

Université de Montréal

**Impact de l'expression du bFGF par les astrocytes du
mésencéphale sur le développement et la fonction synaptique
des neurones dopaminergiques**

par
Caroline Forget

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention de grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en Pharmacologie

11634517

Avril, 2005

© Caroline Forget, 2005



W

4

U58

2005

V. 156

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Impact de l'expression du bFGF par les astrocytes du mésencéphale sur
le développement et la fonction synaptique des neurones
dopaminergiques**

Présenté par :
Caroline Forget

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jean-François Gauchat
Président-rapporteur

Dr. Louis-Éric Trudeau
Directeur de recherche

Dr. Jane Stewart
Co-directeur de recherche

Dr. Guy Massicotte
Membre du jury

RÉSUMÉ

La dépendance aux drogues d'abus, comme l'amphétamine, est associée à plusieurs adaptations dans le système nerveux central, comme par exemple la sensibilisation comportementale. La sensibilisation représente une plus grande réponse de l'organisme aux effets psychomoteurs de la drogue. Ces effets impliquent l'action de la drogue dans la région de l'aire tegmentaire ventrale (ATV) dans le cerveau où sont situés les neurones dopaminergiques (DAergiques). Des études *in vivo* ont suggéré que la sensibilisation à l'amphétamine nécessite l'expression du *basic fibroblast growth factor* (bFGF) par les astrocytes du mésencéphale. Le rôle et la fonction du bFGF astrocytaire dans le mésencéphale ainsi que son implication dans la plasticité des neurones DAergiques ne sont pour l'instant pas très bien compris. Afin d'éclaircir ce point, nous avons utilisé un modèle de culture cellulaire contenant des astrocytes et des neurones DAergiques provenant du mésencéphale de rat. Nos résultats montrent que la majorité des astrocytes en culture expriment le bFGF de façon nucléaire. Malgré cette expression importante, le bFGF ne semble pas être sécrété. Par ailleurs, nous avons observé que l'ajout de bFGF exogène favorise la fonction synaptique des neurones DAergiques malgré une faible baisse du nombre de synapses. La mise au point d'une technique d'interférence à l'ARN (siRNA) contre le bFGF, nous a permis de diminuer son expression endogène dans les astrocytes. Suite aux traitements avec le siRNA contre le bFGF nous avons noté une diminution de la fonction synaptique des neurones DAergiques sans aucun changement dans le développement synaptique. En conclusion, nos travaux suggèrent que l'expression du bFGF nucléaire dans les astrocytes est susceptible d'influencer la fonction des

neurones dopaminergiques par l'intermédiaire d'interactions gliales-neuronales indirectes qui ne nécessitent pas la sécrétion de ce facteur de croissance.

Mots-clés : Astrocytes, bFGF, développement synaptique, libération de dopamine

ABSTRACT

Drugs of abuse like amphetamine (AMPH) cause a number of adaptations in the central nervous system. For example, behavioural sensitization to AMPH results in a greater response of organisms to the psychomotor effects of the drug. These effects require action of the drugs in the ventral tegmental area in the brain where DA neurons are located. In vivo studies suggest that AMPH sensitization requires enhanced expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in midbrain astrocytes. The exact role and function of astrocytic bFGF in the mesencephalon and the link between its enhanced expression and long-term plasticity in DA neurons is unclear. To address these questions we used a cell-culture model of rat mesencephalic astrocytes and DA neurons. Our results show that the majority of mesencephalic astrocytes in culture express bFGF at a nuclear level. In spite of this important expression, bFGF does not appear to be secreted. Moreover, exogenous bFGF enhances synaptic function without increasing their development. Next, we developed a RNA interference (siRNA) strategy to decrease endogenous bFGF mRNA levels. Treatment with siRNA against bFGF caused a reduction in DA release but produced no change in synaptic development. In summary, our results show that expression of nuclear bFGF in astrocytes is likely to influence the function of DAergic neurons indirectly through glial-neuronal interactions that do not require secretion of this peptide.

Keywords: astrocytes, bFGF, synapse formation, dopamine release

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
ABSTRACT.....	v
TABLE DES MATIÈRES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xii
REMERCIEMENTS.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
1. Système dopaminergique.....	2
1.1 Métabolisme de la dopamine.....	2
1.2 Anatomie fonctionnelle.....	5
2. Dysfonctions du système dopaminergique.....	10
2.1 La maladie de Parkinson.....	10
2.2 La schizophrénie.....	14
2.3 La dépendance aux drogues d'abus.....	17
3. Dépendance aux drogues d'abus : Le cas de l'amphétamine.....	20
3.1 Propriétés pharmacologiques de l'amphétamine.....	20
3.2 Mécanisme d'action de l'amphétamine.....	22
3.2.1 A l'échelon cellulaire : À la synapse.....	22
3.2.2 Effets comportementaux de la prise d'amphétamine chez l'animal.....	24

3.3 La tolérance et la sensibilisation à l'amphétamine.....	25
3.4 Le développement de la sensibilisation à l'amphétamine.....	26
4. Les cellules gliales et le bFGF.....	32
4.1 Rôles des cellules gliales dans le système nerveux central.....	32
4.2 Le <i>basic fibroblast growth factor</i> (bFGF).....	39
5. Objectifs de l'étude.....	44
 ARTICLE.....	 45
Accord des coauteurs.....	46
Page titre et « Acknowledgements ».....	47
Abstract.....	48
Introduction.....	49
Materials and Methods.....	51
Results.....	58
Discussion.....	62
References.....	67
Figure legends.....	80
 DISCUSSION.....	 90
6. Considérations méthodologiques.....	91
6.1 Utilisation de la culture cellulaire.....	91
6.2 Échantillonnage et mesure de la dopamine.....	94
6.3 Interférence à l'ARN : siRNA.....	97

7. Expression du bFGF dans notre model experimental.....	101
7.1 La controverse continue, le bFGF est-il sécrété?.....	101
7.2 Les effets du bFGF exogène sur le développement neuronal.....	104
7.3 L'hypothèse de la signalisation intracrine.....	106
8. Perspectives.....	110
9. Conclusion.....	114
BIBLIOGRAPHIE.....	115
ANNEXES.....	xv
Annexe I.....	xvi
Annexe II.....	xviii

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 4.0 :

Actions du bFGF dans différents systèmes.....	41
--	-----------

LISTE DES FIGURES

Figure 1.0 : Voies de synthèse des catécholamines.....	3
Figure 1.1 : Dégradation enzymatique de la dopamine.....	4
Figure 1.2 : Voies dopaminergiques centrales.....	7
Figure 2.0 : Neuropathologie de la maladie de Parkinson.....	13
Figure 2.1 : Représentation schématique du modèle neurodéveloppemental.....	16
Figure 3.0 : Structure chimique de l'amphétamine et d'un analogue...	21
Figure 3.1 : Schéma des effets synaptiques possibles de l'amphétamine.....	23
Figure 3.2 : Représentation schématique des étapes possibles impliquées dans la sensibilisation comportementale.....	31
Figure 4.0 : Récepteurs et voies de signalisation de quelques facteurs de croissance.....	37
Figure 4.1 : Récepteur et voies de signalisation du bFGF	38
Figure 6.0 : Électro-oxydation de la dopamine.....	94
Figure 6.1 : Schéma du mécanisme d'action de l'interférence à l'ARN.	100
Figure 7.0 : Schéma hypothétique de la signalisation intranucléaire du bFGF et du FGFR1.....	107

Figures de l'article

Figure 1: bFGF is expressed in the majority of cultured astrocytes.....	84
Figure 2: bFGF does not appear to be secreted.....	85
Figure 3: Extracellular bFGF does not increase synaptic development.	86
Figure 4: Exogenous bFGF enhances dopamine release.....	87
Figure 5: RNA interference decreases bFGF levels.....	88
Figure 6: bFGF siRNA decrease dopamine release but not synapse number.....	89

Figures des annexes

Figure annexe I.....	xvii
Figure annexe II.....	xx

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3-MT :	3-méthoxytyramine
6-OHDA :	6-hydroxy-dopamine
AMPH :	amphétamine
ATV :	aire tegmentaire ventrale
BDNF :	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bFGF :	<i>basic fibroblast growth factor</i>
CL :	corps de Lewi
CNTF :	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
COMT :	catéchol-O-méthyltransférase
CPF :	cortex pré-frontal
CPP :	acide 3-(2-carboxypiperazine-4-yl)propyl-1-phosphorique
DA :	dopamine
DAergique :	dopaminergique
DAT :	transporteur membranaire de la dopamine
DOPAC :	3,4-dihydroxyphenylalanine
GDNF :	<i>glial derived neurotrophic factor</i>
GFAP :	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
HS:	héparan sulfate
HVA:	acide homovanillique
IV :	intra veineux
KYN :	acide kynurénique

L-DOPA :	L-dihydroxyphenylalanine
LTP :	potentialisation à long terme
MAO :	monoamine oxydase
Nacc :	noyau accumbens
NT-3 :	neurotrophine-3
PET :	<i>positron emission tomography</i>
RE :	réticulum endoplasmique
SN _c (SN _{pc}):	substance noire compacte
SNC :	système nerveux central
SPECT :	<i>single-photon emission computerized tomography</i>
TH:	tyrosine hydroxylase
TK:	tyrosine kinase
VMAT:	transporteur vésiculaire de la dopamine

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr Louis-Éric Trudeau qui m'a donné la chance de travailler dans son laboratoire, qui a su être très présent, patient et qui m'a apporté une aide pédagogique extraordinaire tout au long de mes études supérieures.

Merci à Marie-Josée Bourque dont le travail exceptionnel m'a permis d'accomplir un travail de première qualité. En plus de sa grande présence, son écoute et ses encouragements qui ont été profitables.

À tout les membres du labo Trudeau, merci d'avoir été drôles, attentionnés, à l'écoute, compatissants et pleins d'entrain. Je crois qu'une bonne ambiance dans notre milieu de travail c'est primordial et ça en va de soit de la motivation qui nous pousse à bien travailler.

Évidemment mon partenaire de vie, mon amour et mon ami Dave qui a su m'écouter, m'appuyer et m'encourager. Il m'a permis de réaliser de grande chose et je lui en suis très reconnaissante. Mes parents, ma mère Suzette et mon père Pierre, dont le support, les encouragements et leur grande confiance m'ont permis de faire ce que je voulais dans la vie. Finalement, un énorme merci à tous mes amis (es) qui m'ont continuellement encouragé, écouté et conseillé.

Introduction

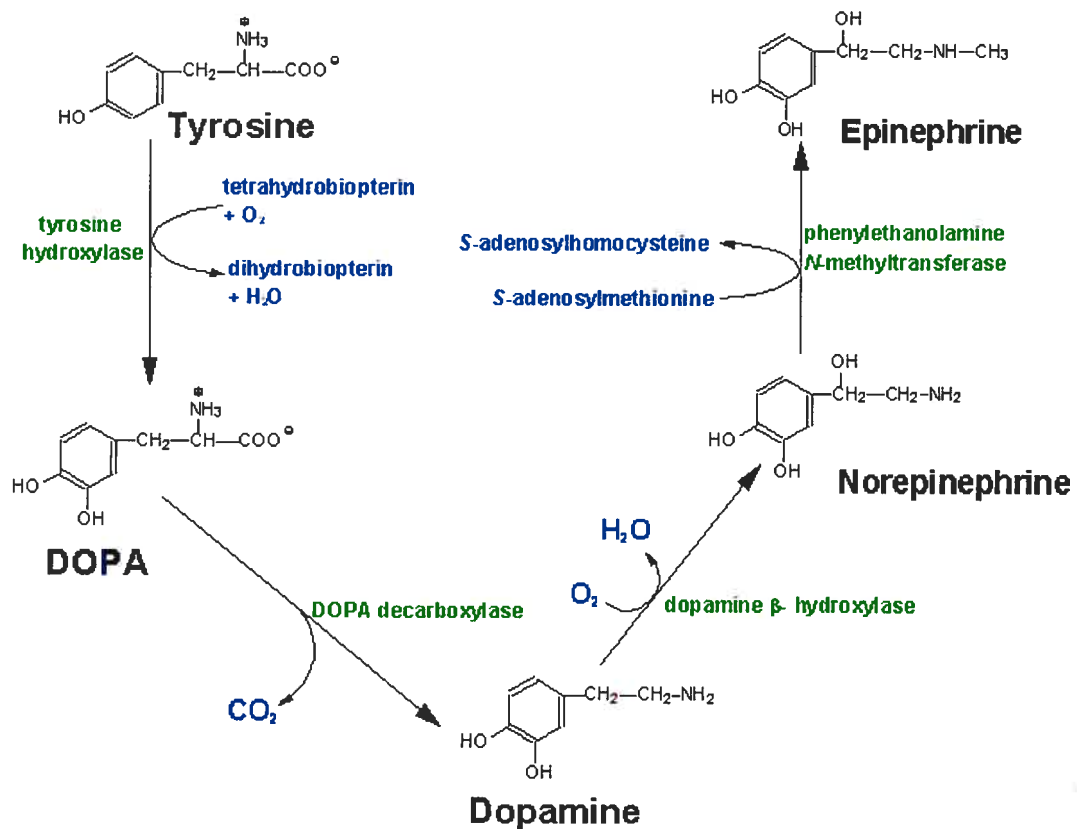
1. Le système dopaminergique

1.1 Métabolisme de la dopamine

La famille des catécholamines, aussi nommées amines biogènes, comprend la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline. Ces transmetteurs sont synthétisés à partir de l'acide aminé tyrosine (Schwartz, 1991) (figure 1.0). La voie de biosynthèse de ces neurotransmetteurs implique cinq enzymes. D'abord, la L-tyrosine atteint le neurone via la circulation sanguine et est convertie en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) via l'action de la tyrosine hydroxylase (TH). Par la suite, la L-DOPA décarboxylase permet la production de dopamine. La dopamine β -hydroxylase convertit la dopamine en noradrénaline et l'enzyme phényléthanolamine N-méthyl transférase convertit la noradrénaline en adrénaline.

C'est en 1958 que Carlsson et al. (Carlsson A. et al, 1958) suggèrent que la 3-hydroxytyramine (dopamine) ne soit pas qu'une simple étape dans la biosynthèse de la noradrénaline et de l'adrénaline, mais un transmetteur à part entière.

Figure 1.0 Voies de synthèse des catécholamines

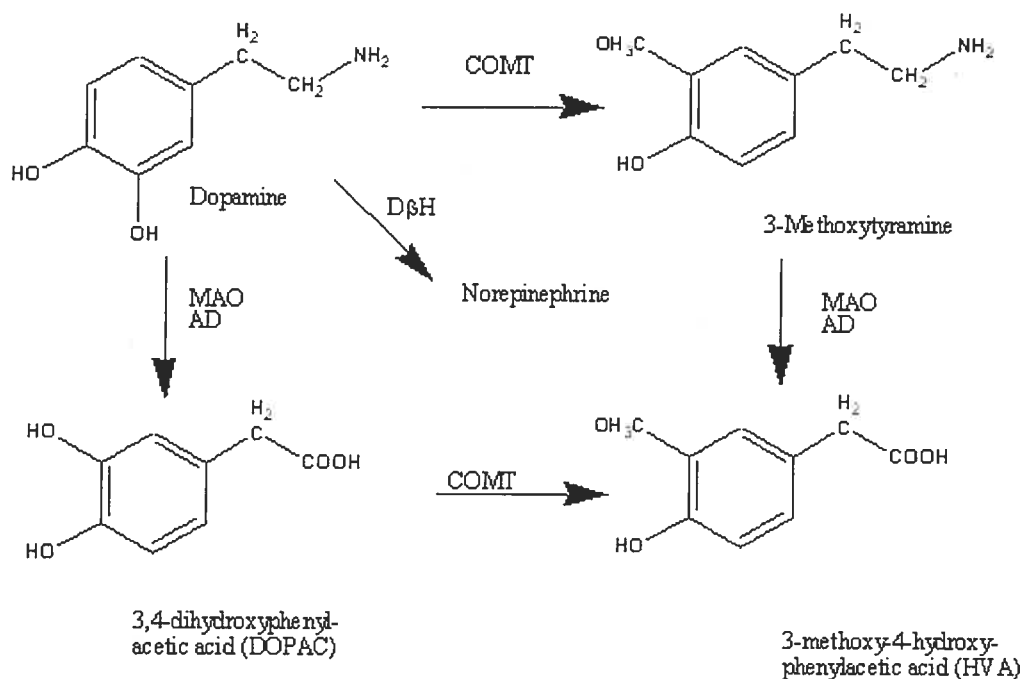


Tiré de : www.bio.davidson.edu.htm

Suite à sa libération, la dopamine peut être soit dégradée ou recapturée. La dégradation produit trois métabolites: la 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPAC), l'acide homovanillic (HVA) et le 3-méthoxytyramine (3-MT) (figure 1.1). La dopamine intracellulaire est convertie en DOPAC par la monoamine oxydase (MAO). Le DOPAC est apte à diffuser à l'extérieur du neurone pour être éliminé du cerveau ou pris en charge par la catéchol-O-méthyltransférase (COMT) qui le converti en

HVA. Finalement, cette même enzyme, la COMT, peut également métaboliser la dopamine en 3-MT. Quoique éliminé rapidement du cerveau la DOPAC et le HVA sont couramment utilisés comme indicateur de la synthèse (catabolisme) de dopamine. Le 3-MT, quant à lui, est éliminé plus lentement du système nerveux central (SNC) et a déjà servi d'indicateur de la libération de dopamine (Carlsson & Lindqvist, 1963; Korf et al, 1976).

