinergiques, glutaminergiques et GABAergiques corticales (Bell *et al.* 2008). Il a également été montré que l'expression d'un fragment dérivé du sAPPα chez des souris $APP^{-/-}$ rétablit certains déficits comme la perte de poids et la réduction de l'activité exploratoire (Ring *et al.* 2007).

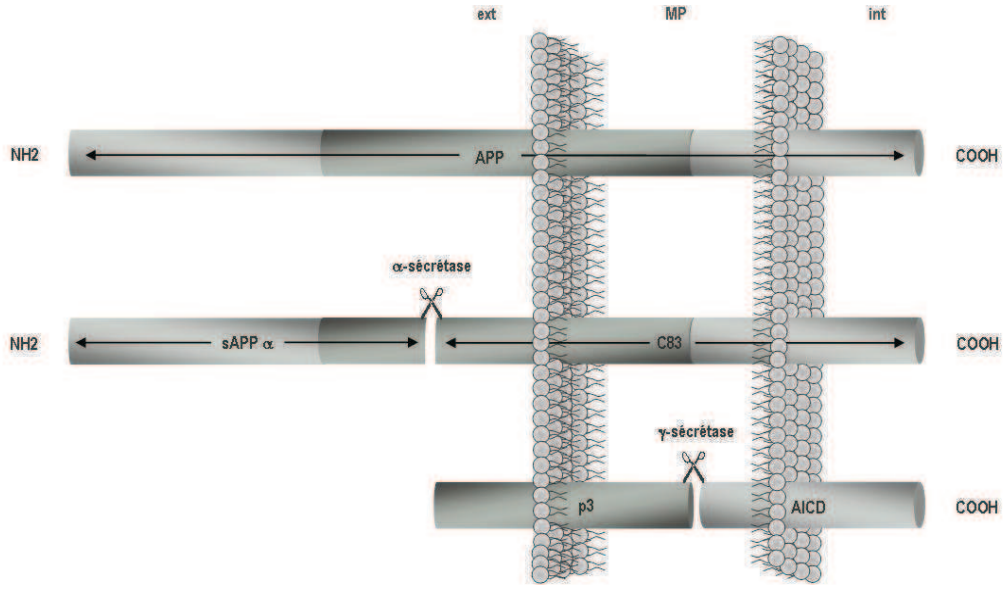


Figure 8 : Schémas représentant la maturation de l'APP *via* la voie non amyloïdogénique. La région correspondant à la séquence du βA est indiquée en gris foncé. AICD, domaine intracellulaire de l'APP - APP, *amyloïd precursor protein* - ext, milieu extracellulaire - int, milieu intracellulaire - MP, membrame plasmique - sAPPα, fragment soluble de l'APP.

Formé suite à l'action de l'α-sécrétase, le fragment C83 quant à lui, est clivé par la γ-sécrétase, un complexe protéique formé des présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), de la nicastrine, de l'α-protéine 1 (APH1) et de la *presenilin enhancer-2* (PEN2), et génère d'une part le fragment p3, également appelé $\beta A_{17-40/42}$ et d'autre part l'*APP intracellular domain* (AICD) (Nixon 2007, pour revue). Les travaux de Cao et Sudhof suggèrent, qu'en s'associant avec la protéine Fe65 et l'histone acétyl transférase Tip60, le peptide AICD pourrait avoir un rôle en tant que facteur de transcription (Cao & Sudhof 2001), et ceux de Wei et collaborateurs montrent que le fragment p3 induit l'apoptose par activation des caspases 3 et 8 dans les lignées de neuroblastomes humains (SH-SY5Y et IMR-32) (Wei *et al.* 2002).

1.2. La voie amyloïdogénique

Elle nécessite l'action de deux sécrétases, la β- et la γ-sécrétase, et conduit à la formation du βA. L'APP est d'abord clivée par la β-sécrétase, également appelée *β-site APP cleaving enzyme* (BACE), en deux fragments, un fragment soluble le sAPPβ, et une partie C-terminale transmembranaire, la protéine C99 (LaFerla *et al.*

2007). Ce dernier fragment, qui contient la séquence entière du βA, est à son tour coupé par la γ-sécrétase qui génère d'une part le βA et d'autre part le fragment AICD, également produit par la voie non-amyloïdogénique (Fig. 9).

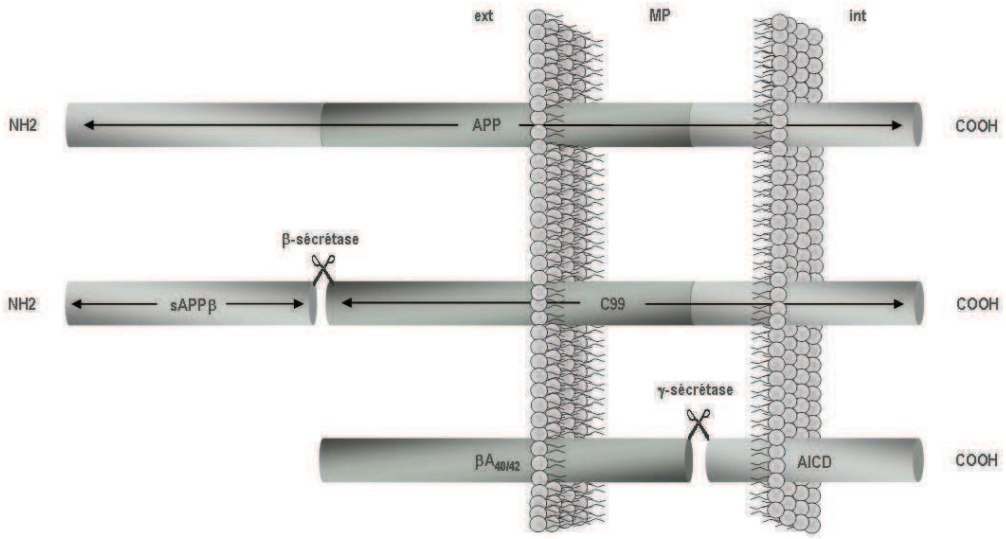


Figure 9 : Schémas représentant la maturation de l'APP *via* la voie amyloïdogénique. La région correspondant à la séquence du βA est indiquée en gris foncé. AICD, domaine intracellulaire de l'APP - APP, *amyloïd precursor protein* - $βA_{40/42}$, β-amyloïde de 40 ou 42 acides aminés - ext, milieu extracellulaire - int, milieu intracellulaire - MP, membrane plasmique - sAPPβ, fragment soluble de l'APP.

Il existe deux formes principales de βA, une forme courte (1-40) et une forme longue (1-42). Le $βA_{1-40}$, la forme majoritairement produite, est un composé soluble qui ne s'aggrège que très lentement (Jarrett *et al.* 1993). De plus, il est rapidement métabolisé et présente donc une durée de vie courte. En conditions physiologiques, le $βA_{1-40}$ est détectable dans le LCR et dans le sang (2,5 et 0,9 ng/ml, respectivement) (Seubert *et al.* 1992, Shoji *et al.* 1992, Selkoe 2002). Le $βA_{1-42}$ quant à lui est retrouvé à faibles concentrations, de l'ordre de 1,6 ng/ml, dans le LCR (Andreasen *et al.* 2001). Ce n'est qu'en conditions pathologiques, comme dans le cas de la MA que la forme longue de $βA_{1-42}$ devient majoritaire et permet donc la formation d'aggrégats. Le fragment $βA_{25-35}$, qui est aussi capable de s'aggréger (Pike *et al.* 1995) et de reproduire les effets neurotoxiques du $βA_{1-42}$ (Frozza *et al.* 2009), a été identifié dans des cerveaux de patients souffrants de la MA (Kubo *et al.* 2002), mais les enzymes responsables de sa formation sont actuellement inconnues.

2. Role du peptide βA dans la MA

2.1. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative, décrite pour la première fois par Aloïs Alzheimer en 1907. Elle est caractérisée par l'apparition de troubles de la mémoire et des fonctions cognitives. L'examen post-mortem de cerveaux de patients atteints de la MA révèle une atrophie des structures cérébrales, notamment au niveau du cortex cérébral et de l'hippocampe, résultant d'une dégénérescence synaptique et d'une mort neuronale. La maladie se caractérise par la présence de dépots intracellulaires de protéine tau, un des constituants anormalement phosphorylé du cytosquelette (Delacourte & Buee 2000) et d'agrégats extracellulaires de peptide βA_{1-42}, constituant majeur des plaques séniles (Mattson 2004, pour revue). Une étude réalisée par McGowan a montré que les souris surexprimant le βA_{1-42} développent des plaques amyloïdes 10 fois plus rapidement que celles surexprimant le βA_{1-40} (McGowan *et al.* 2005) confirmant que le βA_{1-42} a un pouvoir d'aggrégation supérieur à celui du βA_{1-40}. Ces dépots amyloïdes sont entourés par de nombreux astrocytes hypertrophiés caractéristique d'une astrogliose réactionnelle (Nagele *et al.* 2003, Wilhelmsson *et al.* 2006). En conditions pathologiques, il y a donc un déséquilibre entre les deux voies rendant la voie amyloïdogénique majoritaire et entrainant ainsi une surproduction et une accumulation de βA_{1-42}. Plusieurs éléments, caractéristiques de la forme familiale ou sporadique de la maladie, sont responsables de ce déséquilibre.

- ***La forme familiale***, qui ne représente que 5 à 10 % des malades, est due essentiellement à des mutations ponctuelles au niveau des gènes codant l'APP ou les PS1 et PS2 (Suzuki *et al.* 1994). Parmi toutes les mutations de l'APP répertoriées chez l'homme, huit sont localisées dans la région correspondant au βA, ou au niveau des sites d'action des sécrétases (Selkoe 2001, pour revue) (Fig. 10). De même, plusieurs mutations sur les gènes codant PS1 et PS2 seraient responsables du développement de la MA en entrainant la production de la forme la plus agressive du βA, le βA_{1-42} (Levy-Lahad *et al.* 1995, Xia *et al.* 1997). Actuellement, aucune mutation des α- ou β-sécrétases répertoriées ne seraient liées au développement de la MA (Goate 2006).

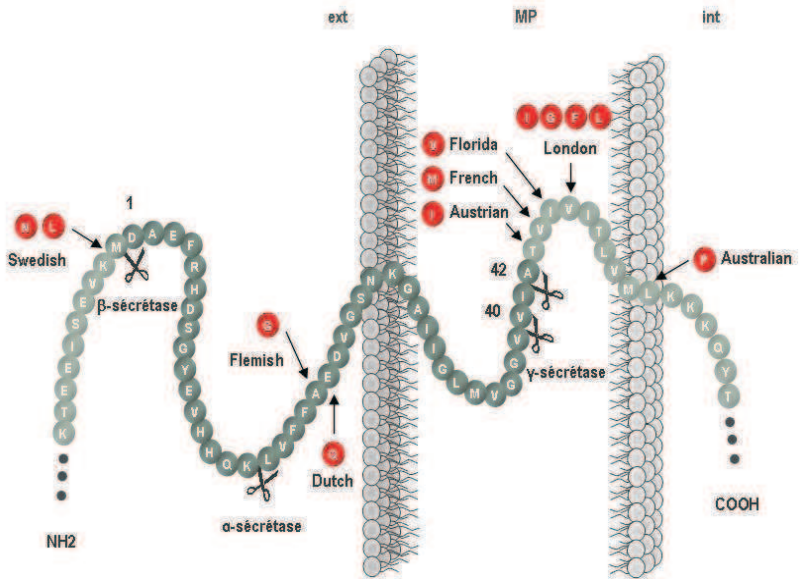


Figure 10 : Localisation des principales mutations de l'APP. Les acides aminés en gris foncé correspondent à la séquence du $\beta A_{40/42}$. Les différentes mutations (*Swedish*, *Flemish*,…) sont signalées par des acides aminés de couleur rouge. ext, milieu extracellulaire - int, milieu intracellulaire - MP, membrane plasmique.

La présence de fortes teneurs en β-sécrétase dans le cerveau de patients atteints de MA, a conduit certains groupes à proposer des inhibiteurs de cette enzyme comme outils thérapeutiques (Harada *et al.* 2006, Zhao *et al.* 2007), mais cette approche a été abandonnée en raison d'effets secondaires trop importants constatés lors de tests chez l'animal (Imbimbo 2008, Wolfe 2008). Par ailleurs, Schenk et collaborateurs ont étudié les effets d'une immunisation contre le βA_{1-42} sur des modèles murins de la MA. Ils ont observé que la vacination pouvait prévenir l'apparition des plaques amyloïdes, l'atrophie neuronale et l'astrogliose réactionnelle chez les sujets jeunes et atténuer considérablement les signes de la maladie chez les rats agés (Schenk *et al.* 1999). Un effet similaire a été obtenu par injection d'anticorps mono- ou polyclonaux dirigés contre le βA_{1-42} chez l'animal (Bard *et al.* 2000, Morgan *et al.* 2000). La vacination contre le βA_{1-42} a été également testée sur des patients atteints de la MA, mais cette approche thérapeutique a été rapidement abandonnée en raison du développement de méningo-encéphalites chez certains patients (Orgogozo *et al.* 2003).

- ***La forme sporadique*** est une manisfestation tardive de la maladie qui se caractérise par des concentrations élevées de βA insoluble et une absence de mutation

au niveau des gènes codant l'APP ou les secrétases (Eckman & Eckman 2007, pour revue). Il est maintenant admis que dans la majorité des cas, la forme sporadique de la MA est une pathologie multifactorielle résultant de l'interaction de divers facteurs environnementaux, épigénétiques et génétiques, qui pourraient favoriser son apparition. La forme sporadique de la maladie peut être causée notamment par une baisse d'activité (mutations, modifications d'expression de gènes ou d'activité protéolytique) ou par les enzymes impliquées dans la dégradation du βA, comme la néprilysine, l'*insulin degrading enzyme* (IDE), l'*endothelin-converting enzyme* (ECE) et la plasmine, ce qui a d'ailleurs conduit Eckman et collaborateurs à les proposé comme outils thérapeutiques (Eckman & Eckman 2005, pour revue). La variante génétique de la forme sporadique de la MA est due à la présence de l'apolipoprotéine E sous la forme allélique ε4 (ApoE4) (Lambert & Amouyel 2007). La présence de cette isoforme peut avoir plusieurs conséquences néfastes. Elle favorise notamment les dépots de βA dans le tissus cérébral de patients atteints de MA (McNamara *et al.* 1998) et participe à la défaillance du système cholinergique observée chez ces malades (Allen *et al.* 1997). A l'inverse, le risque de développer la MA est réduit chez les individus exprimant l'alléle ε2 (Corder *et al.* 1994). Enfin, des antécédents de traumatismes craniens ou d'ischémies cérébrales accroîssent le risque de développer la MA (Jellinger 2004, Rocchi *et al.* 2009).

2.2. *Effets du βA sur les cellules nerveuses*

- ***Effet sur les neurones, mécanismes de la mort neuronale***

Les effets du βA_{1-42} aggrégé et de son fragment neurotoxique, le βA_{25-35}, ont été largement étudiés, sur des neurones en culture et chez des rats ayant reçus une injection cérébrale de peptide. Le βA_{25-35} induit des changements morphologiques et conduit à la mort des cellules (Watt *et al.* 1994). L'application de βA_{1-42} sur des cultures de neurones corticaux ou de la lignée SH-SY-5Y provoque une entrée massive de calcium, *via* l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants de type-L (Ueda *et al.* 1997, Ekinci *et al.* 1999). Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ et le dérèglement de l'homéostasie calcique qui s'en suit, conduit à la mort des cellules (Mattson *et al.*

1992). Des expériences menées sur des membranes artificielles, ont montré que le βA pouvait s'intercaler dans la bi-couche lipidique et former des pores favorisant l'entrée du Ca^{2+} (Kawahara & Kuroda 2000, Kagan *et al.* 2002). L'incubation des cellules en présence de βA_{1-42} induit l'expression de certains facteurs pro-apoptotiques, tels que le ligand de Fas (Su *et al.* 2003), les caspases 3, 8, 2, 9 et 12 (Mehmet 2000, Allen *et al.* 2001), le p53, et provoque la libération de cytochrome C dans le cytosol (Tamagno *et al.* 2003), indiquant que le βA conduit finalement à une mort neuronale par apoptose (Takuma *et al.* 2005, Frozza *et al.* 2009).

- ***Effet sur les cellules gliales***

Parrallèlement à leurs effets neurotoxiques, les dépôts amyloïdes induisent une astrogliose réactionnelle correspondant à une accumulation de cellules astrocytaires (Nagele *et al.* 2004). Ces dernières surexpriment les cytokines IL-1β, IL-6 et IL-10, les chemokines *transforming growth factor-1β et 3β* (TGF-1β et TGF-3β) (Akama & Van Eldik 2000, Apelt & Schliebs 2001) et *fibroblast growth factor beta* (FGF-β) (Nakamura *et al.* 1998). Cette inflammation s'accompagne aussi d'un stress oxydatif, impliquant la production de radicaux libres, tel que le monoxyde d'azote (NO) (Akama & Van Eldik 2000) et les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Schubert *et al.* 2009). La surexpression de tous ces composés va exacerber l'effet du βA sur les neurones. Dans un article récent, Mori et collaborateurs ont même démontré que la surexpression de la proteine S100B par les astrocytes réactifs favorise le développement de la MA (Mori *et al.* 2010). Néanmoins quelques données de la litterature suggèrent que l'activation des astrocytes n'est pas toujours délétaire pour les neurones et que dans certaines conditions les astrocytes pourraient exercer des effets bénéfiques sur la survie des neurones.

Il est généralement admis que les astrocytes, qui contiennent de fortes teneurs en enzymes antioxydantes (Raps *et al.* 1989, Sagara *et al.* 1993, Makar *et al.* 1994), sont plus résistants au stress oxydatif que les neurones (Desagher *et al.* 1996). De plus, certains travaux montrent qu'ils exercent des effets neuroprotecteurs notamment vis-à-vis du H_2O_2 en fournissant aux neurones un antioxydant, le glutathion (Dringen *et al.* 1999). Des travaux récents menés par Allaman et collaborateurs indiquent qu'*in vitro*,

le βA stimule à la fois la libération de glutathion (effet neuroprotecteur potentiel) et la production de H_2O_2 extracellulaire (effect neurotoxique potentiel) (Allaman *et al.* 2010). Finalement, les astrocytes, activés par le βA, induisent la mort des neurones en co-culture (Allaman *et al.* 2010). Bienque ces résultats aillent dans le sens d'une exacerbation par les astrocytes réactifs des effets induits par les dépots amyloïdes sur la survie neuronale (Allaman *et al.* 2010), les données de la littérature montrent à la fois des effets neurotoxiques et neuroprotecteurs induits par les astrocytes réactifs (Sofroniew 2009). L'une des hypothèses actuelles est que le rôle des astrocytes réactifs dans la survie ou la mort des neurones est fonction de la région cérébrale concernée ainsi que du degré de l'astrogliose, n'excluant pas ainsi que les astrocytes exercent des effets neuroprotecteurs notamment dans les premières phases du développement de la maladie.

3. Les récepteurs du peptide βA

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'effet du peptide βA sur l'activation des astrocytes restent mal connus, néanmoins plusieurs travaux indiquent que le βA peut interagir avec des récepteurs membranaires telsque le *receptor for advanced glycation end products* (RAGE), les s*cavenger receptor* (SR) et les *formyl peptide receptors* (FPRs). L'expression de ces différents récepteurs est augmentée au niveau des astrocytes entourant les plaques séniles (Eckman & Eckman 2007).

3.1. Receptor for advanced glycation end products

Les RAGE appartiennent à la superfamille des récepteurs des immunoglobulines. Ils sont formés d'une région extracellulaire, d'un domaine unique transmembrannaire et d'un court domaine cytosolique, responsable de la transduction de signal (Schmidt *et al.* 1992). Les RAGE sont exprimés par divers types cellulaires telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les neurones, les astrocytes et surtout la microglie. Les RAGE sont capables de lier différents ligands tels que la calgranuline, une protéine S100 liant le calcium, l'amphotérine, une

protéine impliquée dans la réponse cellulaire à l'inflammation, ou encore le βA (Yan *et al.* 2010, pour revue).

Le niveau d'expression des RAGE qui est habituellement bas, est augmenté dans la MA. Ces récepteurs sont notamment surexprimés dans les neurones et la microglie entourant les dépots amyloïdes (Lue *et al.* 2001, Miller *et al.* 2008). L'interaction du βA avec les RAGE stimule plusieurs voies de signalisation telles que la *p38 mitogen-activated protein kinase* (p38 MAPK), la *c-Jun N-terminal kinase* (c-JNK) et la *nuclear factor-κB* (NF-κB) (Onyango *et al.* 2005, Origlia *et al.* 2008, Fang *et al.* 2010) et conduit à la libération de cytokines (Lue *et al.* 2001, Hickman *et al.* 2008) et de NO (Baiguera *et al.* 2009).

3.2. Scavenger receptors

Les SR représentent une large famille de protéines membranaires dont les *scavenger receptor class-A* (SR-A) (Krieger & Herz 1994), les *scavenger receptor class-B type I* (SR-BI) (Husemann *et al.* 2002), les CD36 (Coraci *et al.* 2002, Silverstein & Febbraio 2009), les *macrophage receptor with collagenous structure* (SR-MARCO) (Granucci *et al.* 2003) et les *scavenger receptor with C-type lectin* (SRCL) (Nakamura *et al.* 2001). Les SR sont présents dans les monocytes et les macrophages (Hirano *et al.* 1999), les astrocytes et la microglie (Christie *et al.* 1996, Husemann & Silverstein 2001, Alarcon *et al.* 2005), mais le type de récepteur exprimé varie d'un type cellulaire à l'autre.

Le niveau des ARNm codant les SRCL est fortement augmenté dans le cerveau de souris transgéniques surexprimant l'APP et la PS1, ainsi que le cortex de patients décédés de la MA (Nakamura *et al.* 2006). La localisation cellulaire des dépots amyloïdes chez les souris transgéniques suggère que les SRCL participent à la clearance du βA. Par ailleurs, des études ont montré que l'interaction du βA avec les SR-A entraîne la libération de cytokines et de ROS par la microglie (Giulian *et al.* 1995)

3.3. Formyl peptide receptors

Les FPRs ont initialement été identifiés pour leur capacité à lier les peptides N-formylés chimiotactiques d'origine bactérienne (Goetzl *et al.* 1981, Marasco *et al.* 1983), comme le *N-fomyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine* (fMLF), un peptide produit par les bactéries Gram$^-$ (Marasco *et al.* 1984). En plus du FPR, au moins 2 isoformes sont connus, le FPR Like 1 (FPRL1) et le FPR Like 2 (FPRL2) (Murphy *et al.* 1992). Ces récepteurs présentent une distribution cellulaire différente (Tab. 4).

Tableau 4 : Localisation cellulaire des différents FPRs.

Type cellulaire	FPR	FPRL1	FPRL2	Références bibliographiques
Leucocytes	+[1]	+[1]	+[2]	[1] Durstin *et al.* 1994, Yang *et al.* 2001a, [2] Migeotte *et al.* 2005
Microglie	+[3]	+[4]		[3] Lacy *et al.* 1995, [4] Cui *et al.* 2002
Astrocytes	+[5]	+[5]		[5] Le *et al.* 2000
Neurones	+[6]			[6] Becker *et al.* 1998

+, présence des récepteurs sur les cellules.

Ainsi, les FPR et les FPRL1 sont non seulement exprimés par les leucocytes mais également par la microglie et par les astrocytes (Lacy *et al.* 1995, Le *et al.* 2000) alors que les FPRL2 ont été mis en évidence uniquement dans certains types de leucocytes (Migeotte *et al.* 2005).

Ces différents récepteurs peuvent également interagir avec des protéines impliquées dans diverses maladies neurodégénératives, comme la protéine prion PrP106-126 (Le *et al.* 2001a) et le βA_{1-42} (Le *et al.* 2001a) (Tab. 5). Actuellement, il est largement admis que le βA lie préférentiellement les FPRL1 (Le *et al.* 2001a) dont la densité est fortement augmentée dans le tissu cérébral de patients décédés de la MA (Le *et al.* 2001a).

Tableau 5 : Pharmacologie des différents FPRs.

	FPR	FPRL1	FPRL2	Références bibliographiques
Agonistes				
fMLF	+[1] (0,1-1 nM)	+[1] (1 µM)		[1] Le *et al.* 2002
WKYMVm	+[2] (1 nM)	+[2,3] (1 pM)	+[4] (5 nM)	[2] Le *et al.* 1999, [3] Dahlgren *et al.* 2000
WKYMVM		+ [4] (2 nM)	+[4] (80 nM)	[4] Christophe *et al.* 2001
Gp41	+[5] (0,5 µM)	+[5] (0,1 µM)		[5] Su *et al.* 1999b
Cathépsine G	+[6]			[6] Sun *et al.* 2004
Humanine		+[7]	+[7]	[7] Harada *et al.* 2004
Lipoxine A4		+[8]		[8] Takano *et al.* 1997
Hp(2-20)		+[9] (0,3 µM)	+[10] (10 µM)	[9] Bylund *et al.* 2001, [10] Betten *et al.* 2001
SAA		+[11] (0,1 µM)	+[12]	[11] Su *et al.* 1999a, [12] Liang *et al.* 2000
PACAP27		+[13]		[13] Kim *et al.* 2006
F2L			+[14]	[14] Maccioni & Cambiazo 1995
LL-37		+[15] (1 µM)		[15] De *et al.* 2000
PrP(106-126)		+[16] (25 µM)		[16] Le *et al.* 2001b
Antagonistes				
N-t-Boc-FLFLF	+[1] (2 µM)			[1] Freer *et al.* 1980
WRWWWW		+[2]	+[3]	[2] Bae *et al.* 2004, [3] Shin *et al.* 2006
Annexine	+[4]	+[2]		[4] Walther *et al.* 2000
CHIPS	+[5]			[5] de Haas *et al.* 2004
Cyclosporine	+[6]			[6] Wenzel-Seifert & Seifert 1993
PBP10		+[7]		[7] Fu *et al.* 2004
FLIPr	+[8]	+[8]		[8] Prat *et al.* 2006
CDCA	+[9] (175 µM)	+[9] (300 µM)		[9] Chen *et al.* 2000
Spinorphine	+[10]			[10] Liang *et al.* 2001

+, interaction avec le récepteur - CDCA, *chenodeoxycholic acid* - CHIPS, *chemotaxis inhibitory protein of* Staphylococcus aureus - FLIPr, *FPRL1 inhibitory protein* - fMLF, *formyl Methionin-Leucyl-Phenylalanine* - Gp41, protéine de l'enveloppe du HIV-1 - Hp(2-20), peptide provenant de *H. pylori* - LL-37, *COOH-terminal peptide of human cationic antimicrobial protein with a molecular size of 18 kD* - N-t-Boc-FLFLF, *N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanine* - PACAP27, *pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27* - PBP10, *cell-permeable rhodamine B-coupled polyphosphoinositide-binding peptide* - PrP(106-126), proteine prion - SAA, *serum amyloid A*.

Tous les FPRs sont des récepteurs de type *G protein-coupled receptor* (GPCR) classiquement couplés à une PLC par l'intermédaire d'une protéine G sensible à la

PTx (Migeotte *et al.* 2006). La liaison du fMLF sur le FPR entraîne l'activation de la PLC (Le *et al.* 2002) et de la phosphoinositide 3 kinase γ (PI3Kγ) (Hirsch *et al.* 2000) dans les neutrophiles (Fig. 11). De même, l'interaction du βA avec le FPRL1 induit une mobilisation de $[Ca^{2+}]_i$ à partir de pools intracellulaires dans les phagocytes (Tiffany *et al.* 2001).

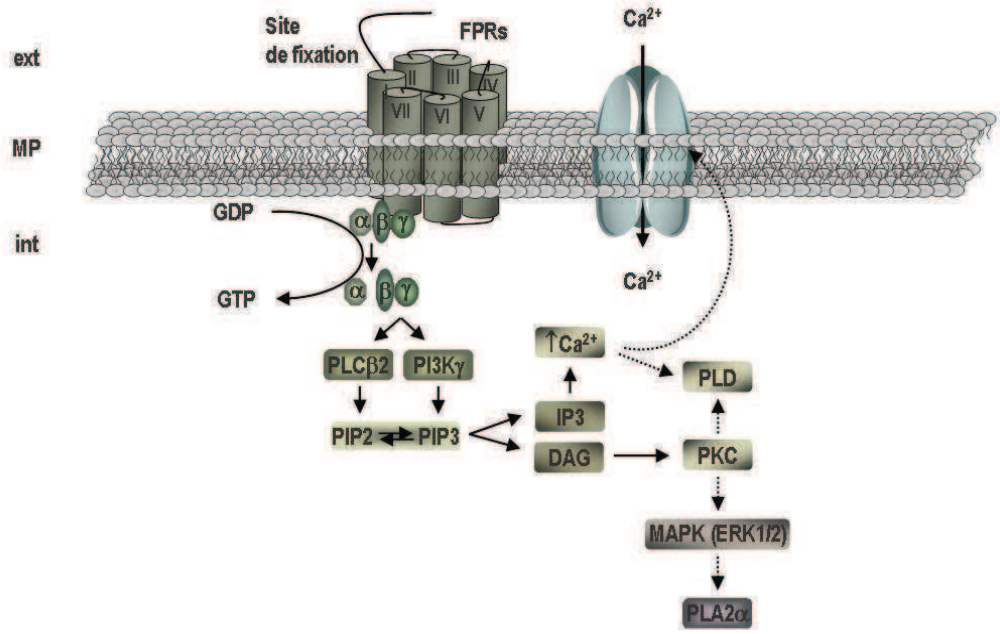


Figure 11 : Principales voies de transduction des FPRs. α β γ, sous unités de la protéine G - DAG, diacylglycérol - ext, milieu extracellulaire - FPRs, famille des *formyl peptide receptors* - GDP, Guanosine diphosphate - GTP, Guanosine triphosphate - int, milieu intracellulaire - IP3, inositol triphosphate - MAPK-ERK1/2, *mitogen-activated protein kinase- extracellular signal-regulated kinases 1 et 2* - MP, membrame plasmique - PIP2, phosphoinositol 4,5-bisphosphate - PIP3, phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate - PI3Kγ, phosphoinositide 3 kinase γ - PKC, protéine kinase C - PLA2, phospholipase A2 - PLCβ2, phospholipase Cβ2 - PLD, phospholipase D.

D'autres systèmes de transduction couplés aux FPRs ont également été proposés. Notamment, il a été montré que les MAPK sont activées par le peptide WKYMYm dans la lignée astrocytaire U87 (Kam *et al.* 2007) et par le fMLF dans les granulocytes HL-60 différenciés (Rane *et al.* 1997). Récemment, il a été montré que, le $βA_{1-42}$ *via* le FPRL1 active la voie des MAPK et de la phospholipase D (PLD) dans les cellules gliales (Brandenburg *et al.* 2008, Brandenburg *et al.* 2010). Finalement, l'interaction du $βA_{1-40}$ avec les FPR conduit à la libération de l'IL-1β à partir de cultures de microglie et de monocytes (Lorton *et al.* 1996). L'activation des FPRs

induit également la formation d'ions superoxyde dans les granulocytes (Rane *et al.* 1997) suggérant que le βA *via* les FPRs pourrait générer des radicaux libres dans les astrocytes.

IV. Objectifs de la thèse

La majorité des données bibliographiques s'accordent à dire que les EZ sont de véritables gliotransmetteurs spécifiquement produits par les cellules gliales chez les mammifères (Tonon *et al.* 1990, Malagon *et al.* 1993, Yanase *et al.* 2002) et que leur libération par les astrocytes est modulée positivement ou négativement par des neurotransmetteurs et des neuropeptides (Tonon *et al.* 2006). Outre leurs effets sur l'activé neuronale, des travaux menés au laboratoire montrent que les EZ peuvent moduler certaines activités astrocytaires telles que la $[Ca^{2+}]_i$ et l'incorporation de [^{3}H]thymidine (Gandolfo *et al.* 1997, 1999).

Quelques données indiquent que la production d'EZ peut être modulée physiologiquement, par exemple suite à un jeune de 24 h chez la souris (Compère *et al.* 2010), mais également dans certaines pathologies neurologiques. En particulier, des études menées chez l'homme indiquent que les taux d'EZ mesurés dans le LCR sont plus importants chez les individus atteints de la MA que chez les patients sains (Ferrarese *et al.* 1990). Ces données sont à rapprocher d'une étude réalisée au laboratoire qui met en évidence l'effet stimulateur du βA sur la synthèse et la libération d'EZ sur les astrocytes de rat en culture (Tokay *et al.* 2005). Néanmoins, les mécanismes mis en jeu dans l'effet du βA sur la libération d'EZ sont inconnus, de même que l'action de la production d'EZ induite par le βA sur l'activité astrocytaire.

L'objectif de ce travail est donc de *(i)* déterminer les récepteurs mis en jeu dans la production d'EZ induite par le βA, *(ii)* d'identifier les voies de transduction impliquées, et *(iii)* d'étudier le rôle des EZ ainsi produites sur l'activité astrocytaire.



Appareil et main
(1927)

Matériels & Méthodes

I. Culture cellulaire d'astrocytes de rat

L'ensemble des expériences présentées dans ce mémoire a été réalisé sur des astrocytes de rat en culture secondaire. Les astrocytes sont obtenus à partir du cortex cérébral de ratons âgés de 1 jour selon la méthode développée au laboratoire (Gandolfo *et al.* 1997).

Après décapitation des animaux, les cortex sont prélevés et placés dans un milieu de culture *Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12 Nutriment Mixture* (DMEM/Ham F-12) (2/1, v/v) contenant de l'insuline (1%), de la glutamine (2 mM), du D(+)-glucose (0,4 %), de l'acide N-(2-hydroxyéthyl)pipérazine-N'-2-éthanesulfonique (HEPES, 5 mM) et 1 % d'une solution d'antibiotique-antimycotique 100x (Gibco). Les méninges sont éliminées et les cellules dissociées mécaniquement par passages lents au travers d'une aiguille de 1,2 mm de diamètre intérieur. Après centrifugation (800 rpm, 5 min) et filtration sur un tamis de nylon (mailles de 100 µm) de la suspension cellulaire, les cellules sont diluées dans du milieu additionné de sérum de veau foetal (SVF, 10%) et mises en culture dans des flasques (150 cm^2) à raison de 20 x 10^6 cellules/flasque. Les cultures sont ensuite placées dans un incubateur en atmosphère humide et maintenues à 37°C en présence de 5% de CO_2. Le milieu de culture est renouvelé tous les 3 jours.

Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, la microglie est éliminée par agitation orbitale (175 rpm, 37°C, 18 h). Les cellules adhérentes sont alors détachées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (0,05%). Après centrifugation (800 rpm, 7 min), la suspension cellulaire est incubée durant environ 2 min dans une flasque de 75 cm^2 afin d'éliminer la microglie résiduelle par adhésion. Les cellules flottantes sont récupérées, et la suspension d'astrocytes est alors diluée entre 0,04 et 0,5 x 10^6 cellules/ml avec du milieu de culture additionné de SVF (10%) et ensemencée dans des plaques 12 puits ou des boîtes de Pétri de 30 mm et 60 mm selon le type d'expérience. Au bout de 2 à 3 jours de culture, les cellules présentent les caractéristiques morphologiques des astrocytes de type I et 98% des cellules expriment la GFAP.

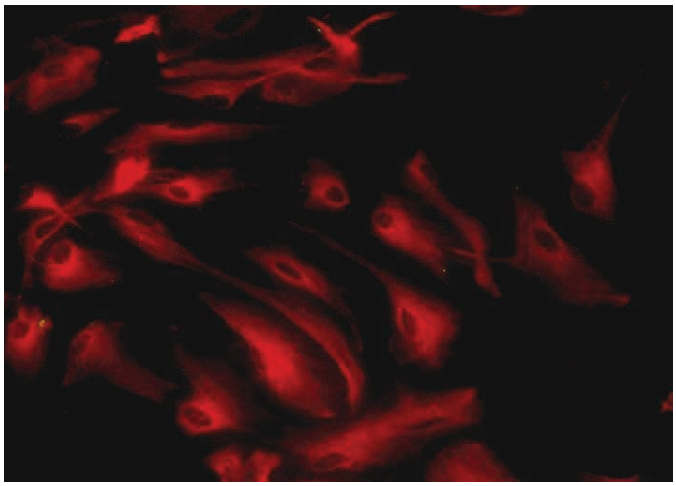


Figure 12 : Marquage des astrocytes de rat en culture secondaire par des anticorps dirigés contre la GFAP (*cliché réalisé par Mickaël Diallo, Inserm U982*).

La grande majorité des expériences a été réalisée sur des cultures d'astrocytes ayant atteint environ 90% de confluence.

II. Mesure de la prolifération astrocytaire

Afin d'évaluer l'effet de différentes substances (βA, ODN…) sur la prolifération des astrocytes, les cellules à 50% de confluence sont préalablement synnchronisées dans un milieu de culture dépourvu de SVF et d'insuline pendant 24 h. A la fin des traitements, les cellules sont rincées avec du tampon phosphate (PBS) à 37°C et décollées à l'aide de la trypsine-EDTA (0,05%). La prolifération astrocytaire est quantifiée par comptage des cellules vivantes, dont le diamètre est compris entre 9 et 23 µm, à l'aide d'un compteur de cellules (Z2 ; Beckman).

III. Mesure de la survie cellulaire

L'effet de différentes substances (βA, ODN…) sur la survie cellulaire a été étudié en incubant, à la fin des expériences, les astrocytes en présence de diacétate de fluoresceine (FDA) (3 mM, 37°C, 8 min) qui est stocké dans le compartiment cytosolique uniquement des cellules vivantes. Après rinçage avec du PBS, les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon Tris-HCl contenant du *sodium dodecyl sulfate solution* (SDS, 10%). La quantification des cellules vivantes est réalisée par mesure de

la fluorescence à 485 /530 nm, à l'aide d'un lecteur de plaques (FL-600, Bio-Tek Instruments).

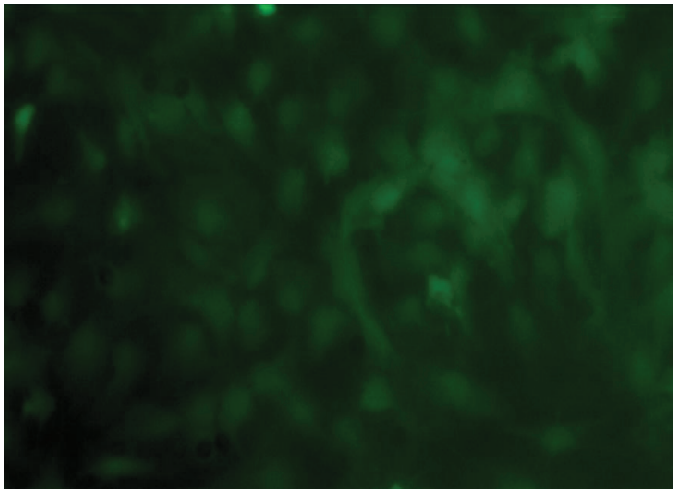


Figure 13 : Marquage des astrocytes de rat en culture secondaire par le diacétate de fluoresceine.

IV. Dosage des polyphosphoinositides

Afin d'étudier l'effet des différentes substances (βA, ODN…) sur le métabolisme des polyphosphoinositides (PIPs), la teneur en PIPs a été déterminée dans les astrocytes à l'aide d'une méthode développée au laboratoire (Desrues *et al.* 1990). Les astrocytes sont incubés en présence des composés à tester dans du milieu de culture appauvri en glucose (6,3 mg/ml) et contenant du [^{3}H]*myo*-inositol (10 μCi/ml; Amersham). A la fin de l'incubation, les cellules sont rincées puis homogénéisées dans de l'acide trichloroacétique (TCA) (10% ; w/v). La fraction membranaire (PIPs) est séparée de la fraction aqueuse (inositol + inositols phosphates) par centrifugation. Les PIPs tritiés sont extraits du culot par une solution de chloroforme/méthanol (2/1; v/v).

V. Dosage radioimmunologique de l'AMPc

L'effet des différentes substances (βA, ODN…) sur l'activié de l'adénylyl cyclase (AC) a été évalué en mesurant la production d'AMPc à l'aide d'un kit commercial de dosage radioimmunologique (RIA) (Amersham).

Les cellules sont pré-incubées en présence d'isobutylméthylxanthine (IBMX, 10^{-4} M; 30 min), inhibiteur de phosphodiestérase, avant d'être mises en présence des composés testés. A la fin l'expérience, le surnageant de culture est éliminé et les cellules sont homogénéisées au sonicateur (4°C, 10 s) dans de l'éthanol absolu. Après centrifugation (14000 rpm, 10 min), les surnageants sont déshydratés au Speed-Vac avant d'être reconstitués dans le tampon de dosage fourni dans le kit. Après une incubation (4°C, 3 h) en présence d'un anticorps dirigé contre l'AMPc froid et l'AMPc marquée à l'iode 125, la radioactivité liée aux complexes anticorps-antigène est mesurée à l'aide un compteur Gamma (1277 Gammamaster, LKB Wallac).

VI. Dosage radioimmunologique des EZ

La mesure des EZ libérées dans les surnageants de culture est réalisée grâce à un dosage RIA développé au laboratoire (Vaudry *et al.* 1978).

Les surnageants de culture récupérés après traitements des cellules sont purifiés sur des cartouches Sep-Pak C18. Les EZ sont éluées à l'aide d'une solution d'acétonitrile/acide trifluoroacétique (TFA) (v/v) et déshydratées au speed-vak.

Le dosage est réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'ODN de rat (dilution finale 1/20000ème) développé au laboratoire (Tonon *et al.* 1990) et d'un analogue de l'ODN, le [Tyr^{0}]-ODN, marqué à l'iode 125 (6000 cpm/tube) selon la méthode décrite par Vaudry et collaborateurs (Vaudry et al. 1978). Les échantillons, resuspendus dans le tampon de dosage phosphate/Triton X-100 (0,1 M / 0,1% ; pH 8), sont incubés en présence de l'anticorps et du peptide radioiodé pendant 48 h à 4°C. Les complexes anticorps-antigène formés sont précipités à l'aide de Polyéthylène glycol (PEG). Après centrifugation (4°C, 30 min), la radioactivité contenue dans les culots est mesurée à l'aide d'un compteur Gamma (1277 Gammamaster, LKB Wallac). La sensibilité du dosage est de 10 pg/tube.

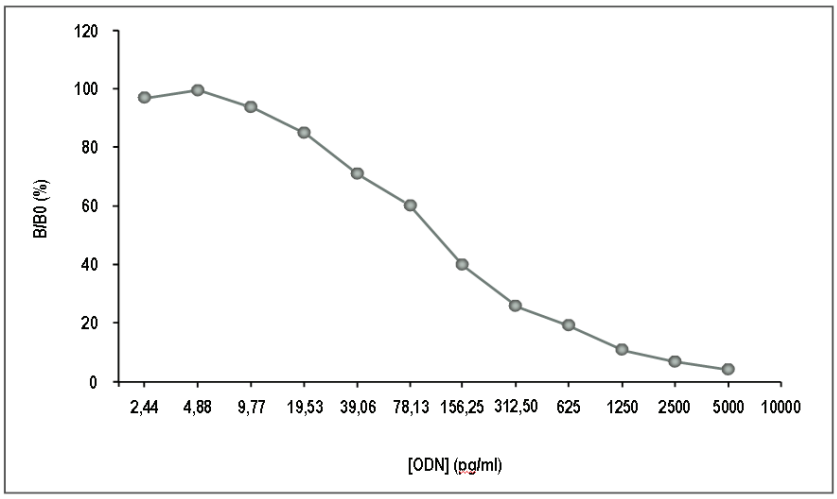


Figure 14 : Représentation graphique d'une gamme standard d'ODN. B/B0, rapport de la radioactivité liée au complexe antigène-anticorps (Ag-Ac) sur la radioactivité liée au complexe Ag-Ac en l'absence d'ODN froid.

VII. Dosage de l'IL- 1β

La mesure de l'IL-1β libérée par les astrocytes dans les surnageants de culture est évaluée à l'aide d'un Kit ELISA (Biosource Europe).

A la fin des expériences, les surnageants de culture sont récupérés et déshydratés au Speed-Vac. Les échantillons, reconstitués dans le tampon fourni dans le kit sont incubés (température ambiante, 3 h,) dans une plaque 96 puits contenant le premier anticorps. La quantification de l'IL-1β est réalisée par mesure de l'absorbance à 450 nm à l'aide du lecteur de plaques (FL-600, Bio-Tek Instruments).

VIII. Réactions en chaîne par polymérase

Afin d'évaluer l'effet de l'ODN sur l'expression du gène codant l'IL-1β, les ARNm ont été quantifiés par réactions en chaîne par polymérase quantitative, également appellée (QPCR).

En fin d'expérience, les ARN totaux sont extraits à partir d'astrocytes en culture selon la technique décrite par Chomczynski et Sacchi (Chomczynski & Sacchi 1987) à l'aide d'une solution de Tri® Reagent (Sigma), purifiés à l'aide du kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Hoedt) et finalement traités à la DNase.