Figure 1.1 Dégradation enzymatique de la dopamine



Tiré de: Okereke, 2002

La recapture constitue le principal processus d'inactivation de la dopamine. Une fois la dopamine dans l'espace extracellulaire celle-ci est transportée vers l'intérieur de la cellule, où elle sera en partie recyclée. Plus de 80% de la dopamine libérée est ainsi recapturée (Thibaut et al, 1995). L'effecteur principal de ce mécanisme est le transporteur membranaire de la dopamine (DAT). La recapture via le DAT se fait selon un mécanisme dépendant du sodium (Na^+) qui permet l'entrée des monoamines dans la terminaison nerveuse contre leur gradient de concentration (Giros et al, 1991; Giros et al, 1996).

1.2 Anatomie fonctionnelle

La découverte de techniques d'histochemie a permis la visualisation des corps cellulaires et des projections associées aux catécholamines dans le SNC. Cette méthode de marquage fût découverte en 1955 par Eränkö (Eranko O. 1955). Cependant, sa mise au point revient à Carlsson, Falck et Hillarp, (Carlsson et al, 1962). La technique de fluorescence histochemie consiste à exposer les tissus à des vapeurs de formaldéhyde, ce traitement produit la condensation des catécholamines et forme un produit nommé isoquinoline. Quand ils sont exposés à la lumière ultra violet les agrégats d'isoquinolines émettent une lueur fluorescente verte claire. Cette méthode d'histofluorescence fournit alors des indications sur l'emplacement des corps cellulaires et des projections des cellules nerveuses contenant des catécholamines (Dahlstroem A., 1964; Fuxe, 1965). Cette approche, combiné à

d'autres techniques, a permis de cartographier les voies dopaminergiques centrales (Ungerstedt, 1971) (Figure 1.2). De nos jours la technique d'histofluorescence tel que décrit par Carlsson, Falck et Hillarp (Carlsson et al, 1962) est encore utilisée. Par contre, elle est maintenant largement supplantée par les techniques d'immuno marquage. Ces dernières utilisent des anticorps dirigés contre des enzymes de synthèse comme la TH (Hökfelt et al, 1984) ou contre le transmetteur lui-même, la dopamine (DA) (Geffard et al, 1984; Decavel et al, 1987). Toutes ces techniques on permit de visualiser et de cartographier, d'interpréter et de comprendre les voies dopaminergiques centrales. Les cellules dopaminergiques sont regroupées dans le mésencéphale selon un patron bien précis (Dahlstroem A., 1964). La nomenclature de ces groupes de cellules dopaminergiques, établit en 1964 par Dalström et Fuxe, est représenté par la lettre A et les différentes régions sont subdivisées selon les chiffres 8 à 15. Dans l'étude qui suit nous aborderons principalement les régions A9 constitué de la substance noire et A10 qui représente l'aire tegmentaire ventrale.

Suite à la mise en évidences de ces groupes de cellules dopaminergiques, l'étude de leurs projections a permis la découverte d'une organisation topographique intéressante (Fallon et al, 1978; Moore, 1978; Fallon & Moore, 1978a). Les principales projections dopaminergiques peuvent être regroupées en trois systèmes majeurs : le système nigrostrié, le système mésolimbique et le système mésocortical (Fallon & Moore, 1978b) (figure 1.2).

Figure 1.2 Voies dopaminergiques centrales

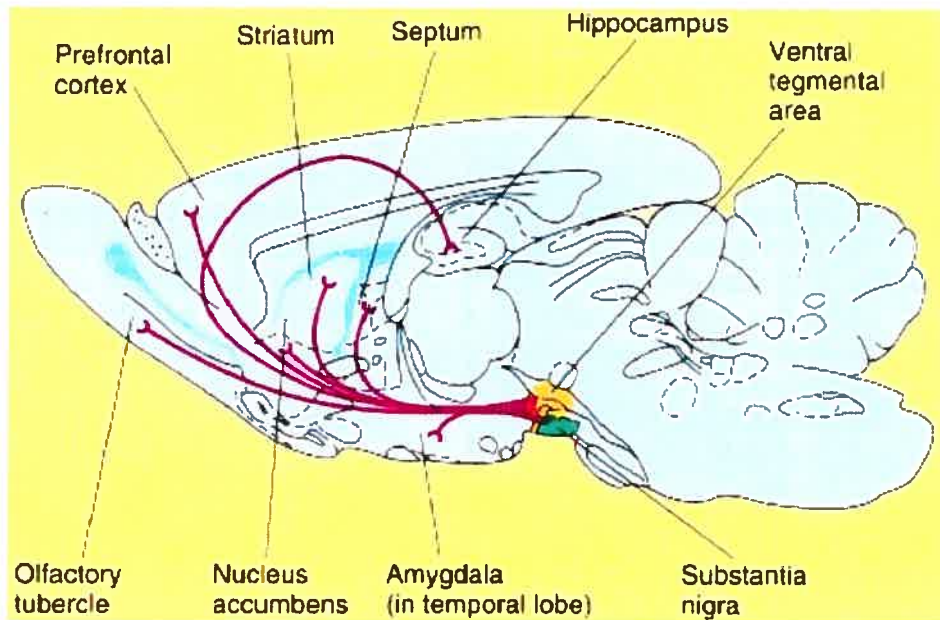


Figure 1.2 Le système nigrostrié; prend origine de la substance noire (vert) et envoie des prolongements dans les différentes régions du striatum.

Le système mésolimbique; prend origine dans l'aire tegmentaire ventrale (jaune) et envoie des prolongements dans l'amygdale, l'hippocampe et le bulbe olfactif antérieur.

Le système mésocortical; prend origine dans l'aire tegmentaire ventrale (jaune) et envoie des prolongements dans la région du cortex pré-frontal.

Tiré de : abdellab.sunderland.ac.uk.html

Dès 1978 Fallon et Moore remarquent une certaine complexité dans l'organisation des projections dopaminergiques ascendantes (Fallon & Moore, 1978b). La topographie des projections serait organisée en trois plans, soit une organisation médio-latérale, antéro-postérieure et dorso-ventrale. Il semble que ce soit selon le plan dorso-ventrale qu'il y ait distinction entre les projections nigrostriées, mésolimbique et mésocorticale, les deux dernières distinctions sont aussi nommée projection mésocorticolimbique (Fallon, 1988). Nous allons donc considérer deux systèmes principaux.

D'abord le système mésostrié qui prend origine dans la substance noire compacte (SN_c; A9), dans l'aire tegmentaire ventral (ATV; A10) et dans le noyau rétrobulbaire (région A8) (figure 1.2). La partie dorsale de ce système, souvent nommé voie nigrostriée, innerve le noyau caudé et le putamen ainsi que le globus pallidus (Fuxe et al, 1985; Fallon, 1988). Chez le rat cette région (A9) contient environ 10 000 cellules dopaminergiques (Halliday & Tork, 1986; German & Manaye, 1993; Grimm et al, 2004). La voie nigrostriée joue un rôle critique dans le contrôle moteur et est impliquée dans la maladie de Parkinson (voir section 2.1). La partie plus ventrale du système mésostrié innerve le noyau accumbens, le bulbe olfactif et le noyau caudé-putamen dans sa région plus médiane (Fuxe et al, 1985; Fallon, 1988). Ces voies qui projettent vers le noyau accumbens jouent un rôle dans le processus de renforcement associé aux drogues psychostimulantes (voir section 2.3).

Ensuite, le système mésocorticolimbique prend origine dans l'ATV (A10) avec une petite contribution des régions A9 et A8. Ces projections se dirigent vers l'amygdale, l'hippocampe, le bulbe olfactif antérieur et certaines régions du cortex préfrontal (Fuxe et al, 1985; Fallon, 1988). La pathophysiologie de la schizophrénie impliquerait un dysfonctionnement de cette voie dopaminergique (voir section 2.2).

2. Dysfonctions du système dopaminergique

2.1 La maladie de Parkinson

En 1817, James Parkinson publie un essai intitulé « Shaking Palsy » qui met en évidence certains troubles moteurs éprouvés par ses patients, comme des tremblements, des défauts de la posture et la difficulté à initier des mouvements volontaires. Aujourd'hui ces observations font partie des principaux symptômes de la maladie de Parkinson. Cette pathologie affecte 1% des individus ayant plus de 65 ans (Tanner, 1992). Les perturbations du mouvement peuvent être séparées en symptômes positifs; jamais vus chez une personne saine, et en symptômes négatifs; considéré comme une perte du comportement normal d'un individu (Kolb & Wishaw, 1990). Les symptômes positifs sont les tremblements, la rigidité musculaire et l'akathésie (mouvements involontaires). Les symptômes négatifs sont les défauts de posture et la bradykinésie (lenteur du mouvement). En plus des troubles moteurs, plusieurs patients démontrent différents degrés de dysfonction cognitive, de la dépression à la démence (Hornykiewicz & Kish, 1984).

Les caractéristiques histopathologiques principales de la maladie de Parkinson sont la dégénérescence sélective de plus de 80% des neurones dopaminergiques de la voie nigrostriée (figure 2.0a) ainsi que la présence d'inclusions cytoplasmiques nommées corps de *Lewi* (CL) (figure 2.0c) (Kish et al, 1986; Gibb, 1992). La dégénérescence affecte principalement les neurones de la SNc qui projettent au

putamen (figure 2.0b) (Kish et al, 1988; Dauer & Przedborski, 2003). La dysfonction de cette voie entraîne une diminution de l'activité inhibitrice des neurones GABA du striatum, qui en retour permettent l'augmentation de l'activité des neurones thalamocorticaux menant à l'excitation du cortex moteur. Le résultat de ce déséquilibre permet aux muscles fléchisseurs et extenseurs de se contracter en même temps ce qui résulte en une importante rigidité musculaire et à plusieurs autres troubles moteurs énumérés plus tôt (Albin et al, 1989; Albin et al, 1995; Dauer & Przedborski, 2003).

Dans 95% des cas, la maladie n'est pas d'origine génétique (Dauer & Przedborski, 2003). Il existe deux hypothèses principales expliquant la pathogenèse de la maladie de Parkinson. La première concerne le mauvais repliement de protéines et leur agrégation, entre autre de l' α -synuclein, menant à la mort des neurones DA (Auluck et al, 2002; Muchowski, 2002; Dauer & Przedborski, 2003; Schulz & Falkenburger, 2004). La seconde concerne une dysfonction mitochondriale qui aurait pour conséquence de générer un stress oxydatif toxique pour les cellules DAergiques (Dauer & Przedborski, 2003; Schulz & Falkenburger, 2004). Les facteurs pathogéniques cités plus haut ne sont pas mutuellement exclusifs, et les chercheurs tentent de découvrir la chronologie des événements menant à la pathologie. Récemment il a été soulevé que les protéines α -synuclein et Parkin seraient impliquées dans la maladie de Parkinson. L' α -synuclein est une protéine pré-synaptique qui module les fonctions synaptiques (Kahle et al, 2002). Des données biochimiques et biophysiques proposent que α -synuclein joue un rôle dans la

dynamique des membranes cellulaire comme l'apport de protéines à la membrane plasmique (Pronin et al, 2000; Ahn et al, 2002). Il a été démontré que l' α -synuclein pourrait être impliqué dans la localisation membranaire du DAT (Lee et al, 2001). La présence abondante d' α -synuclein dans les CL suggère un défaut de repliement qui favorise la formation de fibrille d'amyloïd et entraîne une neurotoxicité. La mutation génique de l' α -synuclein amplifie son potentiel de toxicité (Goedert, 2001). Par contre, la mutation entraînant le mauvais repliement de la protéine α -synuclein interfère avec son fonctionnement normal et c'est cette perte de fonction qui aurait une implication majeure dans la dégénérescence neuronale associée à l' α -synuclein (Abeliovich et al, 2000; Dauer et al, 2002).

La protéine Parkin est une ligase nécessaire à l'ubiquitination (Shimura et al, 2000; Zhang et al, 2000). Généralement les mutations de la Parkin sont retrouvées chez des patients de moins de 30 ans (Mizuno et al, 2001), mais de plus en plus on les retrouve chez les patients plus âgées (Lincoln et al, 2003). La dégénérescence des neurones DAergiques suite à la mutation de la Parkin n'est pour l'instant pas très bien comprise. Les données suggèrent que les multiples mutations pouvant affecter la Parkin éliminent son activité ligase et mène à l'accumulation de ses substrats qui sont responsables de la dégénérescence des neurones DAergiques de la SN_c (Dauer & Przedborski, 2003). Plusieurs substrats pour la Parkin ont été identifiés (Shimura et al, 2000; Zhang et al, 2000; Imai et al, 2001; Chung et al, 2001; Staropoli et al, 2003). Il apparaît que certains de ces substrats relient les fonctions de la Parkin et de la synuclein (Shimura et al, 2000; Chung et al, 2001; Petrucelli et al, 2002). Ainsi,

les données récentes suggèrent qu'il y aurait un lien entre la Parkin, la synuclein et le fonctionnement des protéasomes dans le processus de mort cellulaire associé à la maladie de Parkinson.

Figure 2.0 Neuropathologies de la maladie de Parkinson

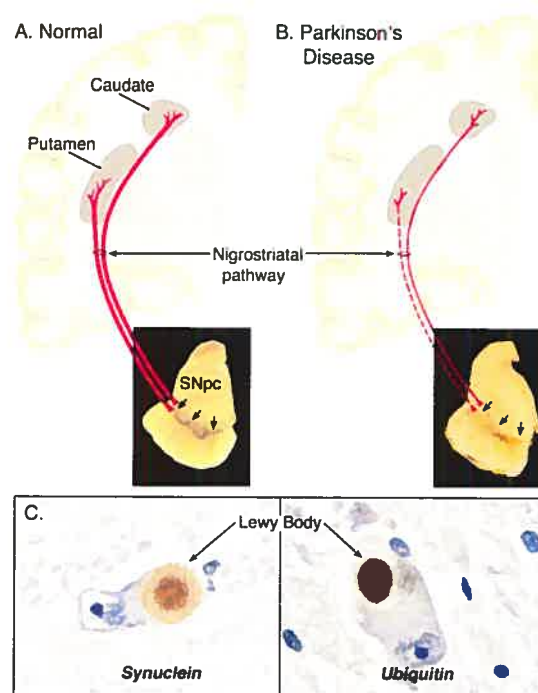


Figure 2.0 (A) Organisation normale de la voie nigrostriée (B) Dégénérescence des projections dopaminergiques de la voie nigrostriée chez un patient affecté par la maladie de Parkinson. (C) Présence d'inclusions cytoplasmiques, nommées corps de Lewi dans lesquels nous retrouvons les protéines synucléine et ubiquitine.

Tiré de : Dauer & Przedborski, 2003

2.2 La schizophrénie

“If you talk to God, you are praying. If God talks to you, you have schizophrenia”
-Thomas Szasz, *Schizophrenia in the Second Sin*.

La schizophrénie est perçue comme un trouble de la pensée. Cette maladie neuropsychiatrique affecte 1% de la population. Les symptômes qui surgissent tard dans l'adolescence ou au début de l'âge adulte sont d'abord caractérisés par une psychose, ou l'on perçoit une importante distorsion de la réalité, une perturbation des perceptions, du fonctionnement intellectuel, de l'affect, de la motivation et du comportement. Les symptômes associés à la pathologie sont divisés en deux catégories, soit les symptômes positifs et les symptômes négatifs (Kraepelin, 1913; Bleuler, 1950; Crow, 1980; Andreasen, 1990). Les symptômes positifs, comportent entre autre les délires, les hallucinations visuelles et auditives ainsi qu'un langage et un comportement désorganisé. Les symptômes négatifs représentent une perte de fonction et sont caractérisés par une pauvreté du langage et de son contenu, une isolation et un retrait sociale, une perte de l'habileté à éprouver du plaisir lors d'activités quotidiennes normalement plaisantes et une perte de volonté et d'énergie (Baldessarini, 1975; Meltzer, 1987; Andreasen, 1987; Kandel, 1991).

L'hypothèse dopaminergique suggère l'implication d'un trouble neurochimique : une libération excessive de dopamine serait à la base de la pathogenèse de la schizophrénie (Meltzer & Stahl, 1976). Deux découvertes principales nous permettent d'appuyer cette hypothèse. D'abord, les drogues qui augmentent le niveau de DA

dans SNC, comme la L-DOPA, l'amphétamine et la cocaïne, produisent des symptômes de type psychotique, semblables à ceux de la schizophrénie, qui sont éliminées par l'administration d'antipsychotiques typiques, qui agissent comme des antagonistes du récepteur D2 de la DA (Hornykiewicz, 1977; Lieberman et al, 1989). En second lieu, des études d'imagerie ont démontré l'existence d'une dysfonction DAergique chez des patients schizophrènes. Prenant avantage des techniques de PET (*Positrons Emission Tomography*) et SPECT (*Single-Photon Emission Computerized Tomography*) ces études ont mesuré la libération de DA induite par l'AMPH chez des patients schizophrènes. Ces études ont rapporté une augmentation de la libération de DA lors de la stimulation à l'AMPH pour les patients schizophrènes comparativement à des contrôles sains (Laruelle et al, 1996; Breier et al, 1997; Abi-Dargham et al, 1998; Laruelle et al, 1999).

Il faut noter que l'hypothèse dopaminergique n'explique pas tous les symptômes de la schizophrénie. La résistance des symptômes négatifs à la pharmacothérapie a entraîné d'autres hypothèses. Prenant en considération les changements neurochimiques et neuroanatomiques, Weinberger a proposé un modèle neurodéveloppemental de la physiopathologie de la schizophrénie (Weinberger, 1987; Weinberger, 1995) (figure 2.1). Ce modèle suggère qu'une anomalie dans le développement de la voie mésocorticale soit à l'origine des pensées confuses, de la perte de volonté et d'énergie, et du retrait social (Wolkin et al, 1992; Kahn & Davis, 1995). De plus, ce problème de développement entraînerait une perte de rétroaction négative provenant du CPF nécessaire à la modulation des neurones sous-corticaux.

L'augmentation de l'activité de la voie mésolimbique qui en résulte serait responsable des hallucinations, des pensées de persécutions et de l'agitation que l'on retrouve chez les patients schizophrènes (Kahn & Davis, 1995; Weinberger, 1995). L'hypothèse dopaminergique et l'hypothèse neurodéveloppementale ne sont que deux parmi plusieurs autres hypothèses tentant d'expliquer la schizophrénie.

Figure 2.1 Représentation schématique du modèle neurodéveloppemental

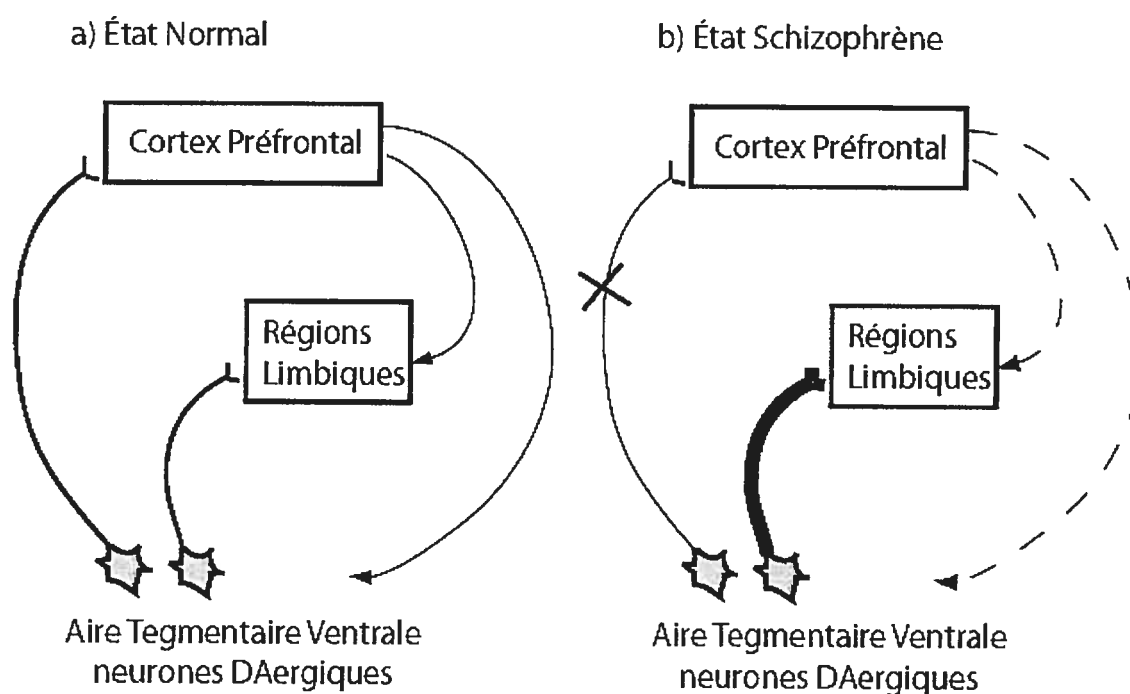


Figure 2.1 Modèle neurodéveloppemental de Weinberger démontrant (a) en condition normale, les voies ascendantes mésocorticales et mésolimbiques, ainsi que les voies descendantes associées. (b) Le modèle suggère qu'une anomalie dans le développement de la voie mésocorticale serait à l'origine de la perte de la rétroaction négative du cortex préfrontal sur la voie mésolimbique ce qui augmente la stimulation des régions limbiques par cette voie.

Tiré de : *Sinauer Associates, Inc., Publisher. Principles of Neuropsychopharmacology, Fig 18-10*

2.3 La dépendance aux drogues d'abus

La dépendance aux drogues d'abus est un immense problème autant au niveau sociale, économique que médical. En 2002 il a été estimé que 19.5 million d'Américains âgés de 12 ans et plus consommaient des drogues illicites. 3.5 million consommaient de l'héroïne et 1 million en étaient dépendant (Substance Abuse and Mental Health Services Administration Office of Applied Studies (2003) ; Kreek et al, 2005). En ce qui concerne les drogues psychostimulantes, le patron n'est gère plus réjouissant puisque près de 34 million d'Américains en ont déjà consommé et 1.5 million en abusent et en sont dépendant (Substance Abuse and Mental Health Services Administration Office of Applied Studies (2003).

Plusieurs études suggèrent que le principal système de récompense du cerveau implique les neurones dopaminergiques (Fibiger & Phillips, 1986; Wise & Hoffman, 1992; Robinson & Berridge, 1993; Robbins & Everitt, 1996). Des manipulations d'ordre psychopharmacologique et des lésions du système dopaminergique altèrent les comportements liés à la récompense chez les animaux (Fibiger & Phillips, 1986; Wise & Hoffman, 1992; Robinson & Berridge, 1993; Robbins & Everitt, 1996). Les drogues d'abus, comme l'amphétamine et la cocaïne, agissent via les neurones dopaminergiques et produisent une forte récompense. C'est d'ailleurs l'action prolongée de la dopamine sur les neurones cibles qui favorise la dépendance (Wise & Hoffman, 1992; Robinson & Berridge, 1993; Robinson & Berridge, 1993; Schultz et al, 1997). Ces neurones envois leurs axones à des structures du cerveau

impliquées dans la motivation et le comportement comme le striatum, le noyau accumbens et le cortex préfrontal (Schultz et al, 1997). Plusieurs données supportent l'idée que ces neurones encodent et distribuent les informations concernant les événements associés aux récompenses (Wise & Rompre, 1989; Wise & Hoffman, 1992; Robbins & Everitt, 1996; Schultz et al, 1997). La récompense est un concept qui décrit la valeur positive qu'un individu attribue à un objet, à un acte comportemental, ou à un état physique interne (White & Milner, 1992; Robbins & Everitt, 1996). La récompense peut également jouer un rôle dans le renforcement positif.

À titre d'exemple, les opiacées, dont l'héroïne et la morphine possèdent trois sous types de récepteurs μ , δ et kappa. Ces récepteurs se retrouvent sur les corps cellulaires des neurones dopaminergiques de l'ATV ainsi que sur les cellules du noyau accumbens et du striatum (Koob, 1992; Di Chiara & North, 1992). Il est accepté que le renforcement positif produit par l'héroïne et la morphine, soient attribuable à la stimulation du récepteur μ opiacé présent sur les interneurons GABA de l'ATV (Di Chiara & North, 1992).

Les psychostimulants tels que la cocaïne et l'amphétamine stimulent directement les neurones dopaminergiques du système mésolimbique. La cocaïne se lie au transporteur de la dopamine, DAT, et bloque la re-capture de la dopamine. L'amphétamine quant à elle stimule la relâche de DA. Il est établi que l'augmentation de la relâche de DA dans le noyau accumbens contribue au renforcement positif et

aux effets psychomoteurs des drogues psychostimulantes (Di Chiara & Imperato, 1988; Negus et al, 1993; Di Chiara, 1995). La nicotine, quant à elle, agit sur un récepteur à canal ionique hétéropentamérique qui est ouvert par l'acétylcholine. Les récepteurs nicotiques sont retrouvés sur les corps cellulaires des neurones dopaminergiques de l'ATV et de la SN ainsi que dans le noyau accumbens et le striatum (Di Chiara & Imperato, 1988; Stolerman & Jarvis, 1995). La nicotine augmente l'activité des neurones de la voie nigrostriée favorisant la libération de DA dans le noyau accumbens et le striatum dorsal, stimulant ainsi le système de récompense et favorisant la dépendance (Di Chiara & Imperato, 1988; Stolerman & Jarvis, 1995).

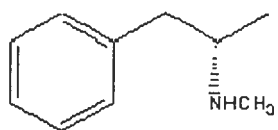
Le mode d'action des quelques drogues d'abus citées plus haut démontre à quel point le système dopaminergique est une cible majeure, ce qui est compatible avec l'idée que ce système soit impliqué dans les mécanismes de dépendance.

3. La dépendance aux drogues d'abus : le cas de l'amphétamine

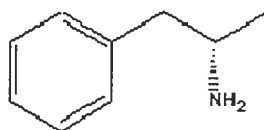
3.1 Propriétés pharmacologiques de l'amphétamine

L'amphétamine (AMPH) est le nom commun pour β -phénylisopropylamine (figure 3.0). L'AMPH peut s'administrer soit oralement, soit par injection par intraveineuse (IV) ou sous-cutanée. L'amphétamine est une base faible, son pK_a est de 9.9 (Mack & Bonisch, 1979). Lors de la prise orale, l'absorption est lente. La molécule se charge positivement dans le milieu acide de l'estomac, empêchant l'absorption intestinale et modère l'effet comparativement à l'administration IV qui produit un effet rapide et intense. L'analogue méthamphétamine peut également être fumé, ce qui permet l'élévation rapide des niveaux plasmatiques (Cook, 1991). L'amphétamine est métabolisée par le foie et principalement excrétée dans l'urine. La demi-vie ($T_{1/2}$) se situe entre 7 et 30 heures dépendamment du pH urinaire.

Figure 3.0 Structure chimique de l'amphétamine et d'un analogue



(+)-methamphetamine



(+)-amphetamine

Tiré de : <http://grandfinale.at.infoseek.co.jp>

3.2 Mécanisme d'action de l'amphétamine

3.2.1 A l'échelon cellulaire : à la synapse

L'amphétamine est un agoniste indirect du système dopaminergique. L'activité d'agoniste provient de la capacité de la drogue à provoquer la relâche de DA par les terminaisons synaptiques, à bloquer sa recapture et à des doses élevées, inhiber la MAO (Miller et al, 1980). L'action de l'AMPH commence par son entrée dans la cellule, par deux voies principales. La première est une simple diffusion passive à travers la membrane plasmique (figure 3.1) (Wong et al, 1972). La seconde, comme substrat du transporteur de la DA (DAT) (figure 3.1) (Ross, 1964). Une fois dans la cellule l'AMPH engendre une série d'actions qui ont pour conséquence d'augmenter la concentration de DA cytosolique. Elle interfère avec le chargement vésiculaire en bloquant indirectement le transporteur vésiculaire (VMAT). Suite à sa synthèse la DA reste donc dans le cytosol (figure 3.1) (Philippu & Beyer, 1973; Knepper et al, 1988). De plus, l'AMPH provoque une relâche de DA des vésicules synaptiques (figure 3.1) (Sulzer & Rayport, 1990; Sulzer et al, 1993). Ce sont les propriétés basiques de la molécule qui lui permettent de pénétrer dans les vésicules. L'intérieur de ces dernières étant plus acide, les molécules d'AMPH se protonnent, acquièrent des charges positives (H^+), et sont ensuite séquestrées dans la vésicule (Sulzer & Rayport, 1990; Sulzer et al, 1993). Cette perte de charge positive produit une augmentation du pH vésiculaire. Comme la fonction du transporteur VMAT dépend d'un fort gradient de protons, l'influx vésiculaire de DA par VMAT est inhibé et l'efflux de DA des

vésicules vers le cytosol est favorisé (figure 3.1) (Sulzer & Rayport, 1990; Sulzer et al, 1993).

Figure 3.1 Schéma des effets synaptiques possible de l'amphétamine

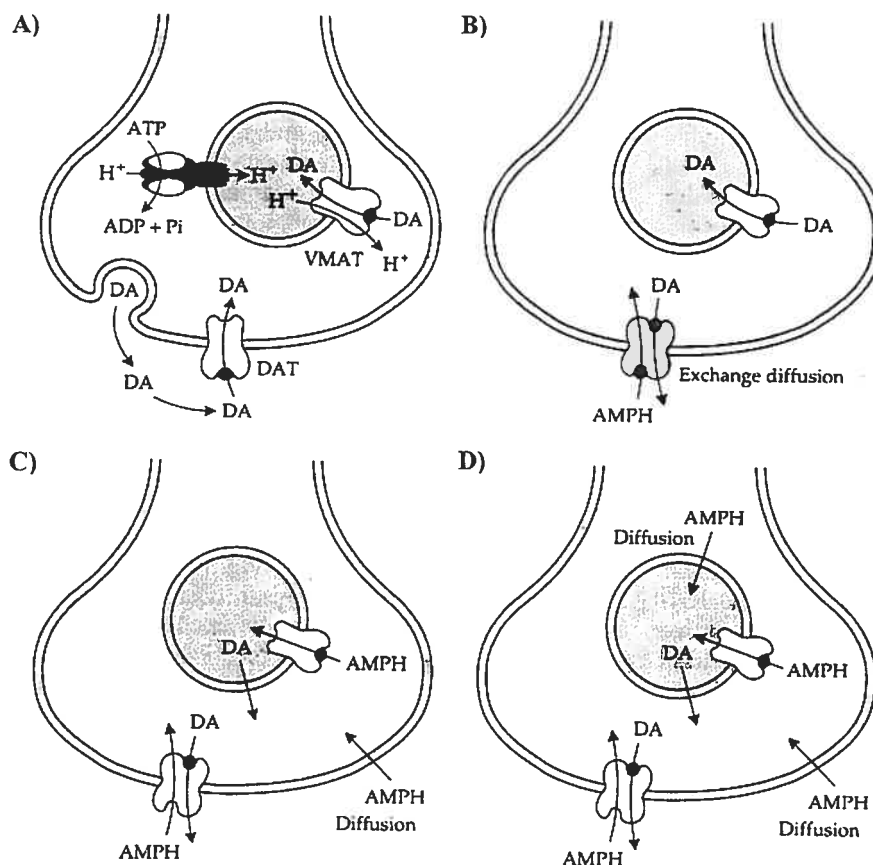


Figure 3.1 (A) Libération synaptique de DA, accumulation vésiculaire et recapture en condition normale. (B) Effet de l'AMPH sur le transporteur membranaire de dopamine, DAT. (C) Une certaine proportion d'AMPH entre dans la terminaison synaptique par diffusion simple. L'AMPH affecte aussi le transporteur vésiculaire de DA, VMAT. (D) L'AMPH peut également pénétrer par diffusion simple dans les vésicules synaptiques et inhiber la capacité de la vésicule à stocker la dopamine.