L'équivallent de 1 µg d'ARN totaux est transcrit en ADNc dans un thermocycleur (Veriti, Applied Biosystems) en présence d'amorces aléatoires (50 µM) et de *ImProm-II Reverse Transcriptase* fournis dans le kit ImProm-II™ (Promega).

La QPCR quantitative, réalisée avec un appareil ABI prism 7500 *Sequence detection* (Applied Biosystem), est effectuée sur l'ADNc (15 ng) en présence d'une solution contenant du *Fast SYBR Green*, la Taq polymérase et des nucléotides, à laquelle sont ajoutées les amorces *forward* et *reverse* spécifiques des ARNm d'intérêt (Tab. 6).

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification par RT-PCR.

Gènes d'intérêt	rDBI	*forward* : 5'-TGCTCCCGCGCTTTCA-3' *reverse* : 5'-CTGAGTCTTGAGGCGTTCAC-3'
	rIL-1β	*forward* : 5'-AAAGTGGAGTTTGAGTCTGCACAGT-3' *reverse* : 5'-CCCGACCATTGCTGTTTCC-3'
Gène de référence	rGAPDH	*forward* : 5'-TCCCATTCCTCCACCTTTGA-3' *reverse* : 5'-CAGGAAATGAGCTTCACAAAGTTG-3'

rDBI, *Diazepam Binding Inhibitor* de rat - rIL-1β, interleukine-1β de rat - rGAPDH, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de rat.

Le programme de la QPCR comprend 40 cycles de dénaturation (95°C, 15 s)-hybridation/élongation (60°C, 1 min). La quantité d'amplicons formés pour chaque échantillon est déterminée en utilisant la formule $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$, dans laquelle le cycle seuil ou Ct (*cycle treshold*) désigne le numéro du cycle à partir duquel la fluorescence atteint la valeur seuil, le ΔCt correspond au Ct du gène d'intérêt – le Ct du gène de référence de chaque échantillon, et le ΔΔCt représente la différence entre le ΔCt d'un échantillon et la moyenne des ΔCt des échantillons utilisés comme contrôle.

IX. Mesure de l'activité glioprotectrice de l'ODN

Afin d'évaluer l'activité glioprotectrice de l'ODN et de déterminer les mécanismes mis en jeu, les astrocytes en culture sont incubés en présence d'un dérivé

réactif de l'oxygéne présentant une forte toxicité cellulaire, le H_2O_2 et plusieurs paramètres sont mesurés.

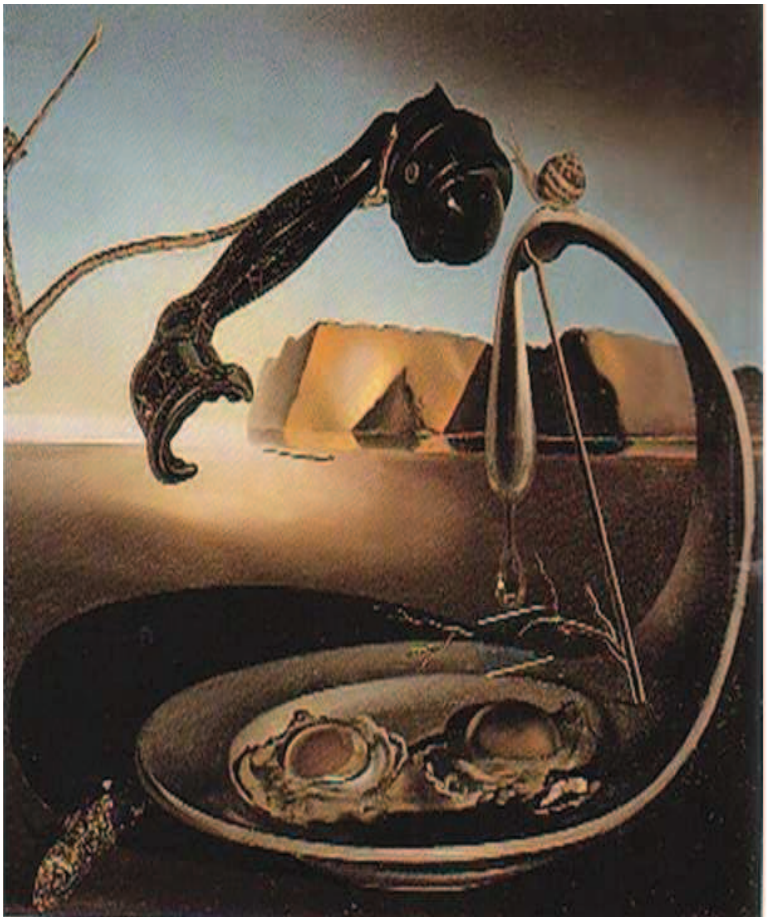
La ***cytotoxicité*** est évaluée en mesurant la libération de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture à l'aide d'un kit commercial (Bio-Maghreb).

Les ***activités de deux enzymes antioxydantes***, la SOD et la catalase, sont mesurées par spectrophotométrie. Dans le cas de la SOD, les échantillons sont incubés en présence de catalase et d'épinephrine dont l'oxydation est mesurée à 480 nm. Dans celui de la catalase, les échantillons sont incubés en présence de H_2O_2 dont la disparition est mesurée à 240 nm. L'activité de la catalase est calculée en utilisant un coeficient d'extinction de 40 mM^{-1} cm^{-1} de H_2O_2.

La ***teneur intracellulaire en dérivés réactifs de l'oxygène*** (ROS) est déterminée par la mesure de la fluorescence du 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), un dérivé d'un composé non fluorescent, le 5-6-Chloromethyl 2'-7'dichlorodihydrofluorescein (DCFH2-DA), obtenu par déacétylation et oxydation de ce dernier au niveau intracellulaire.

Le potentiel membranaire mitochondrial est quantifié par la mesure de la fluorescence de la sonde JC-1 qui émet un signal orange (590 nm) lorsque la membrane mitochondriale est intacte et un signal vert (530 nm) lorsqu'elle est fragilisée.

L'***activité de la caspase 3*** est évaluée à l'aide d'un Kit Apo-ONE caspase-3/7 (Promega).



Le Moment sublime
(1938)

Résultats

Mécanismes d'action et voies de signalisation impliqués dans l'effet du peptide β-amyloïde sur la libération d'endozépines par les astrocytes de rat en culture

Glia, 2008, **56**, 1380-1389

Le terme endozépine (EZ) désigne une famille de peptides qui regroupe le *diazepam-binding-inhibitor* (DBI) et ses dérivés dont l'octadécaneuropeptide (ODN). Dans le système nerveux central des vertébrés, les EZ sont exclusivement synthétisées par les cellules gliales. Des études cliniques ont révélé que les quantités d'EZ mesurées dans le liquide céphalo-rachidien sont augmentées chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une maladie qui se caractérise par des dépôts de peptide bêta-amyloïde (βA) et une prolifération astrocytaire. Des travaux menés dans le laboratoire indiquent que le peptide βA_{25-35} agrégé augmente la production d'EZ et la prolifération des astrocytes *in vitro,* néanmoins les mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'effet du peptide βA_{25-35} sur l'activation des astrocytes restent mal connus.

Quelques études suggèrent que le peptide βA peut interagir avec les récepteurs des peptides N-formylés (FPRs) et d'autres démontrent l'existence de FPRs fonctionnels dans les astrocytes.

Nous avons donc entrepris d'étudier une éventuelle implication de ces récepteurs dans la libération des endozépines induite par le peptide βA agrégé. Dans le présent travail, nous avons recherché à répondre aux questions suivantes :

1. L'effet du βA agrégé sur la production d'endozépines implique-t-il l'activation des FPRs ?
2. Quels sont les systèmes de transduction mis en jeu dans l'effet du βA agrégé sur la libération des endozépines ?

GLIA 56:1380–1389 (2008)

Beta-Amyloid Peptide Stimulates Endozepine Release in Cultured Rat Astrocytes Through Activation of *N*-Formyl Peptide Receptors

TURSONJAN TOKAY,[1,2,3] RAYA HACHEM,[1,2,3] OLFA MASMOUDI-KOUKI,[1,2,3,4] PIERRICK GANDOLFO,[1,2,3] LAURENCE DESRUES,[1,2,3] JEROME LEPRINCE,[1,2,3] HELENE CASTEL,[1,2,3] MICKAEL DIALLO,[1,2,3] MOHAMED AMRI,[4] HUBERT VAUDRY,[1,2,3]* AND MARIE-CHRISTINE TONON[1,2,3]

[1]*INSERM U413, Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France*
[2]*International Associated Laboratory Samuel de Champlain, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France*
[3]*European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), Regional Platform for Cell Imaging of Haute-Normandie (PFRRICHN), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France*
[4]*Laboratory of Physiology of Nutrition, Research Unit 00/UR/08-01, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, Tunis, Tunisia*

KEY WORDS
β-amyloid peptide; *N*-formyl peptide receptors; endozepines; astroglial cells

ABSTRACT
Astroglial cells synthesize and release endozepines, a family of neuropeptides derived from diazepam-binding inhibitor (DBI). The authors have recently shown that β-amyloid peptide (Aβ) stimulates *DBI* gene expression and endozepine release. The purpose of this study was to determine the mechanism of action of Aβ in cultured rat astrocytes. $A\beta_{25–35}$ and the *N*-formyl peptide receptor (FPR) agonist *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF) increased the secretion of endozepines in a dose-dependent manner with EC_{50} value of ≈2 μM. The stimulatory effects of $A\beta_{25–35}$ and the FPR agonists fMLF and *N*-formyl-Met-Met-Met (fMMM) on endozepine release were abrogated by the FPR antagonist *N-t*-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe. In contrast, $A\beta_{25–35}$ increased DBI mRNA expression through a FPR-independent mechanism. $A\beta_{25–35}$ induced a transient stimulation of cAMP formation and a sustained activation of polyphosphoinositide turnover. The stimulatory effect of $A\beta_{25–35}$ on endozepine release was blocked by the adenylyl cyclase inhibitor somatostatin, the protein kinase A (PKA) inhibitor H89, the phospholipase C inhibitor U73122, the protein kinase C (PKC) inhibitor chelerythrine and the ATP binding cassette transporter blocker glyburide. Taken together, these data demonstrate for the first time that $A\beta_{25–35}$ stimulates endozepine release from rat astrocytes through a FPR receptor positively coupled to PKA and PKC. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Diazepam-binding inhibitor (DBI) is an 86-amino acid polypeptide initially isolated from the rat brain by virtue of its ability to displace [^{3}H]diazepam binding from neuronal membranes (Guidotti et al., 1983). Proteolytic cleavage of DBI at basic residues has the potential to generate several peptides, including the triakontatetraneuropeptide (TTN) ($DBI_{17–50}$) and the octadecaneuropeptide (ODN) ($DBI_{33–50}$) (Ferrero et al., 1986; Slobodyansky et al., 1989). DBI and its proteolytic fragments, which act as endogenous ligands of central- and/or peripheral-type benzodiazepine receptors, are collectively termed endozepines (Shoyab et al., 1986; Tonon et al., 2006). The primary structures of endozepines, notably those of TTN and ODN, have been strongly preserved from fish to mammals (Chang and Tsai, 1996; Lihrmann et al., 1994; Mocchetti et al., 1986; Webb et al., 1987), suggesting that these peptides play important biological functions.

In situ hybridization studies indicate that, in the rat brain, the *DBI* gene is primarily expressed in glial cells (Alho et al., 1995; Bürgi et al., 1999; Tong et al., 1991). The occurrence of DBI-related peptides in various populations of astroglial cells has been confirmed by immunohistochemistry, notably in Bergmann cells of the cerebellum, ependymocytes, tanycytes, and pituicytes (Alho et al., 1991; Malagon et al., 1993; Tonon et al., 1990; Yanase et al., 2002). *In vitro* studies have shown that cultured rat astrocytes contain and release substantial amounts of endozepines (Lamacz et al., 1996) and that endozepine secretion is modulated by neuroactive compounds (Diallo et al., in press; Masmoudi et al., 2003, 2005; Patte et al., 1999).

Astrocytes are implicated in the pathogenesis of neurodegenerative diseases notably Alzheimer's disease (AD). Typical hallmarks of AD are the progressive extracellular deposit of β-amyloid peptide (Aβ), the major constituent of senile plaques (Kang et al., 1987), and the appearance of reactive astrocytes in the area surrounding the amyloid-containing plaques (Arelin et al., 2002; Nagele et al., 2004). It is now clearly established

Grant sponsor: INSERM (U413); the European Institute for Peptide Research (IFRMP 23); Regional Platform for Cell Imaging of Haute-Normandie (PFRRICHN); France-Tunisia exchange program Utique; Conseil Régional de Haute-Normandie.

*Correspondence to: Dr. Hubert Vaudry, INSERM U413, Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France.
E-mail: hubert.vaudry@univ-rouen.fr

Received 4 February 2008; Accepted 22 April 2008

DOI 10.1002/glia.20705

Published online 29 May 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2008 Wiley-Liss, Inc.

that, in astrocytes, Aβ activates the synthesis and secretion of various proinflammatory mediators, including interleukin-1 (IL-1) and IL-6 (Eriksson et al., 1998; Toro et al., 2001). We have recently shown that Aβ stimulates both the expression of the *DBI* gene and the release of endozepines from cultured rat astrocytes (Tokay et al., 2005). However, the mechanisms involved in Aβ-induced astroglial cell activation are currently unknown.

There is now evidence that Aβ can activate various types of plasma membrane receptors such as the scavenger receptor (El Khoury et al., 1996; Nakamura et al., 2006; Yan et al., 1996), the receptor for advanced glycation end products (El Khoury et al., 1996; Yan et al., 1996), and the receptors for *N*-formyl peptides (Le et al., 2001a). *N*-formyl peptides are cleavage products of bacterial proteins that act as chemoattractants for phagocytic leucocytes (Marasco et al., 1984). The actions of *N*-formyl peptides are mediated through at least two types of seven-transmembrane G protein-coupled receptors, i.e., the high-affinity *N*-formyl peptide receptor (FPR) and its low affinity variant FPR-like 1 (FPR-L1) (Le et al., 2002).

Since both FPR and FPR-L1 are expressed in astroglial cells (Lacy et al., 1995; Le et al., 2000), in this study we have examined the possible involvement of these FPRs in Aβ-induced activation of *DBI* gene expression and endozepine secretion in cultured rat astrocytes.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), F12 culture medium, D(+)-glucose, bovine serum albumin (BSA), trifluoroacetic acid (TFA), isobutylmethylxanthine (IBMX), β-amyloid 25-35 peptide ($A\beta_{25-35}$), chelerythrine, ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraacetic acid (EGTA), H89, *N*-formyl-Met-Leu-Phe peptide (fMLF), *N*-formyl-Met-Met-Met (fMMM), *N*-*t*-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc-FLFLF), U73122, U73343, and glyburide were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Somatostatin-14 (SRIF) was kindly provided by Dr. I. Fermé (Sanofi-Synthélabo, Le Plessis-Robinson, France). L-Glutamine, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane sulfonic acid (HEPES), and the antibiotic-antimycotic solution were obtained from Biowhitaker (Gagny, France). Fetal bovine serum (FBS) was from Dutscher (Brumath, France). Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin-EDTA) was from GIBCO (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Acetonitrile was from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). [Tyr^0]-ODN was from NeoPMS (Strasbourg, France). *Myo*-[^{3}H]inositol (100 Ci/mmol), $Na^{125}I$ (2000 Ci/mmol) and the cAMP radioimmunoassay (RIA) kit (RPA 509) were from Amersham International (Les Ulis, France). Rat ODN was synthesised by using the standard Fmoc procedure as previously described (Leprince et al., 1998). All other reagents were of A grade purity.

Abbreviations

Aβ	beta-amyloid peptide
DBI	diazepam-binding inhibitor
EZ	endozepines
ODN	octadecaneuropeptide DBI_{33-50}.

Cell Culture

Secondary cultures of rat cortical astrocytes were prepared as previously described (Brown, 1999) with minor modifications. Briefly, cerebral hemispheres from newborn Wistar rats were collected in DMEM/F12 (2:1; v/v) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% glucose, and 1% of the antibiotic-antimycotic solution. The tissues were dissociated mechanically with a syringe equipped with a 1-mm gauge needle, and filtered through a 100-μm sieve (Falcon, Franklin Lakes, NJ). Dissociated cells were resuspended in culture medium supplemented with 10% FBS, plated in 150-cm^2 flask (Techno Plastic Products, Trasandinger, Switzeland) and incubated at 37°C in a 5% CO_2/95% O_2 atmosphere. When cultures were confluent, astrocytes were isolated by shaking mixed glial culture overnight with an orbital agitator (KS 15, Bühler, Ratingen, Germany). Adhesive cells were detached by trypsination and preplated 2 min to discard contaminating oligodendrocytes and microglial cells. Then, the nonadhering astrocytes were harvested and plated at a density of 0.2×10^6 cells/ml on 60-mm Petri dishes for measurement of endozepine secretion or 35-mm Petri dishes for measurement of cAMP and phospholipide inositol metabolism. The cells were incubated at 37°C in a humid atmosphere (5% CO_2). After 4 days of culture, 100% of the cells were labeled with antibodies against glial fibrillary acidic protein, and no labeling was observed with antibodies against galactocerebroside or isolectin B4, markers of oligodendrocytes, or microglia, respectively (data not shown). All experiments were performed on 5- to 7-day-old secondary cultures.

Measurement of ODN-Related Peptide Release

DIV5 cells were incubated at 37°C with fresh serum-free medium in the absence or presence of test substances. At the end of the incubation, culture media were collected and the cells were homogenized in 2 M ice-cold acetic acid. Peptides contained in culture media were concentrated on Sep-Pak C_{18} cartridges (Alltech Europe, Lokeren, Belgium). Bound material was eluted with 50% (v/v) acetonitrile/water containing 0.1% TFA (v/v) and dried by vacuum centrifugation (Speed Vac concentrator, Savant, Hicksville, NY) until RIA.

The concentrations of ODN-like immunoreactivity (ODN-LI) were measured by RIA using an antiserum raised against synthetic rat ODN (Tonon et al., 1990). [Tyr^0]-ODN was iodinated using the chloramine-T proce-

dure (Vaudry et al., 1978) and purified on a Sep-Pak C_{18} cartridge. Dried samples of cultured media were resuspended in phosphate buffer (100 mM; pH 8) containing 0.1% Triton X-100. The final dilution of the ODN antiserum was 1:30,000 and the total amount of tracer was 6,000 cpm/tube. After a 2-day incubation at 4°C, the antibody-bound ODN fraction was precipitated by addition of 100 μl bovine γ-globulins (1%, w/v) and 2 ml polyethylene glycol (20%, w/v). After centrifugation (5,000*g*, 4°C, 30 min), the supernatant was removed and the pellet containing the bound fraction was counted in a gamma counter (LKB Wallac, Rockville, MI). The working range of the RIA was 5-2500 pg/tube, and the sensitivity of the assay was 10 pg/tube.

RT-PCR Analysis

Cultured astrocytes were incubated at 37°C with fresh serum-free culture medium in the absence or presence of test substances. At the end of the incubation, culture media were removed and the cells were rinsed twice with RNase-free saline phosphate buffer (1 M, pH 7.4; Invitrogen). Total RNA was extracted by the guanidine thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski and Sacchi, 1987) using Tri reagent. Approximately 1 μg of total RNA was reverse transcribed by ImPROM-^{IITM} reverse transcriptase (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) using random hexanucleotides as primers. Quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) was performed on 15 ng of total cDNA with 1X SYBR green universal PCR Master mix (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) containing dNTPs, $MgCl_2$, AmpliTaq Gold DNA polymerase, forward (5′-TGCTCCCGCGCTTTCA-3′) and reverse (5′-CTGAGTCTTGAGGCGCTTCAC-3′) DBI primers (300 nM, each; Proligo, Paris, France). The cDNAs were first subjected to 50°C for 2 min and 95°C for 10 min, followed by 40 reaction cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, using the ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystem). The amount of DBI cDNA in each sample was calculated by using the comparative threshold cycle (Ct) method (Masmoudi et al., 2005) and expressed as $2^{\exp(-\Delta\Delta Ct)}$ using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an internal control.

Measurement of cAMP

Cultured cells were preincubated for 30 min with serum-free medium containing 100 μM IBMX. The cells were then incubated in the absence or presence of test substances. The incubation was stopped by removing the medium and adding 10% (w/v) ice-cold trichloroacetic acid (TCA). The cells were homogenized and centrifuged (14,000*g*, 4°C, 10 min). The supernatant was washed three times with 1 ml water-saturated diethylether and dried by vacuum centrifugation. The pellets were used for measurement of protein concentration by the Lowry's method. The dry samples were reconstituted in 1 ml of sodium acetate buffer (0.05 M, pH 5.8), and cAMP content was measured by using a commercial cAMP RIA kit.

Measurement of Polyphosphoinositide Metabolism

Cultured astrocytes were incubated at 37°C with 10 μCi/ml *myo*-[^{3}H]inositol, in glucose- and serum-free medium, in the absence or presence of test substances. The incubation was stopped by removing the medium and adding 10% (w/v) ice-cold TCA. The cells were homogenized and centrifuged (13,000*g*, 4°C, 10 min). [^{3}H]Polyphosphoinositides ([^{3}H]PIPs) were extracted from the pellets with 500 μl of chloroform/methanol (2:1, v/v) and counted in a beta counter (LKB 1217 Rack Beta, EG and G Wallac, Evry, France). The remaining pellets were used for measurement of protein concentration by the Lowry's method.

Statistical Analysis

All values presented in the figures are means ± SEM. Student's *t*-test and ANOVA followed by Bonferroni's test were applied to determine statistical differences between values.

RESULTS

Involvement of FPRs in Amyloid Peptide-Induced Endozepine Release

Exposure of astrocytes to graded concentrations of aggregated $A\beta_{25-35}$ (0.1 to 100 μM) for 1 h resulted in a dose-dependent increase of ODN-LI concentration in the culture medium (Fig. 1A). The FPR agonist fMLF mimicked the effect of $A\beta_{25-35}$ on endozepine secretion. For both $A\beta_{25-35}$ and fMLF, the half-maximum effects were observed at a dose of ≈2 μM and the maximum stimulation of ODN-LI release (194%–199% over control; $P < 0.001$) was obtained at a dose of 100 μM. The FPR agonist fMMM (10 μM) also induced a significant increase in the release of ODN-LI (Fig. 1B). The FPR antagonist Boc-FLFLF (5 μM) totally blocked the effects of $A\beta_{25-35}$, fMLF and fMMM (10 μM each, 1 h) on endozepine release (Fig. 1B).

We have previously shown that Aβ activates *DBI* gene expression concentration-dependently in cultured rat astrocytes (Tokay et al., 2005). $A\beta_{25-35}$ had no effect on DBI mRNA level during the first 12 h of incubation, but significantly ($P < 0.001$) stimulated DBI mRNA expression after 24 and 36 h (Fig. 2A). The effect of $A\beta_{25-35}$ was not mimicked by fMLF and fMMM (10 μM each, 24 h) (Fig. 2B). In addition, the FPR antagonist Boc-FLFLF (5 μM) did not affect the increase of DBI mRNA induced by $A\beta_{25-35}$ (Fig. 2B).

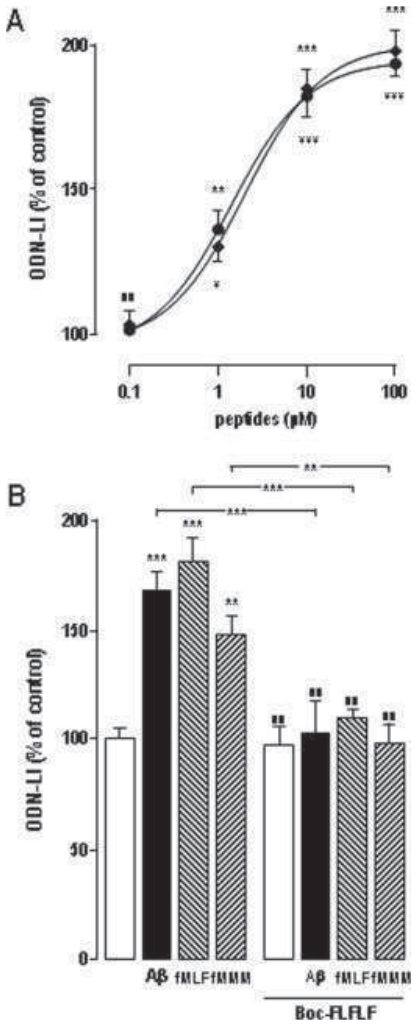


Fig. 1. Effect of $A\beta_{25-35}$ and formyl peptide receptor (FPR) ligands on the release of ODN-like immunoreactivity (ODN-LI) from cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: The cells were incubated for 1 h with increasing concentrations (0.1 to 100 μM) of aggregated $A\beta_{25-35}$ (●) or *N*-formyl-Met-Leu-Phe (fMLF; ♦). **B**: The cells were incubated for 1 h with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ) or fMLF or *N*-formyl-Met-Met-Met (fMMM) (10 μM each) in the absence or presence of the FPR antagonist *N-t*-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (Boc-FLFLF; 5 μM). The results are expressed as percentages of the control. Each value is the mean (± SEM) of at least three independent experiments performed in quintuplicate. The mean basal level of ODN-LI release in these experiments was 133.3 ± 2.9 pg/dish per hour. ANOVA followed by the Bonferroni's test: $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; NS (■■), not statistically different from the control.

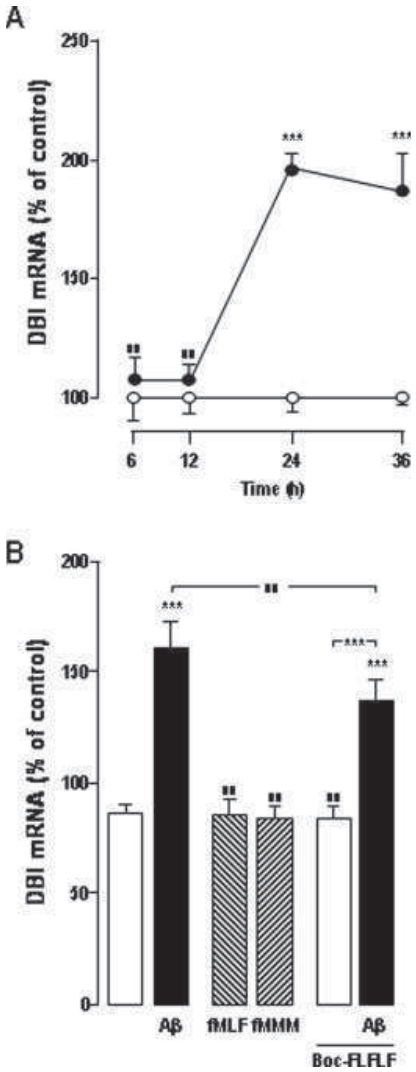


Fig. 2. Effect of $A\beta_{25-35}$ and formyl peptide receptor (FPR) ligands on DBI mRNA level in cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: The cells were incubated for the times indicated in the absence (○) or presence of 10 μM aggregated $A\beta_{25-35}$ (●). **B**: The cells were incubated for 24 h with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ) or the FPR agonists fMLF and fMMM (10 μM each) in the absence or presence of the FPR antagonist Boc-FLFLF (5 μM). The results are expressed as percentages of the control. Each value is the mean (± SEM) of four independent experiments performed in quintuplicate. ANOVA followed by the Bonferroni's test: $^{***}P < 0.001$; NS (■■), not statistically different from the controls.

Involvement of FPRs in the Effects of Amyloid Peptide on cAMP Formation and Polyphosphoinositide Metabolism

At a concentration of 10 μM, $A\beta_{25-35}$ induced a significant ($P < 0.001$), rapid (10 min), and transient increase of cAMP concentration in cultured rat astrocytes (Fig. 3A). The stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ on cAMP formation was mimicked by fMLF (10 μM, 10 min) (Fig. 3B).

$A\beta_{25-35}$ (10 μM) induced a significant ($P < 0.01$) and sustained (1-3 h) increase of [^{3}H]inositol incorporation into the PIP fraction (Fig. 4A). Administration of graded concentrations of $A\beta_{25-35}$ and fMLF (0.1 to 100 μM, 1 h) evoked a dose-dependent increase in [^{3}H]inositol incorporation into PIPs with an EC_{50} value of 1.3 μM (Fig. 4B). Addition of Boc-FLFLF (5 μM) for 1 h did not affect by itself PIP turnover, but suppressed both fMLF- and $A\beta_{25-35}$-induced increase in [^{3}H]PIP formation (Fig. 5A,B).

Preincubation of astrocytes with the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 (10 μM, 15 min) had no effect on basal incorporation of [^{3}H]inositol into PIPs, but totally suppressed the stimulatory effect of 10 μM $A\beta_{25-35}$ (see

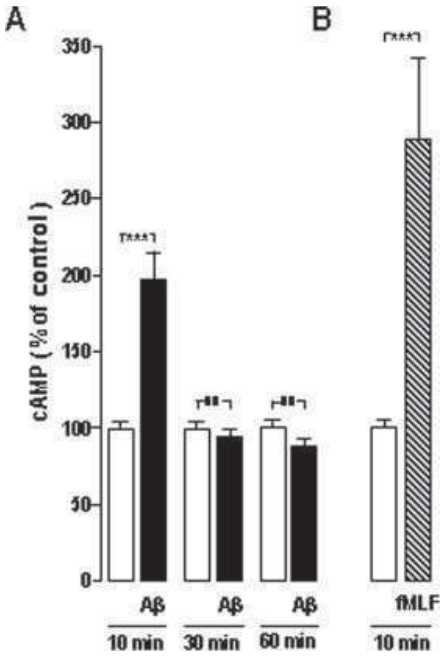


Fig. 3. Effect of $A\beta_{25-35}$ and formyl peptide receptor (FPR) ligand on cAMP formation in cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: After a 30-min preincubation period with 100 μM IBMX, the cells were incubated without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM) for the times indicated. **B**: After a 30-min preincubation period with 100 μM IBMX, the cells were incubated without or with fMLF (10 μM) for 10 min. The results are expressed as percentages of the control. Each value is the mean (± SEM) of at least three independent experiments performed in quintuplicate. The mean protein content in these experiments was 364.2 ± 2.5 μg/dish and the mean cAMP production in control (10 min) was 1.9 ± 0.3 ng/dish. ANOVA followed by the Bonferroni's test: ***$P < 0.0$ 01; NS (■■), not statistically different from the controls.

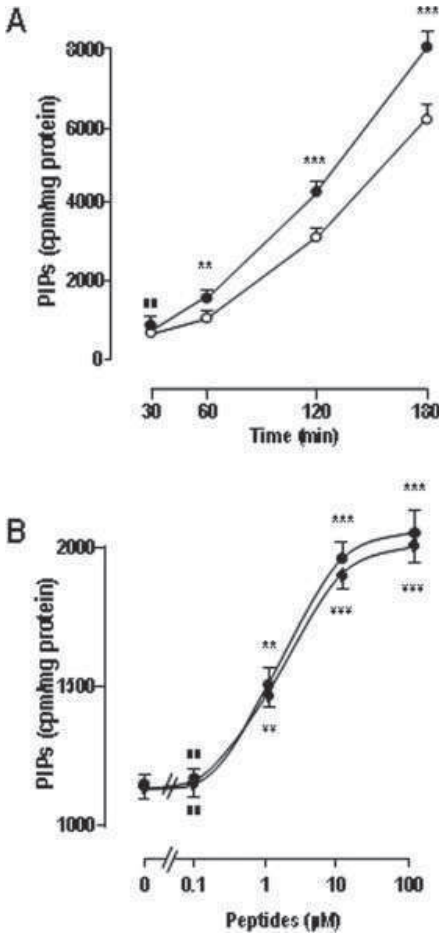


Fig. 4. Effect of $A\beta_{25-35}$ and the FPR agonist fMLF on the incorporation of [^{3}H]inositol into polyphosphoinositides (PIPs) in cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: Time-course of the incorporation of [^{3}H]inositol into PIPs in the absence (○) or presence of aggregated $A\beta_{25-35}$ (●; 10 μM). **B**: Effects of a 1-h incubation with graded concentrations (0.1 to 100 μM) of aggregated $A\beta_{25-35}$ (●) or fMLF (♦) on the incorporation of [^{3}H]inositol into PIPs. Each value is the mean (± SEM) of at least three independent experiments performed in quintuplicate. ANOVA followed by the Bonferroni's test: **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$; NS (■■), not statistically different from the controls.

Fig. 6). In contrast, the inactive analog U73343 (10 μM) did not modify [^{3}H]inositol incorporation induced by $A\beta_{25-35}$ (see Fig. 6).

Signaling Mechanisms Involved in Amyloid Peptide-Induced Endozepine Release

Preincubation of astrocytes with the PLC inhibitor U73122 (10 μM) did not affect the spontaneous release of ODN-LI by cultured rat astrocytes, but totally blocked the stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ (10 μM) on endozepine secretion (Fig. 7A). The inactive analog U73343 had no effect on $A\beta_{25-35}$-induced ODN-LI release. Incubation of cells with EGTA (6 mM) or $NiCl_2$ (2 mM) also suppressed the stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ on endozepine secretion (Fig. 7B,C). Similarly, the selective protein kinase A (PKA) inhibitor H89 (20 μM) and the selective protein kinase C (PKC) inhibitor chelerythrine (2 μM), which had no effect by themselves, both abolished the stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ on the release of ODN-LI (Fig. 8A). We have previously shown that somatostatin inhibits cAMP formation and endozepine release in cultured astrocytes (Masmoudi et al., 2005). Simultaneous administration of $A\beta_{25-35}$ (10 μM) and somatostatin (10 nM) totally blocked $A\beta_{25-35}$-induced release of ODN-LI (Fig. 8B). Finally, preincubation of astrocytes with the selective blocker of ATP binding cassette (ABC) transporters glyburide (10 μM) significantly ($P < 0.01$) attenuated the stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ (10 μM) on endozepine secretion (Fig. 8C).

DISCUSSION

It has previously been shown that endozepines are synthesized by glial cells and that the release of DBI-related peptides by cultured rat astrocytes is a regulated process (Diallo et al., in press; Masmoudi et al., 2003, 2005; Patte et al., 1999). We have recently found that Aβ stimulates the expression of the *DBI* gene and the secretion of endozepines from astroglial cells (Tokay

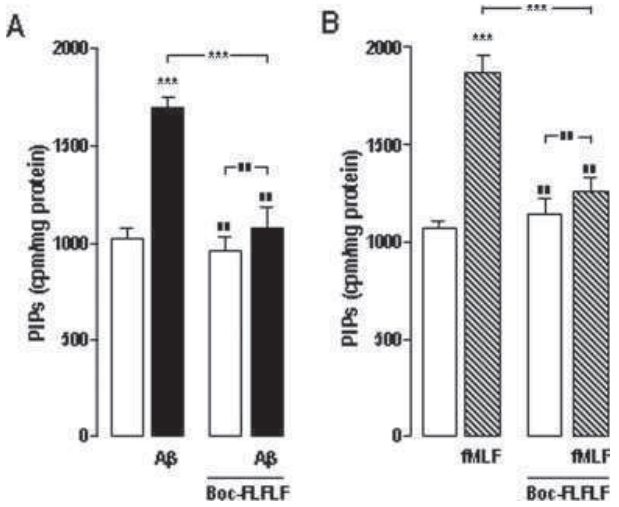


Fig. 5. Effect of the FPR antagonist Boc-FLFLF on basal and $A\beta_{25-35}$- or fMLF-induced incorporation of [^{3}H]inositol into polyphosphoinositides (PIPs) in cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: The cells were incubated for 1 h with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM) in the absence or presence of Boc-FLFLF (5 μM). **B**: The cells were incubated for 1 h with fMLF (10 μM) in the absence or presence of Boc-FLFLF (5 μM). Each value is the mean (± SEM) of at least three independent experiments performed in quintuplicate. ANOVA followed by the Bonferroni's test: ***$P < 0.001$. NS (■■), not statistically different from the control.

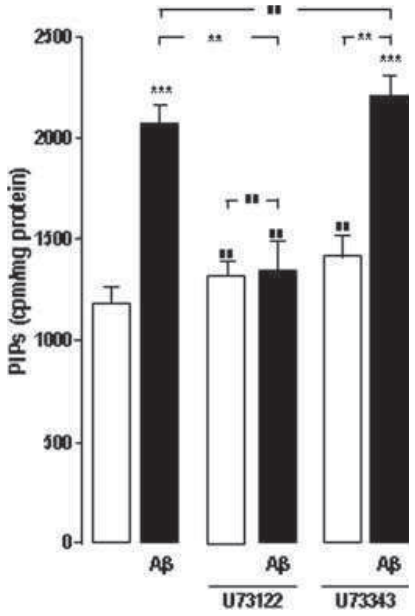


Fig. 6. Effect of the PLC inhibitor U73122 and its inactive analog U73343 on basal and $A\beta_{25-35}$-induced incorporation of [^{3}H]inositol into polyphosphoinositides (PIPs) in cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. The cells were preincubated for 15 min in the absence or presence of U73122 or U73343 (10 μM each), and then incubated for 1 h without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM). Each value is the mean (± SEM) of five independent experiments performed in quintuplicate. ANOVA followed by the Bonferroni's test: **$P < 0.01$; ***$P < 0.001$; NS (■■), not statistically different from the control.

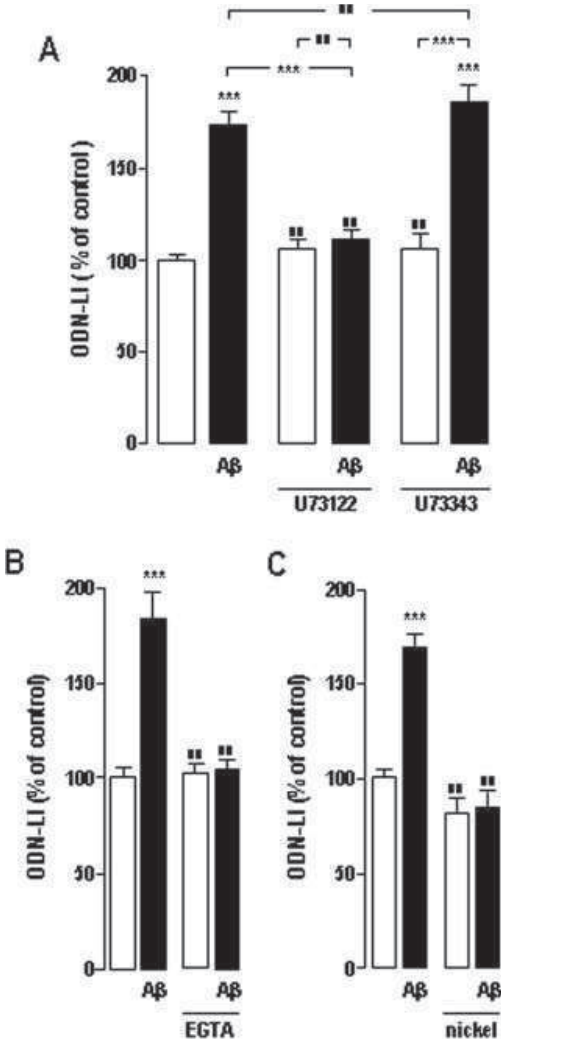


Fig. 7. Effect of the PLC inhibitor U73122, its inactive analog U73343, the calcium chelator EGTA, and nickel on basal and $A\beta_{25-35}$-induced release of ODN-like immunoreactivity (ODN-LI) from cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: The cells were preincubated for 15 min in the absence or presence of U73122 or U73343 (10 μM each), and then incubated for 1 h without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM). **B**, **C**: The cells were preincubated for 10 min in the absence or presence of EGTA (B; 6 mM) or nickel (C; 2 μM), and then incubated for 1 h without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM). The results are expressed as percentages of the control value. The mean basal level of ODN-LI release in these experiments was 109.4 ± 6.1 pg/dish per h. Each value is the mean (± SEM) of at least three independent experiments performed in quintuplicate. ANOVA followed by the Bonferroni's test: ***$P < 0.001$; NS (■■), not statistically different from the control.

et al., 2005). This study now demonstrates that $A\beta_{25-35}$ stimulates cAMP production, activates polyphosphoinositide turnover, and increases endozepine release through activation of *N*-formyl peptide receptors in cultured rat astrocytes.

$A\beta_{25-35}$, a neurotoxic fragment of the Alzheimer β-amyloid peptide, acts as a strong inducer of proinflammatory cytokines, such as IL-1 and IL-6, in astroglial cells (Eriksson et al., 1998; Toro et al., 2001). The mechanisms involved in the activation of astrocytes by Aβ

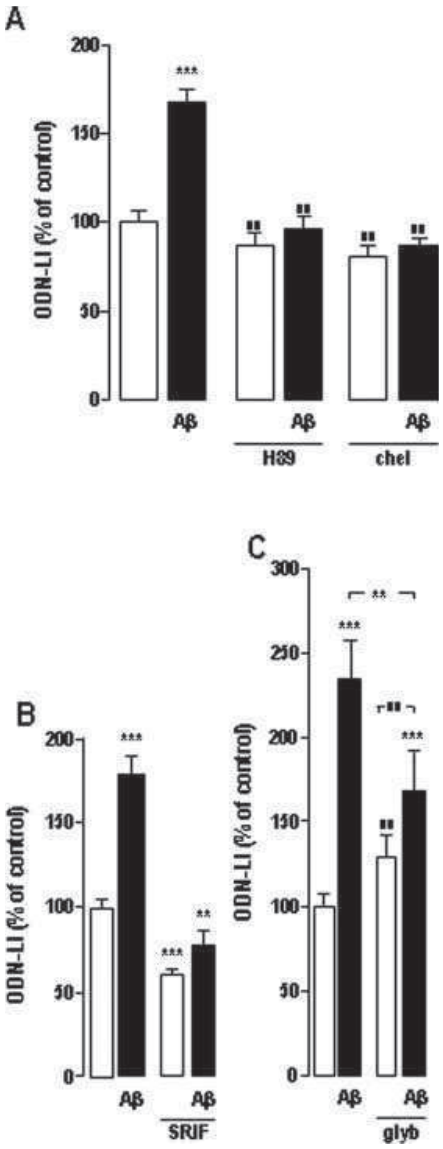


Fig. 8. Effect of the PKA inhibitor H89, the PKC inhibitor chelerythrine, somatostatin, and the selective blocker of ABC transporters glyburide on basal and $A\beta_{25-35}$-induced release of ODN-like immunoreactivity (ODN-LI) from cultured rat astrocytes. $A\beta_{25-35}$ was first incubated for 12 h at 37°C to allow aggregation. **A**: The cells were preincubated for 30 min in the absence or presence of H89 (20 μM) or chelerythrine (chel; 2 μM), and then incubated for 1 h without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM). **B**: The cells were incubated for 1 h in the absence or presence of somatostatin (SRIF; 10 nM) without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM). **C:** The cells were preincubated for 25 min in the absence or presence of glyburide (glyb; 10 μM), and then incubated for 1 h without or with aggregated $A\beta_{25-35}$ (Aβ; 10 μM). The results are expressed as percentages of the control values. Each value is the mean (±SEM) of at least three independent experiments performed in quintuplicate. The mean basal level of ODN-LI release, in these experiments, was 95.8 ± 7.8 pg/dish per hour. ANOVA followed by the Bonferroni's test: $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$; NS (■■), not statistically different from the control.

remain poorly understood. Here, we provide the first evidence that the stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ on endozepine release in cultured rat astrocytes is mediated through FPRs: (i) the $A\beta_{25-35}$-evoked release of ODN-LI was mimicked by the FPR agonists fMLF and fMMM, and (ii) the classical FPR antagonist Boc-FLFLF totally suppressed not only fMLF- and fMMM- but also Aβ-induced endozepine release. These results are consistent with previous data indicating that FPR and its variant FPR-L1 are both expressed in human astrocytes and astrocytoma cells (Lacy et al., 1995; Le et al., 2000) and that fMLF mimics the effect of Aβ on the production of IL-6 from astrocytoma cells (Le et al., 2000).

The fMLF peptide activates at least two G protein-coupled receptors, the high affinity FPR and its low affinity variant FPR-L1 (Le et al., 2002). The present data show that fMLF stimulates endozepine release with an EC_{50} of ≈2 μM, suggesting that, in rat astrocytes, Aβ may, at least in part, act through the low affinity fMLF receptor FPR-L1. In support of this hypothesis, it has been reported that, in cells transfected with FPR or FPR-L1 cDNA, Aβ binds preferentially to FPR-L1 (Le et al., 2001a). The fact that FRP-L1 is overexpressed in the brain of Alzheimer's patients (Le et al., 2001a) also suggests that this low-affinity receptor may be involved in the inflammatory response to Aβ. However, the present data do not rule out the possibility that Aβ could act through both FPR and FPR-L1.

On the other hand, the stimulatory effect of Aβ on DBI mRNA levels was not mimicked by the FPR agonists fMLF and fMMM, and was not affected by the FPR antagonist Boc-FLFLF, indicating that, in contrast to Aβ-induced endozepine release, Aβ-evoked *DBI* gene expression is not mediated through FPR. The mechanism involved in Aβ-induced stimulation of *DBI* gene transcription is currently unknown. Indeed, it has been shown that Aβ can activate other types of membrane receptors such as the scavenger receptor (El Khoury et al., 1996; Nakamura et al., 2006; Yan et al., 1996) and the receptor for advanced glycation end products (El Khoury et al., 1996; Yan et al., 1996). Whether one of these receptors is implicated in the effect of Aβ on DBI mRNA expression remains to be determined. Concurrently, there is now clear evidence that Aβ plays a pivotal role in calcium homeostasis either through opening of existing calcium channels or by forming Ca^{2+}-permeable pores (Green et al., 2002; Micelli et al., 2004). The resulting increase in cytosolic Ca^{2+} concentration can then affect gene transcription. For instance, it has been recently shown that Aβ selectively modulates, in a calcium influx-dependent manner, the expression of α subunits of voltage-sensitive Ca^{2+} channels in human neuroblastoma cells (Chiou, 2006). Thus, Aβ-induced calcium influx may lead to activation/inactivation of transcriptional factors, which turn on *DBI* gene expression in astrocytes.

It is now firmly established that stimulation of FPR causes activation of PKA and mitogen-activated protein kinases (Le et al., 2002). Unlike FPR, information concerning the signal transduction pathways utilized by FPR-L1 is scarce, but it has been hypothesized that FPR and FPR-L1 may share a common signaling cascade (Le et al., 2001b). Two studies have previously shown that micromolar concentrations of fMLF stimulate cAMP pro-

duction in human neutrophils (Spisani et al., 1996) and in a rat leucocyte cell line (Ali et al., 1998), suggesting that FPR-L1 is positively coupled to adenylyl cyclase. In agreement with these observations, we found that $A\beta_{25-35}$ provoked a robust and transient stimulation of cAMP production in cultured rat astrocytes. In addition, $A\beta_{25-35}$ increased in a time- and dose-dependent manner the incorporation of [^{3}H]inositol into polyphosphoinositides. The effects of $A\beta_{25-35}$ on cAMP and PIP formation were both mimicked by the FPR agonist fMLF. The actions of both $A\beta_{25-35}$ and the FPR agonist fMLF on PIP turnover were abolished by the FPR antagonist Boc-FLFLF. Moreover, the PLC inhibitor U73122 suppressed the effect of $A\beta_{25-35}$ on [^{3}H]inositol incorporation suggesting that Aβ, acting through FPR, activates PLC in rat astrocytes. Consistent with this notion, there is now clear evidence that FPR is positively coupled to PLC (Le et al., 2002). Finally, the fact that the PLC inhibitor U73122 blocked Aβ-induced ODN-LI release, while its inactive analog had no effect, demonstrated that PLC activation actually mediates the stimulatory action of Aβ on endozepine secretion.

It has been previously reported that acute administration of aggregated $A\beta_{25-35}$ on cultured astrocytes induces an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) (Stix and Reiser, 1998). Here, we show that addition of EGTA in the incubation medium totally blocked Aβ-induced endozepine release from cultured rat astrocytes. Two additional observations support the involvement of calcium in the stimulatory action of Aβ on endozepine output : (i) addition of nickel, a nonspecific calcium channels blocker, also abolished the effect of Aβ on endozepine release (this study) and (ii) activation of FPR-L1 in RBL-2H3 cells causes mobilization of both intra- and extracellular Ca^{2+} pools (Lee et al., 1997). The mechanism by which calcium mediates the effect of Aβ on endozepine release is currently a matter of speculation. According to the channel hypothesis, amyloid peptides including $A\beta_{25-35}$ can form voltage-independent cation channels that directly allow calcium influx (Arispe et al., 1993; Kagan et al., 2002). Alternatively, activation of FPR by Aβ may trigger calcium entry through calcium channels present in the plasma membrane of astrocytes (D'Ascenzo et al., 2004). We also observed that blockage of PKA and PKC activity suppressed the effect of Aβ on endozepine release. The implication of PKA and PKC in the signaling cascade activated by Aβ in rat astrocytes is consistent with the stimulatory effect of the peptide on adenylyl cyclase activity and PIP turnover. The fact that somatostatin, which inhibits cAMP formation in astrocytes (Masmoudi et al., 2005), also suppressed the effect of Aβ on endozepine secretion, provides additional evidence for the involvement of PKA in Aβ-induced endozepine release.

The DBI sequence lacks a typical signal peptide (Gray, 1987; Lihrmann et al., 1994) and it is thought that the release of endozepines occurs via an ABC transporter similar to that involved in the secretion of IL1-β (Hamon et al.,1997). In support of this hypothesis, we found that glyburide, a blocker of ABC transporters, inhibits the

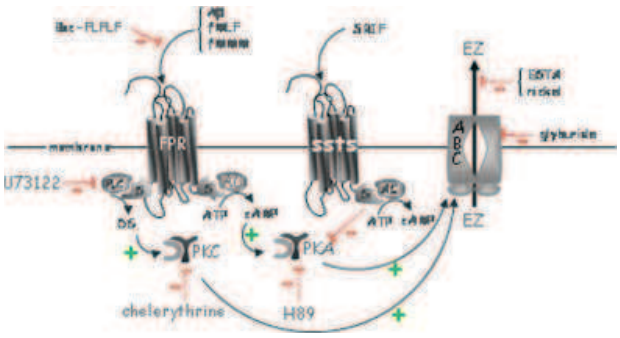


Fig. 9. Schematic representation of the signaling pathways involved in $A\beta_{25-35}$-induced endozepine release from astrocytes. The stimulatory effect of $A\beta_{25-35}$ (Aβ) on endozepine (EZ) release is mimicked by the FPR agonists fMLF and fMMM, and suppressed by the FPR antagonist Boc-FLFLF. $A\beta_{25-35}$ activates FPR, yielding to a transient stimulation of cAMP formation and a sustained activation of polyphosphoinositide turnover. The protein kinase A (PKA) inhibitor H89, the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122, and the protein kinase C (PKC) inhibitor chelerythrine suppress the stimulatory effect of Aβ on endozepine secretion. Somatostatin (SRIF), through activation of its receptors (ssts), inhibits adenylyl cyclase (AC) activity, and suppresses Aβ-induced stimulation of endozepine release. Finally, the effect of Aβ on endozepine secretion is markedly attenuated by the selective blocker of ATP-binding cassette (ABC) transporters glyburide. DG, diacylglycerol; G, G protein. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

effect of Aβ on endozepine release. Rat astrocytes in primary culture express the P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein (Decleves et al., 2000; Gaillard et al., 2000), two members of the family of ABC transporters which possess consensus sites for phosphorylation by PKA and PKC in their regulatory domain (Becq et al., 1997; Vanoye et al., 1999; Wilkes et al., 2002). The observation that PKA and PKC inhibitors suppressed Aβ-induced endozepine release suggests that phosphorylation of ABC transporter proteins by PKA and/or PKC may account for the stimulatory effect of Aβ on endozepine release. In agreement with this notion, it has been shown that PKC blockers inhibit both phosphorylation and activity of the C-terminal nucleotide-binding domain of mammalian P-glycoprotein (Conseil et al., 2001).

The physiopathological significance of the effect of Aβ on endozepine release is still a matter of conjecture. A major histological feature observed in the brain of patients with Alzheimer's disease is the accumulation of activated astrocytes around senile plaques (Arelin et al., 2002; Nagele et al., 2004). In addition, high levels of proinflammatory factors have been found in the brain of Alzheimer's patients (Griffin et al., 1989). It has previously been shown that endozepines mimic both the mitogenic activity of Aβ on astroglial cells (Gandolfo et al., 1999, 2000; Tokay et al., 2005) and the stimulatory effect of Aβ on IL-1β release from cultured rat astrocytes (Tokay et al., 2005). Therefore, Aβ-induced stimulation of endozepine secretion may participate to the proliferation of astrocytes and/or to the propagation of the inflammatory process, and may thus contribute to the progression of Alzheimer's disease.

In conclusion, this study has shown that Aβ stimulates the release of endozepines through activation of a

receptor exhibiting the pharmacological profile and the functional characteristics of an FPR (see Fig. 9). The effect of Aβ is mediated via activation of the adenylyl cylase/PKA and PLC/PKC signaling pathways. Since ABC transporters are thought to be implicated in the release of endozepines, these data suggest that Aβ-induced stimulation of endozepine secretion may be mediated through PKA- and/or PKC-dependent phosphorylation of ABC proteins.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Huguette Lemonnier and Mr. Gérard Cauchois for skilful technical assistance. T.T. was recipient of a fellowship from the Chinese Ministry of Education. M.D. was recipient of a fellowship from the Lille-Amiens-Rouen-Caen Neuroscience network and the Conseil Régional de Haute-Normandie. R.H. was recipient of a fellowship from the University of Tunis.

REFERENCES

Alho H, Harjuntausta T, Schultz R, Pelto-Huikko M, Bovolin P. 1991. Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors. Neuropharmacology 30:1381–1386.

Alho H, Kolmer M, Harjuntausta T, Helen P. 1995. Increased expression of diazepam binding inhibitor in human brain tumors. Cell Growth Differ 6:309–314.

Ali H, Sozzani S, Fisher I, Barr AJ, Richardson RM, Haribabu B, Snyderman R. 1998. Differential regulation of formyl peptide and platelet-activating factor receptors: Role of phospholipase $C\beta_3$ phosphorylation by protein kinase A. J Biol Chem 273:11012–11016.

Arelin K, Kinoshita A, Whelan CM, Irizarry MC, Rebeck GW, Strickland DK, Hyman BT. 2002. LRP and senile plaques in Alzheimer's disease: Colocalization with apolipoprotein E, with activated astrocytes. Mol Brain Res 104:38–46.

Arispe N, Pollard HB, Rojas E. 1993. Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes. Proc Natl Acad Sci USA 90:10573–10577.

Becq F, Hamon Y, Bajetto A, Gola M, Verrier B, Chimini G. 1997. ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. J Biol Chem 272:2695–2699.

Brown DR. 1999. Dependence of neurones on astrocytes in a coculture system renders neurones sensitive to transforming growth factor β1-induced glutamate toxicity. J Neurochem 72:943–953.

Bürgi B, Lichtensteiger W, Lauber ME, Schlumpf M. 1999. Ontogeny of diazepam binding inhibitor/acyl-CoA binding protein mRNA and peripheral benzodiazepine receptor mRNA expression in the rat. J Neuroendocrinol 11:85–100.

Chang JL, Tsai HJ. 1996. Carp cDNA sequence encoding a putative diazepam-binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. Biochim Biophys Acta 1298:9–11.

Chiou WF. 2006. Effect of Aβ exposure on the mRNA expression patterns of voltage-sensitive calcium channel α1 subunits ((1A-(1D) in human SK-N-SH neuroblastoma. Neurochem Int 49:256–261.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156–159.

Conseil G, Perez-Victoria JM, Jault JM, Gamarro F, Goffeau A, Hofmann J, Di Pietro A. 2001. Protein kinase C effectors bind to multidrug ABC transporters and inhibit their activity. Biochemistry 40:2564–2571.

D'Ascenzo M, Vairano M, Andreassi C, Navarra P, Azzena GB, Grassi C. 2004. Electrophysiological and molecular evidence of L-(Cav1), N-(Cav2.2), and R-(Cav2.3) type Ca^{2+} channels in rat cortical astrocytes. Glia 45:354–363.

Decleves X, Regina A, Laplanche JL, Roux F, Boval B, Launay JM, Scherrmann JM. 2000. Functional expression of P-glycoprotein and multidrug resistance- associated protein (Mrp1) in primary cultures of rat astrocytes. J Neurosci Res 60:594–601.

Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P. 2008. [Orn(5)]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. Peptides 29: 813–819.

El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike JD. 1996. Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to β-amyloid fibrils. Nature 382:716–719.

Eriksson G, Zetterstrom M, Cortes Toro V, Bartfai T, Iverfeldt K. 1998. Hypersensitive cytokine response to β-amyloid 25-35 in astroglial cells from IL-1 receptor type I-deficient mice. Int J Mol Med 1:201–206.

Ferrero P, Santi MR, Conti-Tronconi B, Costa E, Guidotti A. 1986. Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): Biological activity and presence in rat brain. Proc Natl Acad Sci USA 83:827–831.

Gaillard PJ, van der Sandt IC, Voorwinden LH, Vu D, Nielsen JL, de Boer AG, Breimer DD. 2000. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an *in vitro* model of the blood-brain barrier. Pharm Res 17:1198–1205.

Gandolfo P, Patte C, Thoumas JL, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC. 1999. The endozepine ODN stimulates [^{3}H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. Neuropharmacology 38:725–732.

Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Vaudry H, Tonon MC. 2000. The TTN stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors. J Neurochem 75:701–707.

Gray PW. 1987. Molecular biology of diazepam binding inhibitor. Neuropharmacology 26:863–865.

Green KN, Boyle JP, Peers C. 2002. Hypoxia potentiates exocytosis and Ca^{2+} channels in PC12 cells via increased amyloid beta peptide formation and reactive oxygen species generation. J Physiol 541:1013–1023.

Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CLr, Araoz C. 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. Proc Natl Acad Sci USA 86:7611–7615.

Guidotti A, Forchetti CM, Corda MG, Konkel D, Bennett CD, Costa E. 1983. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. Proc Natl Acad Sci USA 80:3531–3535.

Hamon Y, Luciani MF, Becq F, Verrier B, Rubartelli A, Chimini G. 1997. Interleukin-1β secretion is impaired by inhibitors of the ATP binding cassette transporter, ABC1. Blood 90:2911–2915.

Kagan BL, Hirakura Y, Azimov R, Azimova R, Lin MC. 2002. The channel hypothesis of Alzheimer's disease: Current status. Peptides 23:1311–1315.

Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325:733–736.

Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR. 1995. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. J Neuroimmunol 61:71–78.

Lamacz M, Tonon MC, Smih-Rouet F, Patte C, Gasque P, Fontaine M, Vaudry H. 1996. The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. Mol Brain Res 37:290–296.

Le Y, Gong W, Tiffany HL, Tumanov A, Nedospasov S, Shen W, Dunlop NM, Gao JL, Murphy PM, Oppenheim JJ, Wang JM. 2001a. Amyloid β42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. J Neuroscience 21:RC123(1–5).

Le Y, Hu J, Gong W, Shen W, Li B, Dunlop NM, Halverson DO, Blair DG, Wang JM. 2000. Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. J Neuroimmunol 111:102–108.

Le Y, Murphy PM, Wang JM. 2002. Formyl-peptide receptors revisited. Trends Immunol 23:541–548.

Le Y, Oppenheim JJ, Wang JM. 2001b. Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. Cytokine Growth Factor Rev 12:91–105.

Lee RJ, Lujan DE, Hall AL, Sklar LA, Wilson BS, Oliver JM. 1997. Cooperation between the FCεR1 and formyl peptide receptor signaling pathways in RBL(FPR) cells: The contribution of receptor-specific Ca^{2+} mobilization responses. Biochem Biophys Res Commun 235: 812–819.

Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchère JL, Vaudry H, Tonon MC. 1998. Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. J Med Chem 41:4433–4438.

Lihrmann I, Plaquevent JC, Tostivint H, Raijmakers R, Tonon MC, Conlon JM, Vaudry H. 1994. Frog diazepam-binding inhibitor: pep-

tide sequence, cDNA cloning, and expression in the brain. Proc Natl Acad Sci USA 91:6899–6903.
Malagon M, Vaudry H, Van Strien F, Pelletier G, Gracia-Navarro F, Tonon MC. 1993. Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. Neuroscience 57:777–786.
Marasco WA, Phan SH, Krutzsch H, Showell HJ, Feltner DE, Nairn R, Becker EL, Ward PA. 1984. Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli. J Biol Chem 259:5430–5439.
Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Vaudry D, Fournier A, Patte-Mensah C, Vaudry H, Tonon MC. 2003. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. FASEB J 17:17–27.
Masmoudi O, Gandolfo P, Tokay T, Leprince J, Ravni A, Vaudry H, Tonon MC. 2005. Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. J Neurochem 94:561–571.
Micelli S, Meleleo D, Picciarelli V, Gallucci E. 2004. Effect of sterols on beta-amyloid peptide (AbetaP 1-40) channel formation and their properties in planar lipid membranes. Biophys J 86:2231–2237.
Mocchetti I, Einstein R, Brosius J. 1986. Putative diazepam binding inhibitor peptide: cDNA clones from rat. Proc Natl Acad Sci USA 83:7221–7225.
Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang K-C, Wegiel J. 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. Neurobiol Aging 25:663–674.
Nakamura K, Ohya W, Funakoshi H, Sakaguchi G, Kato A, Takeda M, Kudo T, Nakamura T. 2006. Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. J Neurosci Res 84:874–890.
Patte C, Gandolfo P, Leprince J, Thoumas JL, Fontaine M, Vaudry H, Tonon MC. 1999. GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. Glia 25:404–411.
Shoyab M, Gentry LE, Marquardt H, Todaro GJ. 1986. Isolation and characterization of a putative endogenous benzodiazepineoid (endozepine) from bovine and human brain. J Biol Chem 261:11968–11973.
Slobodyansky E, Guidotti A, Wambebe C, Berkovich A, Costa E. 1989. Isolation and characterization of a rat brain TTN, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: Specific action at the Ro 5-4864 recognition site. J Neurochem 53:1276–1284.
Spisani S, Pareschi MC, Buzzi M, Colamussi ML, Biondi C, Traniello S, Zecchini GP, Paradisi MP, Torrini I, Ferretti ME. 1996. Effect of cyclic AMP level reduction on human neutrophil responses to formylated peptides. Cell Signal 8:269–277.
Stix B, Reiser G. 1998. β-Amyloid peptide 25-35 regulates basal and hormone-stimulated Ca^{2+} levels in cultured rat astrocytes. Neurosci Lett 243:121–124.
Tokay T, Masmoudi O, Gandolfo P, Leprince J, Pelletier G, Vaudry H, Tonon MC. 2005. Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured rat astrocytes. J Neurochem 94:607–616.
Tong Y, Toranzo D, Pelletier G. 1991. Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution *in situ* hybridization. Neuropeptides 20:33–40.
Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G. 1990. Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. Neuropeptides 15:17–24.
Tonon MC, Leprince J, Gandolfo P, Compère V, Pelletier G, Malagon MM, Vaudry H. 2006. Endozepines. In: Kastin AJ, editor. Handbook of biologically active peptides. New York: Elsevier. pp 813–819.
Toro VC, Tehranian R, Zetterstrom M, Eriksson G, Langel U, Bartfai T, Iverfeld K. 2001. Increased gene expression of interleukin-1α and interleukin-6 in rat primary glial cells induced by β-amyloid fragment. J Mol Neurosci 17:341–350.
Vanoye CG, Castro AF, Pourcher T, Reuss L, Altenberg GA. 1999. Phosphorylation of P-glycoprotein by PKA, PKC modulates swelling-activated Cl^- currents. Am J Physiol 276:C370–C378.
Vaudry H, Tonon MC, Delarue C, Vaillant R, Kraicer J. 1978. Biological and radioimmunological evidence for melanocyte stimulating hormones (MSH) of extrapituitary origin in the rat brain. Neuroendocrinology 27:9–24.
Webb NR, Rose TM, Malik N, Marquardt H, Shoyab M, Todaro GJ, Lee DC. 1987. Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. DNA 6:71–79.
Wilkes DM, Wang C, Aristimuno PC, Castro AF, Altenberg GA. 2002. Nucleotide triphosphatase activity of the N-terminal nucleotide-binding domains of the multidrug resistance proteins P-glycoprotein and MRP1. Biochem Biophys Res Commun 296:388–394.
Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM. 1996. RAGE and amyloid-β peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. Nature 382:685–691.
Yanase H, Shimizu H, Yamada K, Iwanaga T. 2002. Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. Arch Histol Cytol 65:27–36.

Rôle de la libération d'endozépines induite par le peptide β-amyloïde dans l'activité astrocytaire : effet de l'octadécaneuropeptide ODN

Glia, 2009, **57**, S65

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise non seulement par des dépôts amyloïdes mais également par une prolifération astrocytaire intense. Des travaux menés sur des tissus de patients décédés de la MA ou sur des cultures cellulaires de rongeurs montrent que le peptide bêta-amyloïde (βA) stimule la libération de nombreux facteurs, dont l'interleukine 1β (IL-1β) qui est capable de miner l'action du peptide sur la prolifération des astrocytes. Dans le chapitre précédent, nous avons montré que le βA induit aussi une libération d'endozépines (EZ). L'octadécaneuropeptide ODN, un produit de maturation du *diazepam-binding inhibitor* (DBI), est présent dans les surnageants de culture d'astrocytes, et peut moduler l'activité astrocytaire *via* un mécanisme de type auto/paracrine. En particulier, il a été montré que l'ODN stimule l'incorporation de thymidine dans les cellules gliales suggérant que cette EZ pourrait agir comme un facteur trophique responsable de la prolifération et/ou de la survie des astrocytes.

Nous avons donc étudié l'implication de l'EZ ODN dans les effets du βA sur l'activité astrocytaire. Nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

1. L'ODN peut-il mimer l'effet du βA sur la prolifération astrocytaire ?
2. L'ODN peut-il être responsable de la production d'IL-1β induite par le βA ?

Cx43 KO astrocytes has been reported to be reduced, we observed that an acute reduction in Cx43 by siRNA increased proliferation and glucose uptake.

P-162 AGONIST-INDUCED INHIBITION OF GAP JUNCTIONAL COMMUNICATION IN ASTROCYTES: CX43 DEPHOSPHORYLATION AND PARTNERSHIP

Tence M., Ezan P., Amigou E., Giaume C.
INSERM U840, Paris, France

Astrocytes are extensively coupled together by gap junctional communication (GJC). This intercellular communication, which in culture is mostly mediated by Cx43 channels, allows the propagation at a distance of signals critical for neuronal activity and survival and constitutes the basis for a coordinated action of astrocytes. GJC is a highly regulated process that is altered in pathological situations. We have previously shown that sphingosine-1-phosphate (S1P) and endothelin-1 (ET-1), two mediators that increase in brain at sites of injury and inflammation, induced in a few minutes a strong inhibition of GJC in cultured astrocytes. Here, we have studied the molecular mechanisms involved in these effects. For this purpose, we used the scrape-loading dye transfer technique, immunocytochemistry/confocal microscopy and immunoprecipitation approaches. We found that for both S1P and ET-1, activation of Gi-mediated signalling pathway(s) is a prerequisite step for inhibition. This inhibition is accompanied by a dephosphorylation of Cx43 engaged at junctional plaques. This process is mediated by the phosphatase PP2B and depends on Gi activation. Astrocytes expressed occludin, ZO-1 and ZO-2 that display rings at cell-cell contacts and are closely associated with Cx43 as suggested by confocal microscopy. Neither the amount nor the cellular distribution of occludin, ZO-1 and ZO-2 seem modified following dephosphorylation of Cx43. Co-immunoprecipitation experiments demonstrate that Cx43, occludin, ZO-1 and ZO-2 belong to same multiprotein membrane complexes. Indeed, the anti-occludin antibody is able to precipitate Cx43, ZO-1 and ZO-2 and anti-ZO-1 antibody precipitates both Cx43 and ZO-2. The amount of Cx43 present in these complexes is increased following treatment with ET-1. This suggests that, in astrocytes, alteration of GJC implies not only modifications of the phosphorylation status of Cx43 itself but also changes in its molecular interactions with scaffolding partners.

P-163 EFFECTS OF BETA-AMYLOID PEPTIDE ON ASTROCYTES: STIMULATION OF ENDOZEPINE RELEASE AND CELL PROLIFERATION

Hachem R.,[1] Tokay T.,[1] Masmoudi-Kouki O.,[2] Gandolfo P.,[1] Desrues L.,[1] Leprince J.,[1] Castel H.,[1] Diallo M.,[1] Amri M.,[2] Vaudry H.,[1] Tonon M.C.[1]
[1]Inserm U413/FA4310, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, European Institute for Peptide Research, Mont Saint AIGNAN, France; [2]Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Tunis, Tunisia

Beta-amyloid peptide (Aß) is a primary protein component of senile plaques in Alzheimer's disease, a neurodegenerative disorder also characterized by an intense proliferation of glial cells. Some data indicate that cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients exhibits high concentrations of endozepines. All members of the endozepine family, including the octadecaneuropeptide (ODN), derive from the diazepam-binding inhibitor (DBI), and are considered as the endogenous ligands of benzodiazepine receptors. It has been shown that ODN also interacts with a metabotropic receptor positively coupled to a phospholipase C (PLC) through a pertussis toxin sensitive G protein. Endozepines are exclusively produced by astroglial cells in the central nervous system and we have recently shown that Aß stimulates their release from cultured astrocytes. The aim of this study was to determine the mechanisms involved in the effects of Aß on endozepine release and astrocyte proliferation. We have first observed that Aß induces a transient stimulation of cAMP formation and a sustained activation of polyphosphoinositide turnover. The effects of Aß on intracellular pathways as well as on endozepine release are mediated through activation of N-formyl peptide receptors (FPR). We demonstrated that both protein kinases A and C are involved in Aß- and N-formyl peptide-induced endozepine release. In addition, we showed that the stimulatory effect of Aß on endozepine release is dependent on an ATP-binding cassette transporter. In the second part of the study, we have shown that ODN, like Aß and interleukin-1ß (IL-1ß), stimulates astrocyte proliferation in a dose-dependent manner. Since the release of endozepines induced by Aß precedes that of IL-1ß, these data suggest that endozepine release might be involved in Aß-induced IL-1ß production and cell proliferation. Taken together, these data demonstrate for the first time that astroglial FPR are positively coupled to adenylyl cyclase and PLC, and that Aß stimulates endozepine release from astrocytes through activation of FPR. In addition, our results suggest that the release of endozepines stimulates directly or indirectly, via the production of IL-1ß, astrocyte proliferation. Identification of the receptors involved in the effect of endozepines deserves further investigations.

P-164 INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEINS REGULATE GLIAL CELL BEHAVIOR IN AN IGF-1-DEPENDENT AND -INDEPENDENT FASHION: IMPLICATIONS IN MULTIPLE SCLEROSIS

Chesik D.,[1] Wilczak N.,[1] de Keyser J.[2]
[1]University Medical Center Groningen, Groningen, Netherlands; [2]University Hospital of Brussels, Brussels, Belgium

INTRODUCTION: Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) is an essential factor in proper CNS development and induces differentiation of oligodendrocytes. Due to its myelinogenic property, IGF-1 possesses therapeutic potential in treating demyelinating diseases such as multiple sclerosis (MS). However, IGF-1 is under tight regulation by a complex system of IGF binding proteins (IGFBPs).
OBJECTIVE: To characterize the IGF-system in glial cells in MS brain and investigate regulation of the IGF-system on glial cell behavior.
METHODS: By means of immunohistochemistry, we analyzed levels of IGF-1, the type 1 IGF receptor and 6 known IGFBPs in MS brain. Based on expression patterns observed in glial cells in situ, in vitro investigations were conducted to study the effects of the IGF-system on cell signaling and behavior. To this end, we utilized GTPase pull down assays, Western blotting, immunocytochemistry, flow cytometry, as well as proliferation, survival and migration assays.
RESULTS: Reactive astrocytes and microglia in MS lesions showed upregulation of IGFBP-2 expression. By comparison, oligodendrocytes demonstrated a prominent upregulation of IGFBP-1 in MS. In an in vitro model of astrogliosis, reactive cells also expressed high levels of IGFBP-2 and a protease that degraded this protein. We further demonstrate that IGFBP-2 does not inhibit IGF-1 effects on astrocytes yet inhibits IGF-1 effects on oligodendrocytes. Further, in vitro investigation on oligodendrocytes show divergent effects of IGFBP-1. While IGFBP-1 inhibited IGF-1 effects on oligodendrocyte survival as well as MBP and MAG expression, IGFBP-1 also exerted IGF-independent effects on oligodendrocytes mediated through integrin signaling including activation of signaling pathways and enhanced oligodendrocyte migration.
INTERPRETATION: IGFBP-2 upregulation in astrocytes in MS may target IGF-signaling to astrocytes and enhance reactive astrogliosis. IGFBP-2 and IGFBP-1 inhibit IGF-1 signaling in oligodendrocytes which may serve to prevent oligodendrocyte differentiation and allow progenitors to migrate and proliferate in order to repopulate MS lesions, a prerequisite for remyelination of damaged tissue.

P-165 INHIBITION OF CONNEXIN 43 HEMICHANNEL RESPONSES WITH HIGH CYTOPLASMIC CALCIUM CONCENTRATIONS IS MEDIATED BY MECHANISMS DIFFERENT FROM CALCIUM ACTIVATION OF HEMICHANNEL RESPONSES

Wang N., de Vuyst E., de Bock M., Decrock E., Van Moorhem M., Leybaert L.
Ghent University, Ghent, Belgium

Connexin 43 (Cx43) hemichannel (HC) responses can be activated by [Ca2+]i changes according to a bell-shaped response curve with activation of the responses at moderate [Ca2+]i elevation (peak below ~500 nM) and disappearance of the responses (further called inactivation) with [Ca2+]i transients peaking above ~500 nM. We further explored the mechanisms of [Ca2+]i-dependent inactivation. [Ca2+]i–triggered HC responses have been demonstrated to involve an intermediate step of calmodulin (CaM) and arachidonic acid (AA) signaling (see abstract & poster of De Vuyst E. et al.). ATP release assays on HC responses triggered in C6 glioma cells stably transfected with Cx43 cells by Ca2+-independent CaM activation with the peptide CALP 1 demonstrated an S-shaped concentration-response curve, indicating that high [Ca2+]i related inactivation was absent with this trigger. Dye uptake assays (PI and EtBr) with AA-triggered responses revealed a similar S-shaped concentration-response behavior (half-maximal activation at ~330 µM). We next triggered HC dye uptake with AA and

Dans cette partie, ne sont présentées que les données qui ne sont pas incluses dans le premier chapitre, mais qui ont fait l'objet d'un résumé pour le congrès « Glial Cells in Health and Disease 2009 » qui a été publié dans Glia.

1. L'ODN mime l'effet du βA sur la prolifération astrocytaire

L'effet du βA sur la prolifération astrocytaire a été étudié sur des cultures secondaires d'astrocytes synchronisés pendant 24 h en supprimant le sérum et l'insuline du milieu de culture. Les cellules sont ensuite incubées avec le βA et l'agoniste des FPRs, le fMLF, en l'absence ou en présence de l'antagoniste des FPRs, le N-t-Boc-FLFLF. Le nombre des cellules est compté après 48 h d'incubation à l'aide d'un compteur de cellules (Fig. 1).

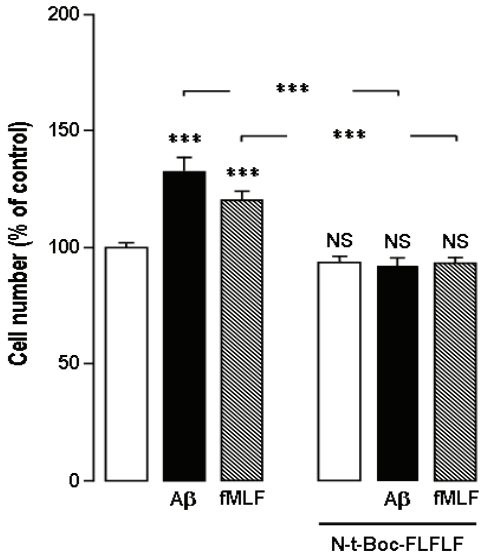


Figure 1 : Effet du βA et du fMLF sur la prolifération astrocytaire. Les astrocytes de rat en culture secondaire sont synchronisés pendant 24 h dans un milieu de culture dépourvu de sérum et d'insuline puis incubés avec du βA agrégé (Aβ, 10 µM) ou du fMLF (10 µM) en absence ou en présence de N-t-Boc-FLFLF (5 µM) durant 48 h. Les résultats sont exprimés en % du contrôle. ***, $P < 0,001$ - NS, non significatif.

Les résultats obtenus montrent que l'effet prolifératif du βA est miné par le fMLF et que l'ajout de l'antagoniste des FPRs bloque totalement l'action des deux peptides. Ces résultats indiquent donc que l'effet proliférateur du βA sur les astrocytes de rat en culture met en jeu les FPRs, et nous ont conduit à envisager que cette activité puisse être, du moins en partie, relayée par la libération d'EZ dans les surnageants des culture.

Dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment, des doses croissantes (10^{-14} à 10^{-6} M) de l'EZ ODN ajoutées au milieu de culture durant 48 h, augmentent le nombre des cellules (Fig. 2A). La forme de la courbe dose-réponse suggère que l'ODN stimule la prolifération astrocytaire *via* un récepteur de très haute affinité (10^{-12} M) et un récepteur de haute affinité (10^{-8} M). L'effet stimulateur de l'ODN (10^{-11} M) observé après 12 h d'incubation pourrait refléter une augmentation de la survie des astrocytes (Fig. 2B).

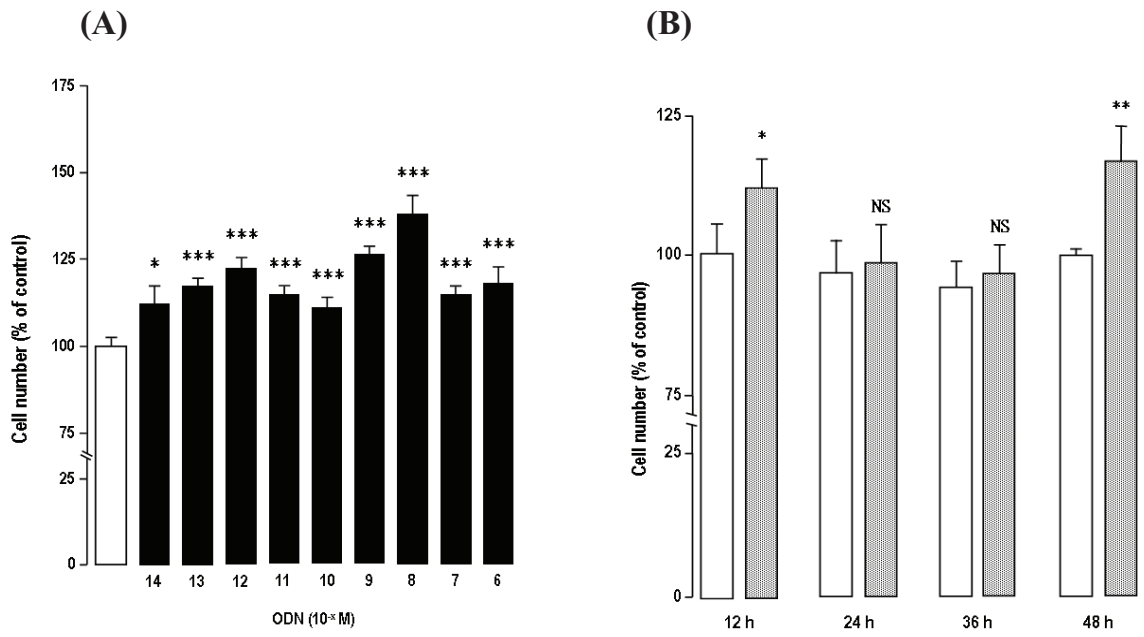


Figure 2 : Effet de l'ODN sur la prolifération astrocytaire. A : Les astrocytes de rat en culture secondaire sont synchronisés pendant 24 h dans un milieu de culture dépourvu de sérum et d'insuline puis incubés pendant 48 h en présence d'ODN (10^{-14} à 10^{-6} M). **B :** Les astrocytes de rat en culture secondaire sont synchronisés pendant 24 h dans un milieu de culture dépourvu de sérum et d'insuline puis incubés en présence d'ODN (10^{-11} M) pour les temps indiqués dans la figure. Le nombre de

cellules est déterminé par comptage et les résultats sont exprimés en % du contrôle. *, P<0,05 - **, P<0.01 - ***, P<0,001 - NS, non significatif.

Ces résultats suggèrent que l'EZ ODN peut mimer, du moins en partie, l'effet du βA sur la prolifération astrocytaire.

2- L'ODN ne mime pas l'effet du βA sur la production d'IL-1β

Les cinétiques de libération d'EZ et d'IL-1β induites par le βA (10 µM), révèlent que le peptide provoque une augmentation rapide (< 30 min) de la libération d'EZ qui se maintient durant 6 h (Fig. 3A). Celle d'IL-1β est plus tardive (2 h) avec un maximum obtenu après 6 h d'incubation (Fig. 3B).

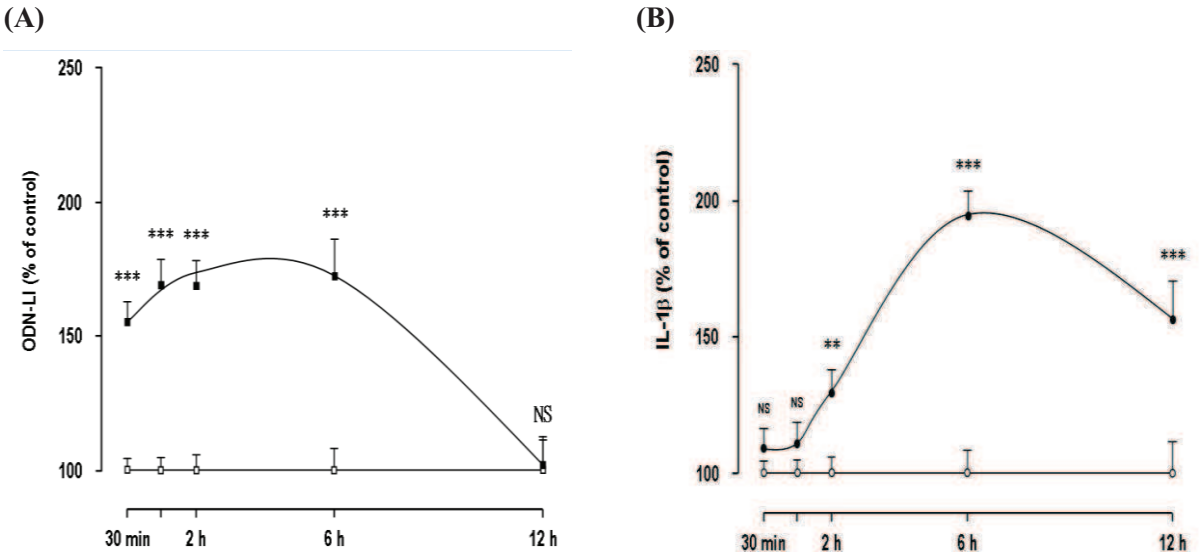


Figure 3 : Effets du βA sur la libération d'EZ et d'IL-1β. Les astrocytes de rat en culture secondaire sont incubés en présence de βA (10 µM) pendant les temps indiqués et les quantités *d'ODN-like immunoreactivity* (ODN-LI) **(A)** et d'IL-1β **(B)** sont mesurées par dosage radioimmunologique et Elisa, respectivement. Les résultats sont exprimés en % du contrôle. **, P<0,01 - ***, P<0,001 - NS, non significatif.

Nous avons donc envisagé que la libération d'IL-1β induite par le βA soit secondaire à la libération d'EZ. Un éventuel effet de l'ODN sur l'expression de l'IL-1β a été évalué par méthode de QPCR (Fig. 4).

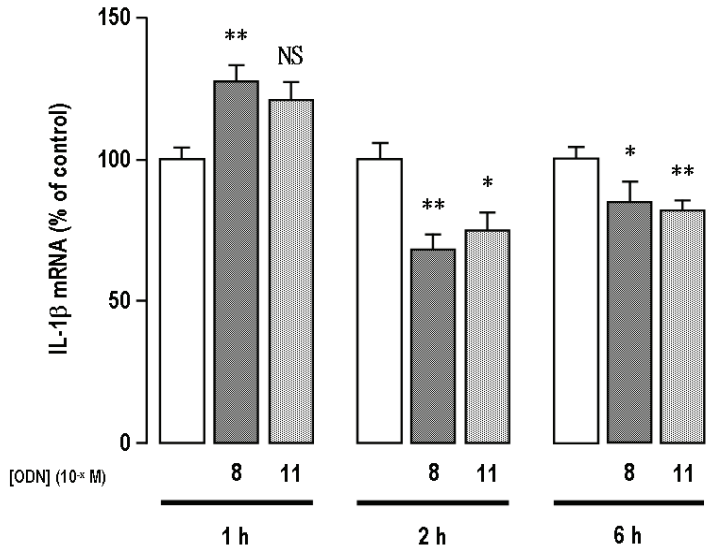


Figure 4 : Effet de l'ODN sur l'expression d'IL-1β. Les astrocytes en culture secondaire sont incubés en présence d'ODN (10^{-8} M et 10^{-11} M) pendant 1 h à 6 h. Les ARNm sont quantifiés par QPCR en utilisant la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comme contrôle interne Les résultats sont exprimés en % des valeurs obtenues en l'absence d'ODN. *, P<0,05 - **, P < 0,01 - NS, non significatif.

Des résultats préliminaires montrent qu'à la concentration de 10^{-8} M, l'ODN induit une augmentation rapide (1 h) et transitoire des ARNm codant l'IL-1β (Fig. 4). Pour des temps plus longs (2 h et 6 h), les quantités d'ARNm sont inférieures à celles mesurées en conditions contrôles. A la concentration de 10^{-11} M, seul un effet inhibiteur de l'ODN est observé.

A l'inverse, l'IL-1β est sans effet sur l'expression du DBI quelque soit la dose utilisée (1,5 pg - 15 ng/ml) et la durée d'incubation (1 h - 12 h) (Fig. 5).

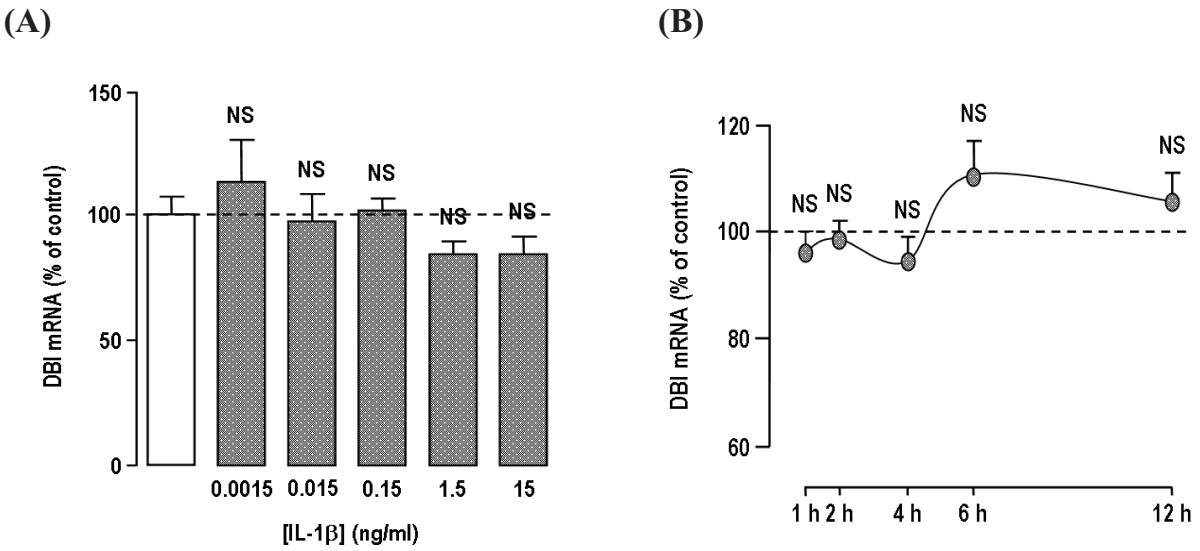


Figure 5 : Effet de l'IL-1β sur l'expression du DBI. A : Les astrocytes en culture secondaire sont incubés pendant 6 h en présence de doses croissantes d'IL-1β (1,5 pg - 15 ng/ml). **B :** Les cellules sont incubées en présence d'IL-1β (2,5 ng) aux temps indiqués. Les ARNm sont quantifiés par QPCR en utilisant la GAPDH comme contrôle interne. Les résultats sont exprimés en % des valeurs obtenues en l'absence d'IL-1β. NS, non significatif.

L'ensemble de ces données suggèrent que les EZ, libérées dans le milieu extracellulaire par le βA, pourraient dans un premier temps mimer l'effet du peptide β-amyloïde sur la libération d'IL-1β. Dans un second temps, les EZ pourraient réduire la libération d'IL-1β et ainsi s'opposer à l'effet du βA sur la production de cytokine pro-inflammatoire par les astrocytes.