Tiré de : *Sinauer Associates, Inc., Publisher. Principles of Neuropharmacology, Fig 13.4*

3.2.2 Effets comportementaux de la prise d'amphétamine chez l'animal

Ces effets pharmacologiques, énumérés plus haut, ont pour conséquence l'augmentation de la concentration de DA extracellulaire et une activation locomotrice. Chez les rongeurs l'amphétamine produit une activation motrice bien organisée ainsi que des comportements stéréotypés. Une simple dose d'AMPH (0.25-1.0 mg/Kg i.p.) mène à une réponse caractéristique; l'animal traité grimpe, renifle de façon excessive son environnement, bouge anormalement la tête et les membres, lèche et mord (Randrup & Munkvad, 1967; Wallach, 1974). Certains chercheurs suggèrent que les récepteurs D₁ et D₂ de la DA soient responsable des principaux effets de l'AMPH (Petry et al, 1993). Plusieurs données appuient cette hypothèse. D'abord l'AMPH et la DA injectés directement dans le Nacc, mais pas dans le noyau caudé, évoquent des activités motrices chez l'animal traité (Pijnenburg et al, 1976; Solomon & Staton, 1982). La micro injection d'AMPH dans le noyau caudé, mais pas dans le Nacc, permet l'obtention des comportements stéréotypés (Solomon & Staton, 1982; Kelley et al, 1988). La stimulation de l'activité motrice par une faible dose d'AMPH est bloquée suite à une lésion à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) des terminaisons DAergiques dans le Nacc, mais pas du noyau caudé (Kelly et al, 1975; Fink & Smith, 1980). La toxicité induite par la 6-OHDA est sélective pour les neurones catécholaminergiques (Luthman et al, 1989). Une fois dans le neurone, la 6-OHDA s'accumule dans le cytoplasme et induit d'abord la dégénérescence des terminaisons et éventuellement la mort du neurone DAergique (Jeon et al, 1995). La stimulation locomotrice produite par l'AMPH est bloquée par l'injection

d'halopéridol, un antagoniste des récepteurs de la DA, dans le Nacc (Pijnenburg et al, 1975). Finalement, une lésion à la 6-OHDA du noyau caudé, prévient l'apparition des comportements stéréotypés produits par l'administration d'AMPH (Kelly et al, 1975; Joyce & Iversen, 1984).

3.3 La tolérance et la sensibilisation à l'amphétamine

La tolérance et la sensibilisation sont deux phénomènes bien distincts qui surviennent en réponse à l'utilisation répétée de diverses drogues d'abus, incluant l'amphétamine. La tolérance est une diminution de l'efficacité d'une drogue donnée suite à des administrations répétées (Stewart & Badiani, 1993). Il est important de spécifier que la tolérance peut se développer différenciellement à un ou plusieurs effets de la drogue. La tolérance à l'amphétamine est rapportée pour les effets anorexiques, hyperthermiques, cardiovasculaires et le renforcement associé à la prise d'AMPH (Miller & Gold, 1989; Perez-Reyes et al, 1991). La tolérance est perçue comme une réaction d'adaptation et est facilement renversée lors de l'arrêt de la consommation (Demellweek & Goudie, 1983; Stewart & Badiani, 1993).

L'exposition intermittente à l'AMPH mène à la sensibilisation, qui est caractérisé par une réponse excessive aux effets psychomoteurs de la drogue. Les effets comportementaux et stéréotypés de l'AMPH perdurent dans le temps suivant la dernière exposition de l'individu ou de l'animal à la drogue. La réexposition à

l'AMPH des semaines voir des mois plus tard produit une activation dopaminergique et comportementale plus importante qu'au début de la consommation (Kalivas & Stewart, 1991; Stewart & Badiani, 1993; Vezina, 2004). La sensibilisation est produite par une cascade d'événements initiée par une augmentation des niveaux extracellulaire de DA dans le Nacc et ATV (Kalivas & Duffy, 1991). La section suivante mettra l'emphasis sur les mécanismes expliquant la sensibilisation.

3.4 Le développement de la sensibilisation à l'amphétamine

Les mécanismes neuronaux qui sous tendent ces effets ont intrigué plusieurs chercheurs. De nombreuses études se sont penchées sur les altérations de la transmission dopaminergique durant la sensibilisation à l'AMPH. Trois substrats anatomiques ont été mis en cause : les régions terminales du système dopaminergique (Nacc, striatum et CPF), le corps cellulaire des neurones DAergiques dans l'ATV et la SN et finalement les afférences modulant les neurones DAergiques soit glutamatergiques ou GABAergiques (*acide γ -Aminobutyrique*). Des études, utilisant la technique de micro injection d'AMPH dans les régions somatodendritiques (ATV) et terminale (Nacc) du système DAergique, ont permis d'identifier les régions impliquées dans le développement de la sensibilisation comportementale (Dougherty & Ellinwood, 1981; Robinson, 1988). Les injections d'AMPH dans le Nacc produisent une réponse motrice importante, qui n'est toutefois pas augmentée lors de l'administration répétée de la drogue. Par contre, l'administration répétée d'AMPH

dans l'ATV résulte en une sensibilisation comportementale (Kalivas & Weber, 1988). Ces études ont montré que l'initiation de la sensibilisation peut être induite via l'action de l'AMPH dans les régions A10 et A9 du système DAergique (Kalivas & Stewart, 1991), tandis que les régions terminales, comme le Nacc, sont essentielles à l'expression de la sensibilisation (Vezina & Stewart, 1990; Perugini & Vezina, 1994; Paulson & Robinson, 1995).

Par la suite, plusieurs études ont évalué l'implication des récepteurs D₁ et D₂ de la dopamine dans l'initiation de la sensibilisation. L'utilisation d'un antagoniste spécifique des récepteurs D₁, la SCH-23390, injecté dans l'ATV prévient l'induction de la sensibilisation, tandis que le sulpiride, antagoniste des récepteurs D₂, ne démontre aucun effet (Vezina & Stewart, 1989; Stewart & Vezina, 1989; Bjiou et al, 1996; Vezina, 1996). Puisque le récepteur D₁ de la DA n'est pas synthétisé par les neurones DAergiques (Mansour et al, 1992), il est probable que des récepteurs D₁ situés sur les afférences dans l'ATV contribuent à l'induction de la sensibilisation à l'AMPH (Kalivas, 1993). Les afférences GABA et glutamatergiques ont attiré l'attention puisque leur activité dans l'ATV est modulée par le récepteur D₁ de la DA (Cameron & Williams, 1993; Kalivas & Duffy, 1995; Wolf & Xue, 1998). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré une augmentation de la relâche de DA dans les régions terminales suite à la stimulation par le glutamate (Imperato et al, 1990; Keefe et al, 1993). Karler et al., (Karler et al, 1989; Karler et al, 1990) ont montré que le MK-801, antagoniste des récepteurs NMDA, co-administré avec l'AMPH prévient le développement de la sensibilisation. De plus, Criswell et al., (Criswell et al, 1990) ont

démontré que le MK-801 bloc le développement de la sensibilisation induit par le SKF-38393, agoniste direct des récepteurs D₁. Ces découvertes suggèrent que le glutamate soit impliqué dans le développement de la sensibilisation induite par l'AMPH et ceci via la stimulation du récepteur D₁ (Wolf, 1998; Vezina & Queen, 2000).

En résumé, les drogues psychostimulantes agissent via l'ATV et augmente les niveaux de DA extracellulaire. La DA agit alors sur les récepteurs D₁ et favorise la libération du glutamate dans cette région. Le glutamate, quant à lui, semble responsable de l'initiation des événements menant à une neuroadaptation qui serait à la base de la sensibilisation.

Considérant la longue durée des changements induits dans les neurones DAergiques par les drogues psychostimulantes, il est intéressant de noter qu'un facteur neurotrophique, le bFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*), semble également impliqué dans la sensibilisation à l'amphétamine (Flores et al, 1998). Le bFGF est reconnu pour favoriser la croissance et la survie des neurones DAergiques (Chadi et al, 1993; Takayama et al, 1995; Bouvier & Mytilineou, 1995; Hou et al, 1997). De plus, le glutamate augmente l'expression du bFGF par les astrocytes (Pechan et al, 1993). D'autre part, le bFGF régule à la hausse l'expression du récepteur mGluR₁ sur les neurones d'hippocampe en culture (Cheng et al, 1995). Sur la base de ces données, Flores et al., (Flores et al, 1998), ont évalué l'expression du bFGF par les astrocytes de l'ATV et de la SN_c, suivant des traitements répétés à

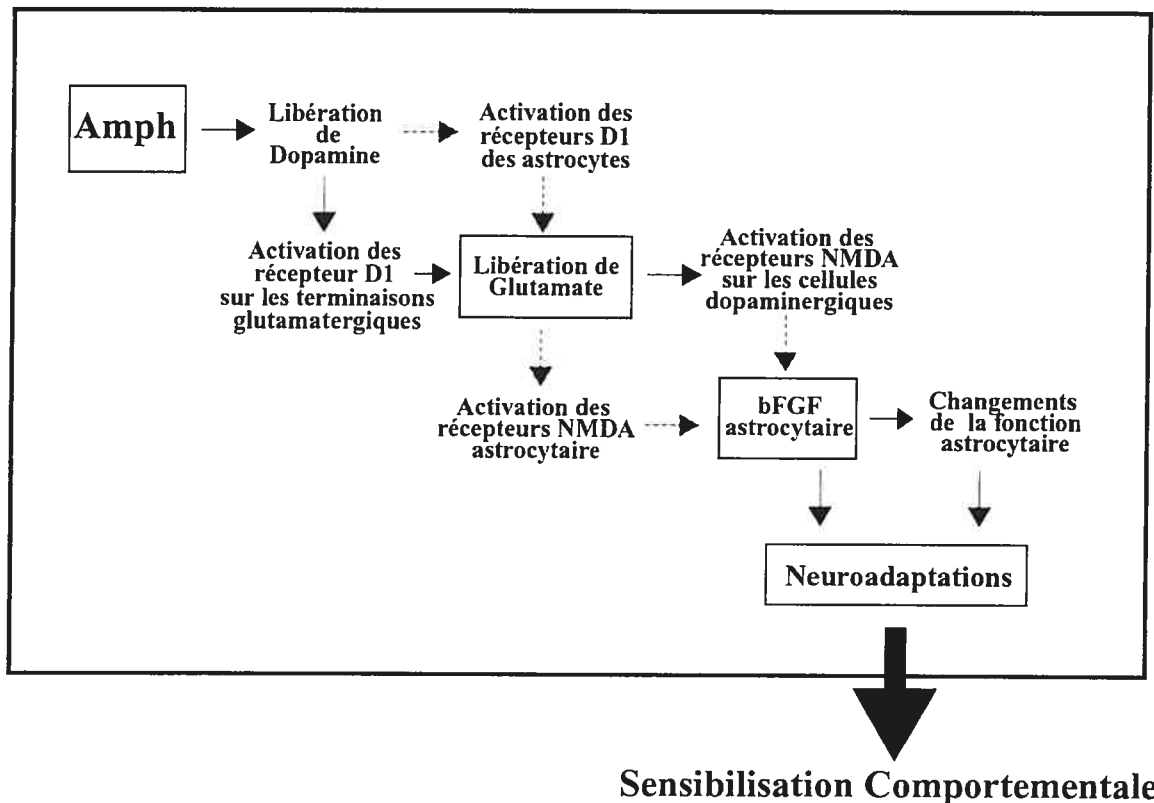
l'AMPH. Des expériences d'immunomarquage ont révélé une augmentation de l'expression du bFGF 24hr après la dernière administration d'AMPH. L'augmentation est soutenue durant 72hrs, une semaine et jusqu'à un mois après la dernière injection d'AMPH. Le glutamate jouant un rôle dans l'initiation de la sensibilisation, ils ont évalué l'effet d'un antagoniste glutamatergique sur l'expression du bFGF. L'acide kynurénique (KYN), antagoniste non sélectif des récepteurs glutamatergique ionotropique, co-administré avec l'AMPH inhibe l'augmentation du bFGF par les astrocytes de l'ATV et de la SN_c. Il semble que l'expression accrue du bFGF dans les régions somatodendritiques des neurones dopaminergiques suivant des traitements répétés à l'AMPH pourrait constituer un des événements responsable de l'initiation et de la maintenance de la sensibilisation (Flores et al, 2000). L'immunoneutralisation du bFGF, ainsi que l'administration d'un antagoniste des récepteurs NMDA du glutamate, le CPP (3-(2-carboxypiperazine-4-yl)propyl-1-phosphoric acid), durant la phase d'induction de la sensibilisation, bloque complètement son développement (Flores et al, 2000). En plus d'inhiber le développement de la sensibilisation le CPP empêche l'augmentation de l'expression du bFGF dans l'ATV et la SN_c. Ces résultats suggèrent donc que le glutamate participe au développement de la sensibilisation à l'AMPH en favorisant l'expression du bFGF par les astrocytes des régions somatodendritiques des neurones DAergiques. Cette idée est supportée par le fait que des injections répétées d'AMPH dans l'ATV sont suffisantes pour induire la sensibilisation (Vezina, 1993; Cador et al, 1995; Flores et al, 2000). Les injections systémiques ou intra ATV d'AMPH, favorisent la

relâche de glutamate dans ATV et l'administration d'antagoniste NMDA bloque le développement de la sensibilisation à l'AMPH (Wolf, 1998; Flores et al, 2000).

L'exposition aux drogues psychostimulantes a des conséquences à long terme sur le comportement et le fonctionnement du cerveau. Les données présentées plus tôt suggèrent fortement que le bFGF, exprimé par les astrocytes du mésencéphale, joue un rôle fondamental dans le développement de la sensibilisation comportementale suivant un traitement répété à l'AMPH (Flores et al, 1998; Flores et al, 2000; Flores & Stewart, 2000a; Flores & Stewart, 2000b). De plus, ces découvertes attribuent au bFGF un rôle de médiateur du glutamate dans le développement de la sensibilisation. Flores et Stewart (Flores & Stewart, 2000a), proposent que le bFGF soit responsable des changements à long terme qui surviennent suite à la consommation répétée de drogues d'abus, des changements d'ordre neurochimiques, morphologiques et comportementaux. La figure 3.2 résume l'impact de l'administration d'AMPH dans l'ATV. D'abord, l'augmentation de la relâche de DA active les récepteurs D₁, probablement localisés sur les terminaisons glutamatergiques et/ou sur les astrocytes (Hosli & Hosli, 1993; Bal et al, 1994; Zanassi et al, 1999). L'augmentation extracellulaire de glutamate favorise l'expression du bFGF via l'activation des récepteurs NMDA. L'emplacement des récepteurs NMDA responsable des effets du glutamate sur l'expression du bFGF reste à élucider (Flores & Stewart, 2000a; Flores & Stewart, 2000b). Le bFGF pourrait agir directement sur les neurones ou indirectement via les astrocytes, afin d'initier les changements à long terme qui permettent l'augmentation de la fonction DAergique. (Flores et al, 1998; Flores et al,

2000; Flores & Stewart, 2000a; Flores & Stewart, 2000b). Les mécanismes par lesquels le bFGF provoque ces changements doivent également être explorés. De l'ensemble de ces considérations, nous pouvons conclure que bien que l'expression du bFGF par les astrocytes de l'ATV soit nécessaire à l'induction de la sensibilisation à l'AMPH, la relation entre cette augmentation et la plasticité à long terme des neurones dopaminergiques reste indéterminée.

Figure 3.2 Représentation schématique des étapes possible impliquées dans la sensibilisation comportementale.



Adapté de : Flores et Stewart, 2000

4. Les cellules gliales et le bFGF

4.1 Rôle des cellules gliales dans le SNC

Les cellules gliales ont longtemps été considérées comme de simple cellule de soutien qui comblerent les espaces et apportent structure et fermeté au cerveau. Cette perception a drastiquement changé au cours des dernières années. Nous verrons qu'il est dorénavant établi que les cellules gliales participent au traitement de l'information dans le cerveau.

Il existe deux types majeurs de cellules gliales dans le SNC, les astrocytes et les oligodendrocytes. Les astrocytes sont soit de type protoplasmique ou fibreux. Les astrocytes protoplasmiques sont caractérisés par un large noyau, un cytoplasme abondant et granuleux et plusieurs prolongements qui partent du corps cellulaire. Ces prolongements font généralement contact sur des neurones, mais aussi sur les vaisseaux sanguins avoisinant. Ces astrocytes sont retrouvés dans la matière grise du SNC, qui est constitué de corps cellulaire, de dendrites et de synapses. Les astrocytes fibreuses sont présentes parmi les fibres nerveuses myélinisées de la matière blanche du SNC. Elles ont des extensions, longues, minces et non symétriques qui se terminent sur des neurones ou des capillaires sanguins. Finalement, les oligodendrocytes sont plus petits que les astrocytes, possèdent de plus petit noyau et

leurs prolongements sont responsables de la formation des gaines de myéline dans le SNC.

Les astrocytes, sont les cellules gliales les plus abondantes du SNC. Elles sont intimement associées aux synapses, mais jusqu'à récemment, on ne les considérait pas comme des éléments participant de façon active à la fonction synaptique. Il a été estimé qu'un astrocyte, dans le cerveau d'un rongeur adulte, englobe et interagit avec environ 10,000 synapses (Bushong et al, 2003; Bushong et al, 2004). La compréhension de ces cellules a grandit durant les dix dernières années. La vision traditionnelle voulant que les astrocytes n'effectuent que des fonctions passives telles la régulation des concentrations d'ions, la recapture des neurotransmetteurs suite à l'activité synaptique et l'apport de substrat énergétique nécessaire au métabolisme est dorénavant considérée comme dépassée. Plusieurs laboratoires ont accumulé des données démontrant l'existence d'une communication bidirectionnelle entre les cellules gliales et les neurones, suggérant que les astrocytes jouent un rôle important dans la physiologie du SNC (Haydon, 2001; Castonguay et al, 2001; Araque et al, 2001).