Effet glioprotecteur de l'octadécaneuropeptide ODN dans la mort astrocytaire induite par le peroxyde d'hydrogène

Free Radical Biology and Medicine (Soumis)

Les astrocytes sont beaucoup moins sensibles aux effets cytotoxiques du bêta-amyloïde (βA) que les neurones. L'effet neurotoxique du βA est en partie du à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), généré notamment à partir du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui entraînent la mort des neurones par apoptose. La présence de fortes concentrations en molécules antioxydantes dans les astrocytes, et notamment de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase, pourrait expliquer la moindre sensibilité de ces cellules au stress oxydatif. Néanmoins, les astrocytes restent vulnérables aux effets du H_2O_2. Dans le chapitre précédent, nous avons observé que l'ODN pouvait exercer un effet glioprotecteur, et ce à très faible concentration. Nous avons donc envisagé que la libération d'endozépines (EZ) induite par le βA pourrait, du moins en partie, être responsable de la moindre susceptibilité des astrocytes au stress oxydatif induit par le βA.

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Pr M. Amri, nous avons étudié un éventuel effet glioprotecteur de l'ODN dans le stress oxydatif induit par le H_2O_2. Nous avons recherché à répondre aux questions suivantes :

1. L'ODN peut-il réduire la mort astrocytaire induite par le H_2O_2 ?
2. Quels sont les mécanismes intracellulaires mis en jeu dans l'effet glioprotecteur de l'ODN ?

*Manuscript
Click here to view linked References

Protective effect of the octadecaneuropeptide ODN on hydrogen peroxide-induced oxidative stress and cell death in cultured rat astrocytes

Olfa Masmoudi-Kouki[a,1], Yosra Hamdi[a,1], Hadhemi Kaddour[a], Faouzi Jenhani[b], Pierrick Gandolfo[c,d,e], David Vaudry [c,d,e], Meherzia Mokni[a], Jérôme Leprince[c,d,e], Raya Hachem[a,c,d,e], Hubert Vaudry[*c,d,e], Marie-Christine Tonon[c,d,e], Mohamed Amri[*a].

[a]Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit 00/UR/08-01, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, University Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia

[b]Laboratory of Cellular Immunology and Cytometry, National Centre of Blood Transfusion, El Manar II 2092, Tunis, Tunisia

[c]Inserm U413 /U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation

[d]International Associated Laboratory Samuel de Champlain,

[e]European Institute for Peptide Research (IFRMP 23), Regional Platform for Cell Imaging of Haute-Normandie (PRIMACEN) , University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

Runnig title: *ODN prevents H_2O_2-induced astrocytes death*

22 *Corresponding authors.

23 Pr Amri Mohamed. Fax: (216) 216 71 87-16-66.

24 *E-mail address*: mohamed.amri@fst.rnu.tn

25 Dr Vaudry Hubert. Fax: (33) 235-14-6946.

26 *E-mail address*: hubert.vaudry@univ-rouen.fr.

27 [1]These authors contributed equally to this work.

28

Abstract

Oxidative stress, resulting from accumulation of reactive oxygen species, plays a critical role on astroglial cell death associated with neurodegenerative diseases and stroke. Astroglial cells synthesize and release endozepines, a family of biologically active peptides that have been implicated in cell protection. Thus, the purpose of the present study was to investigate the potential protective effect of one of the endozepines, the octadecaneuropeptide ODN, on H_2O_2-induced oxidative stress and cell death in rat astrocytes. Incubation of cultured astrocytes with graded concentrations of H_2O_2 for 1 h provoked a dose-dependent reduction of the number of living cells as evaluated by lactate dehydrogenase assay. The cytotoxic effect of H_2O_2 was associated with morphological modifications that were characteristic of apoptotic cell death. H_2O_2-treated cells exhibited high level of reactive oxygen species associated with a reduction of both superoxide dismutases (SOD) and catalase antioxidant enzymatic activities. Pretreatment of astrocytes with very low concentrations of ODN (0.01 pM – 0.1 nM) dose-dependently prevented cell death induced by H_2O_2, and the effect of ODN was accompanied by a marked attenuation of ROS accumulation, reduction of mitochondrial membrane potential and activation of caspase-3 activity. ODN stimulated SOD and catalase activities in a concentration-dependent manner, and blocked H_2O_2-evoked inhibition of SOD and catalase activities. The SOD blocker NaCN (2 mM) and the specific catalase blocker 3-aminotriazole (10 mM) both suppressed the effect of ODN on cell survival. Taken together, these data demonstrate for the first time that the endozepine ODN is a potent

protective agent that prevents oxidative stress-induced apoptotic cell death. Endozepines are thus potential candidates for development into therapeutically valuable agents for the treatment of cerebral injuries.

Keywords:
Astrocytes
Catalase
Hydrogen peroxide
Octadecaneuropeptide
Superoxide dismutase

Introduction

The octadecaneuropeptide (ODN) has been originally isolated from the rat brain and characterized as an endogenous ligand of benzodiazepine receptors [1]. ODN is generated by proteolytic cleavage of an 86-amino acid polypeptide precursor called diazepam-binding inhibitor (DBI) whose gene is mainly expressed in glial cells in the central nervous system (CNS) [2,3]. DBI and its processing products are collectively designated by the term endozepines [4]. It was initially reported that the endozepines ODN and DBI act as inverse agonists of central-type benzodiazepine receptors (CBR; [5]). Subsequently, DBI was found to interact also with peripheral-type benzodiazepine receptors [6]. More recently it has been shown that DBI-derived peptides can activate a metabotropic receptor positively coupled to phospholipase C [7-9].

The sequence of the DBI cDNA has now been characterized in several mammalian species and it has been found that the primary structure of ODN has been strongly conserved during evolution [4], suggesting that this peptide plays important biological functions. Indeed, behavioral studies have shown that ODN, acting through CBR, increases aggressive interactions [10], induces anxiety and proconflict behavior [11], shortens pentobarbital-induced sleeping time [12] and reduces drinking [13] in rodents. Beside, ODN acting through its metabotropic receptor, exerts a potent anorexigenic effect [14,15]. At the cellular level, ODN increases intracellular calcium in cultured rat astrocytes [16], stimulates glial cell proliferation [17], activates neurosteroid biosynthesis [18] and modulates the expression of neuropeptides that control feeding behavior [19,20].

These observations indicate that ODN acts both as an autocrine factor regulating glial cell activity and as a gliotransmitter modulating neurotransmission.

There is now clear evidence that the number of reactive astrocytes and the expression of benzodiazepine receptors increase after various nervous system insults such as ischemia, stroke, neuroinflammatory processes and neurodegenerative diseases [21,22]. In addition, recent reports indicate that benzodiazepines can prevent brain injury induced by neurotoxic chemicals, ischemia and neurological disorders [23,24]. Altogether, these observations suggest that ODN, acting as an endogenous ligand for benzodiazepine receptors, may exert a protective effect on astroglial cells during oxidative stress.

Oxidative stress resulting from accumulation of reactive oxygen species (ROS) is involved in cell death observed in several pathological processes including cerebral ischemia, brain tumor and neurodegenerative diseases [25,26]. Astrocytes contain high levels of antioxidant molecules such as vitamins E and C and the antioxidant enzymes Mn- and Cu,Zn-superoxide dismutases (Mn- and Cu,Zn-SOD), catalase and glutathione peroxidase, which play a major neuroprotective role against the deleterious effects of superoxides [25,26]. Besides, astrocytes exert neuroprotective effects by providing neurons with substrates for antioxidants notably glutathione [27]. Although astrocytes are generally less susceptible to oxidative injury than neurons, there is strong evidence that oxidative stress also alters astrocyte functions [28,29]. In particular, glial cells are extremely vulnerable to hydrogen peroxide (H_2O_2) and astrocytic apoptosis is observed in brain injuries caused by trauma and ischemia [30,31]. Reciprocally, cultured astrocytes derived from Cu,Zn-SOD-overexpressing transgenic mice exhibit increased resistance to

105 oxidative stress induced by menadione or oxygen-glucose deprivation [28]. *In situ*,
106 astrocytes likely contribute to the overall protection observed during and after ischemia in
107 Cu,Zn-SOD-overexpressing animals [28,32]. Therefore, protection of astrocytes from
108 oxidative assault appears essential to maintain cerebral antioxidant competence and to
109 prevent neuronal damage as well as to facilitate neuronal recovery.
110 It has been reported that, during the prenatal period, which corresponds to intense
111 astrocyte generation, high concentrations of DBI mRNA and DBI-derived peptides occur
112 in the rat brain [2,33]. On the other hand, the concentration of endozepines in brain and in
113 cerebrospinal fluid (CSF) is increased in various pathological conditions including
114 Alzheimer's disease (AD) [34,35]. We have recently shown that β-amyloid peptide
115 induces activation of endozepine biosynthesis and release, suggesting that over
116 production of ODN may contribute to astrocyte proliferation associated with AD [36,37].
117 Finally, endozepines increase [^{3}H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes [17].
118 Altogether, these observations suggest that endozepines may act as neurotrophic factors
119 regulating proliferation and/or survival of astroglial cells under injury conditions. In order
120 to test the hypothesis of a glioprotective action of ODN, we have analyzed the effects of
121 the peptide on several oxidative stress-related parameters in H_2O_2-treated astrocytes.
122

Material and methods

Animals

Animals were handled in accordance with the ethical committee of Tunis University for care and use of animals in conformity with NIH guidelines.

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), F12 culture medium, D(+)-glucose, L-glutamine, *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethane sulfonic acid (HEPES), foetal bovine serum (FBS) and the antibiotic-antimycotic solution were obtained from Gibco (Invitrogen, Grand Island NY, USA). Fluorescein diacetate-acetoxymethyl ester (FDA-AM), propidium iodide (IP), Triton X-100, trypsin-EDTA, insulin, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and sodium cyanure (NaCN), 3-aminotriazole and Trolox were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lactate dehydrogenase (LDH; EC 1.1.1.27) assay kit was commercialized by Bio-Maghreb (Ariana, Tunisia). 5-6-Chloromethyl 2'-7'dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H2DCFDA) and the mitochondrial potential sensor JC-1 were obtained from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Fluorometric assay reagents for caspase-3 activity was from Promega (Charbonnière, France). Bovine liver catalase and DL-epinephrine were kindly provided by Pr. F. Limam (National Science and Technology Park, Borj Cedria, Tunisia). Rat ODN

145 (QATVGDVNTDRPGLLDLK) was synthesized by using the standard Fmoc procedure,
146 as previously described [7]. All other reagents were of A grade purity.
147
148 *Cell culture*
149
150 Secondary cultures of rat cortical astrocytes were prepared as previously described
151 [38] with minor modifications. Briefly, cerebral hemispheres from 1- or 2-day-old Wistar
152 rats were collected in DMEM/F12 (2:1; v/v) culture medium supplemented with 2 mM
153 glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% glucose and 1% of the antibiotic-antimycotic
154 solution. The tissues were dissociated mechanically with a syringe equipped with a 1-mm
155 gauge needle, and filtered through a 100-µm sieve (Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA).
156 Dissociated cells were resuspended in culture medium supplemented with 10% FBS,
157 plated in 175-cm^2 flask (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany) and incubated
158 at 37°C in a 5% CO_2 / 95% O_2 atmosphere. When cultures were confluent, astrocytes
159 were isolated by shaking overnight the flasks with an orbital agitator. Adhesive cells were
160 detached by trypsination and preplated for 5 min to discard contaminating microglial
161 cells. Then, the non-adhering astrocytes were harvested and plated on 35-mm Petri dishes
162 at a density of 0.3 X 10^6 cells/ml. The cells were incubated at 37°C in a humid
163 atmosphere (5% CO_2). After 5 days (DIV5), more than 99% of cells were labeled with
164 antibodies against glial fibrillary acidic protein [39]. All experiments were performed on
165 5- to 7-day-old secondary cultures.
166

Measurement of cell cytotoxicity

DIV5-6 cells were incubated at 37°C with fresh serum-free medium in the absence or presence of test substances. At the end of the incubation, the cytotoxicity of H_2O_2 on astrocytes was determined by measurement of LDH activity in culture medium. The amount of LDH released into medium was measured by LDH assay kit (Bio-Maghreb) according to the manufacturer's instructions. The results were expressed as a percentage of total LDH release after cell lysis with 1% Triton X-100 in saline phosphate buffer (PBS, 0.1 M, pH 7.4).

Measurement of cell survival

Cultured cells were incubated at 37°C for 1 h with fresh serum-free culture medium in the absence or presence of H_2O_2 with or without ODN. Then, astrocytes were incubated for 8 min with 15 µg/ml FDA-AM, rinsed twice with PBS and lysed with a Tris/HCl solution containing 1% sodium dodecyld sulfate (SDS). Fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission at 538 nm using a microplate reader (Bio-Tek FL800TBI).

Measurement of intracellular reactive oxygen species (ROS) formation

Reactive oxygen species were detected by measuring the fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) which is derived from the deacetylation and oxidation of the non-fluorescent compound $DCFH_2$-DA. Cells seeded into 24-well plates were first incubated with 10 μM cell-permeant $DCFH_2$-DA in serum-free loading medium for 30 min at 37°C, washed twice with PBS, and then exposed to H_2O_2 with or without ODN. Fluorescence was measured with excitation at 485 nm and emission at 538 nm.

Measurement of mitochondrial activity

Mitochondrial membrane potential was quantified using the JC-1 probe. Cells seeded into 24-well plates were subjected to various treatments, incubated in the presence of the JC-1 probe (10 μg/ml) at 37°C for 15 min and then washed twice with PBS. In healthy astrocytes, the intact membrane potential allows the lipophilic dye JC-1 to enter into the mitochondria where it accumulates and aggregates producing an intense orange signal. In dead cells, where the mitochondrial membrane potential collapses, the monomeric JC-1 remains cytosolic and stains the cell in green. Fluorescence intensity was quantified by measuring emissions at 530 (green) and 590 nm (orange).

Measurement of caspase-3 activity

Cultured astrocytes were incubated at 37°C for 1 h with fresh serum-free culture medium in the absence or presence of H_2O_2 with or without ODN. At the end of the incubation, cells were washed twice and caspase-3 activity was measured with a caspase-3 assay system (Promega). Briefly, 100 µl of the cell suspension was incubated with 100 µl of kit buffer and caspase substrate in 96-well plates. The caspase activity was calculated from the slope of the fluorescence measured every 15 min for 3 h with excitation at 485 nm and emission at 530 nm, and expressed as a percentage of the control.

Measurement of antioxidant enzyme activities

Cultured cells were incubated at 37°C for 1 h with fresh serum-free medium in the absence or presence of test substances. At the end of the incubation, culture medium was removed, cells were washed twice with PBS (0.1 M, pH 7.4) and then homogenized in the same solution at 4°C. Cells were harvested by centrifugation (350 X g, 4°C, 10 min) and the cell pellet was resuspended in 50 µl of ice-cold lysing buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA, 100 µM phenylmethyl-sulfonylfluoride and 1% Triton X-100. Samples were then centrifuged (16,000 X g, 20 min, 4°C) and supernatants were finally stored at –20°C until enzyme activity determinations.

The activity of SOD was measured using a spectrophotometric assay which consists in measuring epinephrine autoxidation induced by superoxide anion. Samples, prepared as described above, were incubated for 3 min with a mixture containing bovine catalase (0.4 U/µl), epinephrine (5 mg/ml) and Na_2CO_3 / $NaHCO_3$ buffer (62.5 mM, pH 10.2). The oxidation of epinephrine was measured at 480 nm with a Bio-Rad spectrophotometer.

Catalase activity was determined on the basis of the decrease of hydrogen peroxide. Samples, prepared as described above, were mixed with 30 mM H_2O_2 in PBS. The disappearance of H_2O_2 was measured at 240 nm for 180 sec at 30 sec intervals. Catalase activity was calculated using the extinction coefficient of 40 mM^{-1} cm^{-1} for H_2O_2.

Radical scavenging and antioxidant activity assays

The radical scavenging capacity and the antioxidant activity of ODN were evaluated by using the $DPPH^{\bullet}$ method and a Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay, respectively. Ascorbic acid was used as a reference compound. Briefly, ODN or ascorbic acid solution was mixed with 0.1 mM DPPH ethanolic solution (1:1). After a 30-min incubation in the dark at room temperature, the absorbance of the mixture was measured at 517 nm. The antioxidant activity of ODN was expressed as mM TEAC, using Trolox (0.05 – 1 mM) as standard, and compared to that of ascorbic acid.

253 *Statistical analysis*

254

255 Data are presented as the mean ± SEM from three independent experiments
256 performed in quadruplicate or quintuplicate. Statistical analysis of the data was performed
257 by using Student's *t* test and ANOVA, followed by Bonferroni's test.

258

Results

Effect of ODN on H_2O_2-induced astrocyte death

Incubation of astrocytes with graded concentrations of H_2O_2 induced a dose-dependent increase of LDH levels in the culture medium. Addition of ODN (0.1 nM) to the culture medium totally suppressed the effect of moderate concentrations of H_2O_2 (100 to 400 μM) and markedly attenuated the effect of higher concentrations of H_2O_2 (500 and 800 μM) on LDH release (Fig. 1).

Examination of cultures by phase-contrast microscopy revealed that ODN-treated cells displayed a flat polygonal morphology similar to that of untreated-astrocytes (Fig. 2A and 2D), while, H_2O_2 induced cell shrinkage and the appearance of long thin processes (Fig. 2B and 2C). Pretreatment of cells with ODN (0.1 nM) totally prevented the morphological changes induced by 300 μM H_2O_2 (Fig. 2E) but was unable to suppress the effect of 500 μM H_2O_2 (Fig. 2F).

Effect of ODN on H_2O_2-induced intracellular ROS accumulation

To examine whether ODN could also block H_2O_2-induced intracellular ROS accumulation, astrocytes were labeled with CMH_2DCFDA which forms the fluorescent dichlorofluorescein compound (DCF) upon oxidation with ROS. Incubation of cultured astrocytes with graded concentrations of H_2O_2 (100 to 800 μM) for 1 h, induced a dose-dependent increase in DCF fluorescence intensity (Fig. 3). Addition of ODN (0.1 nM) to

281 the incubation medium totally blocked the effect of moderate concentrations of H_2O_2
282 (from 100 to 300 μM) and partially reversed the effect of higher concentrations of H_2O_2
283 (500 μM and 800 μM) on DCF formation. In contrast, ODN by itself was unable to
284 produce DCF from $DCFH_2$-DA in the absence of cells (Fig. 3, inset).
285
286 *Effect of ODN on H_2O_2-induced alteration of mitochondrial activity and activation of*
287 *caspase-3*
288
289 Considering the major effect of ROS in the permeabilization of the mitochondrial
290 outer membrane, we examined the effect of ODN on the integrity of mitochondria by
291 visualizing the membrane potential using the fluorescent ratiometric probe JC1.
292 Treatment of astrocytes with graded concentrations of H_2O_2 (100 to 800 μM) for 1 h,
293 induced a dose-dependent decrease of the red signal (590 nm); instead, green fluorescence
294 (530 nm) was observed in cell bodies, indicating that the mitochondrial integrity was
295 severely altered by H_2O_2 (Fig. 4). Incubation of astrocytes with ODN (0.1 nM) had no
296 effect on the 590/530 nm fluorescence ratio, but totally suppressed the deleterious effects
297 of moderate concentrations of H_2O_2 (from 100 to 400 μM) on mitochondrial membrane
298 potential (Fig. 4). At higher concentrations of H_2O_2 (500 and 800 μM), however, ODN
299 was unable to prevent the decrease of mitochondrial activity. H_2O_2-induced reduction of
300 membrane potential was associated with an increase of caspase-3 activity (Fig. 5).
301 Addition of ODN (0.1 nM) in the incubation medium totally suppressed the stimulatory

effect of low concentrations (100 - 300 μM) of H_2O_2 on caspase-3 activity and markedly reduced the effects of higher concentrations (Fig. 5).

Effect of ODN on antioxidant enzyme activities in cultured astrocytes

To further explore the mechanism involved in the protective action of ODN we monitored the activities of the two antioxidant enzymes SOD and catalase in astrocytes. Exposure of astrocytes to graded concentrations of ODN (0.01 pM – 0.1 nM) for 10 min, resulted in a dose-dependent increase in SOD activity (Fig. 6A). The half-maximum effect of ODN was observed at a concentration of 1.7 pM and the maximum stimulation of SOD activity ($P < 0.001$) was obtained at a concentration of 0.1 nM. ODN also induced a concentration-dependent stimulation of catalase activity, with an EC_{50} value of 1.4 pM (Fig. 6B). To exclude that ODN could by itself possess free radical scavenging activity, and thus could inhibit oxidation reaction occurring in SOD and catalase assays, we measured the possible antioxidant activity of ODN. The $DPPH^{\bullet}$ scavenging potential of ODN was similar to that of the culture medium alone (2.73 $\pm$ 0.65 versus 1.74 $\pm$ 0.59 %) and largely lower than that of ascorbic acid (95.20 $\pm$ 1.50 %), a strong free radical scavenger compound (Fig. 6C). Similarly, ODN was devoid of antioxidant activity in the TEAC assay (Fig. 6C).

Time-course experiments revealed that ODN (0.1 nM) significantly enhanced SOD and catalase activities within 2 min and reached a maximum effect after 10 min and 20 min of incubation, respectively (Fig. 7A and 7B). Thereafter, the stimulatory effect of

ODN on SOD and catalase activities gradually declined and vanished after 90 and 45 min, respectively, after the onset of ODN administration. Addition of a novel dose of ODN (0.1 nM) after 10 min (SOD) or 20 min (catalase) of incubation restored the stimulatory effect of ODN on SOD and catalase activities (Fig. 7).

Incubation of astrocytes with graded concentrations of H_2O_2 (100 to 800 μM; 1 h) induced a dose-dependent decrease of both SOD and catalase activities. As illustrated in Figure 8, ODN alone, at a concentration of 0.1 nM, provoked a significant increase in SOD and catalase activities. At all concentrations of H_2O_2 tested, ODN restored SOD and catalase activities above control levels (Fig. 8A and 8B). Addition of 2 mM NaCN, a SOD inhibitor, significantly reduced basal enzymatic activity and totally suppressed the stimulatory effects of ODN (Fig. 8C). In a very similar manner, exposure of cells to 10 mM 3-aminotriazole, a specific catalase inhibitor, strongly decreased basal and ODN-enhanced catalase activity (Fig. 8D). Finally, we have examined whether stimulation of SOD and catalase activity is involved in the glioprotective effect of ODN. Exposure of astrocytes to 2 mM NaCN and 10 mM 3-aminotriazole, which did not affect cell survival by theirselves, totally blocked the protective effect of ODN against H_2O_2-induced cell death (Fig. 9).

Discussion

It is clearly established that oxidative stress causes apoptosis in different cell types, notably in astroglial cells [30,40]. We have recently found that the endozepine ODN induces a concentration-dependent increase of the number of astrocytes in primary culture [37], suggesting that ODN may be involved in the control of survival or/and cell proliferation. The present study demonstrates for the first time that ODN exerts a protective effect on H_2O_2 injured astrocytes and activates the antioxidant system of astroglial cells.

In agreement with previous reports [41,42], we observed that exposure of cultured astrocytes to H_2O_2 at concentrations below 100 μM has little effect on astrocyte viability in culture. The insensitivity of astrocytes in this range of concentrations may be ascribed to their high hydrogen peroxidase activity and their ability to clearing H_2O_2 from culture medium [41,43]. In contrast, at higher concentrations (200 to 800 μM), H_2O_2 provoked astrocyte death which exhibited the characteristic features of apoptosis, i.e. cell shrinkage. Recent reports have provided evidence that astroglial cells can be affected, in terms of viability and functionality, by an insurmountable oxidative stress [43,44]. Indeed, astrocytic apoptosis is observed in brain injuries caused by trauma and ischemia [31]. The present data suggest that ODN, which is specifically produced by glial cells in the brain [3,45], may act as an autocrine factor to reduce the sensitivity of astrocytes to H_2O_2.

We next determined the mechanisms involved in the protective effect of ODN against H_2O_2-induced astrocyte cell death. It is well known that oxidative stress is an important component in H_2O_2-evoked cell toxicity [44]. Thus, in agreement with previous

364 reports, we found that H_2O_2 increases in a concentration-dependent manner the
365 production of ROS in cultured rat astrocytes. The present study reveals that pretreatment
366 of cells with ODN significantly attenuates ROS formation which is likely responsible for
367 a reduction of cell death induced by H_2O_2.

368 Although our understanding of the precise signaling pathways that trigger apoptosis
369 of astrocytes is still fragmentary, it is widely accepted that ROS can cause cell death by
370 multiple mechanisms including damage of mitochondria leading to a decrease of ATP
371 production [46], collapse of the mitochondrial potential and formation of mitochondrial
372 permeability transition pore [47]. Mitochondrial dysfunction causes activation of
373 caspases, the effectors of apoptotic cell death [48]. Measurement of mitochondria activity
374 with the membrane potential-sensitive probe JC-1 revealed that treatment with H_2O_2
375 resulted in a concentration-dependent decrease of the proportion of active mitochondria,
376 and that treatment of the cells with ODN prevented the deleterious effect of H_2O_2.
377 Collectively, these data strongly suggest that ODN promotes astrocyte survival by
378 decreasing the amount of ROS, which in turn preserves mitochondrial activity. In support
379 of this hypothesis, it has been shown that the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-
380 activating polypeptide, which inhibits the deleterious effect of H_2O_2 on mitochondrial
381 membrane potential, markedly reduces cell apoptosis in cultured cerebellar granule
382 neurons [49].

383 It is widely accepted that permeabilization of the mitochondrial outer membrane,
384 yielding to leakage of cytochrome C, is one of the initiator pathways leading to activation
385 of caspases [48]. We have thus investigated the possible effect of ODN on H_2O_2-induced

386 caspase-3 activation in cultured astrocytes. In agreement with previous reports [50,51],
387 we observed that H_2O_2 causes a massive increase of caspase-3 activity. Pre-treatment of
388 astrocytes with a subnanomolar concentration of ODN totally suppressed caspase-3
389 activation induced by H_2O_2, indicating that the protective effect of ODN can be accounted
390 for by an inhibition of caspase-3 activity, probably resulting from oxidative stress
391 suppression.

392 Astroglial cells possess an array of cellular defense systems, including antioxidant
393 enzymes i.e. SOD, glutathione peroxidase and catalase, to prevent damage caused by
394 ROS. Several lines of evidence indicate that the protective effect of ODN against H_2O_2-
395 induced cell death could be mediated through activation of the antioxidant enzyme
396 system. As previously shown [52,53], high concentrations of H_2O_2 provoked astrocyte
397 death probably in part through reduction of SOD and catalase activities. Here, we
398 demonstrate for the first time that the gliopeptide ODN is able to stimulate both SOD and
399 catalase activities in astrocytes. Kinetic studies revealed that ODN provokes a rapid and
400 transient stimulation of SOD and catalase activities with a maximal effect occurring
401 respectively 10 and 20 min after the onset of treatment. Thereafter, the action of ODN
402 gradually declined and vanished. It has been previously reported that cultured astrocytes
403 release proteolytic enzymes which actively degrade various neuropeptides, including
404 somatostatin and neurotensin [54,55]. Therefore, the attenuation of the stimulatory effect
405 of ODN on antioxidant enzyme activities could be accounted for by inactivation of the
406 peptide by proteolytic enzymes released in the culture medium. In support of this

hypothesis, refill of ODN 10 min (SOD) and 20 min (catalase) after the onset of peptide administration restored the stimulatory effect of ODN on both SOD and catalase activity.

The mechanism involved in ODN-induced increase of SOD and catalase activity is currently unknown. It has been demonstrated that dephosphorylation of SOD and catalase in a calcium- and PKC-dependent manner is associated with an increase of the activity of these two enzymes [56,57]. It has also been shown that expression of SOD in human tumoral cell lines [58] and in cultured glial cells [59] depends of PKC activation. In glial cells, the increase of SOD mRNA induced by hypoxia reaches a maximum at 5 min [59]. We have previously shown that ODN provokes rapid calcium mobilization from IP3-sensitive pools in rat astrocytes [7,9]. Thus, the stimulatory effect of ODN on SOD and catalase activities could be ascribed to activation of the PLC/PKC transduction pathway, leading to a rapid increase in SOD expression, and/or intracellular calcium increase, inducing SOD activation through a dephosphorylation process.

Pre-treatment of astrocytes with subnanomolar concentrations of ODN markedly reduced the inhibitory effect of H_2O_2 on SOD and catalase activities, that might be responsible, at least in part, for the glioprotective action of ODN on H_2O_2-induced cell death. The present study reveals that exposure of astrocytes to SOD and catalase inhibitors abrogated the effect of ODN on H_2O_2-evoked inhibition of SOD and catalase activities. In addition, the two blockers suppressed the protective effect of ODN against H_2O_2-induced astrocyte apoptosis. Consistent with these observations, overexpression of Cu,Zn- and Mn-SOD has been found to be protective in transgenic mouse models of ischemia and AD [60] and reduction of SOD activity is associated with an exacerbation of

429 oxidative damages in a mouse AD model [61]. Besides, *in vitro* studies have confirmed
430 that astrocytes isolated from Cu,Zn-SOD transgenic mice exhibit an increased resistance
431 to oxidative stress induced by menadione- or oxygen-glucose deprivation [28,62].
432 Altogether, these data indicate that the protective effect of ODN against H_2O_2-induced
433 cell death in astrocytes is attributable to activation of the antioxidant enzymes that act as
434 scavengers of H_2O_2 and ROS.

435 The protective effect of ODN against H_2O_2-induced oxidative stress and cell death
436 might have a physiopathological significance in patients suffering of degenerative
437 disorders of the CNS, including AD and Parkinson's disease (PD), and in pathological
438 conditions such as ischemia. Clinical studies have shown that the concentration of
439 endozepines is elevated in the CSF of patients with AD and PD [34]. Along these lines,
440 we have recently reported that exposure of cultured astrocytes to beta-amyloid peptide,
441 the main constituent of senile plaques in AD brain, stimulates the biosynthesis and release
442 of ODN-like peptide [36,37], suggesting that up-regulation of endozepine production
443 observed in neurodegenerative disorders may be involved in the protection of glial cells.
444 Moreover, astrocytes contain high levels of antioxidants enzymes and play an important
445 role in antioxidative processes in the brain [63]. Nevertheless, despite their high
446 antioxidative activities, astrocytes cannot survive and protect neurons under
447 insurmountable oxidative stress [30,31]. Thus, enhanced expression of the endozepine
448 ODN, which acts as a protective agent on astrocytes from oxidative assault, might delay
449 neuronal damages in various pathological conditions involving oxidative
450 neurodegeneration.

In conclusion, the present study demonstrates that the endozepine ODN exerts a potent protective action against apoptosis induced by oxidative stress in astrocytes. The anti-apoptotic effect of ODN is attributable, at least in part, to activation of endogenous antioxidant systems and reduction of ROS formation which preserve mitochondrial functions and prevent caspase-3 activation.

Acknowledgments

The authors wish to thank Mr Samir Elbahi for skilful technical assistance. Y.H., H.K. and R.H. were recipients of fellowships from the University of Tunis El Manar and a France-Tunisia exchange program CMCU-Utique. This study was supported by the Research Unit 00-UR-08-01, the CMCU-Utique program (to MA and MCT), Inserm (U413/U982), the European Institute for Peptide Research (IFRMP23) and the Region Haute-Normandie.

Abbreviations: DBI, diazepam-binding inhibitor; H_2O_2, hydrogen peroxide; LDH, lactate dehydrogenase; ODN, octadecaneuropeptide DBI_{33-50}; PI, propidium iodide; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase.

References

[1] Guidotti, A.; Forchetti, C. M.; Corda, M. G.; Konkel, D.; Bennett, C. D.; Costa, E. Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80:**3531–3535; 1983.

[2] Burgi, B.; Lichtensteiger, W.; Lauber, M. E.; Schlumpf, M. Ontogeny of diazepam binding inhibitor/acyl-CoA binding protein mRNA and peripheral benzodiazepine receptor mRNA expression in the rat. *J. Neuroendocrinol.* **11:**85–100; 1999.

[3] Compère, V.; Ouellet, J.; Luu-The, V.; Dureuil, B.; Tonon, M. C.; Vaudry, H.; Labrie, F.; Pelletier, G. Role of androgens and glucocorticoids in the regulation of diazepam-binding inhibitor mRNA levels in male mouse hypothalamus. *Brain Res.* **1119:**50–57; 2006.

[4] Tonon, M. C.; Leprince, J.; Gandolfo, P.; Compère, V.; Pelletier, G.; Malagon, M. M.; Vaudry, H. Endozepines. *In Kastin AJ, editor. Handbook of Biologically Active Peptides New York: Elsevier* 813–819; 2006.

[5] Ferrero, P.; Guidotti, A.; Conti-Tronconi, B.; Costa, E. A brain octadecaneuropeptide generated by tryptic digestion of DBI (diazepam binding inhibitor) functions as a proconflict ligand of benzodiazepine recognition sites. *Neuropharmacology* **23:**1359–1362; 1984.

[6] Papadopoulos, V.; Berkovich, A.; Krueger, K. E. The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. *Neuropharmacology* **30:**1417–1423.; 1991.

[7] Leprince, J.; Oulyadi, H.; Vaudry, D.; Masmoudi, O.; Gandolfo, P.; Patte, C.; Costentin, J.; Fauchère, J. L.; Davoust, D.; Vaudry, H.; Tonon, M. C. Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur. J. Biochem.* **268:**6045–6057; 2001.

[8] Marino, F.; Cosentino, M.; Fietta, A. M.; Ferrari, M.; Cattaneo, S.; Frigo, G.; Lecchini, S.; Frigo, G. M. Interleukin-8 production induced by the endozepine triakontatetraneuropeptide in human neutrophils: role of calcium and pharmacological investigation of signal transduction pathways. *Cell Signal* **15:**511–517; 2003.

[9] Patte, C.; Vaudry, H.; Desrues, L.; Gandolfo, P.; Strijdveen, I.; Lamacz, M.; Tonon, M. C. The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Lett.* **362:**106–110; 1995.

[10] Kavaliers, M.; Hirst, M. An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res.* **383:**343–349; 1986.

[11] De Mateos-Verchère, J. G.; Leprince, J.; Tonon, M. C.; Vaudry, H.; Costentin, J. The octadecaneuropeptide ODN induces anxiety in rodents: possible involvement of a shorter biologically active fragment. *Peptides* **19:**841–848; 1998.

[12] Dong, E.; Matsumoto, K.; Tohda, M.; Watanabe, H. Involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Life Sci.* **64:**1779–1784; 1999.

513 [13] Manabe, Y.; Toyoda, T.; Kuroda, K.; Imaizum, M.; Yamamoto, T.; Fushiki, T.
514 Effect of diazepam binding inhibitor (DBI) on the fluid intake, preference and the
515 taste reactivity in mice. *Behav. Brain Res.* **126:**197–204; 2001.
516 [14] De Mateos-Verchère, J. G.; Leprince, J.; Tonon, M. C.; Vaudry, H.; Costentin, J.
517 The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent
518 anorexigenic effects in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* **414:**225-231; 2001.
519 [15] Do Régo, J. C.; Orta, M. H.; Leprince, J.; Tonon, M. C.; Vaudry, H.; Costentin, J.
520 Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action
521 of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food
522 intake. *Neuropsychopharmacology* **32:**1641–1648; 2007.
523 [16] Gandolfo, P.; Patte, C.; Leprince, J.; Thoumas, J. L.; Vaudry, H.; Tonon, M. C. The
524 stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca^{2+} in rat
525 astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur. J.*
526 *Pharmacol.* **322:**275–281; 1997.
527 [17] Gandolfo, P.; Patte, C.; Thoumas, J. L.; Leprince, J.; Vaudry, H.; Tonon, M. C. The
528 endozepine ODN stimulates [^{3}H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes.
529 *Neuropharmacology* **38:**725–732; 1999.
530 [18] Do-Rego, J. L.; Mensah-Nyagan, A. G.; Beaujean, D.; Leprince, J.; Tonon, M. C.;
531 Luu-The, V.; Pelletier, G.; Vaudry, H. The octadecaneuropeptide ODN stimulates
532 neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine
533 receptors. *J. Neurochem.* **76:**128–138; 2001.

534 [19] Compère, V.; Li, S.; Leprince, J.; Tonon, M. C.; Vaudry, H.; Pelletier, G. Effect of
535 intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression
536 of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone
537 mRNAs in rat hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* **15:**197–203; 2003.
538 [20] Compère, V.; Li, S.; Leprince, J.; Tonon, M. C.; Vaudry, H.; Pelletier, G. *In vivo*
539 action of a new octadecaneuropeptide antagonist on neuropeptide Y and
540 corticotropin-releasing hormone mRNA levels in rat. *Mol. Brain Res.* **141:**156–160;
541 2005.
542 [21] Chen, M. K.; Guilarte, T. R. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor
543 of brain injury and repair. *Pharmacol. Ther.* **118:**1–17; 2008.
544 [22] Veiga, S.; Carrero, P.; Pernia, O.; Azcoitia, I.; Garcia-Segura, L. M. Translocator
545 protein 18 kDa is involved in the regulation of reactive gliosis. *Glia* **55:**1426–1436;
546 2007.
547 [23] Corbett, D.; Larsen, J.; Langdon, K. D. Diazepam delays the death of hippocampal
548 CA1 neurons following global ischemia. *Exp. Neurol.* **214:**309–314; 2008.
549 [24] Ricci, L.; Valoti, M.; Sgaragli, G.; Frosini, M. Neuroprotection afforded by
550 diazepam against oxygen/glucose deprivation-induced injury in rat cortical brain
551 slices. *Eur. J. Pharmacol.* **561:**80–84; 2007.
552 [25] Lotharius, J.; Falsig, J.; van Beek, J.; Payne, S.; Dringen, R.; Brundin, P.; Leist, M.
553 Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by
554 dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase
555 pathway. *J. Neurosci.* **25:**6329–6342; 2005.

556 [26] Resende, R.; Moreira, P. I.; Proenca, T.; Deshpande, A.; Busciglio, J.; Pereira, C.;
557 Oliveira, C. R. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of
558 Alzheimer disease. *Free Radic. Biol. Med.* **44:**2051–2057; 2008.
559 [27] Elekes, O.; Venema, K.; Postema, F.; Dringen, R.; Hamprecht, B.; Korf, J. Evidence
560 that stress activates glial lactate formation *in vivo* assessed with rat hippocampus
561 lactography. *Neurosci. Lett.* **208:**69–72; 1996.
562 [28] Chen, Y.; Chan, P. H.; Swanson, R. A. Astrocytes overexpressing Cu,Zn superoxide
563 dismutase have increased resistance to oxidative injury. *Glia* **33:**343–347; 2001.
564 [29] Choi, J. H.; Kim, D. H.; Yun, I. J.; Chang, J. H.; Chun, B. G.; Choi, S. H. Zaprinast
565 inhibits hydrogen peroxide-induced lysosomal destabilization and cell death in
566 astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **571:**106-115; 2007.
567 [30] Giffard, R. G.; Swanson, R. A. Ischemia-induced programmed cell death in
568 astrocytes. *Glia* **50:**299–306; 2005.
569 [31] Takuma, K.; Baba, A.; Matsuda, T. Astrocyte apoptosis: implications for
570 neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **72:**111–127; 2004.
571 [32] Manni, M. L.; Oury, T. D. Commentary on "Copper chaperone for Cu,Zn-SOD
572 supplement potentiates the Cu,Zn-SOD function of neuroprotective effects against
573 ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus". *Free Radic. Biol. Med.*
574 **43:**899–900; 2007.
575 [33] Malagon, M.; Vaudry, H.; Van Strien, F.; Pelletier, G.; Gracia-Navarro, F.; Tonon,
576 M. C. Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the
577 rat brain. *Neuroscience* **57:**777–786; 1993.

578 [34] Ferrarese, C.; Appollonio, I.; Frigo, M.; Meregalli, S.; Piolti, R.; Tamma, F.;
579 Frattola, L. Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in
580 neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology.* **40:**632–635; 1990.
581 [35] Ferrero, P.; Benna, P.; Costa, P.; Tarenzi, L.; Baggio, G.; Bergamasco, B.;
582 Bergamini, L. Diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity (DBI-LI) in human
583 CSF. Correlations with neurological disorders. *J. Neurol. Sci.* **87:**327–349; 1988.
584 [36] Tokay, T.; Hachem, R.; Masmoudi-Kouki, O.; Gandolfo, P.; Desrues, L.; Leprince,
585 J.; Castel, H.; Diallo, M.; Amri, M.; Vaudry, H.; Tonon, M. C. Beta-amyloid peptide
586 stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-
587 formyl peptide receptors. *Glia* **56:**1380–1389; 2008.
588 [37] Tokay, T.; Masmoudi, O.; Gandolfo, P.; Leprince, J.; Pelletier, G.; Vaudry, H.;
589 Tonon, M. C. Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured
590 rat astrocytes. *J. Neurochem.* **94:**607–616; 2005.
591 [38] Brown, D. R.; Mohn, C. M. Astrocytic glutamate uptake and prion protein
592 expression. *Glia* **25:**282-292; 1999.
593 [39] Castel, H.; Diallo, M.; Chatenet, D.; Leprince, J.; Desrues, L.; Schouft, M. T.;
594 Fontaine, M.; Dubessy, C.; Lihrmann, I.; Scalbert, E.; Malagon, M.; Vaudry, H.;
595 Tonon, M. C.; Gandolfo, P. Biochemical and functional characterization of high-
596 affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J. Neurochem.* **99:**582–595;
597 2006.

598 [40] Feeney, C. J.; Frantseva, M. V.; Carlen, P. L.; Pennefather, P. S.; Shulyakova, N.;
599 Shniffer, C.; Mills, L. R. Vulnerability of glial cells to hydrogen peroxide in
600 cultured hippocampal slices. *Brain Res.* **1198:**1–15; 2008.
601 [41] Dringen, R.; Hamprecht, B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in
602 the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res.*
603 **759:**67–75; 1997.
604 [42] Huang, J.; Philbert, M. A. Distribution of glutathione and glutathione-related
605 enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and
606 granule cells. *Brain Res.* **680:**16-22; 1995.
607 [43] Ferrero-Gutierrez, A.; Perez-Gomez, A.; Novelli, A.; Fernandez-Sanchez, M. T.
608 Inhibition of protein phosphatases impairs the ability of astrocytes to detoxify
609 hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **44:**1806–1816; 2008.
610 [44] Park, S. J.; Kim, H. Y.; Kim, H.; Park, S. M.; Joe, E. H.; Jou, I.; Choi, Y. H.
611 Oxidative stress induces lipid-raft-mediated activation of Src homology 2 domain-
612 containing protein-tyrosine phosphatase 2 in astrocytes. *Free Radic. Biol. Med.*
613 **46:**1694–1702; 2009.
614 [45] Tonon, M. C.; Désy, L.; Nicolas, P.; Vaudry, H.; Pelletier, G. Immunocytochemical
615 localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN)
616 in the rat brain. *Neuropeptides* **15:**17–24; 1990.
617 [46] Whittemore, E. R.; Loo, D. T.; Watt, J. A.; Cotman, C. W. A detailed analysis of
618 hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience*
619 **67:**921–932; 1995.

620 [47] Copin, J. C.; Gasche, Y.; Li, Y.; Chan, P. H. Prolonged hypoxia during cell
621 development protects mature manganese superoxide dismutase-deficient astrocytes
622 from damage by oxidative stress. *Faseb J.* **15:**525–534; 2001.
623 [48] Wu, K. L.; Hsu, C.; Chan, J. Y. Impairment of the mitochondrial respiratory enzyme
624 activity triggers sequential activation of apoptosis-inducing factor-dependent and
625 caspase-dependent signaling pathways to induce apoptosis after spinal cord injury. *J.*
626 *Neurochem.* **101:**1552–1566; 2007.
627 [49] Vaudry, D.; Pamantung, T. F.; Basille, M.; Rousselle, C.; Fournier, A.; Vaudry, H.;
628 Beauvillain, J. C.; Gonzalez, B. J. PACAP protects cerebellar granule neurons
629 against oxidative stress-induced apoptosis. *Eur. J. Neurosci.* **15:**1451–1460; 2002.
630 [50] Juknat, A. A.; Mendez Mdel, V.; Quaglino, A.; Fameli, C. I.; Mena, M.; Kotler, M.
631 L. Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat
632 astrocytes. *J Pineal Res* **38:**84-92; 2005.
633 [51] Shin, J. H.; Kim, S. W.; Lim, C. M.; Jeong, J. Y.; Piao, C. S.; Lee, J. K. alphaB-
634 crystallin suppresses oxidative stress-induced astrocyte apoptosis by inhibiting
635 caspase-3 activation. *Neurosci Res* **64:**355-361; 2009.
636 [52] Lopez, M. V.; Cuadrado, M. P.; Ruiz-Poveda, O. M.; Del Fresno, A. M.; Accame,
637 M. E. Neuroprotective effect of individual ginsenosides on astrocytes primary
638 culture. *Biochim. Biophys. Acta.* **1770:**1308–1316; 2007.
639 [53] Sokolova, T.; Gutterer, J. M.; Hirrlinger, J.; Hamprecht, B.; Dringen, R. Catalase in
640 astroglia-rich primary cultures from rat brain: immunocytochemical localization and

641 inactivation during the disposal of hydrogen peroxide. *Neurosci. Lett.* **297:**129–132;
642 2001.
643 [54] Masmoudi, O.; Gandolfo, P.; Tokay, T.; Leprince, J.; Ravni, A.; Vaudry, H.; Tonon,
644 M. C. Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from
645 cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J. Neurochem.* **94:**561–571;
646 2005.
647 [55] Mentlein, R.; Dahms, P. Endopeptidases 24.16 and 24.15 are responsible for the
648 degradation of somatostatin, neurotensin, and other neuropeptides by cultivated rat
649 cortical astrocytes. *J. Neurochem.* **62:**27–36; 1994.
650 [56] Hopper, R. K.; Carroll, S.; Aponte, A. M.; Johnson, D. T.; French, S.; Shen, R. F.;
651 Witzmann, F. A.; Harris, R. A.; Balaban, R. S. Mitochondrial matrix
652 phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry* **45:**2524-
653 2536; 2006.
654 [57] Kumar, S.; Sud, N.; Fonseca, F. V.; Hou, Y.; Black, S. M. Shear stress stimulates
655 nitric oxide signaling in pulmonary arterial endothelial cells via a reduction in
656 catalase activity: role of protein kinase C delta. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol.*
657 *Physiol.* **298:**L105-116; 2010.
658 [58] Kim, C. H.; Han, S. I.; Lee, S. Y.; Youk, H. S.; Moon, J. Y.; Duong, H. Q.; Park, M.
659 J.; Joo, Y. M.; Park, H. G.; Kim, Y. J.; Yoo, M. A.; Lim, S. C.; Kang, H. S. Protein
660 kinase C-ERK1/2 signal pathway switches glucose depletion-induced necrosis to
661 apoptosis by regulating superoxide dismutases and suppressing reactive oxygen
662 species production in A549 lung cancer cells. *J. Cell Physiol.* **211:**371-385; 2007.

663 [59] Huang, W. C.; Chen, P. C.; Jou, S. B.; Cheng, J. T. Protein kinase C and changes in
664 manganese superoxide dismutase gene expression in cultured glial cells. *Clin. Exp.*
665 *Pharmacol. Physiol.* **28:**822-825; 2001.
666 [60] Dumont, M.; Wille, E.; Stack, C.; Calingasan, N. Y.; Beal, M. F.; Lin, M. T.
667 Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by
668 manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of
669 Alzheimer's disease. *Faseb J.* **23:**2459–2466; 2009.
670 [61] Schuessel, K.; Schafer, S.; Bayer, T. A.; Czech, C.; Pradier, L.; Muller-Spahn, F.;
671 Muller, W. E.; Eckert, A. Impaired Cu/Zn-SOD activity contributes to increased
672 oxidative damage in APP transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **18:**89–99; 2005.
673 [62] Wang, J.; Ma, J. H.; Giffard, R. G. Overexpression of copper/zinc superoxide
674 dismutase decreases ischemia-like astrocyte injury. *Free Radic. Biol. Med.* **38:**1112–
675 1118; 2005.
676 [63] Peuchen, S.; Bolanos, J. P.; Heales, S. J.; Almeida, A.; Duchen, M. R.; Clark, J. B.
677 Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status
678 within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **52:**261–281; 1997.
679
680

Legends to figures

Fig. 1. Effect of ODN on H_2O_2-induced release of lactate dehydrogenase from cultured rat astrocytes. Cells were preincubated for 10 min in the absence or presence of 0.1 nM ODN and then incubated for 1 h with medium alone (□) or with graded concentrations of H_2O_2 (100 - 800 µM) in the absence (●) or presence of ODN (■). The results are expressed as percentages of LDH released in Triton-lysed cells. Each value is the mean (± SEM) calculated from at least 10 different wells from 3 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test: [F= 36.96, df= 12] * $P< 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and NS not statistically different from control; [F= 32.70, df= 11] $^{\#}P< 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs.* H_2O_2-treated cells.

Fig. 2. Phase-contrast images illustrating the effect of ODN on H_2O_2-induced changes in morphology of cultured rat astrocytes. Cells were preincubated for 10 min in the absence (A-C) or presence of 0.1 nM ODN (D-F), and then incubated for 1 h with 300 µM (B and E) or 500 µM H_2O_2 (C and F). Scale bar = 50 µm.

Fig. 3. Effect of ODN on H_2O_2-induced intracellular accumulation of ROS in cultured rat astrocytes. Cells were preincubated for 10 min in the absence or presence of 0.1 nM ODN, and then incubated for 1 h with medium alone, ODN or with H_2O_2 (100 - 800 µM) without or with ODN. Cellular ROS were detected by DCF fluorescence, and the results are expressed as a percentage of fluorescence with respect to that of control cells (F_0).

703 Each value is the mean (± SEM) calculated from at least 4 different wells from 5
704 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test: [F= 29.7, df= 11] ** P
705 < 0.01, *** $P < 0.001$ and NS not statistically different from control; [F= 16.07, df= 9],
706 $^{\#} P < 0.05$, $^{\#\#} P < 0.01$, $^{\#\#\#} P < 0.001$ vs H_2O_2-treated cells and ns not statistically different
707 from H_2O_2 alone.
708 Inset: DCF fluorescence intensity, in the absence of cells, in wells containing medium
709 with CMH_2DCFDA alone (M) or with 0.1 nM ODN (ODN). Each value is the mean (±
710 SEM) calculated from at least 6 different wells. ANOVA followed by the Bonferroni's
711 test: NS, not statistically different from medium alone.
712
713 **Fig. 4.** Effect of ODN on H_2O_2-induced alteration of mitochondrial membrane potential in
714 cultured rat astrocytes. Cells were preincubated for 10 min in the absence or presence of
715 0.1 nM ODN, and then incubated for 1 h with medium alone, ODN or with H_2O_2 (100 -
716 800 μM) without or with ODN. Mitochondrial transmembrane potential was assessed by
717 JC-1 probe. The ratio of fluorescence emissions 590 nm *versus* 530 nm was measured as
718 an index of the mitochondrial activity. The results are expressed as percentage of control.
719 Each value is the mean (± SEM) calculated from at least 4 different wells from 3
720 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test: [F= 37.82, df= 13] ** P
721 < 0.01, *** $P < 0.001$ and NS not statistically different from control; [F= 39.55, df= 11] $^{\#\#}$
722 $P < 0.01$ *vs* H_2O_2-treated cells ; ns not statistically different from H_2O_2 alone.
723

Fig. 5. Effect of ODN on caspase-3 activation induced by H_2O_2 in cultured rat astrocytes. Cells were preincubated for 10 min in the absence or presence of 0.1 nM ODN, and then incubated for 1 h with medium alone or with graded concentrations of H_2O_2 (100 – 500 µM) in the absence or in presence of ODN. The results are expressed as percentages of the control value. Each value is the mean (± SEM) calculated from 4 different wells from 3 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test : [F= 10.76, df= 11] *** $P < 0.001$ and NS not statistically different from the control; $^{###}$ $P < 0.001$ *vs* H_2O_2-treated cells.

Fig. 6. Effect of graded concentrations of ODN on SOD and catalase activities in cultured rat astrocytes. Cells were incubated for 10 min with increasing concentrations of ODN (0.01 pM - 0.1 nM). The results are expressed as a percentage of SOD (A) or catalase (B) activity with respect to control. Each value is the mean (± SEM) calculated from at least 4 different dishes from 3 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test: [(A) F= 17.72, df= 5; (B) F= 8.89, df= 5] * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ and NS not statistically different from control. Mean basal SOD and catalase activities in these experiments were 22.4 $\pm$ 1.7 and 0.93 $\pm$ 0.1 U/mg protein. (C) The capacity of medium alone (M), ODN (0.1 nM) and ascorbic acid (Asc; used as antioxidant reference compound) to scavenge the $DPPH^{\bullet}$ radical is expressed as a percentage of DPPH radical scavenging activity and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Each value is the mean (± SEM) calculated from 2 different wells from 3 independent experiments.

745 **Fig. 7.** Time-course of the effects of ODN on SOD and catalase activities in cultured rat
746 astrocytes. Cells were incubated in the absence or presence of ODN (0.1 nM) for the
747 times indicated. After 10 (A) or 20 min (B) of incubation, a refill of ODN (0.1 nM) was
748 added in the incubation medium (arrows). The results are expressed as a percentage of
749 SOD (A) or catalase (B) activity with respect to control mediums. Each value is the mean
750 (± SEM) of at least 4 different dishes from 3 independent cultures. ANOVA followed by
751 the Bonferroni's test: [(A) F= 5.59, df= 12; (B) F= 12.56, df= 11] * $P < 0.05$, ** $P <$
752 0.01, *** $P < 0.001$and NS not statistically different from control. Mean basal SOD and
753 catalase activities in these experiments were 18.5 $\pm$ 1.08 and 0.89 $\pm$ 0.13 U/mg protein.
754
755 **Fig. 8.** Effect of ODN and H_2O_2 on SOD and catalase activities in cultured rat astrocytes.
756 (A, B) Cells were incubated in the absence or presence of H_2O_2 (100 - 800 μM) for 1 h,
757 and 0.1 nM ODN was added to the incubation medium during the last 10 min of
758 incubation. (C, D) Cells were preincubated for 10 min or 3 h in the absence or presence of
759 the SOD inhibitor NaCN (2 mM, C) or the catalase inhibitor 3-aminotriazole (AZT, 10
760 mM, D), then incubated in the absence or presence of H_2O_2 (300 μM) for 1 h, and 0.1 nM
761 ODN was added to the incubation medium during the last 10 min of incubation. The
762 results are expressed as a percentage of SOD (A, C) or catalase (B, D) activity with
763 respect to control mediums. Each value is the mean (± SEM) of at least 4 different dishes
764 from 3 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test: [(A) F= 17.08,
765 df= 13; (B) F= 20.35, df= 13; (C) F= 17.78, df= 6; (D) F= 66.20, df= 6] * $P < 0.05$, ** P
766 < 0.01, *** $P < 0.001$ and NS not statistically different from control; [(A) F= 23.11, df=

767 11; (B) F= 17.25, df= 11] $^{\#\#}$ $P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* H_2O_2-treated cells and NS not
768 statistically different from H_2O_2 alone; [(C) F= 19.67, df= 3; (D) F= 22.94, df= 3] $^{+++}$ $P <$
769 0.001 *vs* NaCN-treated cells. Mean basal SOD and catalase activities in these experiments
770 were 17.8 $\pm$ 0.25 and 0.62 $\pm$ 0.28 U/mg protein.
771
772 **Fig. 9.** Effect of NaCN on the protective action of ODN against H_2O_2-induced astrocyte
773 cell death. Cells were preincubated for 10 min or 3 h in the absence or presence of the
774 SOD inhibitor NaCN (2 mM) or the catalase inhibitor 3-aminotriazole (AZT, 10 mM),
775 then incubated for 10 min in the absence or presence of 0.1 nM ODN, and for an
776 additional hour without or with H_2O_2 (300 μM). The results are expressed as percentages
777 of the control value. Each value is the mean (± SEM) of at least 4 wells from 3
778 independent cultures. ANOVA followed by the Bonferroni's test: [F= 46.87, df= 9;] ***
779 $P < 0.001$ and NS not statistically different from the control. [F= 80.04, df= 3] $^{\#\#\#}$ $P <$
780 0.001 *vs.* H_2O_2-treated cells. [F= 116.6, df= 3] $^{+++}$ $P < 0.001$ *vs* NaCN-treated cells. [F=
781 61.95, df= 3] §§§ $P < 0.001$ *vs* AZT-treated cells.

Figure(s)

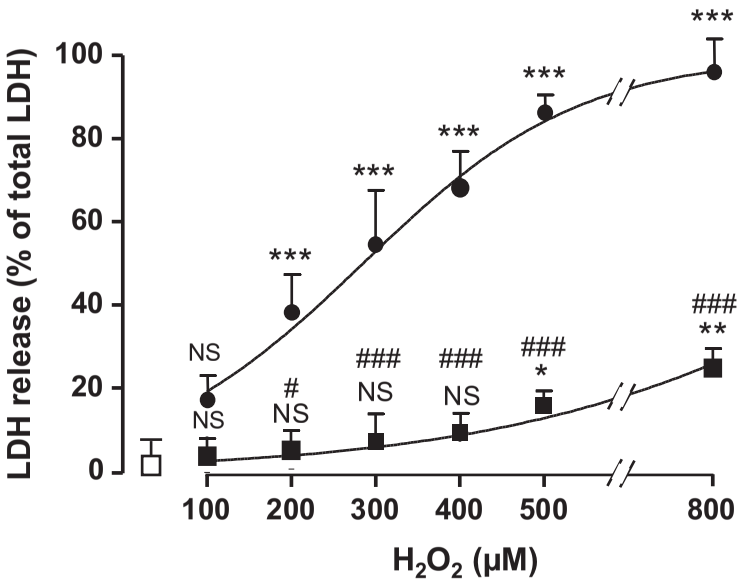


Figure 1
Masmoudi-Kouki O. et al.

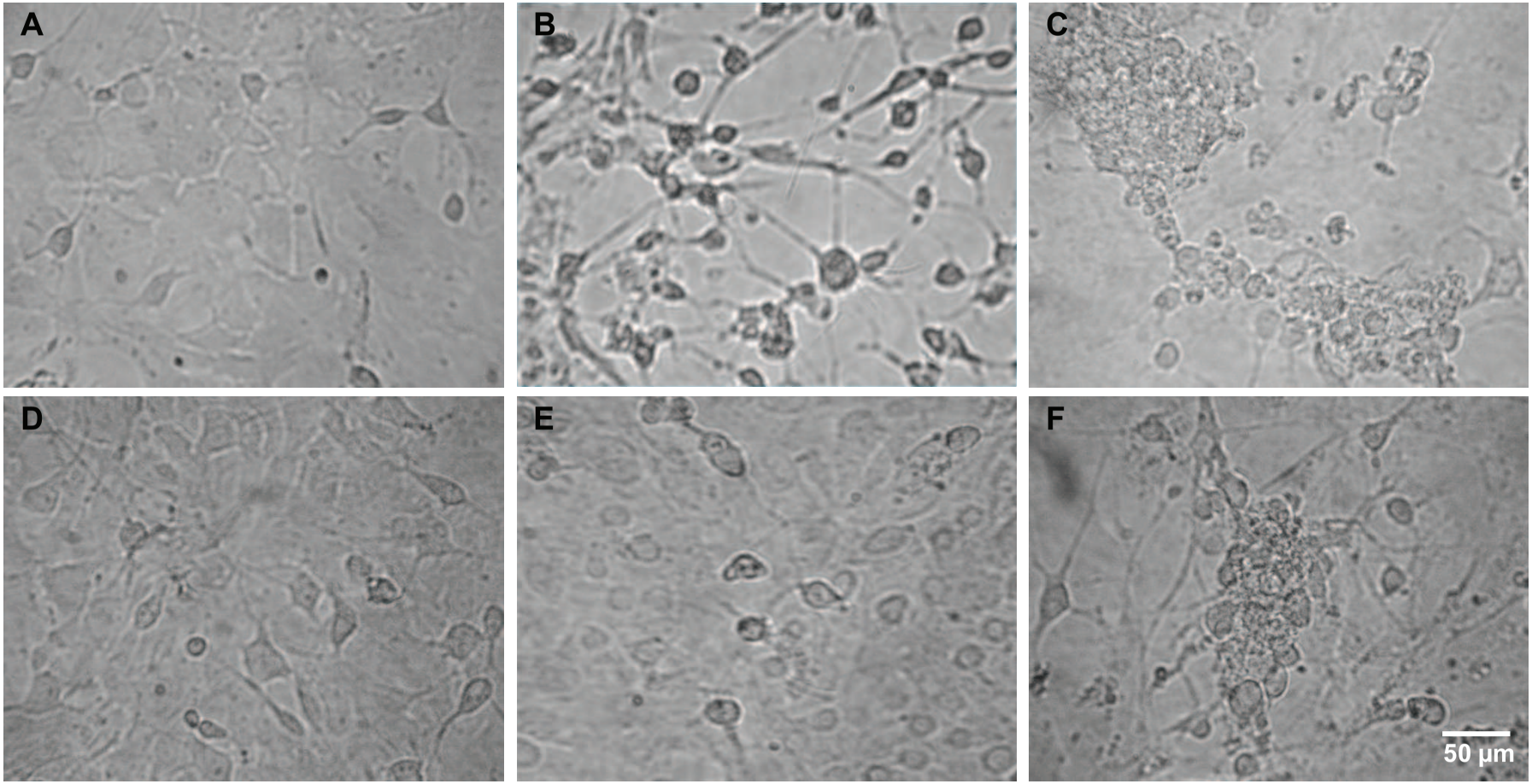


Figure 2
Masmoudi-Kouki O. et al.

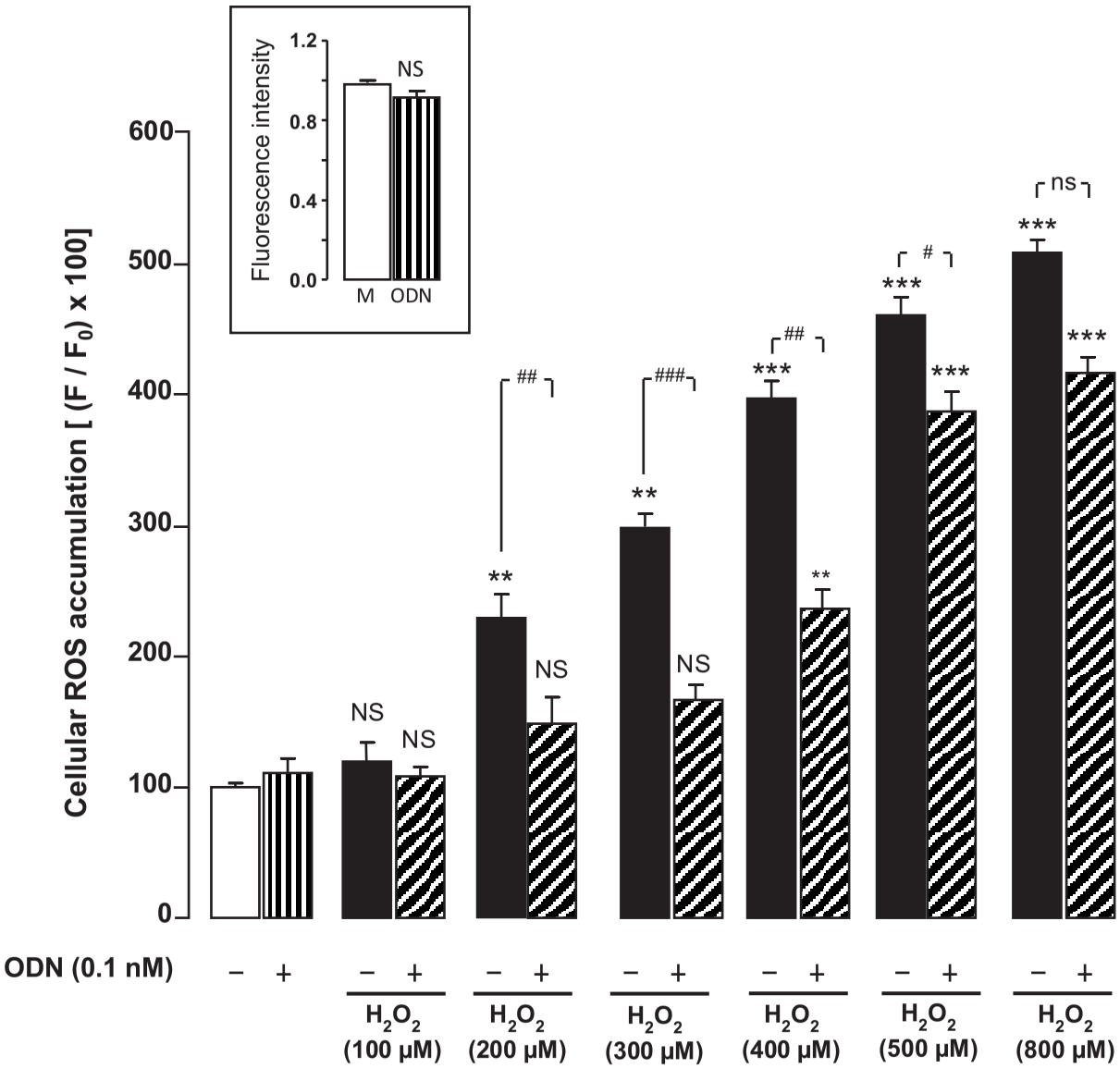


Figure 3
Masmoudi-Kouki O. et al.

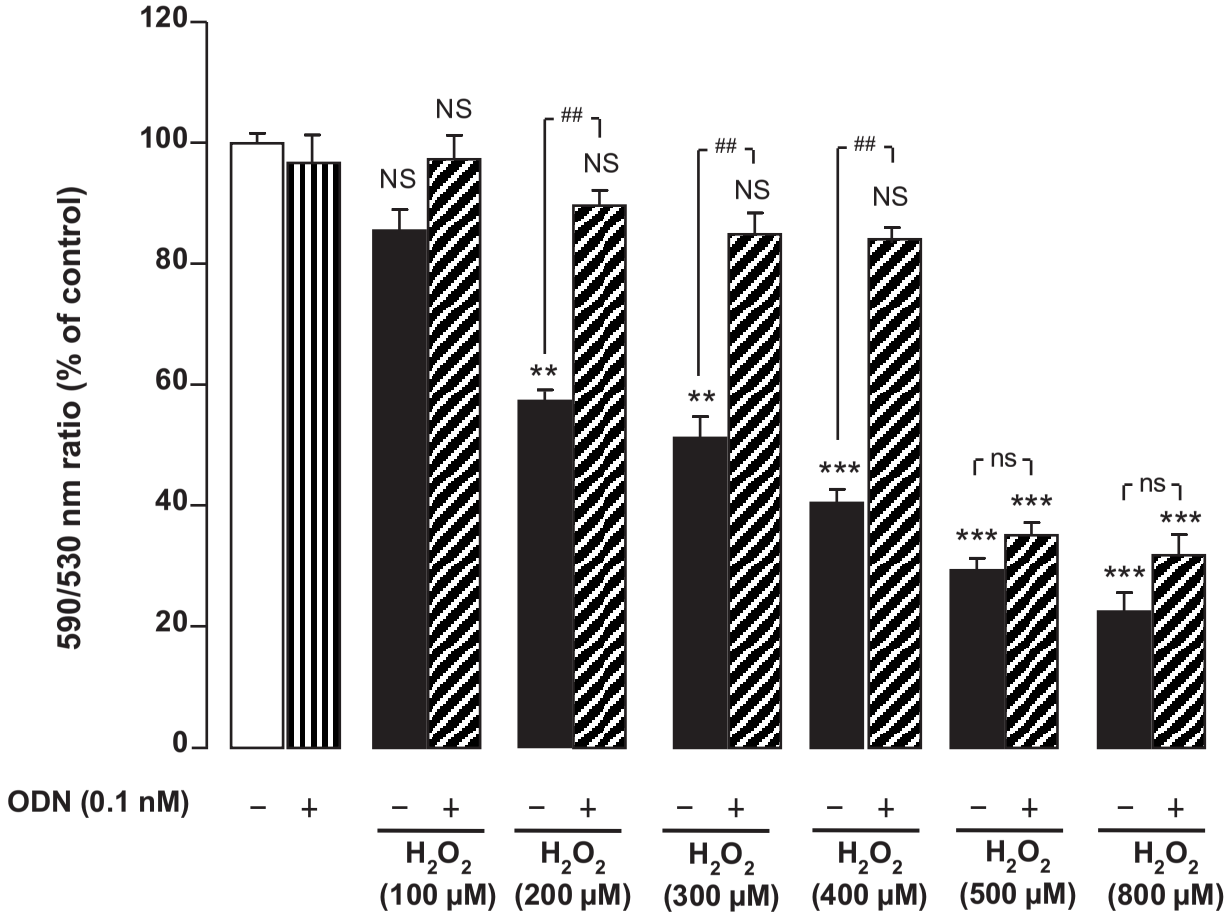


Figure 4
Masmoudi-Kouki O. et al.

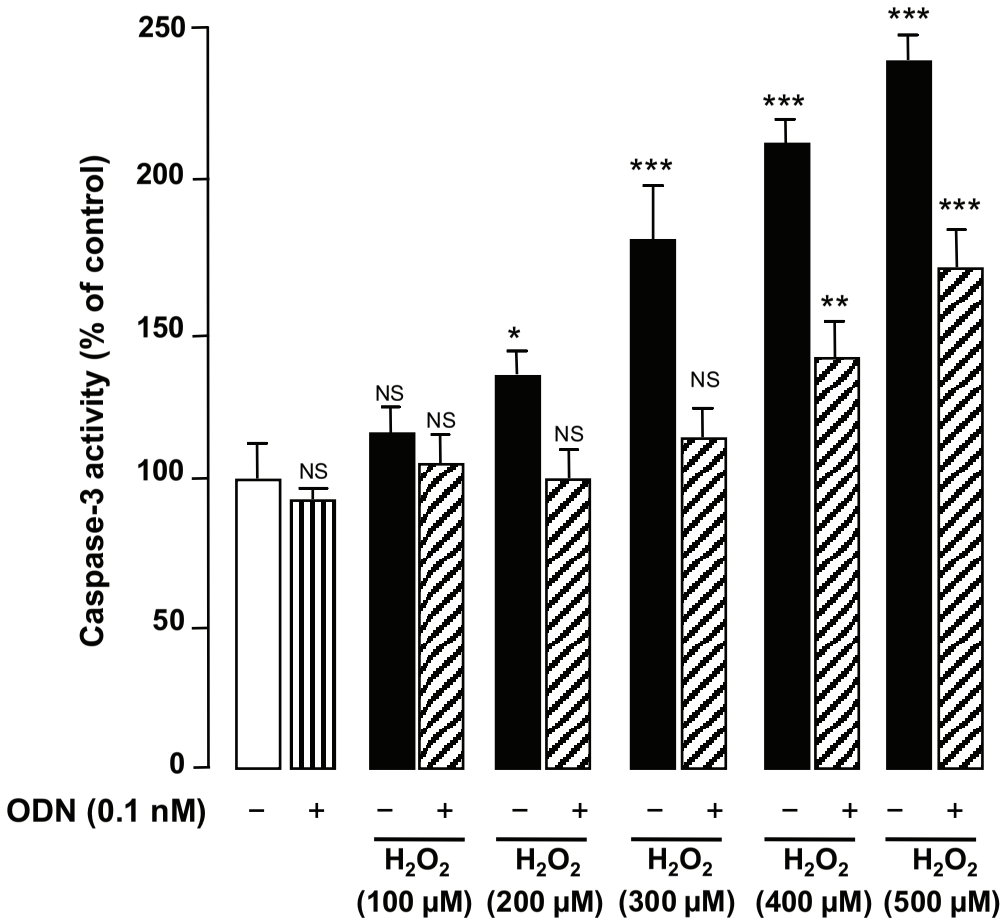


Figure 5
Masmoudi-Kouki O. et al.

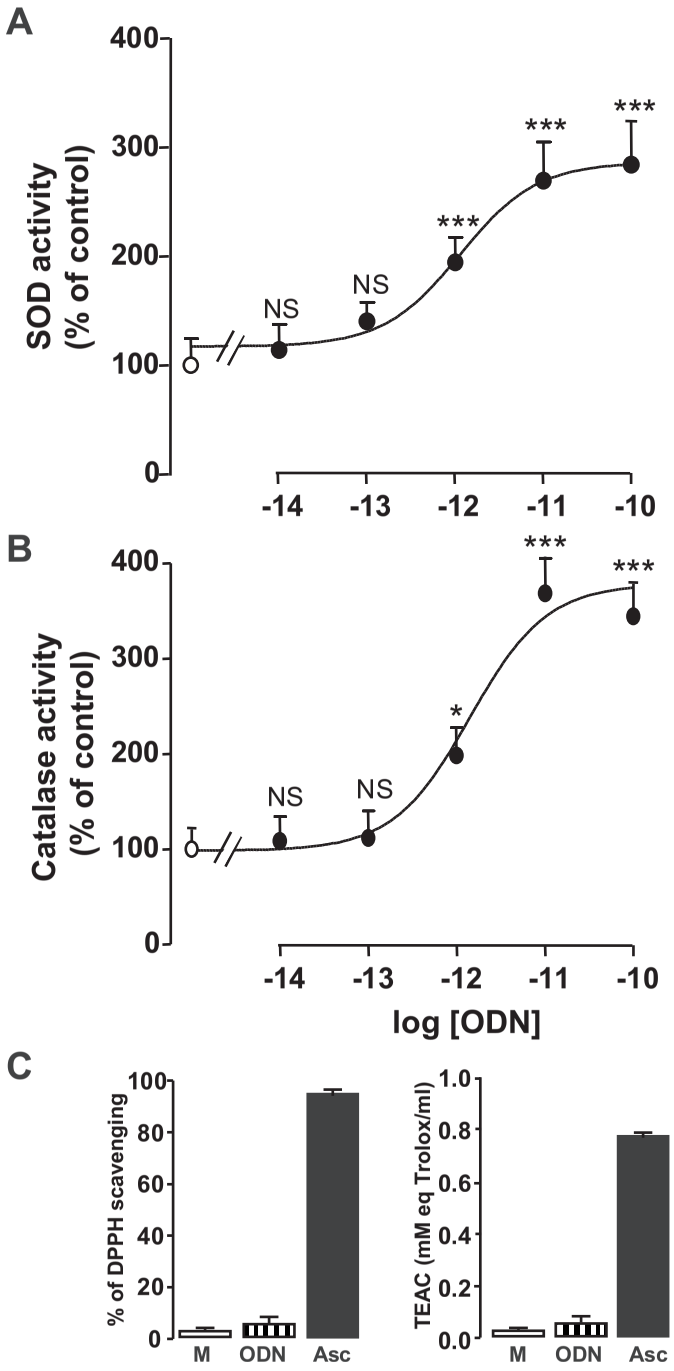


Figure 6
Masmoudi-Kouki O. et al.

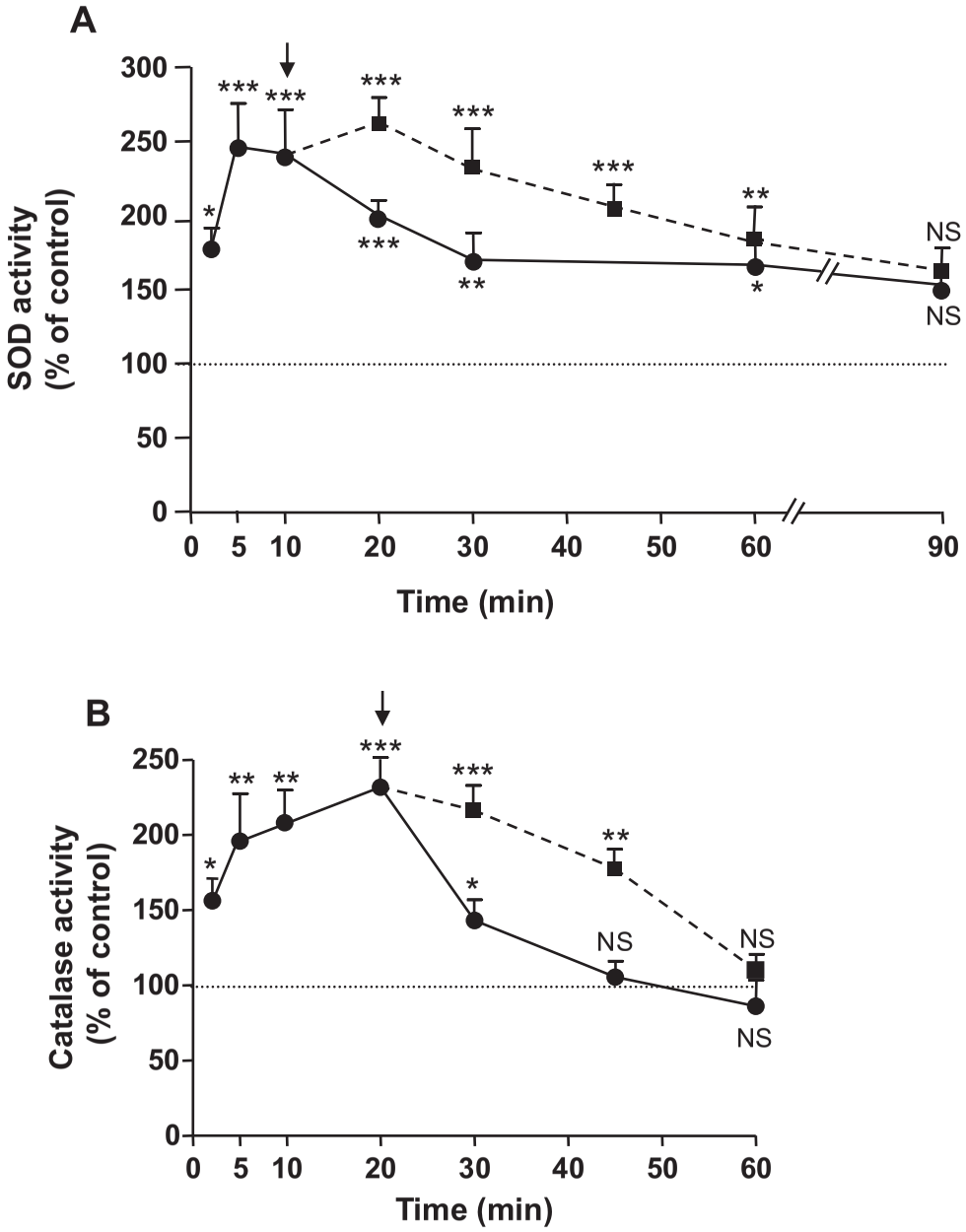
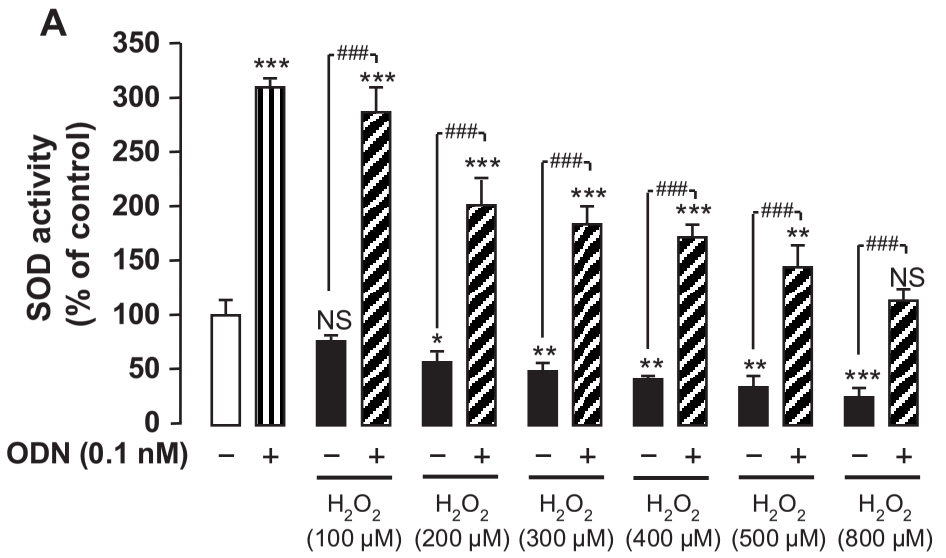
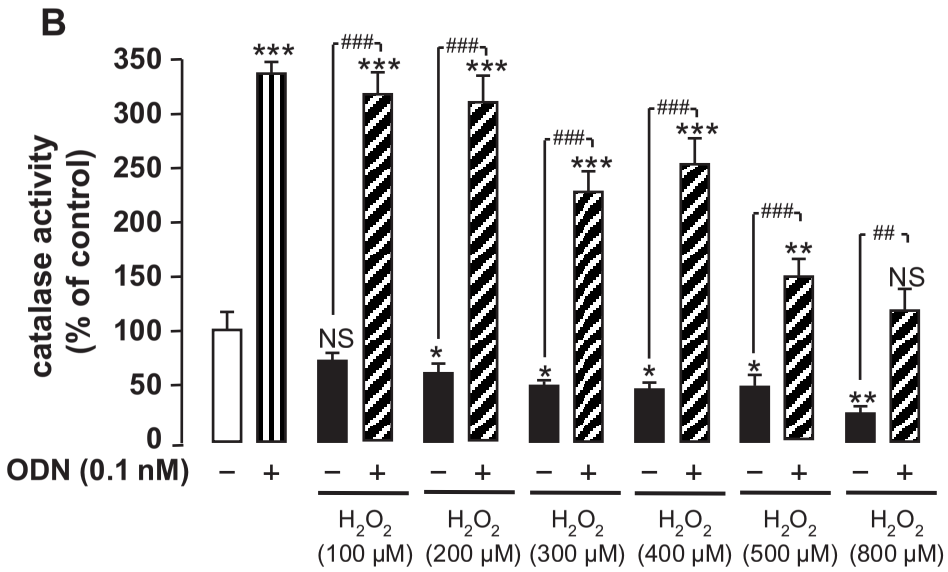
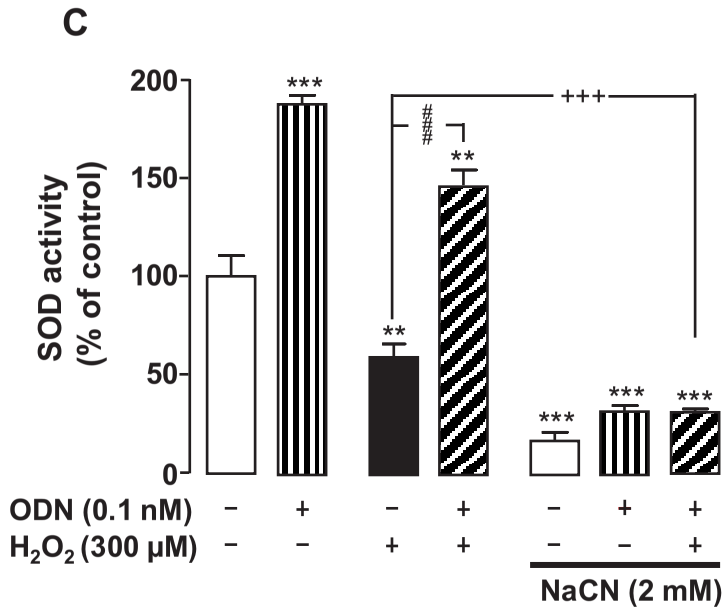


Figure 7
Masmoudi-Kouki O. et al.







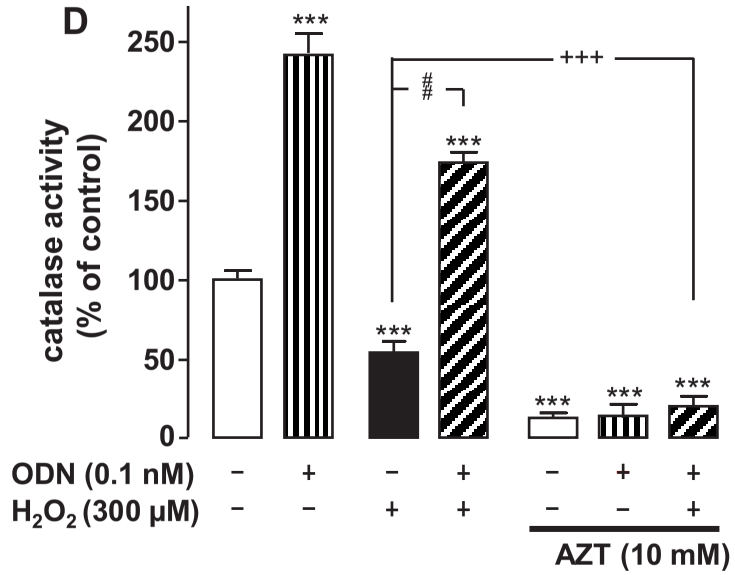


Figure 8
Masmoudi-Kouki O. et al.

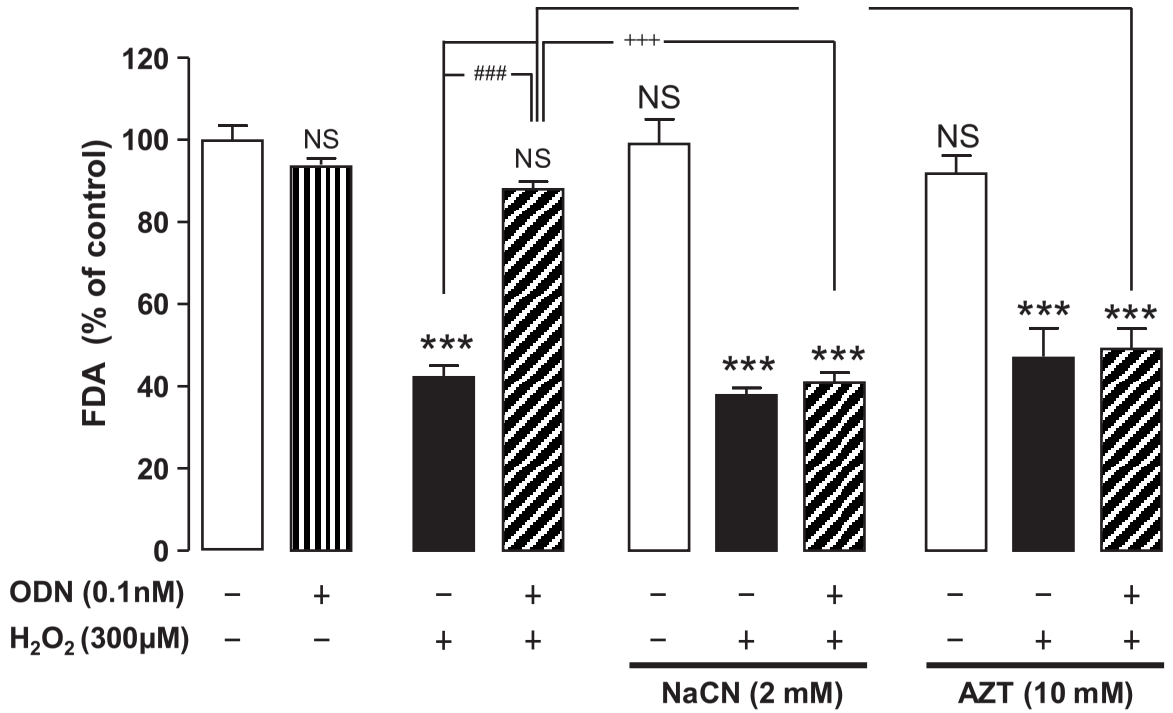
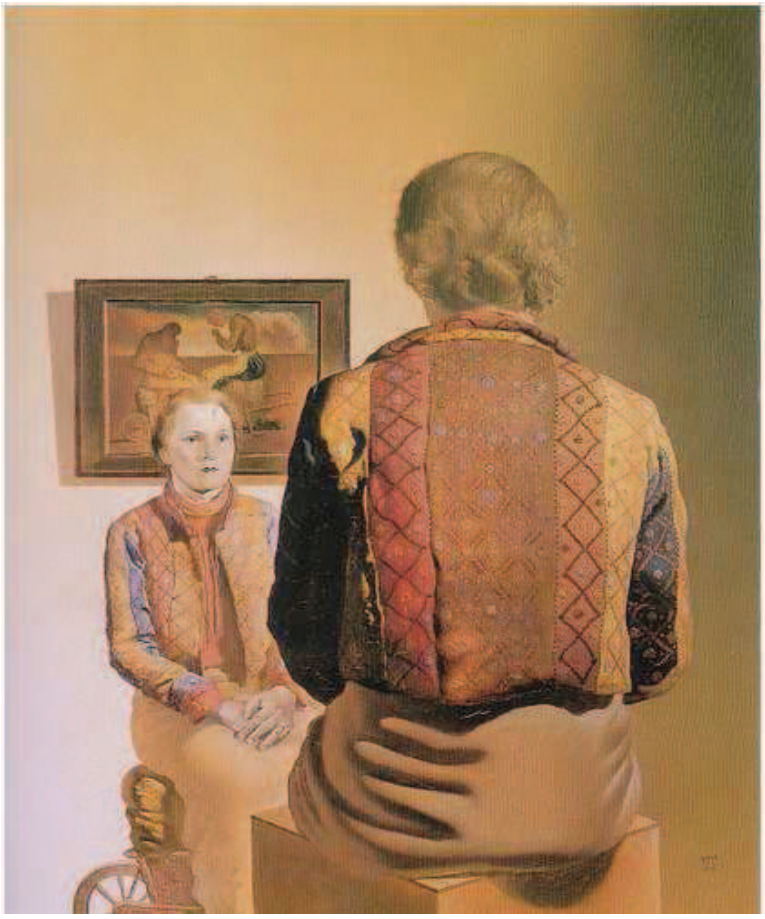


Figure 9
Masmoudi-Kouki O. et al.