Les astrocytes ne sont pas excitable électriquement, mais démontrent une forme d'excitabilité basée sur des variations de calcium (Ca^{2+}) intracellulaire qui peut être déclenché et modulé par des neurotransmetteurs incluant, le glutamate, l'adénosine, la norépinéphrine, le GABA, l'histamine, l'ATP, l'acétylcholine, etc. Les astrocytes expriment une grande variété de récepteurs qui, suivant leur stimulation par

l'application exogène de neurotransmetteur, augmentent leur concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Berger et al, 1995; Porter & McCarthy, 1997; Verkhratsky et al, 1998). Des études en culture cellulaire démontrent que la stimulation d'un seul astrocyte produit une élévation de Ca^{2+} intracellulaire qui se propage aux astrocytes adjacent formant une vague calcique qui peut s'étendre à des centaines de micromètres (Cornell-Bell et al, 1990; Dani et al, 1992; Smith, 1994). Une fois activées, les cellules gliales peuvent relâcher différents transmetteurs comme le glutamate, la D-sérine, le $\text{TNF}\alpha$ ou l'ATP (Araque et al, 1998a; Arcuino et al, 2002; Newman, 2003; Araque & Perea, 2004). Ces transmetteurs, aussi nommé gliotransmetteurs, effectuent une rétroaction sur les différents éléments synaptiques, modulent la libération des neurotransmetteurs des terminaisons synaptiques et permettent la régulation de l'excitabilité neuronale post synaptique (Robitaille, 2002; Auld & Robitaille, 2003; Araque & Perea, 2004).

Un des rôles plus classique des astrocytes est le support trophique des neurones. Plusieurs cellules gliales expriment et sécrètent des facteurs de croissances tels le GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*), le BDNF (*Brain Derived Neurotrophique Factor*), la NT-3 (*Neurotrophine-3*), le CNTF (*Ciliary Neurotrophique Factor*) et le bFGF. Ces facteurs neurotrophiques sont des protéines qui favorise le développement, la différenciation et la survie des neurones. Il a aussi été démontré que ces protéines pourraient être impliquées dans la plasticité du SNC chez les mammifères adulte. Prenons à titre d'exemple la potentialisation à long terme (LTP) qui est considéré comme une forme de plasticité synaptique. L'induction

de la LTP dans l'hippocampe favorise l'expression des ARNm du BDNF de la NT-3 (Patterson et al, 1992). De plus, ces facteurs de croissances semblent produire une augmentation de la transmission synaptique dans l'hippocampe de rat (Levine et al, 1995; Kang & Schuman, 1995). Faisant suite à ces données, il a été démontré que les souris knockout pour le BDNF ont une LTP déficiente (Korte et al, 1995; Patterson et al, 1996). Ces quelques découvertes permettent de suggérer que les facteurs neurotrophiques jouent un rôle important dans la plasticité neuronale chez l'adulte. Ces facteurs ont aussi une importante influence sur les neurones DAergiques. Par exemple, la NT-3, le BDNF et le GDNF favorisent la survie et la différenciation des neurones DAergiques (Hyman et al, 1991; Akerud et al, 1999; Lee et al, 2005). De plus, le GDNF permet une augmentation de l'efficacité synaptique des neurones DAergiques (Bourque & Trudeau, 2000) et prévient la mort des ces cellules suite à un traitement au MPTP (Tomic et al, 1995).

Comme nous l'avons abordé plus tôt, la sensibilisation comportementale est une forme de plasticité neuronale. Plusieurs facteurs de croissances semblent affecter son développement. Des études ont évalué l'effet de micro injections de NT-3 dans l'ATV sur la réponse comportementale produit par une injection de cocaïne. Cette manipulation induit une augmentation de la réponse comportementale lors d'une injection subséquente de cocaïne deux semaines plus tard (Pierce et al, 1999). L'injection dans ATV d'un inhibiteur des MEK (*Mitogen-activated/Extracellulair signal regulated Kinase*), élément de la voies de signalisation du NT-3 et du BDNF, avant l'administration de cocaïne bloque le développement de la sensibilisation

comportementale (Pierce et al, 1999) (figure 4.0). Ces résultats suggèrent que le NT-3 dans l'ATV induit des changements dans le système mésolimbique qui sont semblables à ceux causés par l'administration répétée de drogues psychostimulantes. Le GDNF, membre de la super famille du TGF β (*Transforming Growth Factor β*), a par ailleurs suscité beaucoup d'attention due à ces effets trophiques sur les neurones DAergiques de l'ATV (Lin et al, 1993; Gash et al, 1996). Contrairement aux autres facteurs de croissance, le GDNF bloc les effets psychomoteurs normalement engendrés par l'administration de cocaïne. Ces mêmes chercheurs ont démontré que l'administration répétée de cocaïne diminue la phosphorylation de RET (figure 4.0) dans l'ATV (Messer et al, 2000). Donc, la diminution de la phosphorylation de RET pourrait contribuer à la sensibilisation puisqu'elle interfère avec l'effet inhibiteur du GDNF. Finalement, le bFGF, (figure 4.0, figure 4.1) comme nous l'avons défini plus tôt, est un facteur de croissance neurotrophique qui contribue largement à la sensibilisation comportementale à l'AMPH. Puisque l'étude qui suit concerne principalement le bFGF nous concluons cette introduction en abordant plus en détail ce facteur de croissance.

Figure 4.0 Récepteurs et voies de signalisation de quelques facteurs de croissances

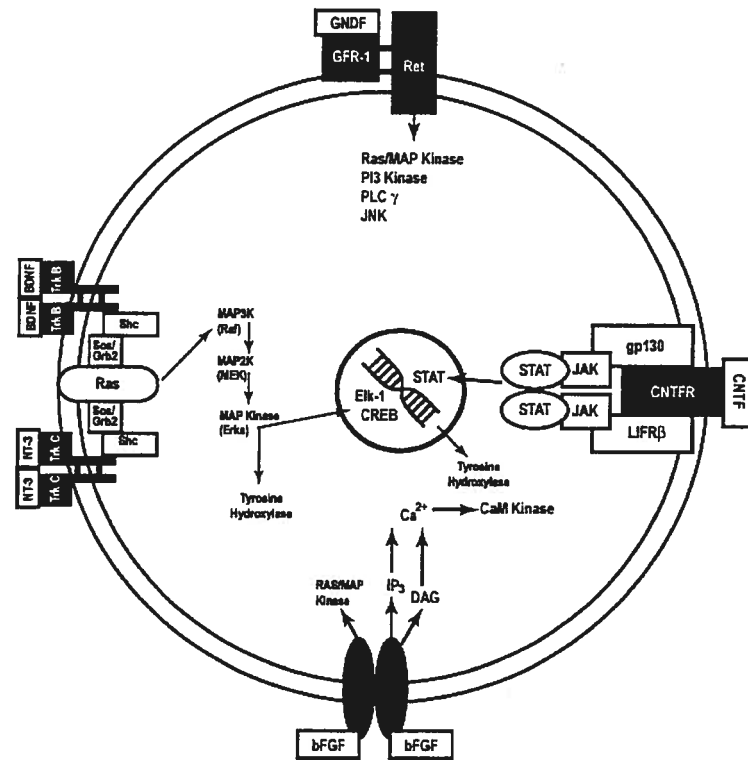


Figure 4.0 Voies de signalisations de quelques facteurs de croissances impliqués dans la dépendance aux drogues d'abus. Notons que le bFGF est un facteur neurotrophique. Sa liaison à son récepteur permet la dimérisation de celui-ci et contrôle la transcription de plusieurs gènes qui seraient impliqués dans la sensibilisation comportementale à l'AMPH.

Tiré de : *Pierce & Bari, 2001*

Figure 4.1 Récepteur et voies de signalisation du bFGF

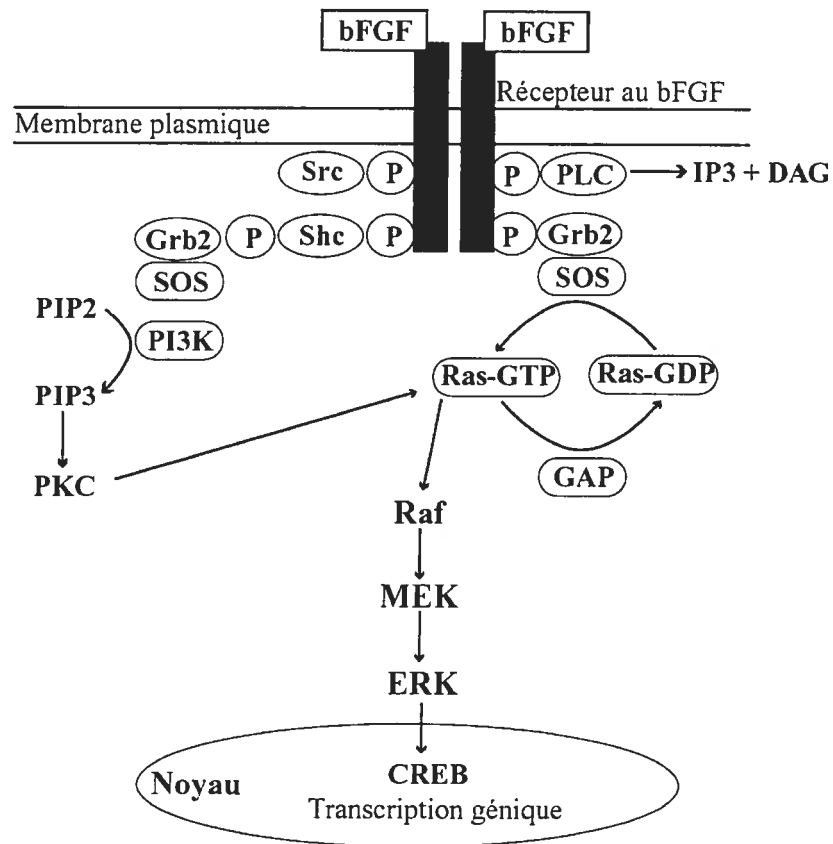


Figure 4.1 Suivant la liaison du bFGF sur son récepteur tyrosine kinase il y a dimérisation du récepteur, phosphorylation des tyrosines et recrutement des seconds messagers nécessaires à la signalisation intracellulaire et à la stimulation de la transcription génique.

4.2 Le *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF)

Il y a, jusqu'à présent, 18 membres qui composent la famille des FGFs (*Fibroblast Growth Factors*). Un des mieux connu est le bFGF, aussi nommé FGF-2, qui fût purifié et caractérisé par le groupe de Gospodarowicz en 1975. Dans le cerveau du rat adulte on retrouve trois isoformes du bFGF avec des poids moléculaires de 18, 21 et 22 kDa, tandis que chez l'homme les isoformes font plutôt 18, 22 et 24 kDa (Giordano et al, 1992). Ces isoformes représentent différents produits de traduction d'un même ARNm (Florkiewicz et al, 1991; Giordano et al, 1992). L'initiation de la traduction de l'isoforme 18kDa débute au codon AUG, tandis que, les isoformes de plus haut poids moléculaire, 21 et 22kDa sont générés à partir des codons CUG (Florkiewicz & Sommer, 1989). Selon le type cellulaire, ces isoformes se retrouvent dans différents compartiments cellulaires. Il semble que l'isoforme 18 kDa soit cytoplasmique et que les isoformes 21 et 22 kDa soit nucléaires (Renko et al, 1990; Renko et al, 1990). Le bFGF, contrairement à plusieurs autres facteurs de croissance polypeptidique, ne possède pas de peptide signal lui permettant d'être sécrété par la voie de sécrétion traditionnelle prenant naissance dans le réticulum endoplasmique (RE) et le golgi. Plusieurs groupes de recherches proposent que le bFGF soit relâché seulement après un dommage cellulaire ou suite à la mort de la cellule exprimant la protéine (Klagsbrun & Vlodavsky, 1988; D'Amore, 1990; Ku & D'Amore, 1995). D'autre proposent des mécanismes de sécrétion qui seraient indépendant du RE et du golgi (Mignatti et al,

1992; Florkiewicz et al, 1995). Ces différentes hypothèses restent encore à approfondir et sont, pour le moment, encore bien controversés.

Le bFGF interagit avec des récepteurs spécifiques à la surface cellulaire. Quatre familles de récepteurs pour les FGFs (FGFRs) ont été identifiés dans le cerveau, le FGFR1 (flg), le FGFR2 (bek), le FGFR3 et le FGFR4 (Jaye et al, 1992; Johnson & Williams, 1993). Ces récepteurs partagent certaines caractéristiques, comme un domaine tyrosine kinase (TK) cytoplasmique, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire de liaison au ligand. De plus, il semblerait que le bFGF possède un double système de récepteur c'est à dire, le FGFR et l'héparan sulfate (HS) protéoglycan. Il est généralement accepté que la présence des deux récepteurs soit essentielle à l'activité du bFGF (Turnbull et al, 2001; Delehedde et al, 2001). Le mode par lequel les deux molécules, FGFR et HS, coopèrent pour induire la dimérisation et la signalisation intracellulaire est toute fois controversé. Selon les études de Delehedde et al., (Delehedde et al, 2002), deux modèles pourraient être considérés, soit une molécule de bFGF dimérise le FGFR avec HS qui lie le bFGF et le FGFR ou deux complexes indépendants de bFGF et HS permettent la dimérisation du récepteur au FGF. Une chose est certaine, la liaison du bFGF induit la dimérisation de son récepteur et l'activité tyrosine kinase intracellulaire (Mohammadi et al, 1996; Schlessinger et al, 2000). Le FGFR est similaire à plusieurs autres récepteurs associés au TK et active les mêmes voies de signalisation. Par exemple, comme le démontre la figure 4.1, le FGFR active la voie ras/MAP kinase (*Mitogen-activated Protein Kinases*) via la formation du complexe Shc/Grb2-Sos (Szebenyi & Fallon, 1999). La

stimulation du FGFR permet aussi l'augmentation de l'inisitol-1,4,5-trophosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG), qui active ensuite la protéine kinase C (PKC), augmente la calcium intracellulaire et finalement favorise l'activation de la CaM Kinase (Szebenyi & Fallon, 1999). Le bFGF est important dans le développement et la fonction de plusieurs systèmes biologiques. Le tableau 4.0 résume la panoplie d'actions et de systèmes influencés par le bFGF.

Tableau 4.0 Actions du bFGF dans différents systèmes

Systèmes et/ou organes	<i>Implications/Rôles/fonctions générales</i>
Cerveau	Différentiation et survie des neurones
Vaisseaux sanguins	Angiogenèse, prolifération des cellules des muscles lisse. Anthérogenèse, contrôle de la pression sanguine
Poumons	Développement des embranchements, fibrose
Membre	Développement des membres
Muscle	Myogenèse
Os	Chondrogenèse
Hématopoïèse	Stimulation de la granulopoïèse, de la mégakaryocytopoïèse, des cellules souches, favorise la survie cellulaire, effets anti-apoptotiques
Système reproducteur	Spermatogenèse
Yeux	Favorise la survie des photorécepteurs
Peau	Mélanogenèse, implications dans la production des kératinocytes, réparation tissulaire

Lors du développement du système nerveux chez le rat, une importante immunoréactivité contre le bFGF, aux stades embryonnaires E16 et E17, est notée dans le cortex, le striatum, le tronc cérébral, la moelle épinière et les ganglions spinaux (Weise et al, 1993). Chez le rat adulte, le bFGF se retrouve dans les astrocytes, dans une sous population neuronale et parfois même dans les microglies (Gomez-Pinilla et al, 1992). Un des rôles bien établis du bFGF est son rôle de facteur neurotrophique, il semble participer au développement de l'arborisation dendritique et favorise les branchements neuronaux (Aoyagi et al, 1994; Bikfalvi et al, 1997; Abe et al, 2001; Reuss et al, 2003). Il semble aussi réguler la différenciation cellulaire des astrocytes et l'expression de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) in vitro (Reuss et al, 2003). Les cellules gliales humaines et plusieurs types de lignée cellulaire expriment le bFGF de façon nucléaire (Moffett et al, 1996; Joy et al, 1997; Stachowiak et al, 1997a). Considérant l'hypothèse que le bFGF nucléaire ne serait pas sécrété, certaines données proposent l'implication d'une signalisation intracellulaire (Joy et al, 1997; Stachowiak et al, 1997b). De plus, les astrocytes et les cellules de gliome U251MG expriment le FGFR1 de façon nucléaire (Stachowiak et al, 1997b), ce qui vient appuyer les observations de plusieurs laboratoires concernant les effets du bFGF nucléaire sur la prolifération et la migration cellulaire (Imamura et al, 1990; Wiedlocha et al, 1994; Joy et al, 1997; Peng et al, 2002; Somanathan et al, 2003; Stachowiak et al, 2003a). Par contre, la stratégie employée par le bFGF pour influencer le développement des neurones reste encore à explorer.