L'Angélus de Gala
(1935)

Discussion

Le DBI, le TTN et l'ODN, initialement isolés à partir du cerveau de rat, sont capables d'inhiber la liaison des BZ (Guidotti *et al.* 1983, Ferrero *et al.* 1984, Slobodyansky *et al.* 1989), et ont été de ce fait regroupés sous le terme générique d'EZ. Dans le SNC des mammifères, les EZ sont exclusivement synthétisées par les cellules gliales (Tong *et al.* 1991, Malagon *et al.* 1993, Vidnyanszky *et al.* 1994, Alho *et al.* 1995). Le DBI étant dépourvu de peptide signal, se posait la question du mécanisme impliqué dans leur libération vers l'espace extracellulaire. Plusieurs études ont démontré que la sécrétion d'EZ par les astrocytes est régulée (Patte *et al.* 1995, Masmoudi *et al.* 2003, 2005), indiquant que ces molécules peuvent être considérées comme d'authentiques facteurs de signalisation intercellulaire.

Quelques travaux suggèrent que les EZ pourraient jouer un rôle dans les processus neurodégénératifs. La mesure de la concentration d'EZ dans le LCR chez l'homme révèle qu'elle est augmentée chez les patients atteints de MA (Ferrarese *et al.* 1990). De plus, une étude menée dans notre laboratoire a montré que le βA agrégé augmente la synthèse et la libération d'EZ par les astrocytes de rat en culture (Tokay *et al.* 2005). Néanmoins, les mécanismes mis en jeu dans la libération d'EZ induite par le βA, ainsi que son rôle dans l'activité astrocytaire sont inconnus. Nous nous sommes donc intéressés aux systèmes de transduction activés par le βA, aux récepteurs mis en jeu et aux processus impliqués dans l'effet du βA sur la libération d'EZ. Ensuite, nous avons recherché les conséquences de cette libération d'EZ sur l'activité des astrocytes en culture, en se focalisant sur la prolifération et la protection cellulaire.

I. Mécanismes mis en jeu dans l'effet du βA sur la libération d'EZ

La première étape de ce travail a consisté à étudier l'effet du βA sur l'activité de l'AC et de la PLC dans les astrocytes de rat en culture. Nous montrons que le peptide βA_{25-35} induit une augmentation rapide et transitoire (10 min) de la production d'AMPc. Parallèlement, le βA_{25-35} stimule de façon temps- et dose-dépendante l'incorporation de l'[^{3}H]inositol dans les PIPs. Cet effet prolongé du βA est totalement aboli par un inhibiteur de PLC, l'U73122. Ces données suggèrent donc que le βA_{25-35}

agit sur les astrocytes en activant un récepteur de type GPCR positivement couplé à l'AC et à la PLC. Des études menées dans divers types cellulaires, les monocytes, la microglie et les astrocytes, montrent que le βA_{25-35} peut interagir avec plusieurs récepteurs membranaires, les SR, les RAGE et les FPRs (Le *et al.* 2001a, Nakamura *et al.* 2006, Yan *et al.* 2010). Contrairement aux autres récepteurs, les FPRs sont des GPCR classiquement couplés à la PLC (Le *et al.* 2001b). Le FPR et son variant FPRL1, sont tous les deux exprimés dans les astrocytes humains et dans des astrocytomes (Lacy *et al.* 1995, Le *et al.* 2000). L'ensemble de ces éléments nous a conduits à rechercher l'implication des FPRs dans les effets du βA_{25-35} sur les voies de transduction. L'agoniste des FPRs, le fMLF, mime l'augmentation de l'incorporation de l'[^{3}H]inositol dans les PIPs induite par le βA_{25-35} et stimule la production d'AMPc dans notre modèle. Finalement, un antagoniste de ces mêmes récepteurs, le N-t-Boc-FLFLF, abolit l'action du peptide βA_{25-35} et du fMLF sur les astrocytes. Un couplage positif des FPRs astrocytaires avec l'AC est en accord avec des données de la littérature indiquant que le fMLF augmente également la production d'AMPc dans les neutrophiles humains (Spisani *et al.* 1996) et dans une lignée de leucocytes de rat (Ali *et al.* 1998). Cependant, ces travaux et les nôtres sont en contradiction avec ceux de Brandenburg et collaborateurs qui ont montré que le βA inhibe l'augmentation d'AMPc induite par la forskoline dans les astrocytes de rat en culture (Brandenburg *et al.* 2008). Il convient de noter que l'effet stimulateur que nous observons est transitoire, et que contrairement aux expériences menées par Brandenburg, les astrocytes ont été incubés en l'absence de forskoline dans notre étude.

Après avoir montré l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les FPRs et le βA dans les astrocytes, nous avons recherché l'implication des FPRs dans la libération d'EZ induite par le βA. L'incubation des astrocytes en présence de deux agonistes des FPRs, le fMLF et le fMMM, induit une augmentation de la libération d'EZ. L'antagoniste des FPRs, le N-t-Boc-FLFLF bloque totalement non seulement l'action du fMLF et du fMMM, mais aussi celle du βA_{25-35}, indiquant que l'effet du βA_{25-35} sur la libération d'EZ met en jeu les FPRs. Les peptides fMLF et fMMM présentent une affinité nanomolaire pour les FPR et micromolaire pour les FPRL1 (Le *et al.* 2002, Migeotte *et al.* 2006). Dans le présent travail, nous montrons que le fMLF

stimule la libération d'EZ et l'incorporation d'[^{3}H]inositol dans les PIPs avec une *effective dose 50* (ED_{50}) d'environ 2 µM, ce qui suggère une interaction du βA_{25-35} avec le récepteur de faible affinité. Ces données sont en accord avec des travaux, indiquant que sur des monocytes, transfectés avec des ADNc codant l'un ou l'autre de ces récepteurs, ou des astrocytes natifs, transfectés avec des siRNA dirigés contre les FPRs, le βA lie préférentiellement les FPRL1 (Le *et al.* 2001a, Brandenburg *et al.* 2008). Le fait que les FPRL1 soient surexprimés dans le cerveau de patients décédés de la MA (Le *et al.* 2001a), est également en faveur d'une action du βA_{25-35} *via* ces récepteurs. Néanmoins, le blocage des effets du peptide par le N-t-Boc-FLFLF n'écarte pas la participation d'autres FPRs dans l'action du βA_{25-35} sur les astrocytes. Enfin, l'existence d'une interaction physique entre les FPRL1 et les récepteurs SR-MARCO (Brandenburg *et al.* 2010), dont le rôle est actuellement inconnu, ne permet pas d'exclure totalement l'implication des SR dans l'effet du βA sur la libération d'EZ.

Dans la continuité de ce travail, nous avons recherché l'importance de la PKA et de la PKC dans la réponse des astrocytes au βA_{25-35}. Nos travaux montrent que l'action du βA_{25-35} sur la libération d'EZ par les astrocytes de rat est totalement bloquée par le H89, un bloqueur spécifique de la PKA, ainsi que par la somatostatine, qui inhibe la libération d'EZ et la formation d'AMPc dans les astrocytes (Masmoudi *et al.* 2005). De plus, la chélérythrine, un inhibiteur de la PKC, et le U73122, un bloqueur de la PLC, abolissent totalement l'effet stimulateur du βA_{25-35} sur la libération d'EZ. L'analogue inactif, le U73343, est quant à lui sans effet.

Outre ces effets sur les voies AC/PKA et PLC/PKC, le peptide βA induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dans les astrocytes en mobilisant des pools intracellulaires (Stix & Reiser 1998). Il pourrait également provoquer un influx calcique suite à l'activation des FPRL1, comme cela a été démontré sur les leucocytes K562 (Li *et al.* 2008). Enfin, des expériences menées sur des membranes artificielles, ont montré que le βA pouvait s'intercaler dans la bi-couche lipidique et former des pores favorisant l'entrée de calcium (Kawahara & Kuroda 2000). Cette interaction βA-Ca^{2+} a été également mise en évidence *in vivo* chez des souris transgéniques surexprimant l'APP humain. Chez ces animaux, il existe une corrélation positive entre le nombre de

canaux calciques et la densité des plaques amyloïdes (Willis *et al.* 2010). La chélation du calcium extracellulaire ou le blocage des canaux calciques par le nickel, abolit l'effet du peptide βA_{25-35} sur la libération d'EZ. L'ensemble de ces travaux indique donc que les voies AC/PKA et PLC/PKC ainsi qu'un influx de calcium sont indispensables à l'effet du βA sur la libération d'EZ par les astrocytes.

Le(s) processus membranaire(s) permettant la translocation des EZ vers le milieu extracellulaire sont totalement inconnus. L'analyse de la portion C-terminale du DBI révèle qu'elle est dépourvue de séquence signal. De plus, la localisation des EZ en microscopie électronique indique que l'immunoréactivité est diffuse dans le cytoplasme et ne semble pas être associée à des structures vésiculaires (Tonon *et al.* 1990). Les EZ ne sont donc pas libérées par les mécanismes classiques d'exocytose, mais ce n'est pas un cas unique. En effet, l'IL-1β, qui est également dépourvue de peptide signal, est présente dans des surnageants de culture de monocytes et sa libération met en jeu des transporteurs ABC sensibles au glyburide (Hamon *et al.* 1997). De nombreuses protéines appartenant à cette famille de transporteurs ont initialement été identifiées chez les levures, et certains de leurs homologues ont été ensuite découverts chez les mammifères (Dean & Annilo 2005, pour revue). En accord avec la présence de transporteurs ABC sur les astrocytes (Kim *et al.* 2006, Tarr & Edwards 2008), nous montrons que le glyburide, un bloqueur de transporteurs ABC, réduit fortement la libération d'EZ induite par le βA_{25-35}. Les transporteurs ABC présentent des sites de phosphorylation par la PKA et la PKC, et leur activation est directement liée à leur état de phosphorylation (Becq *et al.* 1997, Vanoye *et al.* 1999). Le blocage de l'activité PKA ou PKC entraînerait donc une inhibition de la libération d'EZ induite par le βA, ainsi que nous l'avons observé. A l'inverse l'existence d'un lien direct entre la $[Ca^{2+}]_i$ et l'activité des transporteurs ABC n'a jamais été démontré. Les travaux d'Andrei et collaborateurs ont mis en évidence une localisation d'IL-1β dans l'endosome de monocytes humains, et l'accumulation de la cytokine dans ce compartiment est bloquée par un inhibiteur de transporteur ABC (Andrei *et al.* 1999). Ces données ont conduit Wewers à proposer un modèle dans lequel l'IL-1β serait libérée à partir de l'endosome *via* un mécanisme d'exocytose nécessitant un influx calcique (Wewers 2004). La libération d'EZ induite par le βA étant bloquée par

l'EGTA et le nickel, nous formulons l'hypothèse que l'exportation des EZ vers le milieu extracellulaire pourrait également mettre en jeu ce type de sécrétion.

II. Rôle de l'EZ ODN sur la prolifération et l'activité astrocytaire

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons recherché si les EZ libérées par le βA pouvaient être responsables de certains effets du peptide sur l'activité astrocytaire. Cette hypothèse reposait sur le fait que les EZ sont capables d'augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ (Gandolfo *et al.* 1997) et de stimuler l'incorporation de thymidine dans les astrocytes de rat en culture (Gandolfo *et al.* 1999, 2000), indiquant que ces molécules sont susceptibles de moduler l'activité astrocytaire *via* un mécanisme de type autocrine.

Il est clairement établi que les dépôts de βA induisent la mort neuronale et une astrogliose importante (Nagele *et al.* 2004). Néanmoins, il existe des données contradictoires concernant l'effet du βA sur la survie et la prolifération des astrocytes. Certains travaux décrivent une activité délétère du $βA_{25-35}$ sur les cellules (Watt *et al.* 1994, Brera *et al.* 2000, Assis-Nascimento *et al.* 2007), alors que d'autres montrent que le βA n'est pas gliotoxique voir même qu'il induit une prolifération cellulaire (Tokay *et al.* 2005, Hernandez-Guillamon *et al.* 2009). Dans nos conditions de culture, non seulement le $βA_{25-35}$ ne provoque pas la mort des astrocytes, mais il augmente le nombre de cellules (Tokay *et al.* 2005). Nous montrons que la stimulation de la prolifération astrocytaire induite par le βA est mimée par le fMLF et que les effets de l'agoniste des FPRs et du βA sont totalement abolis en présence du N-t-Boc-FLFLF. L'activation des FPRs conduisant à une libération d'EZ, nous avons envisagé que le βA puisse stimuler la prolifération astrocytaire *via* une augmentation de la concentration d'EZ dans le milieu extracellulaire. De fait, nos travaux indiquent qu'une incubation de 48 h en présence d'ODN exogène mime l'action du βA. La forme de la courbe dose-réponse suggère que l'ODN stimule la prolifération astrocytaire *via* un site de très haute affinité (10^{-12} M) et un site de haute affinité (10^{-8} M). Ces résultats sont en accord avec une étude montrant que dans la même

gamme de concentrations, l'ODN stimule l'incorporation de [^{3}H]thymidine dans les astrocytes de rat en culture (Gandolfo *et al.* 1999). Les courbes dose-réponse pour ces deux sites ont un aspect « en cloche », comparable à celui observé pour les effets de l'ODN sur l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ (Gandolfo *et al.* 1997, Leprince *et al.* 2001) et l'incorporation de thymidine (Gandolfo *et al.* 1999) dans les astrocytes de rat en culture. Ce type de réponse pourrait être due à une désensibilisation du(des) récepteur(s). La mesure des EZ, présentes dans le surnageant de culture d'astrocytes incubés en présence du βA, indique que les quantités libérées sont compatibles avec l'activation des sites de très haute affinité. L'ensemble de ces données suggèrent donc que le βA *via* l'activation des FPRs stimule la libération d'EZ et que celles-ci peuvent à leur tour induire une prolifération.

En accord avec les données de la littérature (Araujo & Cotman 1992, Akama & Van Eldik 2000, Apelt & Schliebs 2001, Toro *et al.* 2001), le βA stimule la libération d'IL-1β, avec un maximum à 6 h. Cet effet est précédé par une libération d'EZ, suggérant que leur présence dans le milieu extracellulaire pourrait être responsable de cet effet. Des résultats préliminaires montrent qu'à la concentration de 10^{-8} M, l'ODN induit une augmentation rapide (1 h) et transitoire des ARNm codant l'IL-1β. Cependant, pour des temps plus longs (2 h et 6 h), le peptide exerce un effet inhibiteur sur l'expression d'IL-1β, ce qui est en contradiction avec l'action stimulatrice du βA sur la libération de la cytokine. A l'inverse, l'IL-1β est sans effet sur l'expression du DBI. Ces résultats suggèrent donc que la production d'IL-1β et la libération d'EZ induites par le βA sont indépendantes l'une de l'autre. Ces données sont à rapprocher d'une étude réalisée sur la lignée astrocytaire U87 montrant qu'un agoniste des FPRL1, qui stimule la libération d'EZ dans notre modèle, est sans effet sur l'expression de l'IL-1β pour des temps d'incubation supérieures à 6 h (Kam *et al.* 2007). Plus récemment, Froger et collaborateurs révèlent que l'activation des astrocytes par l'IL-1β favorise l'ouverture de pores membranaires et que cet effet potentialise l'action neurotoxique du glutamate (Froger *et al.* 2010). En réduisant, l'expression d'IL-1β astrocytaires, les EZ pourraient donc s'opposer en partie à l'action du βA, et faire pencher la balance vers une action neuroprotectrice des

astrocytes. A l'appuie de cette hypothèse, il est actuellement admis que le degré de réactivité des astrocytes est fonction de l'intensité du traumatisme cérébral, et que ces cellules peuvent exercer des effets délétères ou bénéfiques sur les neurones, qui varient dans le temps (Sofroniew & Vinters 2010).

En étudiant l'effet de l'ODN sur la prolifération des astrocytes en culture, nous avons constaté que le peptide augmentait le nombre de cellules dès 12 h d'incubation. Vu la durée du cycle cellulaire (Gandolfo *et al.* 1999), cet effet ne peut pas être imputable à une augmentation de la prolifération des astrocytes. Les expériences ont été menées sur des cultures secondaires de 48 h, privées de sérum et d'insuline durant 36 h. Dans ces conditions, il est probable qu'un petit pourcentage de cellules soit affecté par un tel traitement, et que l'ajout d'ODN favorise la survie de ces cellules. De fait, une incubation de 24 et 36 h en présence d'ODN ne modifie pas le nombre de cellules. Le diazépam, un ligand des R-BZ, exerce une action neuroprotectrice en cas d'ischémies (Ricci *et al.* 2007, Corbett *et al.* 2008). Dans le SNC, les R-BZ sont présents non seulement sur les neurones mais également sur les cellules gliales (Mohler & Okada 1977). En tant que ligand endogène des R-BZ, les EZ pourraient donc exercer une activité protectrice sur ces différentes populations de cellules nerveuses. Outre un effet direct sur les neurones, les EZ pouraient être impliquées indirectement dans la survie des neurones en favorisant la survie des astrocytes, et par la même, la production de facteurs neuroprotecteurs.

Comme discuté précédemment, le βA peut induire la mort des astrocytes, cependant seul 30 à 50 % des cellules meurent en présence de βA (Brera *et al.* 2000, Assis-Nascimento *et al.* 2007). En plus des effets déjà décrits du βA sur les astrocytes (astrogliose réactionnelle et réaction inflammatoire), le peptide induit un stress oxydatif résultant d'une production de NO, de radicaux libres et de ROS (Akama & Van Eldik 2000, Abramov *et al.* 2004, Abramov & Duchen 2005, Schubert *et al.* 2009). Cependant, quelques travaux indiquent que les astrocytes sont moins sensibles au H_2O_2, qui peut conduire à la formation de ROS, que les neurones (Chen *et al.* 2001). L'ensemble de ces éléments nous ont conduit à rechercher, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Tunis, un éventuel effet glioprotecteur de l'ODN vis-à-vis du stress oxydatif induit par le H_2O_2. En accord avec les données de la littérature,

le H_2O_2 provoque la mort des astrocytes dans une gamme de concentrations comprises entre 100 et 800 µM. La moindre sensibilité des astrocytes aux agents tels que le H_2O_2, est due à leur capacité de détoxification nettement supérieure comparée à celles des neurones. En effet, les astrocytes présentent de fortes teneurs en molécules antioxydantes, et notammet en enzymes antioxydantes telles que la catalase, la SOD et la gluthathion peroxydase (Dringen & Hamprecht 1997, Chen *et al.* 2001, Ferrero-Gutierrez *et al.* 2008). A la concentration de 0,1 nM, l'ODN réverse totalement les effets gliotoxiques du H_2O_2 (de l'ordre de 200 à 800 µM), indiquant que cette EZ est capable de protéger les astrocytes contre le stress oxydatif induit par les ROS. L'ODN, qui stimule de façon dose-dépendante l'activité antioxydante de la SOD et de la catalase, réduit l'effet inhibiteur du H_2O_2 sur ces deux activités enzymatiques. Les mécanismes impliqués dans l'effet de l'ODN sur l'activité de la SOD et de la catalase sont encore inconnus. Il a été démontré, dans une lignée cellulaire issue d'un carcinome pulmonaire ou dans un système non cellulaire, que l'activation de la SOD est PKC- et calcium-dépendante (Hopper *et al.* 2006, Kim *et al.* 2007). Comme l'ODN stimule l'activité de la PLC et augmente la $[Ca^{2+}]_i$ dans les astrocytes en culture (Patte *et al.* 1995, Gandolfo *et al.* 1997), son effet sur les activités SOD et/ou catalase pourrait être dû à l'activation de la voie de transduction PLC/PKC. Des astrocytes isolés à partir d'animaux transgéniques surexprimant la SOD sont plus résistants à un stress oxydatif (Chen *et al.* 2001). Ces données renforcent donc la notion que la SOD, et probablement la catalase, jouent un rôle clé dans la glioprotection induite par l'ODN.

L'augmentation de la production de ROS dans la cellule conduit à l'activation de la voie apoptotique mitochondriale, processus caractérisé par un certain nombre d'altérations de l'activité cellulaire. La modification du potentiel mitochondrial et la formation de pores membranaires provoquent la libération du cytochrome C dans le cytosol (Whittemore *et al.* 1995). Il s'en suit une activation de la caspase 9, puis de la caspase 3, enzyme initiatrice de l'apoptose (Wu *et al.* 2007). En accord avec les données de la littérature (Juknat *et al.* 2005, Shin *et al.* 2009), nous confirmons que la mort des astrocytes induite par le H_2O_2 présente toutes les caractéristiques d'une mort cellulaire par apoptose : augmentation de la production de ROS, dysfonctionnement

des mitochondries et finalement activation de la caspase 3. Outre son effet sur l'activité des enzymes SOD et catalase, l'ODN contrecarre les effets de H_2O_2 à toutes les étapes clés du processus apoptotique. Ainsi, le peptide réduit significativement la production de ROS induite par le H_2O_2, prévient l'action du H_2O_2 sur le potentiel mitochondrial, et bloque totalement son effet sur l'activation de la caspase 3.

L'ensemble de nos résultats indiquent donc que l'ODN exerce un effet glioprotecteur et que la libération d'EZ induite par le βA, pourrait permettre aux astrocytes de lutter contre le stress oxydatif et la réduction du glutathion *(Abramov et al.* 2004, pour revue). En conditions physiologiques, la concentration en glutathion dans les astrocytes est bien supérieure à celle mesurée dans les neurones et il est généralement admis que les cellules astrocytaires pourvoient les neurones en cet agent antioxydant (Elekes *et al.* 1996). En favorisant la survie astrocytaire, et donc le maintient de concentrations élévées en glutathion, les EZ participeraient aux effets bénéfiques des astrocytes sur la survie neuronale.



Personnage à une fenêtre
(1925)

Conclusions & Perspectives

Au terme de ce travail, nous avons identifié les récepteurs et les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'effet stimulateur du peptide βA sur la libération d'EZ par les astrocytes de rat en culture. Nous avons montré que les EZ libérées modulent à leur tour l'activité astrocytaire. Cet effet autocrine des EZ pourrait rendre compte de l'action du βA sur la prolifération cellulaire. Parallèlement, les EZ seraient capables de contrecarrer, du moins en partie, les effets délétères du βA sur les cellules nerveuses. L'ensemble de ces éléments est illustré dans la figure 15.

Dans un premier temps, le peptide βA stimule la libération d'EZ en interagissant avec des FPRL1 couplés positivement à l'AC et la PLC. L'activation de la PKA et de la PKC, ainsi qu'un influx calcique sont nécessaires à la libération d'EZ induite par le βA. La translocation des EZ vers le milieu extracellulaire met en jeu des transporteurs ABC sensibles au glyburide. Dans le prolongement de ces travaux, nous proposons de déterminer les mécanismes exacts qui sont impliqués dans le processus de libération des EZ par les astrocytes. *(i)* La caractérisation du/des transporteur(s) ABC mis en jeu se fera par l'utilisation d'outils pharmacologiques et une approche moléculaire visant à invalider ou surexprimer le(s) transporteur(s) identifié(s). *(ii)* Par analogie avec l'IL-1β, nous rechercherons si le modèle proposé par Wewers peut s'appliquer aux EZ (Wewers 2004). Une éventuelle localisation des EZ dans l'endosome sera recherchée en microscopie confocale par double marquage à l'aide de marqueurs spécifiques de cette structure. La présence d'EZ dans le compartiment endosomal nous conduira à rechercher les mécanismes mis en jeu dans leur stockage dans l'endosome et leur libération vers le milieu extracellulaire.

Dans un deuxième temps, les EZ libérées par le βA peuvent interagir avec des récepteurs présents sur la membrane des astrocytes. Nous avons montré que la prolifération astrocytaire induite par le βA met en jeu les FPRL1 suggérant que les EZ pouvaient être responsables de l'effet prolifératif du βA. de fait, l'ajout du peptide ODN dans le milieu de culture mime l'action du βA. La courbe dose-réponse obtenue

avec l'ODN suggère que l'action proliférative de cette EZ fait appel à deux sites de liaison d'affinité différente.

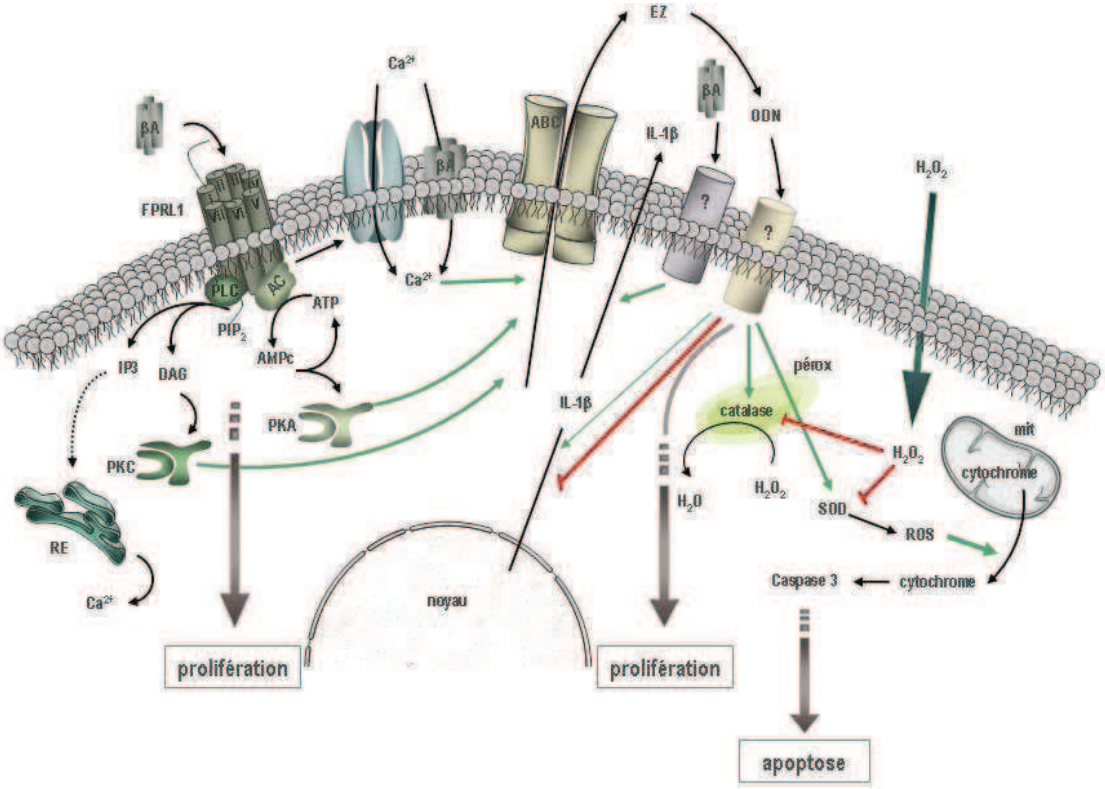


Figure 15 : Schémas récapitulatif des voies de transduction mises en jeu dans les effets du βA sur la libération d'EZ des effets de l'ODN sur la modification de l'activité astrocytaire induite par le βA. (→), induit - (⊣), inhibe - ( ), stimule - ABC, *ATP Binding cassette transporter* - AC, adénylyl cyclase - ADP, adénosine diphosphate - AMPc, adénosine monophosphate cyclique - ATP, adénosine triphosphate - βA, peptide β-amyloïde - DAG, diacylglycérol - EZ, endozépines - FPRL1, *formyl peptide receptor like1* - H_2O, eau - H_2O_2, peroxyde d'hydrogène - IL-1β, interleukine 1β - IP3, inositol triphosphate - mit, mitochondrie - ODN, octadécaneuropeptide - pérox, péroxysome - PIP_2, phosphoinositol-4,5-bisphosphate - PKA, protéine kinase A - PKC, protéine kinase C, PLC, phospholipase C - RE, réticulum endoplasmique - ROS, dérivés réactifs de l'oxygène - SOD, superoxyde dismutase.

Dans la continuité de ce travail, nous rechercherons si la libération d'EZ induite par le βA est effectivement responsable de la prolifération astrocytaire, en mesurant la prolifération induite par l'ODN et le βA, en présence des antagonistes des récepteurs « classiques » des BZ (flumazénil, PK11195) ainsi que l'antagoniste du récepteur

métabotropique de l'ODN, le cyclo(1-8)[DLeu^5]OP qui a été développé au laboratoire (Leprince *et al.* 1998).

En ce qui concerne l'effet du βA sur la production d'IL-1β, il ne semble pas que l'action du βA puisse être reproduite par l'ODN. En effet, l'action stimulatrice de l'ODN sur les taux d'ARNm est transitoire et que le peptide exerce majoritairement un effet inhibiteur sur les ARNm codant l'IL-1β. Ces données devront être confirmées. La participation des EZ dans la libération d'IL-1β induite par le βA, sera étudiée par une approche pharmacologique similaire à celle décrite ci-dessus.

Au vu des effets prolifératifs de l'ODN observés après 12 h d'incubation, nous avions émis l'hypothèse que les EZ puissent favoriser la survie astrocytaire. De fait, nous avons montré dans le cadre de la collaboration avec le laboratoire du Pr Amri que cette EZ stimule l'activité de la SOD et de la catalase. En réduisant l'effet du H_2O_2 sur l'activité des enzymes antioxydantes, le potentiel mitochondrial et finalement l'activité de la caspase 3, les EZ pourraient donc s'opposer, du moins en partie aux effets délétères du βA à la fois sur la survie des astrocytes mais également indirectement sur la survie des neurones. Le rôle glioprotecteur et neuroprotecteur des EZ est activement étudié à Tunis.

Tous ces travaux, menés *in vitro,* nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'un lien entre les EZ et le βA. La prochaine étape consistera donc à rechercher si ces gliopeptides peuvent exercer un effet positif ou négatif dans le développement de la MA. Il existe plusieurs modèles murins surexprimant l'APP humaine et présentant toutes les caractérisiques de la MA (formation de plaques amyloïdes, déficits cognitifs et dégénérescence neuronale), comme les souris *Swedish* par exemple (Wisor *et al.* 2005). Nous rechercherons donc l'existence d'une corrélation entre les taux d'EZ (mesure de la protéine par RIA et l'expression du gène DBI par QPCR) dans diverses aires cérébrales, et le développement de la maladie (détection de plaques séniles, astrogliose, dégénérescence synaptique ou encore apoptose neuronale) chez ces animaux. Nous rechercherons chez les souris *Swedish*, l'effet d'injections icv d'ODN et d'antagonistes des R-BZ (flumazénil,

PK11195) ou du récepteur métabotropique (cyclo(1-8)[DLeu^5]OP) sur l'évolution des lésions.

L'ensemble de ce projet pourrait permettre à terme d'apporter une vision nouvelle sur la physiopathologie de la MA et sur le rôle des endozépines dans le développement de cette maladie.



Portrait de Monsieur Emilio Terry (1930)

Références bibliographiques

-A-

Abbott, N. J. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat,* **200,** 629-638.

Abramov, A. Y., Canevari, L. and Duchen, M. R. (2004) Beta-amyloid peptides induce mitochondrial dysfunction and oxidative stress in astrocytes and death of neurons through activation of NADPH oxidase. *J Neurosci,* **24,** 565-575.

Abramov, A. Y. and Duchen, M. R. (2005) The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **360,** 2309-2314.

Agerberth, B., Boman, A., Andersson, M., Jornvall, H., Mutt, V. and Boman, H. G. (1993) Isolation of three antibacterial peptides from pig intestine: gastric inhibitory polypeptide (7-42), diazepam-binding inhibitor (32-86) and a novel factor, peptide 3910. *Eur J Biochem,* **216,** 623-629.

Akama, K. T. and Van Eldik, L. J. (2000) Beta-amyloid stimulation of inducible nitric-oxide synthase in astrocytes is interleukin-1beta- and tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha)-dependent, and involves a TNFalpha receptor-associated factor- and NFkappaB-inducing kinase-dependent signaling mechanism. *J Biol Chem,* **275,** 7918-7924.

Akinci, M. K. and Schofield, P. R. (1999) Widespread expression of GABA(A) receptor subunits in peripheral tissues. *Neurosci Res,* **35,** 145-153.

Alarcon, R., Fuenzalida, C., Santibanez, M. and von Bernhardi, R. (2005) Expression of scavenger receptors in glial cells. Comparing the adhesion of astrocytes and microglia from neonatal rats to surface-bound beta-amyloid. *J Biol Chem,* **280,** 30406-30415.

Alho, H., Costa, E., Ferrero, P., Fujimoto, M., Cosenza-Murphy, D. and Guidotti, A. (1985) Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain. *Science,* **229,** 179-182.

Alho, H., Harjuntausta, T., Schultz, R., Pelto-Huikko, M. and Bovolin, P. (1991) Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors. *Neuropharmacology,* **30,** 1381-1386.

Alho, H., Kolmer, M., Harjuntausta, T. and Helen, P. (1995) Increased expression of diazepam binding inhibitor in human brain tumors. *Cell Growth Differ,* **6,** 309-314.

Alho, H., Varga, V. and Krueger, K. E. (1994) Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell Growth Differ,* **5,** 1005-1014.

Ali, H., Sozzani, S., Fisher, I., Barr, A. J., Richardson, R. M., Haribabu, B. and Snyderman, R. (1998) Differential regulation of formyl peptide and platelet-activating factor receptors. Role of phospholipase Cbeta3 phosphorylation by protein kinase A. *J Biol Chem,* **273,** 11012-11016.

Allaman, I., Gavillet, M., Belanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A. and Magistretti, P. J. (2010) Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J Neurosci,* **30,** 3326-3338.

Allen, J. W., Eldadah, B. A., Huang, X., Knoblach, S. M. and Faden, A. I. (2001) Multiple caspases are involved in beta-amyloid-induced neuronal apoptosis. *J Neurosci Res,* **65,** 45-53.

Allen, S. J., MacGowan, S. H., Tyler, S., Wilcock, G. K., Robertson, A. G., Holden, P. H., Smith, S. K. and Dawbarn, D. (1997) Reduced cholinergic function in normal and Alzheimer's disease brain is associated with apolipoprotein E4 genotype. *Neurosci Lett,* **239,** 33-36.

Amin, J., Brooks-Kayal, A. and Weiss, D. S. (1997) Two tyrosine residues on the alpha subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of gamma-aminobutyric acidA receptors. *Mol Pharmacol,* **51,** 833-841.

Andersen, K. V. and Poulsen, F. M. (1993) The three-dimensional structure of acyl-coenzyme A binding protein from bovine liver: structural refinement using heteronuclear multidimensional NMR spectroscopy. *J Biomol NMR,* **3,** 271-284.

Andreasen, N., Gottfries, J., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Davidson, P., Blennow, K., Rosengren, L. and Blennow, K. (2001) Evaluation of CSF biomarkers for axonal and neuronal degeneration, gliosis, and beta-amyloid metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry,* **71,** 557-558.

Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisi, M. R., Chimini, G. and Rubartelli, A. (1999) The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell,* **10,** 1463-1475.

Anholt, R. R., De Souza, E. B., Oster-Granite, M. L. and Snyder, S. H. (1985) Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther,* **233,** 517-526.

Anholt, R. R., Murphy, K. M., Mack, G. E. and Snyder, S. H. (1984) Peripheral-type benzodiazepine receptors in the central nervous system: localization to olfactory nerves. *J Neurosci,* **4,** 593-603.

Anzini, M., Cappelli, A., Vomero, S., Giorgi, G., Langer, T., Bruni, G., Romeo, M. R. and Basile, A. S. (1996) Molecular basis of peripheral vs central benzodiazepine receptor selectivity in a new class of peripheral benzodiazepine receptor ligands related to alpidem. *J Med Chem,* **39,** 4275-4284.

Apelt, J. and Schliebs, R. (2001) Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res,* **894,** 21-30.

Araque, A., Sanzgiri, R. P., Parpura, V. and Haydon, P. G. (1999) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol,* **77,** 699-706.

Araujo, D. M. and Cotman, C. W. (1992) Beta-amyloid stimulates glial cells in vitro to produce growth factors that accumulate in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res,* **569,** 141-145.

Asano, T. and Ogasawara, N. (1980) Solubilization of the benzodiazepine receptor from rat brain. *Life Sci,* **26,** 607-613.

Asano, T. and Spector, S. (1979) Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous ligands for the brain benzodiazepine-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **76,** 977-981.

Assis-Nascimento, P., Jarvis, K. M., Montague, J. R. and Mudd, L. M. (2007) Beta-amyloid toxicity in embryonic rat astrocytes. *Neurochem Res,* **32,** 1476-1482.

Avallone, R., Zeneroli, M. L., Venturini, I. et al. (1998) Endogenous benzodiazepine-like compounds and diazepam binding inhibitor in serum of patients with liver cirrhosis with and without overt encephalopathy. *Gut,* **42,** 861-867.

Awad, M. and Gavish, M. (1991) Peripheral-type benzodiazepine receptors in human cerebral cortex, kidney, and colon. *Life Sci,* **49,** 1155-1161.

Azuma, T., Matsubara, T., Shima, Y., Haeno, S., Fujimoto, T., Tone, K., Shibata, N. and Sakoda, S. (1993) Neurosteroids in cerebrospinal fluid in neurologic disorders. *J Neurol Sci,* **120,** 87-92.

-B-

Bae, Y. S., Lee, H. Y., Jo, E. J., Kim, J. I., Kang, H. K., Ye, R. D., Kwak, J. Y. and Ryu, S. H. (2004) Identification of peptides that antagonize formyl peptide receptor-like 1-mediated signaling. *J Immunol,* **173,** 607-614.

Baiguera, S., Fioravanzo, L., Grandi, C., Di Liddo, R., Parnigotto, P. P. and Folin, M. (2009) Involvement of the receptor for advanced glycation-end products (RAGE) in beta-amyloid-induced toxic effects in rat cerebromicrovascular endothelial cells cultured in vitro. *Int J Mol Med,* **24,** 9-15.

Barbaccia, M. L., Costa, E., Ferrero, P., Guidotti, A., Roy, A., Sunderland, T., Pickar, D., Paul, S. M. and Goodwin, F. K. (1986) Diazepam-binding inhibitor. A brain neuropeptide present in human spinal fluid: studies in depression, schizophrenia, and Alzheimer's disease. *Arch Gen Psychiatry,* **43,** 1143-1147.

Bard, F., Cannon, C., Barbour, R. et al. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med,* **6,** 916-919.

Barmack, N. H., Bilderback, T. R., Liu, H., Qian, Z. and Yakhnitsa, V. (2004) Activity-dependent expression of acyl-coenzyme a-binding protein in retinal muller glial cells evoked by optokinetic stimulation. *J Neurosci,* **24,** 1023-1033.

Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S. and Malenka, R. C. (2002) Control of synaptic strength by glial TNFalpha. *Science,* **295,** 2282-2285.

Becker, E. L., Forouhar, F. A., Grunnet, M. L. et al. (1998) Broad immunocytochemical localization of the formylpeptide receptor in human organs, tissues, and cells. *Cell Tissue Res,* **292,** 129-135.

Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B. and Chimini, G. (1997) ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in Xenopus laevis oocytes. *J Biol Chem,* **272,** 2695-2699.

Bell, K. F., Zheng, L., Fahrenholz, F. and Cuello, A. C. (2008) ADAM-10 over-expression increases cortical synaptogenesis. *Neurobiol Aging,* **29,** 554-565.

Benavides, J., Peny, B., Ruano, D., Vitorica, J. and Scatton, B. (1993) Comparative autoradiographic distribution of central omega (benzodiazepine) modulatory site subtypes with high, intermediate and low affinity for zolpidem and alpidem. *Brain Res,* **604,** 240-250.

Benavides, J., Quarteronet, D., Imbault, F., Malgouris, C., Uzan, A., Renault, C., Dubroeucq, M. C., Gueremy, C. and Le Fur, G. (1983) Labelling of "peripheral-type" benzodiazepine binding sites in the rat brain by using [3H]PK 11195, an isoquinoline carboxamide derivative: kinetic studies and autoradiographic localization. *J Neurochem,* **41,** 1744-1750.

Berkovich, A., McPhie, P., Campagnone, M., Guidotti, A. and Hensley, P. (1990) A natural processing product of rat diazepam binding inhibitor, triakontatetraneuropeptide (diazepam binding inhibitor 17-50) contains an alpha-helix, which allows discrimination between benzodiazepine binding site subtypes. *Mol Pharmacol,* **37,** 164-172.

Berman, J. A., Roberts, J. L. and Pritchett, D. B. (1994) Molecular and pharmacological characterization of GABAA receptors in the rat pituitary. *J Neurochem,* **63,** 1948-1954.

Betten, A., Bylund, J., Christophe, T., Boulay, F., Romero, A., Hellstrand, K. and Dahlgren, C. (2001) A proinflammatory peptide from Helicobacter pylori activates monocytes to induce lymphocyte dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest,* **108,** 1221-1228.

Bezzi, P., Domercq, M., Brambilla, L. et al. (2001) CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci,* **4,** 702-710.

Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E. and Volterra, A. (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci,* **7,** 613-620.

Bhuiyan, J., Pritchard, P. H., Pande, S. V. and Seccombe, D. W. (1995) Effects of high-fat diet and fasting on levels of acyl-coenzyme A binding protein in liver, kidney, and heart of rat. *Metabolism,* **44,** 1185-1189.

Blondel, O., Collin, C., McCarran, W. J., Zhu, S., Zamostiano, R., Gozes, I., Brenneman, D. E. and McKay, R. D. (2000) A glia-derived signal regulating neuronal differentiation. *J Neurosci,* **20,** 8012-8020.

Borboni, P., Condorelli, L., De Stefanis, P., Sesti, G. and Lauro, R. (1991) Modulation of insulin secretion by diazepam binding inhibitor and its processing products. *Neuropharmacology,* **30,** 1399-1403.

Bormann, J. (1991) Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABAA receptors. *Neuropharmacology,* **30,** 1387-1389.

Bormann, J. and Kettenmann, H. (1988) Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl- channels in cultured astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **85,** 9336-9340.

Bovolin, P., Santi, M. R., Puia, G., Costa, E. and Grayson, D. (1992) Expression patterns of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and astrocytes from neonatal rat cerebella. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **89,** 9344-9348.

Braestrup, C., Albrechtsen, R. and Squires, R. F. (1977) High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas. *Nature,* **269,** 702-704.

Braestrup, C., Nielsen, M. and Olsen, C. E. (1980) Urinary and brain beta-carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **77,** 2288-2292.

Braestrup, C. and Squires, R. F. (1977) Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **74,** 3805-3809.

Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W. H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J. and Bethea, J. R. (2005) Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med,* **202,** 145-156.

Brandenburg, L. O., Konrad, M., Wruck, C., Koch, T., Pufe, T. and Lucius, R. (2008) Involvement of formyl-peptide-receptor-like-1 and phospholipase D in the internalization and signal transduction of amyloid beta 1-42 in glial cells. *Neuroscience,* **156,** 266-276.

Brandenburg, L. O., Konrad, M., Wruck, C. J., Koch, T., Lucius, R. and Pufe, T. (2010) Functional and physical interactions between formyl-peptide-receptors and scavenger receptor MARCO and their involvement in amyloid beta 1-42-induced signal transduction in glial cells. *J Neurochem,* **113,** 749-760.

Brera, B., Serrano, A. and de Ceballos, M. L. (2000) beta-amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: a role for oxidative stress. *Neurobiol Dis,* **7,** 395-405.

Brown, A. M., Tekkok, S. B. and Ransom, B. R. (2003a) Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J Physiol,* **549,** 501-512.

Brown, A. S. and Hall, P. F. (1991) Stimulation by endozepine of the side-chain cleavage of cholesterol in a reconstituted enzyme system. *Biochem Biophys Res Commun,* **180,** 609-614.

Brown, R. C., Degenhardt, B., Kotoula, M. and Papadopoulous, V. (2000) Location-dependent role of the human glioma cell peripheral-type benzodiazepine receptor in proliferation and steroid biosynthesis. *Cancer Lett,* **156,** 125-132.

Brown, R. C., Han, Z., Cascio, C. and Papadopoulos, V. (2003b) Oxidative stress-mediated DHEA formation in Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging,* **24,** 57-65.

Bureau, M., Laschet, J., Bureau-Heeren, M., Hennuy, B., Minet, A., Wins, P. and Grisar, T. (1995) Astroglial cells express large amounts of GABAA receptor proteins in mature brain. *J Neurochem,* **65,** 2006-2015.

Burgi, B., Lichtensteiger, W., Lauber, M. E. and Schlumpf, M. (1999) Ontogeny of diazepam binding inhibitor/acyl-CoA binding protein mRNA and peripheral benzodiazepine receptor mRNA expression in the rat. *J Neuroendocrinol,* **11,** 85-100.

Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y. et al. (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem,* **273,** 27765-27767.

Bylund, J., Christophe, T., Boulay, F., Nystrom, T., Karlsson, A. and Dahlgren, C. (2001) Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother,* **45,** 1700-1704.

-C-

Caille, I., Allinquant, B., Dupont, E., Bouillot, C., Langer, A., Muller, U. and Prochiantz, A. (2004) Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development,* **131,** 2173-2181.

Cao, X. and Sudhof, T. C. (2001) A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science,* **293,** 115-120.

Chang, J. L. and Tsai, H. J. (1996) Carp cDNA sequence encoding a putative diazepam-binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Biochim Biophys Acta,* **1298,** 9-11.

Chatton, J. Y., Pellerin, L. and Magistretti, P. J. (2003) GABA uptake into astrocytes is not associated with significant metabolic cost: implications for brain imaging of inhibitory transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **100,** 12456-12461.

Chen, S. J. and Liu, H. D. (1998) Cloning and Sequencing of cDNA Encoding the Diazepam Binding Inhibitor (DBI). *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai),* **30,** 631-634.

Chen, X., Yang, D., Shen, W., Dong, H. F., Wang, J. M., Oppenheim, J. J. and Howard, M. Z. (2000) Characterization of chenodeoxycholic acid as an endogenous antagonist of the G-coupled formyl peptide receptors. *Inflamm Res,* **49,** 744-755.

Chen, Y., Chan, P. H. and Swanson, R. A. (2001) Astrocytes overexpressing Cu,Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury. *Glia,* **33,** 343-347.

Chen, Z. W., Bergman, T., Jornvall, H. et al. (1997) Full-length and N-terminally truncated chicken intestinal diazepam-binding inhibitor. Purification, structural characterization and influence on insulin release. *Regul Pept,* **69,** 63-68.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem,* **162,** 156-159.

Christie, R. H., Freeman, M. and Hyman, B. T. (1996) Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease. *Am J Pathol,* **148,** 399-403.

Christophe, T., Karlsson, A., Dugave, C., Rabiet, M. J., Boulay, F. and Dahlgren, C. (2001) The synthetic peptide Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-NH2 specifically activates neutrophils through FPRL1/lipoxin A4 receptors and is an agonist for the orphan monocyte-expressed chemoattractant receptor FPRL2. *J Biol Chem,* **276,** 21585-21593.

Cinone, N., Hotje, H. D. and Carotti, A. (2000) Development of a unique 3D interaction model of endogenous and synthetic peripheral benzodiazepine receptor ligands. *J Comput Aided Mol Des,* **14,** 753-768.

Clausen, T. (1992) Potassium and sodium transport and pH regulation. *Can J Physiol Pharmacol,* **70 Suppl,** S219-222.

Clow, A., Glover, V., Armando, I. and Sandler, M. (1983) New endogenous benzodiazepine receptor ligand in human urine: identity with endogenous monoamine oxidase inhibitor? *Life Sci,* **33,** 735-741.

Coco, S., Calegari, F., Pravettoni, E., Pozzi, D., Taverna, E., Rosa, P., Matteoli, M. and Verderio, C. (2003) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem,* **278,** 1354-1362.

Collin, R. W., van Strien, D., Leunissen, J. A. and Martens, G. J. (2004) Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian Xenopus laevis. *Eur J Biochem,* **271,** 1906-1912.

Compère, V., Lanfray, D., Castel, H., Morin, F., Leprince, J., Dureuil, B., Vaudry, H., Pelletier, G. and Tonon, M. C. (2010) Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecaneuropeptide ODN, in mouse glial cells. *J Mol Endocrinol,* **44,** 295-299.

Compère, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (2003) Effect of intracerebroventricular administration of the octadecaneuropeptide on the expression of pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNAs in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol,* **15,** 197-203.

Compère, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (2004) In vivo action of a new octadecaneuropeptide (ODN) antagonist on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *Neuroscience,* **125,** 411-415.

Compère, V., Li, S., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (2005) In vivo action of a new octadecaneuropeptide antagonist on neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone mRNA levels in rat. *Brain Res Mol Brain Res,* **141,** 156-160.

Compère, V., Ouellet, J., Luu-The, V., Dureuil, B., Tonon, M. C., Vaudry, H., Labrie, F. and Pelletier, G. (2006) Role of androgens and glucocorticoids in the regulation of diazepam-binding inhibitor mRNA levels in male mouse hypothalamus. *Brain Res,* **1119,** 50-57.

Coraci, I. S., Husemann, J., Berman, J. W., Hulette, C., Dufour, J. H., Campanella, G. K., Luster, A. D., Silverstein, S. C. and El-Khoury, J. B. (2002) CD36, a class B scavenger receptor, is expressed

on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol,* **160,** 101-112.

Corbett, D., Larsen, J. and Langdon, K. D. (2008) Diazepam delays the death of hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *Exp Neurol,* **214,** 309-314.

Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J. et al. (1994) Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat Genet,* **7,** 180-184.

Cosentino, M., Marino, F., Cattaneo, S., Di Grazia, L., Francioli, C., Fietta, A. M., Lecchini, S. and Frigo, G. (2000) Diazepam-binding inhibitor-derived peptides induce intracellular calcium changes and modulate human neutrophil function. *J Leukoc Biol,* **67,** 637-643.

Costa, E., Corda, M. G. and Guidotti, A. (1983) On a brain polypeptide functioning as a putative effector for the recognition sites of benzodiazepine and beta-carboline derivatives. *Neuropharmacology,* **22,** 1481-1492.

Cui, Y. H., Le, Y., Zhang, X., Gong, W., Abe, K., Sun, R., Van Damme, J., Proost, P. and Wang, J. M. (2002) Up-regulation of FPR2, a chemotactic receptor for amyloid beta 1-42 (A beta 42), in murine microglial cells by TNF alpha. *Neurobiol Dis,* **10,** 366-377.

-D-

Dahlgren, C., Christophe, T., Boulay, F., Madianos, P. N., Rabiet, M. J. and Karlsson, A. (2000) The synthetic chemoattractant Trp-Lys-Tyr-Met-Val-DMet activates neutrophils preferentially through the lipoxin A(4) receptor. *Blood,* **95,** 1810-1818.

Daigle, I. and Li, C. (1993) apl-1, a Caenorhabditis elegans gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **90,** 12045-12049.

de Haas, C. J., Veldkamp, K. E., Peschel, A., Weerkamp, F., Van Wamel, W. J., Heezius, E. C., Poppelier, M. J., Van Kessel, K. P. and van Strijp, J. A. (2004) Chemotaxis inhibitory protein of Staphylococcus aureus, a bacterial antiinflammatory agent. *J Exp Med,* **199,** 687-695.

De Mateos-Verchere, J. G., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Costentin, J. (1998) The octadecaneuropeptide ODN induces anxiety in rodents: possible involvement of a shorter biologically active fragment. *Peptides,* **19,** 841-848.

de Mateos-Verchere, J. G., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Costentin, J. (2001) The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur J Pharmacol,* **414,** 225-231.

De Souza, E. B., Anholt, R. R., Murphy, K. M., Snyder, S. H. and Kuhar, M. J. (1985) Peripheral-type benzodiazepine receptors in endocrine organs: autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, and testis. *Endocrinology,* **116,** 567-573.

De Stefanis, P., Impagnatiello, F., Berkovich, A. and Guidotti, A. (1995) Inhibitory effect of ODN, a naturally occurring processing product of diazepam binding inhibitor, on secretagogues-induced insulin secretion. *Regul Pept,* **56,** 153-165.

De, Y., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J. and Chertov, O. (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med,* **192,** 1069-1074.

Dean, M. and Annilo, T. (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet,* **6,** 123-142.

DeBernardi, M. A., Crowe, R. R., Mocchetti, I., Shows, T. B., Eddy, R. L. and Costa, E. (1988) Chromosomal localization of the human diazepam binding inhibitor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **85,** 6561-6565.

Deitmer, J. W. and Rose, C. R. (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Prog Neurobiol,* **48,** 73-103.

Delacourte, A. and Buee, L. (2000) Tau pathology: a marker of neurodegenerative disorders. *Curr Opin Neurol,* **13,** 371-376.

Dencker, S. J. and Johansson, G. (1990) Benzodiazepine-like substances in mother's milk. *Lancet,* **335,** 413.

Desagher, S., Glowinski, J. and Premont, J. (1996) Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci,* **16,** 2553-2562.

Desclaux, M., Teigell, M., Amar, L., Vogel, R., Gimenez, Y. R. M., Privat, A. and Mallet, J. (2009) A novel and efficient gene transfer strategy reduces glial reactivity and improves neuronal survival and axonal growth in vitro. *PLoS One,* **4,** e6227.

Desrues, L., Tonon, M. C. and Vaudry, H. (1990) Thyrotrophin-releasing hormone stimulates polyphosphoinositide metabolism in the frog neurointermediate lobe. *J Mol Endocrinol,* **5,** 129-136.

Do-Rego, J. L., Mensah-Nyagan, A. G., Beaujean, D., Leprince, J., Tonon, M. C., Luu-The, V., Pelletier, G. and Vaudry, H. (2001) The octadecaneuropeptide ODN stimulates neurosteroid biosynthesis through activation of central-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem,* **76,** 128-138.

do Rego, J. C., Orta, M. H., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Costentin, J. (2007) Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology,* **32,** 1641-1648.

Domercq, M., Brambilla, L., Pilati, E., Marchaland, J., Volterra, A. and Bezzi, P. (2006) P2Y1 receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: control by tumor necrosis factor-alpha and prostaglandins. *J Biol Chem,* **281,** 30684-30696.

Dong, E., Matsumoto, K., Tohda, M. and Watanabe, H. (1999) Involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice. *Life Sci,* **64,** 1779-1784.

Dong, Y. and Benveniste, E. N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia,* **36,** 180-190.

Dringen, R. and Hamprecht, B. (1997) Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res,* **759,** 67-75.

Dringen, R., Pfeiffer, B. and Hamprecht, B. (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *J Neurosci,* **19,** 562-569.

Duan, X., Kang, E., Liu, C. Y., Ming, G. L. and Song, H. (2008) Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol,* **18,** 108-115.

Duncan, G. E., Breese, G. R., Criswell, H. E., McCown, T. J., Herbert, J. S., Devaud, L. L. and Morrow, A. L. (1995) Distribution of [3H]zolpidem binding sites in relation to messenger RNA encoding the alpha 1, beta 2 and gamma 2 subunits of GABAA receptors in rat brain. *Neuroscience,* **64,** 1113-1128.

Duparc, C., Lefebvre, H., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Kuhn, J. M. (2003) Characterization of endozepines in the human testicular tissue: effect of triakontatetraneuropeptide on testosterone secretion. *J Clin Endocrinol Metab,* **88,** 5521-5528.

Durstin, M., Gao, J. L., Tiffany, H. L., McDermott, D. and Murphy, P. M. (1994) Differential expression of members of the N-formylpeptide receptor gene cluster in human phagocytes. *Biochem Biophys Res Commun,* **201,** 174-179.

Duyckaerts, C., Potier, M. C. and Delatour, B. (2008) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol,* **115,** 5-38.

-E-

Eckman, C. B. and Eckman, E. A. (2007) An update on the amyloid hypothesis. *Neurol Clin,* **25,** 669-682, vi.

Eckman, E. A. and Eckman, C. B. (2005) Abeta-degrading enzymes: modulators of Alzheimer's disease pathogenesis and targets for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans,* **33,** 1101-1105.

Eddleston, M. and Mucke, L. (1993) Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience,* **54,** 15-36.

Ekinci, F. J., Malik, K. U. and Shea, T. B. (1999) Activation of the L voltage-sensitive calcium channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cells to beta-amyloid. MAP kinase mediates beta-amyloid-induced neurodegeneration. *J Biol Chem,* **274,** 30322-30327.

Elekes, O., Venema, K., Postema, F., Dringen, R., Hamprecht, B. and Korf, J. (1996) Evidence that stress activates glial lactate formation in vivo assessed with rat hippocampus lactography. *Neurosci Lett,* **208,** 69-72.

Elholm, M., Bjerking, G., Knudsen, J., Kristiansen, K. and Mandrup, S. (1996) Regulatory elements in the promoter region of the rat gene encoding the acyl-CoA-binding protein. *Gene,* **173,** 233-238.

Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. and Lee, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res,* **25,** 1439-1451.

-F-

Faergeman, N. J. and Knudsen, J. (2002) Acyl-CoA binding protein is an essential protein in mammalian cell lines. *Biochem J,* **368,** 679-682.

Fang, F., Lue, L. F., Yan, S. et al. (2010) RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, Abeta accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Faseb J,* **24,** 1043-1055.

Fellin, T. (2009) Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity. *J Neurochem,* **108,** 533-544.

Ferrarese, C., Appollonio, I., Frigo, M., Meregalli, S., Piolti, R., Tamma, F. and Frattola, L. (1990) Cerebrospinal fluid levels of diazepam-binding inhibitor in neurodegenerative disorders with dementia. *Neurology,* **40,** 632-635.

Ferrarese, C., Cogliati, T., Tortorella, R. et al. (1998) Diazepam binding inhibitor (DBI) in the plasma of pediatric and adult epileptic patients. *Epilepsy Res,* **29,** 129-134.

Ferrarese, C., Perego, M., Marzorati, C., Bianchi, G., Frigo, M., Pecora, N., Riva, R., Moretti, G. and Frattola, L. (1996) Modifications of diazepam binding inhibitor and peripheral benzodiazepine receptors in the lymphocytes of epileptic patients. *Ital J Neurol Sci,* **17,** 141-145.

Ferrarese, C., Vaccarino, F., Alho, H., Mellstrom, B., Costa, E. and Guidotti, A. (1987) Subcellular location and neuronal release of diazepam binding inhibitor. *J Neurochem,* **48,** 1093-1102.

Ferrero-Gutierrez, A., Perez-Gomez, A., Novelli, A. and Fernandez-Sanchez, M. T. (2008) Inhibition of protein phosphatases impairs the ability of astrocytes to detoxify hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med,* **44,** 1806-1816.

Ferrero, P., Conti-Tronconi, B. and Guidotti, A. (1986a) DBI, an anxiogenic neuropeptide found in human brain. *Adv Biochem Psychopharmacol,* **41,** 177-185.

Ferrero, P., Guidotti, A., Conti-Tronconi, B. and Costa, E. (1984) A brain octadecaneuropeptide generated by tryptic digestion of DBI (diazepam binding inhibitor) functions as a proconflict ligand of benzodiazepine recognition sites. *Neuropharmacology,* **23,** 1359-1362.

Ferrero, P., Penna, P., Vischia, F., Tarenzi, L., Bergamasco, B. and Bergamini, L. (1988) Diazepam binding inhibitor in brain and in cerebrospinal fluid of human. *Ann Ist Super Sanita,* **24,** 443-459.

Ferrero, P., Santi, M. R., Conti-Tronconi, B., Costa, E. and Guidotti, A. (1986b) Study of an octadecaneuropeptide derived from diazepam binding inhibitor (DBI): biological activity and presence in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **83,** 827-831.

Freer, R. J., Day, A. R., Radding, J. A., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Showell, H. J. and Becker, E. L. (1980) Further studies on the structural requirements for synthetic peptide chemoattractants. *Biochemistry,* **19,** 2404-2410.

Froger, N., Orellana, J. A., Calvo, C. F., Amigou, E., Kozoriz, M. G., Naus, C. C., Saez, J. C. and Giaume, C. (2010) Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Mol Cell Neurosci,* **45,** 37-46.

Frozza, R. L., Horn, A. P., Hoppe, J. B., Simao, F., Gerhardt, D., Comiran, R. A. and Salbego, C. G. (2009) A comparative study of beta-amyloid peptides Abeta1-42 and Abeta25-35 toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Res,* **34,** 295-303.

Fu, H., Bjorkman, L., Janmey, P., Karlsson, A., Karlsson, J., Movitz, C. and Dahlgren, C. (2004) The two neutrophil members of the formylpeptide receptor family activate the NADPH-oxidase through signals that differ in sensitivity to a gelsolin derived phosphoinositide-binding peptide. *BMC Cell Biol,* **5,** 50.

-G-

Galiegue, S., Jbilo, O., Combes, T., Bribes, E., Carayon, P., Le Fur, G. and Casellas, P. (1999) Cloning and characterization of PRAX-1. A new protein that specifically interacts with the peripheral benzodiazepine receptor. *J Biol Chem,* **274,** 2938-2952.

Gallager, D. W., Mallorga, P., Oertel, W., Henneberry, R. and Tallman, J. (1981) [3H]Diazepam binding in mammalian central nervous system: a pharmacological characterization. *J Neurosci,* **1,** 218-225.

Gandolfo, P., Patte, C., Leprince, J., Rego, J. L., Mensah-Nyagan, A. G., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2000) The triakontatetraneuropeptide (TTN) stimulates thymidine incorporation in rat astrocytes through peripheral-type benzodiazepine receptors. *J Neurochem,* **75,** 701-707.

Gandolfo, P., Patte, C., Leprince, J., Thoumas, J. L., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1997) The stimulatory effect of the octadecaneuropeptide (ODN) on cytosolic Ca2+ in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol,* **322,** 275-281.

Gandolfo, P., Patte, C., Thoumas, J. L., Leprince, J., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1999) The endozepine ODN stimulates [3H]thymidine incorporation in cultured rat astrocytes. *Neuropharmacology,* **38,** 725-732.

Garcia de Mateos-Verchere, J., Leprince, J., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Costentin, J. (1998) The octadecaneuropeptide ODN inhibits apomorphine-induced yawning in rats. *Eur J Pharmacol,* **357,** 121-126.

Garnier, M., Boujrad, N., Ogwuegbu, S. O., Hudson, J. R., Jr. and Papadopoulos, V. (1994a) The polypeptide diazepam-binding inhibitor and a higher affinity mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor sustain constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *J Biol Chem,* **269,** 22105-22112.

Garnier, M., Boujrad, N., Oke, B. O., Brown, A. S., Riond, J., Ferrara, P., Shoyab, M., Suarez-Quian, C. A. and Papadopoulos, V. (1993) Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology,* **132,** 444-458.

Garnier, M., Dimchev, A. B., Boujrad, N., Price, J. M., Musto, N. A. and Papadopoulos, V. (1994b) In vitro reconstitution of a functional peripheral-type benzodiazepine receptor from mouse Leydig tumor cells. *Mol Pharmacol,* **45,** 201-211.

Gersuk, V. H., Rose, T. M. and Todaro, G. J. (1995) Molecular cloning and chromosomal localization of a pseudogene related to the human acyl-CoA binding protein/diazepam binding inhibitor. *Genomics,* **25,** 469-476.

Giulian, D., Haverkamp, L. J., Li, J., Karshin, W. L., Yu, J., Tom, D., Li, X. and Kirkpatrick, J. B. (1995) Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem Int,* **27,** 119-137.

Givalois, L., Grinevich, V., Li, S., Garcia-De-Yebenes, E. and Pelletier, G. (1998) The octadecaneuropeptide-induced response of corticotropin-releasing hormone messenger RNA levels is mediated by GABA(A) receptors and modulated by endogenous steroids. *Neuroscience,* **85,** 557-567.

Glenner, G. G. and Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun,* **120,** 885-890.

Glover, V., Armando, I., Clow, A. and Sandler, M. (1983) Endogenous urinary monoamine oxidase inhibitor: the benzodiazepine connection. *Mod Probl Pharmacopsychiatry,* **19,** 118-125.

Goate, A. (2006) Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis,* **9,** 341-347.

Goetzl, E. J., Foster, D. W. and Goldman, D. W. (1981) Isolation and partial characterization of membrane protein constituents of human neutrophil receptors for chemotactic formylmethionyl peptides. *Biochemistry,* **20,** 5717-5722.

Goodman, Y. and Mattson, M. P. (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect hippocampal neurons against amyloid beta-peptide-induced oxidative injury. *Exp Neurol,* **128,** 1-12.

Granucci, F., Petralia, F., Urbano, M., Citterio, S., Di Tota, F., Santambrogio, L. and Ricciardi-Castagnoli, P. (2003) The scavenger receptor MARCO mediates cytoskeleton rearrangements in dendritic cells and microglia. *Blood,* **102,** 2940-2947.

Gray, P. W., Glaister, D., Seeburg, P. H., Guidotti, A. and Costa, E. (1986) Cloning and expression of cDNA for human diazepam binding inhibitor, a natural ligand of an allosteric regulatory site of the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **83,** 7547-7551.

Guarneri, P., Berkovich, A., Guidotti, A. and Costa, E. (1990) A study of diazepam binding inhibitor (DBI) processing products in human cerebrospinal fluid and in postmortem human brain. *Neuropharmacology,* **29,** 419-428.

Guerrero, C., Martin-Rufian, M., Reina, J. J. and Heredia, A. (2006) Isolation and characterization of a cDNA encoding a membrane bound acyl-CoA binding protein from Agave americana L. epidermis. *Plant Physiol Biochem,* **44,** 85-90.

Guidotti, A. (1991) Role of DBI in brain and its posttranslational processing products in normal and abnormal behavior. *Neuropharmacology,* **30,** 1425-1433.

Guidotti, A., Corda, M. G. and Costa, E. (1983a) Strategies for the isolation and characterization of an endogenous effector of the benzodiazepine recognition sites. *Adv Biochem Psychopharmacol,* **38,** 95-103.

Guidotti, A., Forchetti, C. M., Corda, M. G., Konkel, D., Bennett, C. D. and Costa, E. (1983b) Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **80,** 3531-3535.

Gulyas, B., Makkai, B., Kasa, P. et al. (2009) A comparative autoradiography study in post mortem whole hemisphere human brain slices taken from Alzheimer patients and age-matched controls using two radiolabelled DAA1106 analogues with high affinity to the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) system. *Neurochem Int,* **54,** 28-36.

-H-

Hadingham, K. L., Garrett, E. M., Wafford, K. A., Bain, C., Heavens, R. P., Sirinathsinghji, D. J. and Whiting, P. J. (1996) Cloning of cDNAs encoding the human gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6 subunit and characterization of the pharmacology of alpha 6-containing receptors. *Mol Pharmacol,* **49,** 253-259.

Halassa, M. M. and Haydon, P. G. (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol,* **72,** 335-355.

Hamby, M. E., Hewett, J. A. and Hewett, S. J. (2006) TGF-beta1 potentiates astrocytic nitric oxide production by expanding the population of astrocytes that express NOS-2. *Glia,* **54,** 566-577.

Hamon, Y., Luciani, M. F., Becq, F., Verrier, B., Rubartelli, A. and Chimini, G. (1997) Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1. *Blood,* **90,** 2911-2915.

Hansen, H. O., Andreasen, P. H., Mandrup, S., Kristiansen, K. and Knudsen, J. (1991) Induction of acyl-CoA-binding protein and its mRNA in 3T3-L1 cells by insulin during preadipocyte-to-adipocyte differentiation. *Biochem J,* **277 (Pt 2),** 341-344.

Hansen, J. S., Faergeman, N. J., Kragelund, B. B. and Knudsen, J. (2008) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi in a ligand-dependent manner in mammalian cells. *Biochem J,* **410,** 463-472.

Harada, H., Tamaoka, A., Ishii, K., Shoji, S., Kametaka, S., Kametani, F., Saito, Y. and Murayama, S. (2006) Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is increased in remaining neurons in Alzheimer's disease brains. *Neurosci Res,* **54,** 24-29.

Harada, M., Habata, Y., Hosoya, M., Nishi, K., Fujii, R., Kobayashi, M. and Hinuma, S. (2004) N-Formylated humanin activates both formyl peptide receptor-like 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun,* **324,** 255-261.

Hardwick, M., Fertikh, D., Culty, M., Li, H., Vidic, B. and Papadopoulos, V. (1999) Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res,* **59,** 831-842.

Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H. and Rusakov, D. A. (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature,* **463,** 232-236.

Hernandez-Guillamon, M., Delgado, P., Ortega, L. et al. (2009) Neuronal TIMP-1 release accompanies astrocytic MMP-9 secretion and enhances astrocyte proliferation induced by beta-amyloid 25-35 fragment. *J Neurosci Res,* **87,** 2115-2125.

Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B. et al. (2008) STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J Neurosci,* **28,** 7231-7243.

Herzig, K. H. (1998) Cholecystokinin- and secretin-releasing peptides in the intestine--a new regulatory interendocrine mechanism in the gastrointestinal tract. *Regul Pept,* **73,** 89-94.

Herzig, K. H., Schon, I., Tatemoto, K., Ohe, Y., Li, Y., Folsch, U. R. and Owyang, C. (1996) Diazepam binding inhibitor is a potent cholecystokinin-releasing peptide in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **93,** 7927-7932.

Hevers, W. and Luddens, H. (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol,* **18,** 35-86.

Hickman, S. E., Allison, E. K. and El Khoury, J. (2008) Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci,* **28,** 8354-8360.

Hirano, K., Yamashita, S., Nakagawa, Y. et al. (1999) Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions. *Circ Res,* **85,** 108-116.

Hirsch, E., Katanaev, V. L., Garlanda, C. et al. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science,* **287,** 1049-1053.

Hopper, R. K., Carroll, S., Aponte, A. M., Johnson, D. T., French, S., Shen, R. F., Witzmann, F. A., Harris, R. A. and Balaban, R. S. (2006) Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium. *Biochemistry,* **45,** 2524-2536.

Hu, L., Deeney, J. T., Nolan, C. J. et al. (2005) Regulation of lipolytic activity by long-chain acyl-coenzyme A in islets and adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab,* **289,** E1085-1092.

Huang, H., Atshaves, B. P., Frolov, A., Kier, A. B. and Schroeder, F. (2005) Acyl-coenzyme A binding protein expression alters liver fatty acyl-coenzyme A metabolism. *Biochemistry,* **44,** 10282-10297.

Husemann, J., Loike, J. D., Anankov, R., Febbraio, M. and Silverstein, S. C. (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia,* **40,** 195-205.

Husemann, J. and Silverstein, S. C. (2001) Expression of scavenger receptor class B, type I, by astrocytes and vascular smooth muscle cells in normal adult mouse and human brain and in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol,* **158,** 825-832.

-I-

Iijima, K., Lee, D. S., Okutsu, J., Tomita, S., Hirashima, N., Kirino, Y. and Suzuki, T. (1998) cDNA isolation of Alzheimer's amyloid precursor protein from cholinergic nerve terminals of the electric organ of the electric ray. *Biochem J,* **330 (Pt 1),** 29-33.

Imbimbo, B. P. (2008) Therapeutic potential of gamma-secretase inhibitors and modulators. *Curr Top Med Chem,* **8,** 54-61.

Inazu, M., Takeda, H. and Matsumiya, T. (2003) Expression and functional characterization of the extraneuronal monoamine transporter in normal human astrocytes. *J Neurochem,* **84,** 43-52.

Ishida, A., Furukawa, K., Keller, J. N. and Mattson, M. P. (1997) Secreted form of beta-amyloid precursor protein shifts the frequency dependency for induction of LTD, and enhances LTP in hippocampal slices. *Neuroreport,* **8,** 2133-2137.

Itzhak, Y., Baker, L. and Norenberg, M. D. (1993) Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. *Glia,* **9,** 211-218.

Ivell, R., Pusch, W., Balvers, M., Valentin, M., Walther, N. and Weinbauer, G. (2000) Progressive inactivation of the haploid expressed gene for the sperm-specific endozepine-like peptide (ELP) through primate evolution. *Gene,* **255,** 335-345.

-J-

Jarrett, J. T., Berger, E. P. and Lansbury, P. T., Jr. (1993) The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis. *Ann N Y Acad Sci,* **695,** 144-148.

Jellinger, K. A. (2004) Head injury and dementia. *Curr Opin Neurol,* **17,** 719-723.

Jenkins, E. C., Devine-Gage, E. A., Robakis, N. K. et al. (1988) Fine mapping of an Alzheimer disease-associated gene encoding beta-amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun,* **151,** 1-8.

John, G. R., Lee, S. C. and Brosnan, C. F. (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist,* **9,** 10-22.

Jourdain, P., Bergersen, L. H., Bhaukaurally, K. et al. (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci,* **10,** 331-339.

Juknat, A. A., Mendez Mdel, V., Quaglino, A., Fameli, C. I., Mena, M. and Kotler, M. L. (2005) Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J Pineal Res,* **38,** 84-92.

-K-

Kagan, B. L., Hirakura, Y., Azimov, R., Azimova, R. and Lin, M. C. (2002) The channel hypothesis of Alzheimer's disease: current status. *Peptides,* **23,** 1311-1315.

Kam, A. Y., Tse, T. T., Kwan, D. H. and Wong, Y. H. (2007) Formyl peptide receptor like 1 differentially requires mitogen-activated protein kinases for the induction of glial fibrillary acidic protein and interleukin-1alpha in human U87 astrocytoma cells. *Cell Signal,* **19,** 2106-2117.

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K. and Muller-Hill, B. (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature,* **325,** 733-736.

Kang, J. and Muller-Hill, B. (1990) Differential splicing of Alzheimer's disease amyloid A4 precursor RNA in rat tissues: PreA4(695) mRNA is predominantly produced in rat and human brain. *Biochem Biophys Res Commun,* **166,** 1192-1200.

Katsura, K., Kristian, T., Nair, R. and Siesjo, B. K. (1994) Regulation of intra- and extracellular pH in the rat brain in acute hypercapnia: a re-appraisal. *Brain Res,* **651,** 47-56.

Katsura, M., Hara, A., Higo, A., Tarumi, C., Hibino, Y. and Ohkuma, S. (1998) Continuous treatment with morphine increases diazepam binding inhibitor mRNA in mouse brain. *J Neurochem,* **71,** 2638-2641.

Katsura, M., Ohkuma, S., Jun, X., Tsujimura, A. and Kuriyama, K. (1995a) Ethanol stimulates diazepam binding inhibitor (DBI) mRNA expression in primary cultured neurons. *Brain Res Mol Brain Res,* **34,** 355-359.

Katsura, M., Ohkuma, S., Tsujimura, A. and Kuriyama, K. (1995b) Increase of diazepam binding inhibitor mRNA levels in the brains of chronically ethanol-treated and -withdrawn mice. *J Pharmacol Exp Ther,* **273,** 1529-1533.

Kavaliers, M. and Hirst, M. (1986) An octadecaneuropeptide (ODN) derived from diazepam binding inhibitor increases aggressive interactions in mice. *Brain Res,* **383,** 343-349.

Kawahara, M. and Kuroda, Y. (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's beta-amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res Bull,* **53,** 389-397.

Khan, Z. U., Gutierrez, A., Mehta, A. K., Miralles, C. P. and De Blas, A. L. (1996) The alpha 4 subunit of the GABAA receptors from rat brain and retina. *Neuropharmacology,* **35,** 1315-1322.

Kim, C. H., Han, S. I., Lee, S. Y. et al. (2007) Protein kinase C-ERK1/2 signal pathway switches glucose depletion-induced necrosis to apoptosis by regulating superoxide dismutases and suppressing reactive oxygen species production in A549 lung cancer cells. *J Cell Physiol,* **211,** 371-385.

Kim, W. S., Guillemin, G. J., Glaros, E. N., Lim, C. K. and Garner, B. (2006a) Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport,* **17,** 891-896.

Kim, Y., Lee, B. D., Kim, O., Bae, Y. S., Lee, T., Suh, P. G. and Ryu, S. H. (2006b) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 is a functional ligand for formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol,* **176,** 2969-2975.

Klotz, U. (1991) Occurrence of "natural" benzodiazepines. *Life Sci,* **48,** 209-215.

Knudsen, J., Faergeman, N. J., Skott, H. et al. (1994) Yeast acyl-CoA-binding protein: acyl-CoA-binding affinity and effect on intracellular acyl-CoA pool size. *Biochem J,* **302 (Pt 2),** 479-485.

Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X. et al. (2004) Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nat Med,* **10,** 719-726.

Koizumi, S. (2010) Synchronization of Ca2+ oscillations: involvement of ATP release in astrocytes. *Febs J,* **277,** 286-292.

Kolmer, M., Alho, H., Costa, E. and Pani, L. (1993) Cloning and tissue-specific functional characterization of the promoter of the rat diazepam binding inhibitor, a peptide with multiple biological actions. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **90,** 8439-8443.

Kolmer, M., Roos, C., Tirronen, M., Myohanen, S. and Alho, H. (1994) Tissue-specific expression of the diazepam-binding inhibitor in Drosophila melanogaster: cloning, structure, and localization of the gene. *Mol Cell Biol,* **14,** 6983-6995.

Kolmer, M., Rovio, A. and Alho, H. (1995) The characterization of two diazepam binding inhibitor (DBI) transcripts in humans. *Biochem J,* **306 (Pt 2),** 327-330.

Korkhov, V. M., Sachse, C., Short, J. M. and Tate, C. G. (2010) Three-dimensional structure of TspO by electron cryomicroscopy of helical crystals. *Structure,* **18,** 677-687.

Kragelund, B. B., Poulsen, K., Andersen, K. V. et al. (1999) Conserved residues and their role in the structure, function, and stability of acyl-coenzyme A binding protein. *Biochemistry,* **38,** 2386-2394.

Krieger, M. and Herz, J. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem,* **63,** 601-637.

Krueger, K. E. and Papadopoulos, V. (1990) Peripheral-type benzodiazepine receptors mediate translocation of cholesterol from outer to inner mitochondrial membranes in adrenocortical cells. *J Biol Chem,* **265,** 15015-15022.

Kubo, T., Nishimura, S., Kumagae, Y. and Kaneko, I. (2002) In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients. *J Neurosci Res,* **70,** 474-483.

Kuhlmann, A. C. and Guilarte, T. R. (2000) Cellular and subcellular localization of peripheral benzodiazepine receptors after trimethyltin neurotoxicity. *J Neurochem,* **74,** 1694-1704.

Kushner, M. G., Sher, K. J. and Beitman, B. D. (1990) The relation between alcohol problems and the anxiety disorders. *Am J Psychiatry,* **147,** 685-695.

-L-

Lacapère, J. J. and Papadopoulos, V. (2003) Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis. *Steroids,* **68,** 569-585.

Lacor, P., Benavides, J. and Ferzaz, B. (1996) Enhanced expression of the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and its endogenous ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the regenerating adult rat sciatic nerve. *Neurosci Lett,* **220,** 61-65.

Lacor, P., Gandolfo, P., Tonon, M. C., Brault, E., Dalibert, I., Schumacher, M., Benavides, J. and Ferzaz, B. (1999) Regulation of the expression of peripheral benzodiazepine receptors and their endogenous ligands during rat sciatic nerve degeneration and regeneration: a role for PBR in neurosteroidogenesis. *Brain Res,* **815,** 70-80.

Lacy, M., Jones, J., Whittemore, S. R., Haviland, D. L., Wetsel, R. A. and Barnum, S. R. (1995) Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol,* **61,** 71-78.

LaFerla, F. M., Green, K. N. and Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci,* **8,** 499-509.

Lamacz, M., Tonon, M. C., Smih-Rouet, F., Patte, C., Gasque, P., Fontaine, M. and Vaudry, H. (1996) The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res,* **37,** 290-296.

Lambert, J. C. and Amouyel, P. (2007) Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology,* **32 Suppl 1,** S62-70.

Lambert, J. J., Belelli, D., Hill-Venning, C. and Peters, J. A. (1995) Neurosteroids and GABAA receptor function. *Trends Pharmacol Sci,* **16,** 295-303.

Lan, N. C. and Gee, K. W. (1994) Neuroactive steroid actions at the GABAA receptor. *Horm Behav,* **28,** 537-544.

Laurie, D. J., Seeburg, P. H. and Wisden, W. (1992) The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci,* **12,** 1063-1076.

Le, Y., Gong, W., Li, B., Dunlop, N. M., Shen, W., Su, S. B., Ye, R. D. and Wang, J. M. (1999) Utilization of two seven-transmembrane, G protein-coupled receptors, formyl peptide receptor-like 1 and formyl peptide receptor, by the synthetic hexapeptide WKYMVm for human phagocyte activation. *J Immunol,* **163,** 6777-6784.

Le, Y., Gong, W., Tiffany, H. L. et al. (2001a) Amyloid (beta)42 activates a G-protein-coupled chemoattractant receptor, FPR-like-1. *J Neurosci,* **21,** RC123.

Le, Y., Hu, J., Gong, W., Shen, W., Li, B., Dunlop, N. M., Halverson, D. O., Blair, D. G. and Wang, J. M. (2000) Expression of functional formyl peptide receptors by human astrocytoma cell lines. *J Neuroimmunol,* **111,** 102-108.

Le, Y., Murphy, P. M. and Wang, J. M. (2002) Formyl-peptide receptors revisited. *Trends Immunol,* **23,** 541-548.

Le, Y., Oppenheim, J. J. and Wang, J. M. (2001b) Pleiotropic roles of formyl peptide receptors. *Cytokine Growth Factor Rev,* **12,** 91-105.

Le, Y., Yazawa, H., Gong, W., Yu, Z., Ferrans, V. J., Murphy, P. M. and Wang, J. M. (2001c) The neurotoxic prion peptide fragment PrP(106-126) is a chemotactic agonist for the G protein-coupled receptor formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol,* **166,** 1448-1451.

Lee, L., DeBono, C. A., Campagna, D. R., Young, D. C., Moody, D. B. and Fleming, M. D. (2007) Loss of the acyl-CoA binding protein (Acbp) results in fatty acid metabolism abnormalities in mouse hair and skin. *J Invest Dermatol,* **127,** 16-23.

Leprince, J., Cosquer, D., Bellemere, G., Chatenet, D., Tollemer, H., Jegou, S., Tonon, M. C. and Vaudry, H. (2006) Catabolism of the octadecaneuropeptide ODN by prolyl endopeptidase: identification of an unusual cleavage site. *Peptides,* **27,** 1561-1569.

Leprince, J., Gandolfo, P., Thoumas, J. L., Patte, C., Fauchere, J. L., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1998) Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecaneuropeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J Med Chem,* **41,** 4433-4438.

Leprince, J., Oulyadi, H., Vaudry, D. et al. (2001) Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist. *Eur J Biochem,* **268,** 6045-6057.

Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. and Vaudry, H. (1998) Effect of the triakontatetraneuropeptide (TTN) on corticosteroid secretion by the frog adrenal gland. *J Mol Endocrinol,* **20,** 45-53.

Lesouhaitier, O., Kodjo, M. K., Cartier, F., Contesse, V., Yon, L., Delarue, C. and Vaudry, H. (2000) The effect of the endozepine triakontatetraneuropeptide on corticosteroid secretion by the frog adrenal gland is mediated by activation of adenylyl cyclase and calcium influx through T-type calcium channels. *Endocrinology,* **141,** 197-207.

Leung, K. C., Li, H. Y., Mishra, G. and Chye, M. L. (2004) ACBP4 and ACBP5, novel Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Mol Biol,* **55,** 297-309.

Levy-Lahad, E., Wijsman, E. M., Nemens, E., Anderson, L., Goddard, K. A., Weber, J. L., Bird, T. D. and Schellenberg, G. D. (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science,* **269,** 970-973.

Li, H., Degenhardt, B., Tobin, D., Yao, Z. X., Tasken, K. and Papadopoulos, V. (2001) Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. *Mol Endocrinol,* **15,** 2211-2228.

Li, S. and Pelletier, G. (1995) Inhibitory effect of the potential endogenous benzodiazepine receptor ligand, octadecaneuropeptide (ODN), on gonadotropin-releasing hormone gene expression in the male rat brain. *Neuroreport,* **6,** 1354-1356.

Li, Y. S., Wu, P., Zhou, X. Y. et al. (2008) Formyl-peptide receptor like 1: a potent mediator of the Ca2+ release-activated Ca2+ current ICRAC. *Arch Biochem Biophys,* **478,** 110-118.

Liang, T. S., Gao, J. L., Fatemi, O., Lavigne, M., Leto, T. L. and Murphy, P. M. (2001) The endogenous opioid spinorphin blocks fMet-Leu-Phe-induced neutrophil chemotaxis by acting as a specific antagonist at the N-formylpeptide receptor subtype FPR. *J Immunol,* **167,** 6609-6614.

Liang, T. S., Wang, J. M., Murphy, P. M. and Gao, J. L. (2000) Serum amyloid A is a chemotactic agonist at FPR2, a low-affinity N-formylpeptide receptor on mouse neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun,* **270,** 331-335.

Lihrmann, I., Plaquevent, J. C., Tostivint, H., Raijmakers, R., Tonon, M. C., Conlon, J. M. and Vaudry, H. (1994) Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cDNA cloning, and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **91,** 6899-6903.

Liu, J., Cavalli, L. R., Haddad, B. R. and Papadopoulos, V. (2003a) Molecular cloning, genomic organization, chromosomal mapping and subcellular localization of mouse PAP7: a PBR and PKA-RIalpha associated protein. *Gene,* **308,** 1-10.

Liu, J., Matyakhina, L., Han, Z., Sandrini, F., Bei, T., Stratakis, C. A. and Papadopoulos, V. (2003b) Molecular cloning, chromosomal localization of human peripheral-type benzodiazepine receptor and PKA regulatory subunit type 1A (PRKAR1A)-associated protein PAP7, and studies in PRKAR1A mutant cells and tissues. *Faseb J,* **17,** 1189-1191.

Liu, M., Zhang, T. Y. and Xu, W. H. (2005) A cDNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein in Helicoverpa armigera: molecular characterization and expression analysis associated with pupal diapause. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,* **141,** 168-176.

Lorton, D., Kocsis, J. M., King, L., Madden, K. and Brunden, K. R. (1996) beta-Amyloid induces increased release of interleukin-1 beta from lipopolysaccharide-activated human monocytes. *J Neuroimmunol,* **67,** 21-29.

Louiset, E., Vaudry, H. and Cazin, L. (1993) Allosteric modulation of the GABA-induced chloride current in frog melanotrophs. *Ann N Y Acad Sci,* **680,** 564-566.

Luchetti, S., Bossers, K., Van de Bilt, S., Agrapart, V., Morales, R. R., Frajese, G. V. and Swaab, D. F. (2009) Neurosteroid biosynthetic pathways changes in prefrontal cortex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*.

Lue, L. F., Walker, D. G., Brachova, L., Beach, T. G., Rogers, J., Schmidt, A. M., Stern, D. M. and Yan, S. D. (2001) Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Exp Neurol,* **171,** 29-45.

-M-

Maccioni, R. B. and Cambiazo, V. (1995) Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev,* **75,** 835-864.

Makar, T. K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A. S., Perumal, A. S. and Cooper, A. J. (1994) Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem,* **62,** 45-53.

Malagon, M., Vaudry, H., Van Strien, F., Pelletier, G., Gracia-Navarro, F. and Tonon, M. C. (1993) Ontogeny of diazepam-binding inhibitor-related peptides (endozepines) in the rat brain. *Neuroscience,* **57,** 777-786.

Manabe, Y., Toyoda, T., Kuroda, K., Imaizumi, M., Yamamoto, T. and Fushiki, T. (2001) Effect of diazepam binding inhibitor (DBI) on the fluid intake, preference and the taste reactivity in mice. *Behav Brain Res,* **126,** 197-204.

Mandrup, S., Hummel, R., Ravn, S., Jensen, G., Andreasen, P. H., Gregersen, N., Knudsen, J. and Kristiansen, K. (1992) Acyl-CoA-binding protein/diazepam-binding inhibitor gene and pseudogenes. A typical housekeeping gene family. *J Mol Biol,* **228,** 1011-1022.

Mandrup, S., Sorensen, R. V., Helledie, T., Nohr, J., Baldursson, T., Gram, C., Knudsen, J. and Kristiansen, K. (1998) Inhibition of 3T3-L1 adipocyte differentiation by expression of acyl-CoA-binding protein antisense RNA. *J Biol Chem,* **273,** 23897-23903.

Marangos, P. J., Patel, J., Boulenger, J. P. and Clark-Rosenberg, R. (1982) Characterization of peripheral-type benzodiazepine binding sites in brain using [3H]Ro 5-4864. *Mol Pharmacol,* **22,** 26-32.

Marasco, W. A., Fantone, J. C., Freer, R. J. and Ward, P. A. (1983) Characterization of the rat neutrophil formyl peptide chemotaxis receptor. *Am J Pathol,* **111,** 273-281.

Marasco, W. A., Phan, S. H., Krutzsch, H., Showell, H. J., Feltner, D. E., Nairn, R., Becker, E. L. and Ward, P. A. (1984) Purification and identification of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by Escherichia coli. *J Biol Chem,* **259,** 5430-5439.

Marino, F., Cosentino, M., Fietta, A. M., Ferrari, M., Cattaneo, S., Frigo, G., Lecchini, S. and Frigo, G. M. (2003) Interleukin-8 production induced by the endozepine triakontatetraneuropeptide in human neutrophils: role of calcium and pharmacological investigation of signal transduction pathways. *Cell Signal,* **15,** 511-517.

Martineau, M., Galli, T., Baux, G. and Mothet, J. P. (2008) Confocal imaging and tracking of the exocytotic routes for D-serine-mediated gliotransmission. *Glia,* **56,** 1271-1284.

Masmoudi-Kouki, O., Gandolfo, P., Leprince, J., Vaudry, D., Pelletier, G., Fournier, A., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2006) PACAP stimulates biosynthesis and release of endozepines from rat astrocytes. *Ann N Y Acad Sci,* **1070,** 411-416.

Masmoudi, O., Gandolfo, P., Leprince, J., Vaudry, D., Fournier, A., Patte-Mensah, C., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2003) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism. *Faseb J,* **17,** 17-27.

Masmoudi, O., Gandolfo, P., Tokay, T., Leprince, J., Ravni, A., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2005) Somatostatin down-regulates the expression and release of endozepines from cultured rat astrocytes via distinct receptor subtypes. *J Neurochem,* **94,** 561-571.