Comme nous l'avons amplement décrit dans la section 3.4, les astrocytes de l'ATV et de la SN_c expriment le bFGF nucléaire. Cette expression est augmentée lors de l'administration répétée d'AMPH. De plus, les neurones dopaminergiques de la SN_c expriment le FGFR1 (Matsuo et al, 1994), l'immunomarquage astrocytaire contre le FGFR1 n'est pas décrit dans ce model. L'augmentation de l'expression du bFGF par les astrocytes de l'ATV et la SN semblerait impliquée dans l'initiation de la sensibilisation comportementale, potentiellement via l'action du polypeptide, bFGF, sur les neurones DAergiques, mais ceci reste à être confirmé.

5. Objectifs de l'étude


La prise de drogues d'abus, comme l'AMPH, est associée à une adaptation du SNC, en particulier dans la région du mésencéphale, qui comprend l'ATV et la SN. La prise répétée d'AMPH induit un état de sensibilisation, soit une plus grande sensibilité de l'animal, ou de l'homme, aux effets psychomoteurs de la drogue. Des études *in vivo* ont suggéré que la sensibilisation à l'AMPH soit associée à l'augmentation de l'expression d'un facteur de croissance, le *basic fibroblaste growth factor* (bFGF), par les astrocytes du mésencéphale. Le rôle et la fonction précise du bFGF astrocytaire dans le mésencéphale, ainsi que le lien entre l'augmentation de son expression et l'induction de la plasticité synaptique dans les neurones DAergiques est encore obscur. Notre hypothèse est que l'augmentation de l'expression du bFGF par les astrocytes influence positivement la fonction et le développement synaptique des neurones DAergiques. À l'aide d'un modèle de co-culture d'astrocytes, provenant du mésencéphale, et de neurones DAergiques nous évaluerons les impacts de l'expression de bFGF sur la fonction et le développement synaptique des neurones DAergiques.

Nos méthodes et résultats sont présentés dans la prochaine section, sous la forme d'un manuscrit devant être soumis prochainement pour publication.

Article

Accord des coauteurs

1. Identification de l'étudiant et du programme

Forget, Caroline 
M.Sc. Pharmacologie

2. Description de l'article

Auteurs: Forget Caroline, Jane Stewart et Louis-Éric Trudeau

Titre : *Impact of basic FGF expression in astrocytes on dopamine neuron synaptic function and development*

Revue et date de publication: Article en rédaction

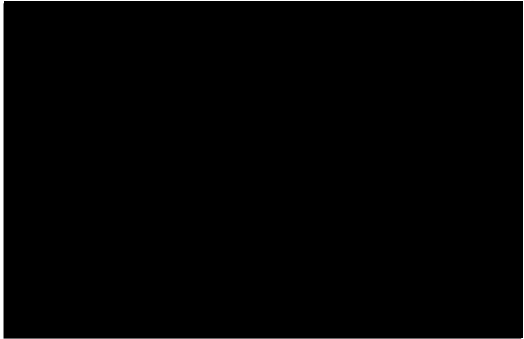
3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Caroline Forget, inclus cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre;

Impact de l'expression du bFGF par les astrocytes du mésencéphale sur le développement et la fonction synaptique des neurones dopaminergiques.

Louis-Éric Trudeau
Coauteur

Jane Stewart
Coauteur


26 jan. 2005
Date

25/01/05
Date

Receiving editor: Phil Haydon

**IMPACT OF BASIC FGF EXPRESSION IN ASTROCYTES ON
DOPAMINE NEURON SYNAPTIC FUNCTION AND
DEVELOPMENT**

Caroline Forget¹, Jane Stewart², and Louis-Éric Trudeau^{1*}

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal¹, and
Center for Studies in Behavioral Neurobiology, Department of Psychology,
Concordia University².

*. To whom correspondence should be addressed at:

Department of Pharmacology
Faculty of Medicine
Université de Montréal
C.P. 6128, Succursale Centre-Ville
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7
Tel. 514-343-5692
Fax. 514-343-2291

Running title : Impact of astrocytic bFGF on dopamine neurons

Number of figures: 6

Number of words in manuscript (7577), abstract (252) and introduction (501).

Key words : astrocytes, bFGF, synapse formation, dopamine release, rat

Acknowledgements: This work was supported in part by a team grant from Fonds de Recherche sur la Nature et les Technologies (Québec) and by the Canadian Institutes of Health Research. Louis-Éric Trudeau is a scholar of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. We wish to thank Marie-Josée Bourque for her important contribution to the preparation and maintenance of the neuronal cultures and for image capture and processing.

Abstract

Behavioural sensitization to amphetamine (AMPH) requires action of the drug in the ventral midbrain where dopamine (DA) neurons are located. In vivo studies suggest that AMPH sensitization requires enhanced expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the nucleus of midbrain astrocytes. One idea is that the AMPH-induced increases in bFGF expression in astrocytes leads to enhanced secretion of this peptide and to long-term plasticity in DA neurons. To study directly the effects of astrocytic expression of bFGF on DA neurons we established a cell-culture model of mesencephalic astrocytes and DA neurons. Immunolabeling showed that even in the absence a pharmacological stimulus, the majority of mesencephalic astrocytes in culture express bFGF at a nuclear level. Arguing against the idea that bFGF was secreted, bFGF was undetectable in the extracellular medium (below 10 pg/ml). However, supplementing culture medium with exogenous bFGF at standard concentrations (20 ng/ml) lead to a dramatic change in the morphology of astrocytes, increased spontaneous DA release, and inhibited synapse formation by individual DA neurons. RNA interference (siRNA) against bFGF mRNA, caused a reduction in DA release but produced no change in synaptic development. Together these data demonstrate that under basal conditions (in the absence of a pharmacological stimulus such as amphetamine) the growth factor bFGF is not secreted even though there is abundant nuclear expression by astrocytes. The effects of bFGF seen here on DA neurons are thus likely to be mediated through more indirect glial-neuronal interactions, leading to enhanced DA release without a necessary change in synapse number.

Introduction

Psychomotor stimulant drugs such as amphetamine (AMPH) produce multiple effects. Notable among them is their ability to increase extracellular levels of dopamine (DA), increase locomotor activity and support self-administration in humans and laboratory animals. The repeated intermittent administration of many drugs of abuse such as AMPH results in a progressive increase in their psychomotor activating and rewarding effects, a phenomenon known as behavioural sensitization (Segal & Schuckit, 1983; Robinson & Becker, 1986; Kalivas & Stewart, 1991; Robinson & Berridge, 1993; Vezina et al, 2002). One of the principal immediate actions of AMPH is to increase extracellular levels of DA in the terminal and cell body regions of midbrain DA neurons (Seiden et al, 1993; Sulzer et al, 1995; Kahlig et al, 2005).

Repeated administration of AMPH into the ventral tegmental area (VTA) but not into the nucleus accumbens (Nacc), is sufficient to induce sensitized behavioural responses and enhanced DA release in response to subsequent systemic injections of AMPH, or cocaine (Kalivas & Weber, 1988; Vezina & Stewart, 1990; Vezina, 1993; Vezina, 1996). Glutamatergic transmission is necessary for sensitization. AMPH increases glutamate efflux in the VTA (Wolf & Xue, 1998; Wolf & Xue, 1999; Wolf et al, 2000) and both systemic and intra-VTA administration of NMDA, AMPA, or metabotropic glutamate receptors antagonists during the induction phase of sensitization prevent the development of sensitization to AMPH, or cocaine (Karler et al, 1989; Karler et al, 1990; Karler et al, 1991; Stewart & Druhan, 1993; Li et al,

1997; Druhan & Wilent, 1999; Li et al, 1999). The long term changes induced in DA neurons by stimulant drugs might in addition result from the activation of growth factors, such as basic fibroblast growth factor (bFGF). Basic FGF is produced mainly by astrocytes and promotes growth and survival of midbrain DA cells (Chadi et al, 1993; Bouvier & Mytilineou, 1995; Hou et al, 1997). Repeated intermittent AMPH administration increases bFGF immunoreactivity (IR) in the VTA and SN for up to one month (Flores et al, 1998). Moreover the co-administration of AMPH and kynurenic acid, a broad spectrum glutamate receptor antagonist, blocks the increase in bFGF-IR induced by AMPH. In addition, bFGF immunoneutralization blocks the induction of sensitization to AMPH and co-treatment with CPP, an NMDA receptor antagonist, prevents both the increase in the expression of bFGF in VTA and SN and the development of sensitization (Flores et al, 2000). Basic FGF in the VTA thus plays a critical role in sensitization to AMPH. Furthermore we have found recently that AMPH induces dendritic growth in VTA DA neurons *in vivo* via endogenous bFGF (Mueller et al, 2004).

The link between bFGF expression in VTA astrocytes and long-term plasticity in DA neurons is unclear. To begin addressing this question we used a primary mesencephalic culture system. We found abundant nuclear bFGF expression in mesencephalic astrocytes under basal condition but this was not accompanied by significant elevations of extracellular bFGF. Partial knockdown of bFGF using RNA interference caused a reduction in DA release but not in synapse number.

Materials and methods

Cell culture

For astrocytes culture, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanaesthetized and their brains were rapidly removed and transferred into ice-cold dissociation solution. A 1-mm-thick slice was cut at the level of the midbrain flexure from which a block of tissue, approximately 2mm³ in size, was surgically isolated. The blocks were digested in papain for 60 min at 37°C before being gently triturated. The dissociated cells were diluted in BME and 5 ml of cell suspension was plated in flasks (two rats were used per flask). 48 hours after plating, cells were washed with cold BME to kill neurons and select glial cells. After one week, glial cells were detached from the flask with a 0.05% trypsin solution and centrifuged. Cells were counted and plated on standard coverslips coated with collagen/poly-L-lysine at 100 000 cells/ml. When the cells reached confluence, after 48 hours, fluorodeoxyuridine (FUdR) was added to inhibit their proliferation.

Experiments measuring extracellular DA levels were performed using standard DA neuron cultures prepared according to recently described protocols (Bourque & Trudeau, 2000; Congar et al, 2002; Bergevin et al, 2002; Jomphe et al, 2003), originally derived from (Cardozo, 1993) and (Sulzer et al, 1998). Overall, the procedure involves plating neurons onto a pre-established monolayer of purified astrocytes. The coating and the layer of astrocytes partially mimic the extracellular matrix by promoting cell adhesion, growth, and survival. For some experiments, cultures were treated at day two and five after neuronal plating and used at day seven.

For other experiments, cultures were treated at day five and seven and used at day 10 after neuronal plating.

For neuronal cultures, neonatal (P0 to P2) Sprague-Dawley rats were cryoanaesthetized and their brains were rapidly removed and transferred into ice-cold dissociation solution. A 1-mm-thick slice was cut at the level of the midbrain flexure from which a block of tissue, approximately 2mm³ in size, was surgically isolated. This block was found previously to contain most neuronal populations immunoreactive for tyrosine hydroxylase, a DA biosynthetic enzyme. The blocks were digested in papain for 30 min at 37°C before being gently triturated. The dissociated cells were collected by centrifugation, counted, and plated at a concentration of 350 000 living cells per millilitre. This concentration gave consistent levels of extracellular DA and was optimal for neuronal viability. In order to provide an extracellular milieu as rich as possible in natural growth factors, a flask plated with astrocytes was filled with BME (Basal Medium Eagle) for two weeks to produce conditioned medium (BME+). Neuronal cultures were maintained in a solution composed of (1:3) BME+ and Neurobasal A supplemented with penicillin/streptomycin, GlutaMAX-1, 10% fetal bovine serum (GIBCO, USA) and B27 serum extender (Invitrogen). FUdR was added to the medium 24 hours after neurons were plated to prevent cell division of newly plated cells, and kynurenic acid (0.5mM), a broad spectrum glutamate receptor antagonist, was added 7 days after plating in order to prevent excitotoxicity. Cell cultures were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

Experiments quantifying synaptic development were performed on isolated neurons in μ -droplet cultures. In this model, cultured neurons grow on μ -droplets of substrate that limit synaptic connectivity to the cells within the droplets. Under such conditions, single neurons establish synaptic connections onto themselves, called autapses, thus allowing measurements or quantification of synaptic development from single isolated neurons. Coverslips were first coated with poly-L-ornithine and then agarose, which prevent cell adhesion. Collagen was applied on top of the agarose using a micro-sprayer, thus establishing droplets or islands of substrate that are suitable for cell growth. Astrocytes and neurons were then plated in much the same way as for standard cultures, although final concentrations for astrocytes and neurons were respectively 60 000 and 100 000 living cells per millilitres. These proportions maximized the number of μ -droplets containing single neurons.

Sampling procedure and dopamine assay

In order to examine extracellular DA levels, standard neuronal cultures were deposited in a well containing 400 μ l of normal saline (NS) from which 100 μ l samples were drawn every 3 min. The NS was composed of (in mM): NaCl 140; KCl 5; MgCl₂ 2; CaCl₂ 2; Sucrose 6; Glucose 10; HEPES 10. Osmolarity was 305-310 mOsm and pH was adjusted to 7.35 with NaOH 5N. Numbered aliquots were prepared prior to the experiment containing 2 μ l of preservative solution (pH 6.5) consisting of ethylene glycol-bis(β -amino-ethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) (90 mg/ml) and reduced glutathion (60 mg/ml) in order to prevent the

oxidation of DA. The aliquots also contained 20 μ l of distilled water to yield sufficient volume for the automatic injection into the HPLC system (automatic injection of 100 μ l). The data shown in this paper were corrected for this dilution. The collected 100 μ l-samples of extracellular medium (25% of total volume) withdrawn from the well were dropped into the numbered aliquots and immediately replaced with an equivalent volume of fresh NS. The aliquots were put on dry ice for the duration of the experiment (usually 50 min) and then stored at -80°C until analysis with the HPLC system. The first four aliquots were usually not analysed since preliminary experiments showed that extracellular levels of DA required 15 min to stabilize. Samples were thawed and then placed onto the stage of the HPLC system (Gilson, Villiers-Le-Bel, France), to be injected automatically every 10 min. HPLC coupled to a coulometric detector (Coulochem II; ESA, Bedford, USA) was used to detect DA (detection limit: approximately 25 pg/100 μ l sample). For experiments evaluating the impact of treatments on evoked DA release, saline containing 40mM potassium was used. NaCl was lowered by 40mM to prevent changes in osmolarity.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 100% methanol for 5 min at 4°C , permeabilized with 0.1% triton X-100 for 10 min and bathed for 5 min in a solution containing BSA (0.5%) in order to block nonspecific binding sites. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies: rabbit monoclonal antibody against TH (1:1000; Pelfrez Biological, USA), mouse monoclonal anti- bFGF (1:500; Upstate biotechnology, Lake Placid, NY), mouse monoclonal anti-SV2 (1:500; Developmental Studies

Hybridoma Bank, Iowa, USA) or rabbit polyclonal anti-cow S-100 (1:5000; DAKO, California, USA). Primary antibodies were detected using Alexa-488 or Alexa-647 (1:200) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) fluorescently labelled secondary antibodies before being finally mounted with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, USA).

Confocal microscopy

μ -droplet neuronal cultures pre-treated with neutralizing anti-bFGF antibody, exogenous bFGF, siRNA against bFGF were immunolabelled with anti-TH and anti-SV2. Primary antibodies were detected using Alexa-488 and Alexa-647, respectively. Images were acquired using a point-scanning confocal microscope from Prairie Technologies LLC (Middleton, WI, USA). Excitation was achieved using the 488nm line of an argon ion laser and the 633nm line of a helium ion laser. Images were analysed using Metamorph software v4.5 from Universal Imaging Corp (Downingtown, PA, USA).

Small interfering RNA (siRNA)

The siRNA were synthesized *in vitro* with a construction kit from Ambion (Austin, TX, USA). Three different oligonucleotides were tested and the most effective were selected. RNAiFect reagent from Qiagen (Mississauga, Ontario, CAN) was used for lipofection. Depending on the cell surface the quantity of siRNA and RNAiFect reagent were changes respecting the 1/5 ratio, 1 μ g of siRNA for 5 μ l of RNAiFect reagent. The astrocytes were incubated for 24 hours with the transfection complex. We performed transfection with the siRNA against bFGF. Control experiments were performed with siRNA against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and without any siRNA.

Western blot

Purified astrocytes from midbrain primary cultures were transfected with siRNA against bFGF, using RNAiFect lipofection reagent (Qiagen). The transfection complexes were applied to cells for 24 hours. Cell monolayers were then washed with tris-buffered saline (TBS) (pH 7.4) and immediately lysed (lysis buffer; TBS with 1% of IGEPAL CA-630 and 0.5% SDS 20% with added protease inhibitors; PMSF 1:100, Leupeptin 1:100 and Pepstatin 1:1000). Cell lysates (30 µg) were resolved by electrophoresis on 15% polyacrylamide minigels and transferred on pure nitrocellulose membrane (0.45 µm). Blots were probed with anti-bFGF (1:500) and anti-β-Actin (1:10,000; Abcam, Cambridge, MA, USA). Bound antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson immunoresearch laboratories, West Grove, PA, USA) and revealed by chemiluminescence (SuperSignal, West Pico Chemoluminescence Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA). The blots were quantified by densitometric evaluation with ImageQuant software (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc, CAN).