Matsuda, K., Wada, K., Miura, T., Maruyama, K., Shimakura, S. I., Uchiyama, M., Leprince, J., Tonon, M. C. and Vaudry, H. (2007) Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. *Neuroscience,* **150,** 425-432.

Matsumoto, S., Yoshiga, T., Yokoyama, N. et al. (2001) Characterization of acyl-CoA-binding protein (ACBP) in the pheromone gland of the silkworm, Bombyx mori. *Insect Biochem Mol Biol,* **31,** 603-609.

Mattson, M. P. (2004) Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature,* **430,** 631-639.

Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. and Rydel, R. E. (1992) beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci,* **12,** 376-389.

McDermott, K. W., Barry, D. S. and McMahon, S. S. (2005) Role of radial glia in cytogenesis, patterning and boundary formation in the developing spinal cord. *J Anat,* **207,** 241-250.

McEnery, M. W., Snowman, A. M., Trifiletti, R. R. and Snyder, S. H. (1992) Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **89,** 3170-3174.

McGowan, E., Pickford, F., Kim, J. et al. (2005) Abeta42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron,* **47,** 191-199.

McNamara, M. J., Gomez-Isla, T. and Hyman, B. T. (1998) Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta40 and Abeta42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol,* **55,** 1001-1004.

Medina, J. H., Paladini, A. C. and Izquierdo, I. (1993) Naturally occurring benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules in brain. *Behav Brain Res,* **58,** 1-8.

Mehmet, H. (2000) Caspases find a new place to hide. *Nature,* **403,** 29-30.

Mehta, A. K. and Ticku, M. K. (1989) Benzodiazepine and beta-carboline interactions with GABAA receptor-gated chloride channels in mammalian cultured spinal cord neurons. *J Pharmacol Exp Ther,* **249,** 418-423.

Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M. and Ungerer, A. (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnestic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95,** 12683-12688.

Migeotte, I., Communi, D. and Parmentier, M. (2006) Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev,* **17,** 501-519.

Migeotte, I., Riboldi, E., Franssen, J. D. et al. (2005) Identification and characterization of an endogenous chemotactic ligand specific for FPRL2. *J Exp Med,* **201,** 83-93.

Miller, M. C., Tavares, R., Johanson, C. E., Hovanesian, V., Donahue, J. E., Gonzalez, L., Silverberg, G. D. and Stopa, E. G. (2008) Hippocampal RAGE immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res,* **1230,** 273-280.

Miller, R. H. and Raff, M. C. (1984) Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. *J Neurosci,* **4,** 585-592.

Milligan, E. D. and Watkins, L. R. (2009) Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci,* **10,** 23-36.

Mocchetti, I., Einstein, R. and Brosius, J. (1986) Putative diazepam binding inhibitor peptide: cDNA clones from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **83,** 7221-7225.

Mocchetti, I. and Santi, M. R. (1991) Diazepam binding inhibitor peptide: cloning and gene expression. *Neuropharmacology,* **30,** 1365-1371.

Mogensen, I. B., Schulenberg, H., Hansen, H. O., Spener, F. and Knudsen, J. (1987) A novel acyl-CoA-binding protein from bovine liver. Effect on fatty acid synthesis. *Biochem J,* **241,** 189-192.

Mohler, H. and Okada, T. (1977) Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. *Science,* **198,** 849-851.

Mohler, H., Polc, P., Cumin, R., Pieri, L. and Kettler, R. (1979) Nicotinamide is a brain constituent with benzodiazepine-like actions. *Nature,* **278,** 563-565.

Moore, B. W. (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun,* **19,** 739-744.

Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E. et al. (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature,* **408,** 982-985.

Morgello, S., Uson, R. R., Schwartz, E. J. and Haber, R. S. (1995) The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia,* **14,** 43-54.

Mori, T., Koyama, N., Arendash, G. W., Horikoshi-Sakuraba, Y., Tan, J. and Town, T. (2010) Overexpression of human S100B exacerbates cerebral amyloidosis and gliosis in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Glia,* **58,** 300-314.

Mothet, J. P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P. and Baux, G. (2005) Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **102,** 5606-5611.

Moynagh, P. N. (2005) The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat,* **207,** 265-269.

Murphy, P. M., Ozcelik, T., Kenney, R. T., Tiffany, H. L., McDermott, D. and Francke, U. (1992) A structural homologue of the N-formyl peptide receptor. Characterization and chromosome mapping of a peptide chemoattractant receptor family. *J Biol Chem,* **267,** 7637-7643.

Musa, A., Lehrach, H. and Russo, V. A. (2001) Distinct expression patterns of two zebrafish homologues of the human APP gene during embryonic development. *Dev Genes Evol,* **211,** 563-567.

-N-

Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V. and Wang, H. Y. (2003) Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res,* **971,** 197-209.

Nagele, R. G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K. C. and Wegiel, J. (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging,* **25,** 663-674.

Nakamura, K., Funakoshi, H., Miyamoto, K., Tokunaga, F. and Nakamura, T. (2001) Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun,* **280,** 1028-1035.

Nakamura, K., Ohya, W., Funakoshi, H., Sakaguchi, G., Kato, A., Takeda, M., Kudo, T. and Nakamura, T. (2006) Possible role of scavenger receptor SRCL in the clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res,* **84,** 874-890.

Nakamura, S., Arima, K., Haga, S., Aizawa, T., Motoi, Y., Otsuka, M., Ueki, A. and Ikeda, K. (1998) Fibroblast growth factor (FGF)-9 immunoreactivity in senile plaques. *Brain Res,* **814,** 222-225.

Nedergaard, M., Ransom, B. and Goldman, S. A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci,* **26,** 523-530.

Neuhaus, J., Risau, W. and Wolburg, H. (1991) Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann N Y Acad Sci,* **633,** 578-580.

Newman, E. A. (1999) Sodium-bicarbonate cotransport in retinal astrocytes and Muller cells of the rat. *Glia,* **26,** 302-308.

Newman, E. A. (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci,* **23,** 1659-1666.

Nicholson, L. F., Faull, R. L., Waldvogel, H. J. and Dragunow, M. (1992) The regional, cellular and subcellular localization of GABAA/benzodiazepine receptors in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience,* **50,** 355-370.

Niddam, R., Dubois, A., Scatton, B., Arbilla, S. and Langer, S. Z. (1987) Autoradiographic localization of [3H]zolpidem binding sites in the rat CNS: comparison with the distribution of [3H]flunitrazepam binding sites. *J Neurochem,* **49,** 890-899.

Nitz, I., Doring, F., Schrezenmeir, J. and Burwinkel, B. (2005) Identification of new acyl-CoA binding protein transcripts in human and mouse. *Int J Biochem Cell Biol,* **37,** 2395-2405.

Nixon, R. A. (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci,* **120,** 4081-4091.

Noble, M., Wren, D. and Wolswijk, G. (1992) The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin Cell Biol,* **3,** 413-422.

-O-

Oikari, S., Ahtialansaari, T., Heinonen, M. V. et al. (2008a) Downregulation of PPARs and SREBP by acyl-CoA-binding protein overexpression in transgenic rats. *Pflugers Arch,* **456,** 369-377.

Oikari, S., Ahtialansaari, T., Huotari, A., Kiehne, K., Folsch, U. R., Wolffram, S., Janne, J., Alhonen, L. and Herzig, K. H. (2008b) Effect of medium- and long-chain fatty acid diets on PPAR and SREBP-1 expression and glucose homeostasis in ACBP-overexpressing transgenic rats. *Acta Physiol (Oxf),* **194,** 57-65.

Okada, M., Nakao, R., Hosoi, R., Zhang, M. R., Fukumura, T., Suzuki, K. and Inoue, O. (2009) In vivo monitoring of extracellular 13N-glutamine derived from blood-borne 13N-ammonia in rat striatum using microdialysis with radio-LC method. *J Neurosci Methods,* **184,** 37-41.

Oke, B. O., Suarez-Quian, C. A., Riond, J., Ferrara, P. and Papadopoulos, V. (1992) Cell surface localization of the peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol,* **87,** R1-6.

Onoe, H., Tsukada, H., Nishiyama, S., Nakanishi, S., Inoue, O., Langstrom, B. and Watanabe, Y. (1996) A subclass of GABAA/benzodiazepine receptor exclusively localized in the limbic system. *Neuroreport,* **8,** 117-122.

Onyango, I. G., Tuttle, J. B. and Bennett, J. P., Jr. (2005) Altered intracellular signaling and reduced viability of Alzheimer's disease neuronal cybrids is reproduced by beta-amyloid peptide acting through receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Mol Cell Neurosci,* **29,** 333-343.

Orgogozo, J. M., Gilman, S., Dartigues, J. F. et al. (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology,* **61,** 46-54.

Origlia, N., Righi, M., Capsoni, S. et al. (2008) Receptor for advanced glycation end product-dependent activation of p38 mitogen-activated protein kinase contributes to amyloid-beta-mediated cortical synaptic dysfunction. *J Neurosci,* **28,** 3521-3530.

Ostuni, M. A. and Lacapère, J. J. (2005) [A new role for peripheral benzodiazepine receptor?]. *Med Sci (Paris),* **21,** 240-242.

Owens, G. P., Sinha, A. K., Sikela, J. M. and Hahn, W. E. (1989) Sequence and expression of the murine diazepam binding inhibitor. *Brain Res Mol Brain Res,* **6,** 101-108.

-P-

Panatier, A., Theodosis, D. T., Mothet, J. P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D. A. and Oliet, S. H. (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell,* **125,** 775-784.

Papadopoulos, V. (2003) Peripheral benzodiazepine receptor: structure and function in health and disease. *Ann Pharm Fr,* **61,** 30-50.

Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R. et al. (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci,* **27,** 402-409.

Papadopoulos, V., Berkovich, A. and Krueger, K. E. (1991a) The role of diazepam binding inhibitor and its processing products at mitochondrial benzodiazepine receptors: regulation of steroid biosynthesis. *Neuropharmacology,* **30,** 1417-1423.

Papadopoulos, V., Berkovich, A., Krueger, K. E., Costa, E. and Guidotti, A. (1991b) Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology,* **129,** 1481-1488.

Papadopoulos, V., Mukhin, A. G., Costa, E. and Krueger, K. E. (1990) The peripheral-type benzodiazepine receptor is functionally linked to Leydig cell steroidogenesis. *J Biol Chem,* **265,** 3772-3779.

Parola, A. L. and Laird, H. E., 2nd (1991) The bovine peripheral-type benzodiazepine receptor: a receptor with low affinity for benzodiazepines. *Life Sci,* **48,** 757-764.

Parpura, V., Baker, B. J., Jeras, M. and Zorec, R. (2010) Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. *Neurochem Int*.

Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S. and Haydon, P. G. (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature,* **369,** 744-747.

Parramon, M., Oset-Gasque, M. J., Gonzalez, M. P. and Stephenson, F. A. (1994) Identification of GABAA receptor subunits expressed in bovine adrenal medulla. *Neurosci Lett,* **168,** 243-246.

Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J. and Hooper, N. M. (1998) Alzheimer's amyloid precursor protein alpha-secretase is inhibited by hydroxamic acid-based zinc metalloprotease

inhibitors: similarities to the angiotensin converting enzyme secretase. *Biochemistry,* **37,** 1680-1685.

Pascual, O., Casper, K. B., Kubera, C. et al. (2005) Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science,* **310,** 113-116.

Patte, C., Gandolfo, P., Leprince, J., Thoumas, J. L., Fontaine, M., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (1999) GABA inhibits endozepine release from cultured rat astrocytes. *Glia,* **25,** 404-411.

Patte, C., Vaudry, H., Desrues, L., Gandolfo, P., Strijdveen, I., Lamacz, M. and Tonon, M. C. (1995) The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes. *FEBS Lett,* **362,** 106-110.

Pekny, M. and Nilsson, M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia,* **50,** 427-434.

Perea, G., Navarrete, M. and Araque, A. (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci,* **32,** 421-431.

Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G. and Cotman, C. W. (1995) Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. *J Neurochem,* **64,** 253-265.

Podlisny, M. B., Tolan, D. R. and Selkoe, D. J. (1991) Homology of the amyloid beta protein precursor in monkey and human supports a primate model for beta amyloidosis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol,* **138,** 1423-1435.

Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I. et al. (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest,* **113,** 1456-1464.

Powell, J. E. and Taylor, D. (1992) Anger, depression, and anxiety following heroin withdrawal. *Int J Addict,* **27,** 25-35.

Prat, C., Bestebroer, J., de Haas, C. J., van Strijp, J. A. and van Kessel, K. P. (2006) A new staphylococcal anti-inflammatory protein that antagonizes the formyl peptide receptor-like 1. *J Immunol,* **177,** 8017-8026.

Pritchett, D. B., Luddens, H. and Seeburg, P. H. (1989) Type I and type II GABAA-benzodiazepine receptors produced in transfected cells. *Science,* **245,** 1389-1392.

Puia, G., Vicini, S., Seeburg, P. H. and Costa, E. (1991) Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl- currents. *Mol Pharmacol,* **39,** 691-696.

Pusch, W., Jahner, D., Spiess, A. N. and Ivell, R. (1999) Rat endozepine-like peptide (ELP): cDNA cloning, genomic organization and tissue-specific expression. *Gene,* **235,** 51-57.

-R-

Rago, L., Adojaan, A. and Masso, R. (1990) [3H]Ro 5-4864 binding sites in the nucleus of rat lymphocytes. *Eur J Pharmacol,* **187,** 561-562.

Rakic, P. (2003) Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex,* **13,** 541-549.

Rakic, S. and Zecevic, N. (2003) Emerging complexity of layer I in human cerebral cortex. *Cereb Cortex,* **13,** 1072-1083.

Randall, L. O. (1960) Pharmacology of methaminodiazepoxide. *Dis Nerv Syst,* **21(3)Suppl,** 7-10.

Rane, M. J., Carrithers, S. L., Arthur, J. M., Klein, J. B. and McLeish, K. R. (1997) Formyl peptide receptors are coupled to multiple mitogen-activated protein kinase cascades by distinct signal transduction pathways: role in activation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J Immunol,* **159,** 5070-5078.

Ransom, B. R., Carlini, W. G. and Connors, B. W. (1986) Brain extracellular space: developmental studies in rat optic nerve. *Ann N Y Acad Sci,* **481,** 87-105.

Ransom, B. R., Yamate, C. L. and Connors, B. W. (1985) Activity-dependent shrinkage of extracellular space in rat optic nerve: a developmental study. *J Neurosci,* **5,** 532-535.

Rao, K. V., Panickar, K. S., Jayakumar, A. R. and Norenberg, M. D. (2005) Astrocytes protect neurons from ammonia toxicity. *Neurochem Res,* **30,** 1311-1318.

Raps, S. P., Lai, J. C., Hertz, L. and Cooper, A. J. (1989) Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. *Brain Res,* **493,** 398-401.

Rasmussen, J. T., Faergeman, N. J., Kristiansen, K. and Knudsen, J. (1994) Acyl-CoA-binding protein (ACBP) can mediate intermembrane acyl-CoA transport and donate acyl-CoA for beta-oxidation and glycerolipid synthesis. *Biochem J,* **299 (Pt 1),** 165-170.

Rasmussen, J. T., Rosendal, J. and Knudsen, J. (1993) Interaction of acyl-CoA binding protein (ACBP) on processes for which acyl-CoA is a substrate, product or inhibitor. *Biochem J,* **292 (Pt 3),** 907-913.

Rhodes, K. E., Moon, L. D. and Fawcett, J. W. (2003) Inhibiting cell proliferation during formation of the glial scar: effects on axon regeneration in the CNS. *Neuroscience,* **120,** 41-56.

Ricci, L., Valoti, M., Sgaragli, G. and Frosini, M. (2007) Neuroprotection afforded by diazepam against oxygen/glucose deprivation-induced injury in rat cortical brain slices. *Eur J Pharmacol,* **561,** 80-84.

Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B. et al. (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice. *J Neurosci,* **27,** 7817-7826.

Riond, J., Mattei, M. G., Kaghad, M., Dumont, X., Guillemot, J. C., Le Fur, G., Caput, D. and Ferrara, P. (1991) Molecular cloning and chromosomal localization of a human peripheral-type benzodiazepine receptor. *Eur J Biochem,* **195,** 305-311.

Riond, J., Vita, N., Le Fur, G. and Ferrara, P. (1989) Characterization of a peripheral-type benzodiazepine-binding site in the mitochondria of Chinese hamster ovary cells. *FEBS Lett,* **245,** 238-244.

Rissman, R. A., De Blas, A. L. and Armstrong, D. M. (2007) GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease. *J Neurochem,* **103,** 1285-1292.

Rocchi, A., Orsucci, D., Tognoni, G., Ceravolo, R. and Siciliano, G. (2009) The role of vascular factors in late-onset sporadic Alzheimer's disease. Genetic and molecular aspects. *Curr Alzheimer Res,* **6,** 224-237.

Rogers, C. J., Twyman, R. E. and Macdonald, R. L. (1994) Benzodiazepine and beta-carboline regulation of single GABAA receptor channels of mouse spinal neurones in culture. *J Physiol,* **475,** 69-82.

Rohan de Silva, H. A., Jen, A., Wickenden, C., Jen, L. S., Wilkinson, S. L. and Patel, A. J. (1997) Cell-specific expression of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs and proteins in neurons and astrocytes. *Mol Brain Res,* **47,** 147-156.

Rose, C. R. and Ransom, B. R. (1997) Gap junctions equalize intracellular Na+ concentration in astrocytes. *Glia,* **20,** 299-307.

Rose, T. M., Schultz, E. R., Sasaki, G. C., Kolattukudy, P. E. and Shoyab, M. (1994) Nucleotide sequence and genomic structure of duck acyl-CoA binding protein/diazepam-binding inhibitor: co-localization with S-acyl fatty acid synthase thioesterase. *DNA Cell Biol,* **13,** 669-678.

Rose, T. M., Schultz, E. R. and Todaro, G. J. (1992) Molecular cloning of the gene for the yeast homolog (ACB) of diazepam binding inhibitor/endozepine/acyl-CoA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **89,** 11287-11291.

Rosen, D. R., Martin-Morris, L., Luo, L. Q. and White, K. (1989) A Drosophila gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **86,** 2478-2482.

Rothstein, J. D., McKhann, G., Guarneri, P., Barbaccia, M. L., Guidotti, A. and Costa, E. (1989) Cerebrospinal fluid content of diazepam binding inhibitor in chronic hepatic encephalopathy. *Ann Neurol,* **26,** 57-62.

Roy, A. (1991) Cerebrospinal fluid diazepam binding inhibitor in depressed patients and normal controls. *Neuropharmacology,* **30,** 1441-1444.

Roy, A., Pickar, D., Gold, P., Barbaccia, M., Guidotti, A., Costa, E. and Linnoila, M. (1989) Diazepam-binding inhibitor and corticotropin-releasing hormone in cerebrospinal fluid. *Acta Psychiatr Scand,* **80,** 287-291.

-S-

Sagara, J. I., Miura, K. and Bannai, S. (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *J Neurochem,* **61,** 1672-1676.

Sandberg, M. B., Bloksgaard, M., Duran-Sandoval, D., Duval, C., Staels, B. and Mandrup, S. (2005) The gene encoding acyl-CoA-binding protein is subject to metabolic regulation by both sterol regulatory element-binding protein and peroxisome proliferator-activated receptor alpha in hepatocytes. *J Biol Chem,* **280,** 5258-5266.

Sandbrink, R., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1994) Beta A4-amyloid protein precursor mRNA isoforms without exon 15 are ubiquitously expressed in rat tissues including brain, but not in neurons. *J Biol Chem,* **269,** 1510-1517.

Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W. et al. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature,* **400,** 173-177.

Schjerling, C. K., Hummel, R., Hansen, J. K., Borsting, C., Mikkelsen, J. M., Kristiansen, K. and Knudsen, J. (1996) Disruption of the gene encoding the acyl-CoA-binding protein (ACB1) perturbs acyl-CoA metabolism in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem,* **271,** 22514-22521.

Schmidt, A. M., Vianna, M., Gerlach, M. et al. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem,* **267,** 14987-14997.

Schoemaker, H., Boles, R. G., Horst, W. D. and Yamamura, H. I. (1983) Specific high-affinity binding sites for [3H]Ro 5-4864 in rat brain and kidney. *J Pharmacol Exp Ther,* **225,** 61-69.

Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N. et al. (1987) Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature,* **328,** 221-227.

Schousboe, A. (2003) Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *Neurochem Res,* **28,** 347-352.

Schubert, D., Soucek, T. and Blouw, B. (2009) The induction of HIF-1 reduces astrocyte activation by amyloid beta peptide. *Eur J Neurosci,* **29,** 1323-1334.

Seidah, N. G., Day, R., Marcinkiewicz, M. and Chretien, M. (1998) Precursor convertases: an evolutionary ancient, cell-specific, combinatorial mechanism yielding diverse bioactive peptides and proteins. *Ann N Y Acad Sci,* **839,** 9-24.

Selkoe, D. J. (2001) Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev,* **81,** 741-766.

Selkoe, D. J. (2002) Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science,* **298,** 789-791.

Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F. et al. (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature,* **359,** 325-327.

Sherrin, T., Blank, T., Saravana, R., Rayner, M., Spiess, J. and Todorovic, C. (2009) Region specific gene expression profile in mouse brain after chronic corticotropin releasing factor receptor 1 activation: the novel role for diazepam binding inhibitor in contextual fear conditioning. *Neuroscience,* **162,** 14-22.

Shin, E. H., Lee, H. Y., Kim, S. D., Jo, S. H., Kim, M. K., Park, K. S., Lee, H. and Bae, Y. S. (2006) Trp-Arg-Trp-Trp-Trp-Trp antagonizes formyl peptide receptor like 2-mediated signaling. *Biochem Biophys Res Commun,* **341,** 1317-1322.

Shin, J. H., Kim, S. W., Lim, C. M., Jeong, J. Y., Piao, C. S. and Lee, J. K. (2009) alphaB-crystallin suppresses oxidative stress-induced astrocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 activation. *Neurosci Res,* **64,** 355-361.

Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J. et al. (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science,* **258,** 126-129.

Sieghart, W. (1989) Benzodiazepine receptor subtypes and their possible clinical significance. *Psychopharmacol Ser,* **7,** 131-137.

Sieghart, W. (2000) Unraveling the function of GABA(A) receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci,* **21,** 411-413.

Sieghart, W. and Moehler, H. (1982) [3H]clonazepam, like [3H]flunitrazepam, is a photoaffinity label for the central type of benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol,* **81,** 171-173.

Sieglaff, D. H., Duncan, K. A. and Brown, M. R. (2005) Expression of genes encoding proteins involved in ecdysteroidogenesis in the female mosquito, Aedes aegypti. *Insect Biochem Mol Biol,* **35,** 471-490.

Siiskonen, H., Oikari, S., Korhonen, V. P. et al. (2007) Diazepam binding inhibitor overexpression in mice causes hydrocephalus, decreases plasticity in excitatory synapses and impairs hippocampus-dependent learning. *Mol Cell Neurosci,* **34,** 199-208.

Silver, I. A. and Erecinska, M. (1997) Energetic demands of the Na+/K+ ATPase in mammalian astrocytes. *Glia,* **21,** 35-45.

Silverstein, R. L. and Febbraio, M. (2009) CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal,* **2,** re3.

Slezak, M. and Pfrieger, F. W. (2003) New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci,* **26,** 531-535.

Slobodyansky, E., Antkiewicz-Michaluk, L. and Martin, B. (1994) Purification of a novel DBI processing product, DBI39-75, and characterization of its binding site in rat brain. *Regul Pept,* **50,** 29-35.

Slobodyansky, E., Guidotti, A., Wambebe, C., Berkovich, A. and Costa, E. (1989) Isolation and characterization of a rat brain triakontatetraneuropeptide, a posttranslational product of diazepam binding inhibitor: specific action at the Ro 5-4864 recognition site. *J Neurochem,* **53,** 1276-1284.

Slunt, H. H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A. C., Tanzi, R. E. and Sisodia, S. S. (1994) Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP). *J Biol Chem,* **269,** 2637-2644.

Snyder, M. J. and Feyereisen, R. (1993) A diazepam binding inhibitor (DBI) homolog from the tobacco hornworm, Manduca sexta. *Mol Cell Endocrinol,* **94,** R1-4.

Sofroniew, M. V. (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci,* **32,** 638-647.

Sofroniew, M. V. and Vinters, H. V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol,* **119,** 7-35.

Spisani, S., Pareschi, M. C., Buzzi, M. et al. (1996) Effect of cyclic AMP level reduction on human neutrophil responses to formylated peptides. *Cell Signal,* **8,** 269-277.

Stepien, H., Agro, A., Crossley, J., Padol, I., Richards, C. and Stanisz, A. (1993) Immunomodulatory properties of diazepam-binding inhibitor: effect on human interleukin-6 secretion, lymphocyte proliferation and natural killer cell activity in vitro. *Neuropeptides,* **25,** 207-211.

Stix, B. and Reiser, G. (1998) Beta-amyloid peptide 25-35 regulates basal and hormone-stimulated Ca2+ levels in cultured rat astrocytes. *Neurosci Lett,* **243,** 121-124.

Stridh, M. H., Correa, F., Nodin, C., Weber, S. G., Blomstrand, F., Nilsson, M. and Sandberg, M. (2010) Enhanced glutathione efflux from astrocytes in culture by low extracellular Ca2+ and curcumin. *Neurochem Res,* **35,** 1231-1238.

Su, J. H., Anderson, A. J., Cribbs, D. H., Tu, C., Tong, L., Kesslack, P. and Cotman, C. W. (2003) Fas and Fas ligand are associated with neuritic degeneration in the AD brain and participate in beta-amyloid-induced neuronal death. *Neurobiol Dis,* **12,** 182-193.

Su, S. B., Gong, W., Gao, J. L., Shen, W., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J. and Wang, J. M. (1999a) A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med,* **189,** 395-402.

Su, S. B., Gong, W. H., Gao, J. L., Shen, W. P., Grimm, M. C., Deng, X., Murphy, P. M., Oppenheim, J. J. and Wang, J. M. (1999b) T20/DP178, an ectodomain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41, is an activator of human phagocyte N-formyl peptide receptor. *Blood,* **93,** 3885-3892.

Sudakov, S. K., Medvedeva, O. F., Rusakova, I. V., Terebilina, N. N. and Goldberg, S. R. (2001) Differences in genetic predisposition to high anxiety in two inbred rat strains: role of substance P, diazepam binding inhibitor fragment and neuropeptide Y. *Psychopharmacology (Berl),* **154,** 327-335.

Sun, R., Iribarren, P., Zhang, N. et al. (2004) Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled formyl peptide receptor. *J Immunol,* **173,** 428-436.

Suzuki, N., Cheung, T. T., Cai, X. D., Odaka, A., Otvos, L., Jr., Eckman, C., Golde, T. E. and Younkin, S. G. (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science,* **264,** 1336-1340.

Swinnen, J. V., Alen, P., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1998) Identification of diazepam-binding Inhibitor/Acyl-CoA-binding protein as a sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem,* **273,** 19938-19944.

Swinnen, J. V., Esquenet, M., Heyns, W., Rombauts, W. and Verhoeven, G. (1994) Androgen regulation of the messenger RNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein in the human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Mol Cell Endocrinol,* **104,** 153-162.

Swinnen, J. V., Esquenet, M., Rosseels, J., Claessens, F., Rombauts, W., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1996a) A human gene encoding diazepam-binding inhibitor/acy1-CoA-binding protein: transcription and hormonal regulation in the androgen-sensitive human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *DNA Cell Biol,* **15,** 197-208.

Swinnen, J. V., Vercaeren, I., Esquenet, M., Heyns, W. and Verhoeven, G. (1996b) Androgen regulation of the messenger RNA encoding diazepam-binding inhibitor/acyl-CoA-binding protein in the rat. *Mol Cell Endocrinol,* **118,** 65-70.

-T-

Takano, T., Fiore, S., Maddox, J. F., Brady, H. R., Petasis, N. A. and Serhan, C. N. (1997) Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 (LXA4) and LXA4 stable analogues are potent inhibitors of acute inflammation: evidence for anti-inflammatory receptors. *J Exp Med,* **185,** 1693-1704.

Takuma, K., Yan, S. S., Stern, D. M. and Yamada, K. (2005) Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J Pharmacol Sci,* **97,** 312-316.

Talwar, D. and Sher, P. K. (1987) Benzodiazepine receptor development in murine glial cultures. *Dev Neurosci,* **9,** 183-189.

Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M. and Danni, O. (2003) Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med,* **35,** 45-58.

Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., Kimura, J., Nakamura, S. and Ueda, K. (1989) Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun,* **165,** 1406-1414.

Tarr, P. T. and Edwards, P. A. (2008) ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J Lipid Res,* **49,** 169-182.

Taupin, V., Gogusev, J., Descamps-Latscha, B. and Zavala, F. (1993) Modulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression in human monocytes by an endogenous anxiogenic benzodiazepine ligand, triakontatetraneuropeptide: evidence for a role of prostaglandins. *Mol Pharmacol,* **43,** 64-69.

Taupin, V., Herbelin, A., Descamps-Latscha, B. and Zavala, F. (1991) Endogenous anxiogenic peptide, ODN-diazepam-binding inhibitor, and benzodiazepines enhance the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human monocytes. *Lymphokine Cytokine Res,* **10,** 7-13.

Tavolaro, R., Canonaco, M. and Franzoni, M. F. (1993) A quantitative autoradiographic study of GABAA and benzodiazepine receptors in the brain of the frog, Rana esculenta. *Brain Behav Evol,* **42,** 171-177.

Tenen, S. S. and Hirsch, J. D. (1980) beta-Carboline-3-carboxylic acid ethyl ester antagonizes diazepam activity. *Nature,* **288,** 609-610.

Thoeringer, C. K., Binder, E. B., Salyakina, D. et al. (2007) Association of a Met88Val diazepam binding inhibitor (DBI) gene polymorphism and anxiety disorders with panic attacks. *J Psychiatr Res,* **41,** 579-584.

Tiffany, H. L., Lavigne, M. C., Cui, Y. H., Wang, J. M., Leto, T. L., Gao, J. L. and Murphy, P. M. (2001) Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem,* **276,** 23645-23652.

Todaro, G. J., Rose, T. M. and Shoyab, M. (1991) Human DBI (endozepine): relationship to a homologous membrane associated protein (MA-DBI). *Neuropharmacology,* **30,** 1373-1380.

Todd, S. and Naylor, S. L. (1992) New chromosomal mapping assignments for argininosuccinate synthetase pseudogene 1, interferon-beta 3 gene, and the diazepam binding inhibitor gene. *Somat Cell Mol Genet,* **18,** 381-385.

Tokay, T., Hachem, R., Masmoudi-Kouki, O. et al. (2008) Beta-amyloid peptide stimulates endozepine release in cultured rat astrocytes through activation of N-formyl peptide receptors. *Glia,* **56,** 1380-1389.

Tokay, T., Masmoudi, O., Gandolfo, P., Leprince, J., Pelletier, G., Vaudry, H. and Tonon, M. C. (2005) Beta-amyloid peptides stimulate endozepine biosynthesis in cultured rat astrocytes. *J Neurochem,* **94,** 607-616.

Tong, Y., Rheaume, E., Simard, J. and Pelletier, G. (1991a) Localization of peripheral benzodiazepine binding sites and diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in mammary glands and dimethylbenz(a)antracene (DMBA)-induced mammary tumors in the rat. *Regul Pept,* **33,** 263-273.

Tong, Y., Toranzo, D. and Pelletier, G. (1991b) Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution in situ hybridization. *Neuropeptides,* **20,** 33-40.

Tonon, M. C., Adjeroud, S., Lamacz, M., Louiset, E., Danger, J. M., Desrues, L., Cazin, L., Nicolas, P. and Vaudry, H. (1989) Central-type benzodiazepines and the octadecaneuropeptide modulate the effects of GABA on the release of alpha-melanocyte-stimulating hormone from frog neurointermediate lobe in vitro. *Neuroscience,* **31,** 485-493.

Tonon, M. C., Desy, L., Nicolas, P., Vaudry, H. and Pelletier, G. (1990) Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides,* **15,** 17-24.

Tonon, M. C., Leprince, J., Gandolfo, P., Compère, V., Pelletier, G., Malagon, M. and Vaudry, H. (2006) *Endozepines. In "Handbook of Biologically Active Peptides"*. Elsevier

Toranzo, D., Tong, Y., Tonon, M. C., Vaudry, H. and Pelletier, G. (1994) Localization of diazepam-binding inhibitor and peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat ovary. *Anat Embryol (Berl),* **190,** 383-388.

Torgner, I. and Kvamme, E. (1990) Synthesis of transmitter glutamate and the glial-neuron interrelationship. *Mol Chem Neuropathol,* **12,** 11-17.

Toro, V. C., Tehranian, R., Zetterstrom, M., Eriksson, G., Langel, U., Bartfai, T. and Iverfeld, K. (2001) Increased gene expression of interleukin-1alpha and interleukin-6 in rat primary glial cells induced by beta-amyloid fragment. *J Mol Neurosci,* **17,** 341-350.

Tretter, V., Ehya, N., Fuchs, K. and Sieghart, W. (1997) Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci,* **17,** 2728-2737.

-U-

Ueda, K., Shinohara, S., Yagami, T., Asakura, K. and Kawasaki, K. (1997) Amyloid beta protein potentiates Ca2+ influx through L-type voltage-sensitive Ca2+ channels: a possible involvement of free radicals. *J Neurochem,* **68,** 265-271.

Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S. and Barres, B. A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science,* **291,** 657-661.

-V-

Vanoye, C. G., Castro, A. F., Pourcher, T., Reuss, L. and Altenberg, G. A. (1999) Phosphorylation of P-glycoprotein by PKA and PKC modulates swelling-activated Cl- currents. *Am J Physiol,* **276,** C370-378.

Vaudry, H., Tonon, M. C., Delarue, C., Vaillant, R. and Kraicer, J. (1978) Biological and radioimmunological evidence for melanocyte stimulating hormones (MSH) of extrapituitary origin in the rat brain. *Neuroendocrinology,* **27,** 9-24.

Vidnyanszky, Z., Gorcs, T. J. and Hamori, J. (1994) Diazepam binding inhibitor fragment 33-50 (octadecaneuropeptide) immunoreactivity in the cerebellar cortex is restricted to glial cells. *Glia,* **10,** 132-141.

Vitalis, T., Fouquet, C., Alvarez, C., Seif, I., Price, D., Gaspar, P. and Cases, O. (2002) Developmental expression of monoamine oxidases A and B in the central and peripheral nervous systems of the mouse. *J Comp Neurol,* **442,** 331-347.

Vock, C., Doring, F. and Nitz, I. (2008) Transcriptional regulation of HMG-CoA synthase and HMG-CoA reductase genes by human ACBP. *Cell Physiol Biochem,* **22,** 515-524.

Volterra, A. and Meldolesi, J. (2005) Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci,* **6,** 626-640.

-W-

Waldvogel, H. J., Kubota, Y., Fritschy, J., Mohler, H. and Faull, R. L. (1999) Regional and cellular localisation of GABA(A) receptor subunits in the human basal ganglia: An autoradiographic and immunohistochemical study. *J Comp Neurol,* **415,** 313-340.

Walther, A., Riehemann, K. and Gerke, V. (2000) A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol Cell,* **5,** 831-840.

Wang, J. L., Wang, J. X. and Zhao, X. F. (2008) Molecular cloning and expression profiles of the acyl-CoA-binding protein gene from the cotton bollworm Helicoverpa armigera. *Arch Insect Biochem Physiol,* **68,** 79-88.

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E. and Solomon, F. (1992) Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **89,** 10758-10762.

Watt, J. A., Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J. and Cotman, C. W. (1994) Ultrastructural analysis of beta-amyloid-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *Brain Res,* **661,** 147-156.

Webb, N. R., Rose, T. M., Malik, N., Marquardt, H., Shoyab, M., Todaro, G. J. and Lee, D. C. (1987) Bovine and human cDNA sequences encoding a putative benzodiazepine receptor ligand. *DNA,* **6,** 71-79.

Wei, W., Norton, D. D., Wang, X. and Kusiak, J. W. (2002) Abeta 17-42 in Alzheimer's disease activates JNK and caspase-8 leading to neuronal apoptosis. *Brain,* **125,** 2036-2043.

Wender, R., Brown, A. M., Fern, R., Swanson, R. A., Farrell, K. and Ransom, B. R. (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J Neurosci,* **20,** 6804-6810.

Wenzel-Seifert, K. and Seifert, R. (1993) Cyclosporin H is a potent and selective formyl peptide receptor antagonist. Comparison with N-t-butoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucyl-L-phenylalanyl-L- leucyl-L-phenylalanine and cyclosporins A, B, C, D, and E. *J Immunol,* **150,** 4591-4599.

Wewers, M. D. (2004) IL-1beta: an endosomal exit. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **101,** 10241-10242.

Whittemore, E. R., Loo, D. T., Watt, J. A. and Cotman, C. W. (1995) A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience,* **67,** 921-932.

Wildmann, J. (1988) Increase of natural benzodiazepines in wheat and potato during germination. *Biochem Biophys Res Commun,* **157,** 1436-1443.

Wildmann, J., Mohler, H., Vetter, W., Ranalder, U., Schmidt, K. and Maurer, R. (1987) Diazepam and N-desmethyldiazepam are found in rat brain and adrenal and may be of plant origin. *J Neural Transm,* **70,** 383-398.

Wildmann, J., Niemann, J. and Matthaei, H. (1986) Endogenous benzodiazepine receptor agonist in human and mammalian plasma. *J Neural Transm,* **66,** 151-160.

Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H. and Pekny, M. (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **103,** 17513-17518.

Willis, M., Kaufmann, W. A., Wietzorrek, G. et al. (2010) L-type calcium channel CaV 1.2 in transgenic mice overexpressing human AbetaPP751 with the London (V717I) and Swedish (K670M/N671L) mutations. *J Alzheimers Dis,* **20,** 1167-1180.

Wisor, J. P., Edgar, D. M., Yesavage, J., Ryan, H. S., McCormick, C. M., Lapustea, N. and Murphy, G. M., Jr. (2005) Sleep and circadian abnormalities in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: a role for cholinergic transmission. *Neuroscience,* **131,** 375-385.

Wolfe, M. S. (2008) Inhibition and modulation of gamma-secretase for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics,* **5,** 391-398.

Wolff, J. R., Stuke, K., Missler, M., Tytko, H., Schwarz, P., Rohlmann, A. and Chao, T. I. (1998) Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: a new view on cellular autoregulation during process formation. *Glia,* **24,** 121-140.

Woods, M. J., Zisterer, D. M. and Williams, D. C. (1996) Two cellular and subcellular locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor in rat liver. *Biochem Pharmacol,* **51,** 1283-1292.

Wu, C., Wong, T., Wu, X., Sheppy, E. and Zhang, L. (2009) Adenosine as an endogenous regulating factor of hippocampal sharp waves. *Hippocampus,* **19,** 205-220.

Wu, K. L., Hsu, C. and Chan, J. Y. (2007) Impairment of the mitochondrial respiratory enzyme activity triggers sequential activation of apoptosis-inducing factor-dependent and caspase-dependent signaling pathways to induce apoptosis after spinal cord injury. *J Neurochem,* **101,** 1552-1566.

-X-

Xia, W., Zhang, J., Perez, R., Koo, E. H. and Selkoe, D. J. (1997) Interaction between amyloid precursor protein and presenilins in mammalian cells: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94,** 8208-8213.

-Y-

Yamagishi, H. and Kawaguchi, M. (1998) Characterization of central- and peripheral-type benzodiazepine receptors in rat salivary glands. *Biochem Pharmacol,* **55,** 209-214.

Yan, S. F., Ramasamy, R. and Schmidt, A. M. (2010) Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol,* **79,** 1379-1386.

Yanagibashi, K., Ohno, Y., Kawamura, M. and Hall, P. F. (1988) The regulation of intracellular transport of cholesterol in bovine adrenal cells: purification of a novel protein. *Endocrinology,* **123,** 2075-2082.

Yanase, H., Shimizu, H., Kanda, T., Fujii, H. and Iwanaga, T. (2001) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor (DBI) in the gastrointestinal tract of mice and its coexistence with the fatty acid binding protein (FABP). *Arch Histol Cytol,* **64,** 449-460.

Yanase, H., Shimizu, H., Yamada, K. and Iwanaga, T. (2002) Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein. *Arch Histol Cytol,* **65,** 27-36.

Yang, D., Chen, Q., Le, Y., Wang, J. M. and Oppenheim, J. J. (2001a) Differential regulation of formyl peptide receptor-like 1 expression during the differentiation of monocytes to dendritic cells and macrophages. *J Immunol,* **166,** 4092-4098.

Yang, F., Sun, X., Beech, W., Teter, B., Wu, S., Sigel, J., Vinters, H. V., Frautschy, S. A. and Cole, G. M. (1998) Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. *Am J Pathol,* **152,** 379-389.

Yang, Y., Pritchard, P. H., Bhuiyan, J., Seccombe, D. W. and Moghadasian, M. H. (2001b) Overexpression of acyl-coA binding protein and its effects on the flux of free fatty acids in McA-RH 7777 cells. *Lipids,* **36,** 595-600.

Yoshida, H., Tsunoda, Y. and Owyang, C. (1999) Diazepam-binding inhibitor33-50 elicits Ca2+ oscillation and CCK secretion in STC-1 cells via L-type Ca2+ channels. *Am J Physiol,* **276,** G694-702.

Young, J. K. (1994) Immunoreactivity for diazepam binding inhibitor in Gomori-positive astrocytes. *Regul Pept,* **50,** 159-165.

-Z-

Zhang, Z., Chen, G., Zhou, W., Song, A., Xu, T., Luo, Q., Wang, W., Gu, X. S. and Duan, S. (2007) Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol,* **9,** 945-953.

Zhao, G., Mao, G., Tan, J., Dong, Y., Cui, M. Z., Kim, S. H. and Xu, X. (2004) Identification of a new presenilin-dependent zeta-cleavage site within the transmembrane domain of amyloid precursor protein. *J Biol Chem,* **279,** 50647-50650.

Zhao, J., Fu, Y., Yasvoina, M. et al. (2007) Beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci,* **27,** 3639-3649.

Résumé

Les endozépines (EZ) forment une famille de peptides, incluant le *diazepam-binding inhibitor* (DBI) et ses dérivés dont l'octadécaneuropeptide (ODN) qui sont produits par les cellules astrogliales dans le système nerveux central (SNC) des mammifères. Plusieurs neuropeptides dont le bêta-amyloïde (βA) modulent la libération des EZ *in vitro*, et le taux d'EZ est augmenté dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA). Cette pathologie est caractérisée notamment par des dépôts de βA, une astrogliose, une libération d'interleukine 1β (IL-1β) et une production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). Le but de ce travail était d'identifier les récepteurs et les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'effet du βA sur la libération d'EZ, ainsi que le rôle de ces EZ libérées dans les effets du βA sur l'activité astrocytaire.

Nous montrons que, sur des astrocytes de rat en culture, le βA interagit avec les récepteurs des peptides N-formylés (FPRs) positivement couplés à l'adénylyl cyclase (AC) et la phospholipase C (PLC). La libération d'EZ induite par le βA est mimée par deux agonistes des FPRs, et elle est totalement abolie par le N-t-Boc-FLFLF, un antagoniste de ces mêmes récepteurs. L'activation des protéines kinase A (PKA) et C (PKC) qui s'en suit, ainsi qu'un influx calcique, sont indispensables à la libération d'EZ induite par le βA. Enfin, la translocation des EZ vers le milieu extracellulaire s'effectue *via* des transporteurs du type *ATP-binding cassette* (ABC) sensibles au glyburide.

L'effet du βA sur la prolifération astrocytaire, est mimé par un agoniste des FPRs et il est bloqué par l'antagoniste. L'effet du βA est également reproduit par l'ODN, qui agit probablement *via* deux sites d'affinités différentes. De plus, le peptide ODN favorise la survie des astrocytes. La libération d'IL-1β induite par le βA, suit celle des EZ de quelques heures. Néanmoins, l'ODN exerce globalement un effet inhibiteur sur l'expression d'IL-1β suggèrant que le βA stimule indépendemment la libération de ces deux composés. En accord avec un rôle de l'ODN sur la survie des astrocytes, le peptide réduit la production de ROS induite par le H_2O_2 en stimulant l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase. L'ODN bloque aussi l'action du H_2O_2 sur le potentiel mitochondrial et l'activité de la caspase 3.

L'ensemble de nos résultats indique donc que le βA stimule la libération d'EZ *via* l'activation de FPRs positivement couplés aux voies AC/PKA et PLC/PKC. La translocation des EZ vers le milieu extracellulaire est PKA-, PKC- et Ca^{2+}- dépendante et met en jeu des transporteurs ABC. Les EZ libérées peuvent à leur tour mimer l'effet du βA sur la prolifération astrocytaire et contrecarrer certains effets délétères du βA en favorisant notamment la survie cellulaire.

Mots clés : endozépines – bêta-amyloïde – astrocytes – récepteurs des peptides N-formylés – transporteurs ABC – prolifération/survie.