ELISA test against bFGF

A human basic FGF ELISA Kit from Calbiochem (San Diego, CA, USA) was used to evaluate the extracellular concentration of bFGF. We first performed standard curves with bFGF protein at known concentrations (160, 80, 40, 20, 10 and 0 pg/ml). Optical density was recorded for the standard samples and unknown samples and the bFGF concentration was calculated according to the standard curve.

Results

bFGF is expressed in the nucleus of the majority of cultured mesencephalic astrocytes

We first examined the expression of bFGF in primary mesencephalic cells in culture. Using double-label immunocytochemistry to detect bFGF and the astrocyte-specific protein S-100, we found that bFGF immunoreactivity was present in the majority of astrocytes but not in neurons (Fig. 1A, 1B, 1C, 1D). The labelling was essentially nuclear in all cells examined (Fig. 1E). Western blots prepared from purified astrocytes showed that all three bFGF isoforms can be detected (Fig. 1F).

bFGF does not appear to be secreted

The capacity of bFGF-expressing cells to release this growth factor is controversial. We thus performed an ELISA test to determine whether the high expression of bFGF by mesencephalic astrocytes is accompanied by detectable extracellular accumulation of bFGF. Culture medium from astrocyte cultures, astrocyte-neuron mixed cultures or control medium not exposed to cells were compared. In all cases, bFGF levels were found to be below the limit of detection, which was around 10 pg/ml (Fig. 2A, 2B). These data show that abundant bFGF expression by cultured mesencephalic astrocytes is not accompanied by significant secretion of this polypeptide.

Additional support for a lack of bFGF secretion

In support of our conclusion of a lack of bFGF secretion, we found that the morphology of cultured astrocytes in our model did not show the characteristic highly stellar shape of astrocytes exposed to bFGF (Eclancher et al, 1996a; Reilly et al, 1998a; Brambilla et al, 2003). Indeed, treatment of cultured astrocytes with exogenous bFGF produced the expected striking alteration in cell morphology (Fig. 2C, 2D)

Another prediction deriving from the lack of bFGF secretion is that extracellular application of a bFGF function-blocking antibody should fail to affect DA neurons. Using isolated DA neurons after two days in μ -culture (Fig. 3A), we quantified synaptic development following a five-days treatment with neutralizing anti-bFGF mouse monoclonal antibody (10 μ g/ml). We found that the treatment had no effect on the synaptic development of DA neurons (Fig. 3B). As a positive control, we also examined the effect of exogenous bFGF (20 ng/ml) on synaptic development. As shown in figure 3C, exogenous bFGF actually caused a small but significant inhibition of synaptic development.

To provide a more direct evaluation of the functioning of DA neurons, we also used HPLC to measure basal as well as K^+ -evoked DA levels in standard mixed mesencephalic cultures. Each coverslip contained between 300 and 800 spontaneously firing DA neurons (St-Gelais et al, 2004). We initially treated standard cultures at day two in culture with exogenous bFGF (20 ng/ml), repeating the

treatment at day four in culture. DA levels were then sampled at day seven. Exposure to bFGF caused a significant increase in the basal level of extracellular DA (197.35 ± 8.80 pg/ml, $n=21$) compared to control cells not exposed to bFGF (149.36 ± 7.15 pg/ml, $n=15$) ($p < 0.05$) (Fig. 4A). Potassium-evoked DA release was not significantly affected by exogenous bFGF (768.00 ± 71 pg/ml, $n=21$ vs. 710.40 ± 80 pg/ml, $n=15$) (Fig 4A, 4B). Similar experiments were performed on more mature cultures treated at days five and seven in culture, with DA sampled at day ten. Basal DA release was again significantly higher after bFGF treatment (351.92 ± 37.3 pg/ml, $n=18$ vs. 236.13 ± 24 pg/ml, $n=12$) ($p < 0.05$) (Fig. 4C, 4D). Potassium-evoked DA release showed a modest but non-significant increase (1954.61 ± 245 pg/ml, $n=18$ vs. 1574.22 ± 203 pg/ml, $n=12$). Together these findings show that exogenous bFGF can affect the function of DA neurons and the morphology of astrocytes. These findings argue that if endogenous bFGF had been released by astrocytes in our cultures, it should have produced effects similar to those produced by exogenous bFGF and these effects should have been blocked by a function blocking antibody. The effects of this growth factor on DA neurons are therefore unlikely to be mediated through extracellular secretion.

RNA interference against bFGF decreases dopamine release but not synapse number

If bFGF is not secreted, an alternate hypothesis is that it acts within astrocytes to indirectly affect the functioning of DA neurons. To test this hypothesis we used RNA interference (siRNA) to decrease endogenous levels of bFGF in confluent cultured

astrocytes. Figures 5A and 5B show that bFGF expression was decreased by 50 to 60% 24 hours after transfection with siRNAs. Quantified independently, the 18kDa isoform was decreased to $48.58 \pm 8.60\%$ of control (n=5) ($p < 0.05$), the 21kDa isoform to $40.35 \pm 9.98\%$ of control (n=5) ($p < 0.05$) and the 22 kDa isoform to $43.78 \pm 8.54\%$ of control (n=5). Transfection with a control siRNA directed against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) failed to significantly affect bFGF levels (Fig. 5A)

Using standard mixed cultures we next transfected siRNA against bFGF at day seven in culture and sampled extracellular DA levels at day ten in culture. Downregulation of bFGF in astrocytes caused a significant reduction in basal DA levels (115.22 ± 7.31 pg/ml, n=14, vs. 161.57 ± 20.60 pg/ml, n=9) ($p < 0.05$) (Fig. 6A, 6B). Potassium-evoked DA release was also slightly decreased, but the effect did not reach statistical significance (1012.12 ± 111.4 pg/ml, n=14, vs. 1346.12 ± 161.0 pg/ml, n=9) (Fig. 6A, 6B). Similar siRNA transfection experiments were also performed in isolated DA neuron at day two in culture and fixed for analysis at day seven in culture. As shown in Figure 6C, this failed to affect synaptic development. It would appear from these findings that a reduction of bFGF protein levels in astrocytes reduces basal DA release, but does not affect the synaptic development of DA neurons.

Discussion

The objective of the present study was to establish the role of astrocytic bFGF in the synaptic development and function of DA neurons. We show that in VTA astrocytes in primary culture, bFGF protein is expressed in the vast majority of cells. However, its expression is exclusively nuclear and it does not appear to be actively secreted. Using a RNA interference strategy, we found that decreasing endogenous bFGF protein levels produced no change in synapse number, but decreased DA release. Taken together, these results suggest that astrocytic bFGF acts indirectly on DA neurons to enhance their synaptic function without directly influencing morphological synapse development.

Although this has never been quantified directly, it appears that in the mature brain, only a relatively small proportion of astrocytes express nuclear bFGF under basal conditions (Tessler & Neufeld, 1990; Woodward et al, 1992; Szele et al, 1995; Salik et al, 2005). Interestingly, the number of astrocytes that express nuclear bFGF in the ventral midbrain increases following repeated-intermittent AMPH administration (Flores et al, 1998; Flores et al, 1999; Flores et al, 2000). Since we find that most cultured astrocytes express nuclear bFGF, it may be that the process of cell dissociation and culture puts these cells in a state similar to that found after sensitization to drugs of abuse (Flores et al, 1998).

Basic FGF is a polypeptide that exists in three isoforms with molecular weight of 18, 21 and 22kDa, respectively in the rat (Powell & Klagsbrun, 1991; Giordano et al,

1992). The 18 kDa isoform is reported to be predominantly cytoplasmic while the high molecular weight isoforms are preferentially localized in nuclear and ribosomal compartments (Renko et al, 1990; Florkiewicz et al, 1991; Klein et al, 1996). Even if all three isoforms are expressed in our preparation, only nuclear expression can be detected in cultured mesencephalic astrocytes (Fig. 1). Human astrocytes have however been reported to express both nuclear and cytoplasmic bFGF (Stachowiak et al, 1994; Moffett et al, 1996; Joy et al, 1997). The capacity of bFGF to be secreted has long been the subject of debate. The mechanism of bFGF secretion remains unclear since the peptide bears no signal sequence (Abraham et al, 1986a). bFGF also does not progress through the endoplasmic reticulum and the Golgi via the regulated secretory pathway (Abraham et al, 1986a; Abraham et al, 1986b; Schweigerer et al, 1987). It has been suggested that bFGF is released from cells as the result of cell death or cell damage, during non-lethal membrane disruption or following chemical injuries (Klagsbrun & Vlodavsky, 1988; McNeil et al, 1989; D'Amore, 1990; Ku & D'Amore, 1995). Others have proposed that bFGF is released by cells via a secretory pathway that is independent from the endoplasmic reticulum or Golgi (Vlodavsky et al, 1987; D'Amore, 1990; Rifkin et al, 1991; Mignatti et al, 1992; Florkiewicz et al, 1995). Moreover, Le Roux and Esquenazi (2002), used western blotting to demonstrate the presence of bFGF in media conditioned by cortical astrocytes (Le & Esquenazi, 2002). Although we have not evaluated here whether the bFGF contained in our astrocytes can be released by chemical or pathological stimuli, our ELISA measurements show quite clearly that extracellular bFGF levels are extremely low and actually correspond to background signal (Fig. 2A, B). Such low levels are

insufficient to produce effects typically induced by modest concentrations of exogenous bFGF such as induction of a stellate morphology in astrocytes (Eclancher et al, 1990; Eclancher et al, 1996b; Reilly et al, 1998b), an effect that was readily seen in our experiments after short-term exposure to exogenous bFGF (Fig. 2D). Compatible with the hypothesis that bFGF is not released, we observed that treatment of isolated DA neurons with bFGF neutralizing antibodies did not change the synaptic development of DA neurons (Fig. 3A) (Fig. 3B). However, exogenous bFGF caused a modest but significant decrease in synapse number (Fig. 3C). This observation is compatible with the earlier work of Williams et al. (1995), who showed that bFGF can under certain circumstances inhibit neurite outgrowth in a dose dependent manner via arachidonic acid production (Williams et al, 1995). We thus conclude that the abundant nuclear bFGF is not released in any significant manner in our midbrain astrocytes cultures.

Even though we found that bFGF is not released, a decrease in endogenous bFGF levels in response to RNAi directed against bFGF mRNA caused a decrease in DA release (Fig. 6A, 6B). This implies that astrocytic bFGF acts to promote DA release. If bFGF is not released from astrocytes, then how could it lead to plastic changes in DAergic neurons such as enhanced DA release? Trudel et al. (Trudel et al, 2000) proposed that bFGF can be translocated to the cell surface without release in the conditioned media. This hypothesis is not readily compatible with our results since whether it is released or not in the medium, its presence on the extracellular membrane should activate bFGF receptors and cause physiological effects such as

induction of a stellate morphology in astrocytes. Another interesting hypothesis proposed by Stachowiak and collaborators (Stachowiak et al, 1997a; Stachowiak et al, 1997b; Hu et al, 2004) is that FGFR1 is localised in the nucleus and could serve as an effector for nuclear bFGF. Cellular effects of bFGF could indeed be mediated by an intracellular (intracrine) pathway (Logan, 1990) (Sherman et al, 1993) (Bouche et al, 1987; Nakanishi et al, 1992; Arese et al, 1999) that operates through nuclear FGFR1. Functional FGFR1 within the nucleus could mediate the mitogenic effects of bFGF in many cell types (Imamura et al, 1990; Wiedlocha et al, 1994; Bikfalvi et al, 1995; Joy et al, 1997). Activation of such receptors could perhaps also mediate the effects we have noted on synaptic function in the present study. This could occur if nuclear bFGF regulates various aspects of glial-neuronal communication, for example through induction of the release of growth factors or other gliotransmitters such as glutamate or ATP (Cotrina et al, 2000; Haydon, 2001; Ullian et al, 2004).

Based on our results, it may now be necessary to reconsider the range of possible models proposed by Flores and Stewart to explain AMPH sensitization (Flores & Stewart, 2000b). As previously proposed, AMPH may lead to D₁ DA receptor stimulation in the VTA (Hosli & Hosli, 1993; Bal et al, 1994; Luo et al, 1998; Zanassi et al, 1999), thus causing an elevation of extracellular glutamate and stimulation of bFGF synthesis in astrocytes. We can now hypothesize that at least in part, some of the long-term plasticity induced in DA neurons under such circumstances (Mueller et al, 2004) may result from bFGF-mediated intracrine signalling in astrocytes, leading to the generation of a secondary diffusible messenger

or some contact-dependent signal in DA neurons. Further experiments will be required to test this hypothesis and evaluate more closely the nature of the glial-neuronal mechanisms potentially involved.

In conclusion, our work shows that cultured mesencephalic astrocyte express abundant levels of bFGF in their nuclear compartment but that this growth factor may not necessarily be released. Instead, intracellular activation of bFGF signalling pathways may regulate astrocyte function and signals, indirectly leading to the functional regulation of DA neurons.

References

- Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D. & Fiddes, J.C. (1986a) Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*, **233**, 545-8.
- Abraham, J.A., Whang, J.L., Tumolo, A., Mergia, A., Friedman, J., Gospodarowicz, D. & Fiddes, J.C. (1986b) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J*, **5**, 2523-8.
- Arese, M., Chen, Y., Florkiewicz, R.Z., Gualandris, A., Shen, B. & Rifkin, D.B. (1999) Nuclear activities of basic fibroblast growth factor: potentiation of low-serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localization signals. *Mol Biol Cell*, **10**, 1429-44.
- Bal, A., Bachelot, T., Savasta, M., Manier, M., Verna, J.M., Benabid, A.L. & Feuerstein, C. (1994) Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res Mol Brain Res*, **23**, 204-12.
- Bergevin, A., Girardot, D., Bourque, M.J. & Trudeau, L.E. (2002) Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacology*, **42**, 1065-78.
- Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Quarto, N., Mignatti, P. & Rifkin, D.B. (1995) Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J Cell Biol*, **129**, 233-43.

Bouche, G., Gas, N., Prats, H., Baldin, V., Tauber, J.P., Teissie, J. & Amalric, F. (1987) Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal genes in ABAE cells undergoing G0----G1 transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6770-4.

Bourque, M.J. & Trudeau, L.E. (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci*, **12**, 3172-80.

Bouvier, M.M. & Mytilineou, C. (1995) Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci*, **15**, 7141-9.

Brambilla, R., Cottini, L., Fumagalli, M., Ceruti, S. & Abbracchio, M.P. (2003) Blockade of A2A adenosine receptors prevents basic fibroblast growth factor-induced reactive astrogliosis in rat striatal primary astrocytes. *Glia*, **43**, 190-4.

Cardozo, D.L. (1993) Midbrain dopaminergic neurons from postnatal rat in long-term primary culture. *Neuroscience*, **56**, 409-21.

Chadi, G., Moller, A., Rosen, L., Janson, A.M., Agnati, L.A., Goldstein, M., Ogren, S.O., Pettersson, R.F. & Fuxe, K. (1993) Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res*, **97**, 145-58.

Congar, P., Bergevin, A. & Trudeau, L.E. (2002) D2 receptors inhibit the secretory process downstream from calcium influx in dopaminergic neurons: implication of K⁺ channels. *J Neurophysiol*, **87**, 1046-56.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., Lopez-Garcia, J.C., Naus, C.C. & Nedergaard, M. (2000) ATP-mediated glia signaling. *J Neurosci*, **20**, 2835-44.

D'Amore, P.A. (1990) Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer Metastasis Rev*, **9**, 227-38.

Druhan, J.P. & Wilent, W.B. (1999) Effects of the competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, CPP, on the development and expression of conditioned hyperactivity and sensitization induced by cocaine. *Behav Brain Res*, **102**, 195-210.

Eclancher, F., Kehrl, P., Labourdette, G. & Sensenbrenner, M. (1996a) Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain. *Brain Res*, **737**, 201-14.

Eclancher, F., Kehrl, P., Labourdette, G. & Sensenbrenner, M. (1996b) Basic fibroblast growth factor (bFGF) injection activates the glial reaction in the injured adult rat brain. *Brain Res*, **737**, 201-14.

Eclancher, F., Perraud, F., Faltin, J., Labourdette, G. & Sensenbrenner, M. (1990) Reactive astrogliosis after basic fibroblast growth factor (bFGF) injection in injured neonatal rat brain. *Glia*, **3**, 502-9.

Flores, C., Rodaros, D. & Stewart, J. (1998) Long-lasting induction of astrocytic basic fibroblast growth factor by repeated injections of amphetamine: blockade by concurrent treatment with a glutamate antagonist. *J Neurosci*, **18**, 9547-55.

Flores, C., Salmaso, N., Cain, S., Rodaros, D. & Stewart, J. (1999) Ovariectomy of adult

rats leads to increased expression of astrocytic basic fibroblast growth factor in the ventral tegmental area and in dopaminergic projection regions of the entorhinal and prefrontal cortex. *J Neurosci*, **19**, 8665-73.

Flores, C., Samaha, A.N. & Stewart, J. (2000) Requirement of endogenous basic fibroblast growth factor for sensitization to amphetamine. *J Neurosci*, **20**, RC55.

Flores, C. & Stewart, J. (2000b) Basic fibroblast growth factor as a mediator of the effects of glutamate in the development of long-lasting sensitization to stimulant drugs: studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, **151**, 152-65.

Florkiewicz, R.Z., Baird, A. & Gonzalez, A.M. (1991) Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization. *Growth Factors*, **4**, 265-75.

Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D. & Florkiewicz, E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol*, **162**, 388-99.

Giordano, S., Sherman, L., Lyman, W. & Morrison, R. (1992) Multiple molecular weight forms of basic fibroblast growth factor are developmentally regulated in the central nervous system. *Dev Biol*, **152**, 293-303.

Haydon, P.G. (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 185-93.

Hosli, E. & Hosli, L. (1993) Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **40**, 477-506.

Hou, J.G., Cohen, G. & Mytilineou, C. (1997) Basic fibroblast growth factor stimulation of glial cells protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem*, **69**, 76-83.

Hu, Y., Fang, X., Dunham, S.M., Prada, C., Stachowiak, E.K. & Stachowiak, M.K. (2004) 90-kDa ribosomal S6 kinase is a direct target for the nuclear fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1): role in FGFR1 signaling. *J Biol Chem*, **279**, 29325-35.

Imamura, T., Engleka, K., Zhan, X., Tokita, Y., Forough, R., Roeder, D., Jackson, A., Maier, J.A., Hla, T. & Maciag, T. (1990) Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science*, **249**, 1567-70.

Jomphe, C., Levesque, D. & Trudeau, L.E. (2003) Calcium-dependent, D2 receptor-independent induction of c-fos by haloperidol in dopamine neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **367**, 480-9.

Joy, A., Moffett, J., Neary, K., Mordechai, E., Stachowiak, E.K., Coons, S., Rankin-Shapiro, J., Florkiewicz, R.Z. & Stachowiak, M.K. (1997) Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. *Oncogene*, **14**, 171-83.

Kahlig, K.M., Binda, F., Khoshbouei, H., Blakely, R.D., McMahon, D.G., Javitch, J.A. & Galli, A. (2005) Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3495-500.

Kalivas, P.W. & Stewart, J. (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain*

Res Rev, **16**, 223-44.

Kalivas, P.W. & Weber, B. (1988) Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, **245**, 1095-102.

Karler, R., Calder, L.D., Chaudhry, I.A. & Turkanis, S.A. (1989) Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci*, **45**, 599-606.

Karler, R., Calder, L.D. & Turkanis, S.A. (1991) DNQX blockade of amphetamine behavioral sensitization. *Brain Res*, **552**, 295-300.

Karler, R., Chaudhry, I.A., Calder, L.D. & Turkanis, S.A. (1990) Amphetamine behavioral sensitization and the excitatory amino acids. *Brain Res*, **537**, 76-82.

Klagsbrun, M. & Vlodavsky, I. (1988) Biosynthesis and storage of basic fibroblast growth factor (bFGF) by endothelial cells: implication for the mechanism of action of angiogenesis. *Prog Clin Biol Res*, **266**, 55-61.

Klein, S., Morimoto, T. & Rifkin, D.B. (1996) Characterization of fibroblast growth factor-2 binding to ribosomes. *Growth Factors*, **13**, 219-28.

Ku, P.T. & D'Amore, P.A. (1995) Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene and protein expression following its release from sublethally injured endothelial cells. *J Cell Biochem*, **58**, 328-43.

Le, R. & Esquenazi, S. (2002) Astrocytes mediate cerebral cortical neuronal axon and dendrite growth, in part, by release of fibroblast growth factor. *Neurol Res*, **24**, 81-92.

Li, Y., Hu, X.T., Berney, T.G., Vartanian, A.J., Stine, C.D., Wolf, M.E. & White, F.J. (1999) Both glutamate receptor antagonists and prefrontal cortex lesions prevent induction of cocaine sensitization and associated neuroadaptations. *Synapse*, **34**, 169-80.

Li, Y., Vartanian, A.J., White, F.J., Xue, C.J. & Wolf, M.E. (1997) Effects of the AMPA receptor antagonist NBQX on the development and expression of behavioral sensitization to cocaine and amphetamine. *Psychopharmacology (Berl)*, **134**, 266-76.

Logan, A. (1990) Intracrine regulation at the nucleus--a further mechanism of growth factor activity? *J Endocrinol*, **125**, 339-43.

Luo, Y., Kokkonen, G.C., Wang, X., Neve, K.A. & Roth, G.S. (1998) D2 dopamine receptors stimulate mitogenesis through pertussis toxin-sensitive G proteins and Ras-involved ERK and SAP/JNK pathways in rat C6-D2L glioma cells. *J Neurochem*, **71**, 980-90.

McNeil, P.L., Muthukrishnan, L., Warder, E. & D'Amore, P.A. (1989) Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol*, **109**, 811-22.

Mignatti, P., Morimoto, T. & Rifkin, D.B. (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol*, **151**, 81-93.

Moffett, J., Kratz, E., Florkiewicz, R. & Stachowiak, M.K. (1996) Promoter regions involved in density-dependent regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in human astrocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2470-5.

Mueller, D., Chapman, C., and Stewart, J. Early exposure to amphetamine alters the morphology of dopamine neurons in the ventral tegmental area. Society for Neuroscience Abstracts , Program No. 358.1. 2004.

Nakanishi, Y., Kihara, K., Mizuno, K., Masamune, Y., Yoshitake, Y. & Nishikawa, K. (1992) Direct effect of basic fibroblast growth factor on gene transcription in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 5216-20.

Powell, P.P. & Klagsbrun, M. (1991) Three forms of rat basic fibroblast growth factor are made from a single mRNA and localize to the nucleus. *J Cell Physiol*, **148**, 202-10.

Reilly, J.F., Maher, P.A. & Kumari, V.G. (1998a) Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2. *Glia*, **22**, 202-10.

Reilly, J.F., Maher, P.A. & Kumari, V.G. (1998b) Regulation of astrocyte GFAP expression by TGF-beta1 and FGF-2. *Glia*, **22**, 202-10.

Renko, M., Quarto, N., Morimoto, T. & Rifkin, D.B. (1990) Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J Cell Physiol*, **144**, 108-14.

Rifkin, D.B., Quarto, N., Mignatti, P., Bizik, J. & Moscatelli, D. (1991) New observations on the intracellular localization and release of bFGF. *Ann N Y Acad Sci*, **638**, 204-6.

Robinson, T.E. & Becker, J.B. (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of

amphetamine psychosis. *Brain Res*, **396**, 157-98.

Robinson, T.E. & Berridge, K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, **18**, 247-91.

Salik, E., Ercan, F., Sirvanci, S., Cetinel, S., Onat, F. & San, T. (2005) Effect of aging on the distribution of basic fibroblast growth factor immunoreactive cells in the rat hippocampus. *Brain Res Bull*, **64**, 409-15.

Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J.A., Fiddes, J.C. & Gospodarowicz, D. (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*, **325**, 257-9.

Segal & Schuckit (1983) Animals models of stimulant-induced psychosis. In Creese, I. (ed), *Stimulants: neurochemical, behavioral and clinical perspectives*. Raven, New York, pp. 131-167.

Seiden, L.S., Sabol, K.E. & Ricaurte, G.A. (1993) Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **33**, 639-77.

Sherman, L., Stocker, K.M., Morrison, R. & Ciment, G. (1993) Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development*, **118**, 1313-26.

St-Gelais, F., Legault, M., Bourque, M.J., Rompre, P.P. & Trudeau, L.E. (2004) Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci*, **24**, 2566-74.

Stachowiak, E.K., Maher, P.A., Tucholski, J., Mordechai, E., Joy, A., Moffett, J., Coons, S. & Stachowiak, M.K. (1997a) Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells--association with cell proliferation. *Oncogene*, **14**, 2201-11.

Stachowiak, M.K., Moffett, J., Joy, A., Puchacz, E., Florkiewicz, R. & Stachowiak, E.K. (1994) Regulation of bFGF gene expression and subcellular distribution of bFGF protein in adrenal medullary cells. *J Cell Biol*, **127**, 203-23.

Stachowiak, M.K., Moffett, J., Maher, P., Tucholski, J. & Stachowiak, E.K. (1997b) Growth factor regulation of cell growth and proliferation in the nervous system. A new intracrine nuclear mechanism. *Mol Neurobiol*, **15**, 257-83.

Stewart, J. & Druhan, J.P. (1993) Development of both conditioning and sensitization of the behavioral activating effects of amphetamine is blocked by the non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801. *Psychopharmacology (Berl)*, **110**, 125-32.

Sulzer, D., Chen, T.K., Lau, Y.Y., Kristensen, H., Rayport, S. & Ewing, A. (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J Neurosci*, **15**, 4102-8.

Sulzer, D., Joyce, M.P., Lin, L., Geldwert, D., Haber, S.N., Hattori, T. & Rayport, S. (1998) Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci*, **18**, 4588-602.

Szele, F.G., Alexander, C. & Chesselet, M.F. (1995) Expression of molecules associated with neuronal plasticity in the striatum after aspiration and thermocoagulatory lesions of the cerebral cortex in adult rats. *J Neurosci*, **15**, 4429-48.

Tessler, S. & Neufeld, G. (1990) Basic fibroblast growth factor accumulates in the nuclei of various bFGF-producing cell types. *J Cell Physiol*, **145**, 310-7.

Trudel, C., Faure-Desire, V., Florkiewicz, R.Z. & Baird, A. (2000) Translocation of FGF2 to the cell surface without release into conditioned media. *J Cell Physiol*, **185**, 260-8.

Ullian, E.M., Christopherson, K.S. & Barres, B.A. (2004) Role for glia in synaptogenesis. *Glia*, **47**, 209-16.

Vezina, P. (1993) Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res*, **605**, 332-7.

Vezina, P. (1996) D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **16**, 2411-20.

Vezina, P., Lorrain, D.S., Arnold, G.M., Austin, J.D. & Suto, N. (2002) Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity promotes the pursuit of amphetamine. *J Neurosci*, **22**, 4654-62.

Vezina, P. & Stewart, J. (1990) Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. *Brain Res*, **516**, 99-106.

Vlodavsky, I., Fridman, R., Sullivan, R., Sasse, J. & Klagsbrun, M. (1987) Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated

and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J Cell Physiol*, **131**, 402-8.

Wiedlocha, A., Falnes, P.O., Madshus, I.H., Sandvig, K. & Olsnes, S. (1994) Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell*, **76**, 1039-51.

Williams, E.J., Mittal, B., Walsh, F.S. & Doherty, P. (1995) FGF inhibits neurite outgrowth over monolayers of astrocytes and fibroblasts expressing transfected cell adhesion molecules. *J Cell Sci*, **108 (Pt 11)**, 3523-30.

Wolf, M.E. & Xue, C.J. (1998) Amphetamine and D1 dopamine receptor agonists produce biphasic effects on glutamate efflux in rat ventral tegmental area: modification by repeated amphetamine administration. *J Neurochem*, **70**, 198-209.

Wolf, M.E. & Xue, C.J. (1999) Amphetamine-induced glutamate efflux in the rat ventral tegmental area is prevented by MK-801, SCH 23390, and ibotenic acid lesions of the prefrontal cortex. *J Neurochem*, **73**, 1529-38.

Wolf, M.E., Xue, C.J., Li, Y. & Wavak, D. (2000) Amphetamine increases glutamate efflux in the rat ventral tegmental area by a mechanism involving glutamate transporters and reactive oxygen species. *J Neurochem*, **75**, 1634-44.

Woodward, W.R., Nishi, R., Meshul, C.K., Williams, T.E., Coulombe, M. & Eckenstein, F.P. (1992) Nuclear and cytoplasmic localization of basic fibroblast growth factor in astrocytes and CA2 hippocampal neurons. *J Neurosci*, **12**, 142-52.

Zanassi, P., Paolillo, M., Montecucco, A., Avvedimento, E.V. & Schinelli, S. (1999) Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci Res*, **58**, 544-52.

Figure legends

Figure 1. **bFGF is expressed in the majority of cultured mesencephalic astrocytes.** (A) Immunofluorescence image showing nuclear expression of bFGF in mesencephalic astrocytes in culture (green). (B) Same astrocytes as in *A* after immunostaining against the glial protein S-100 (red). (C) Co-localisation (yellow) of bFGF (green) and S-100 (red) shows that bFGF is expressed in the nucleus of astrocytes. (D) Phase contrast image merged with bFGF immunoreactivity (green) showing astrocytes and neurons in co-culture. Note that only astrocytes show bFGF immunolabelling. (E) bFGF and S-100 double-labelling examined at low power (10X). Note that the vast majority of astrocytes (red) express bFGF (green). (F) Western blot analysis, of multiple extracts prepared from mesencephalic astrocytes, showing that the three bFGF isoforms are expressed.

Figure 2. **bFGF does not appear to be secreted.** (A) A bFGF ELISA test was performed with different culture media including: fresh neurobasal without serum (NB), neurobasal conditioned by exposure to neurons and astrocytes (Cond. NB), fresh basal medium eagle (BME), BME conditioned by exposure to purified astrocytes grown in flask for 2 days (BME 2d) or 7 days (BME 7d), neurobasal with serum (NB + serum), and neurobasal conditioned by exposure to neurons and astrocytes in micro-culture (μ -culture NB) and standard cultures (Std culture NB). Finally, the control column represents the signal produced by the lowest tested

concentration of bFGF measured with the ELISA test (10pg/ml) and represents the limit of detection. Note that in all cases, bFGF concentrations were below the level of detection. (B) ELISA standard curve showing our ability to detect concentrations in the low pg/ml range. (C) Immuno-labelling against S-100 protein in a control culture. (D) Immuno-labelling against S-100 protein in a culture treated for 7 days with exogenous bFGF (20ng/ml). Note the stellate appearance of astrocytes after treatment with bFGF.

Figure 3. Extracellular bFGF does not increase synaptic development. (A) Single neurons in μ -culture after immunostaining for tyrosine hydroxylase (TH) (green) and for the synaptic vesicle protein SV2 (red). The lower image shows a higher resolution portion of the SV2 signal delimited by the white dotted box. Small SV2+ punctuate structures were considered as putative axon terminals and counted using Metamorph Software. (B) Five days treatment with a bFGF neutralizing antibody (10 μ g/ml) did not change the number of morphologically identifiable axon terminals counted at day seven in culture (n=44) compared to control (n=49). (C) Five days treatment with exogenous bFGF (20ng/ml) caused a decrease in synapse number, counted at day seven in culture (n=32) compared to control (n=27).

Figure 4. **Exogenous bFGF enhances dopamine release.** (A) HPLC was used to measure basal (due to spontaneous firing) and 40mM K⁺ evoked DA release. bFGF was applied at days two and four in culture, and DA sampling was performed at day seven in culture. (B) Summary data of the experiment shown in *A*, showing the average DA concentrations during the baseline period. Basal levels were significantly higher after exogenous bFGF (20ng/ml) (triangles, n=21) in comparison to control (diamonds, n=15) (t-test, p< 0.05). (C) Same experiment as in *A* except that bFGF was applied at days five and seven in culture and sampling were performed at day ten. Note that DA levels are higher in these cultures due to more extensive synaptic development after 10 days in culture. (D) Summary data of the experiment shown in *C*, showing the average DA concentrations during the baseline period. Basal levels were again significantly higher after exogenous bFGF (20ng/ml) (triangle, n=18) (t-test, p< 0.05) compared to control (diamonds, n=12).

Figure 5. **RNA interference decreases bFGF levels.** (A) Western blot showing the decrease of the three bFGF isoforms after transfection with siRNA against bFGF mRNA compared to control, n=5. Used as a negative control, siRNA against GAPDH did not reduce bFGF levels. (B) Histogram showing the quantification of bFGF isoforms after siRNA transfection, t-test, p< 0.05.

Figure 6. **bFGF siRNA decreases dopamine release but not synapse number.** (A) HPLC measurements of basal (due to spontaneous firing) and 40mM K⁺ evoked DA release. Control cells (diamonds, n=9) and siRNA transfected cells (triangles, n=14) were treated at day seven in culture and sampling was performed at day ten in culture. (B) Summary diagram showing the average DA concentrations during the baseline period. siRNA treatment caused a significant decrease relative to the control group (t-test, p< 0.05). (C) Single neuron cultures transfected with siRNA (n=97) did not show a decrease in synapse number at day seven in culture compared to control (n=65).

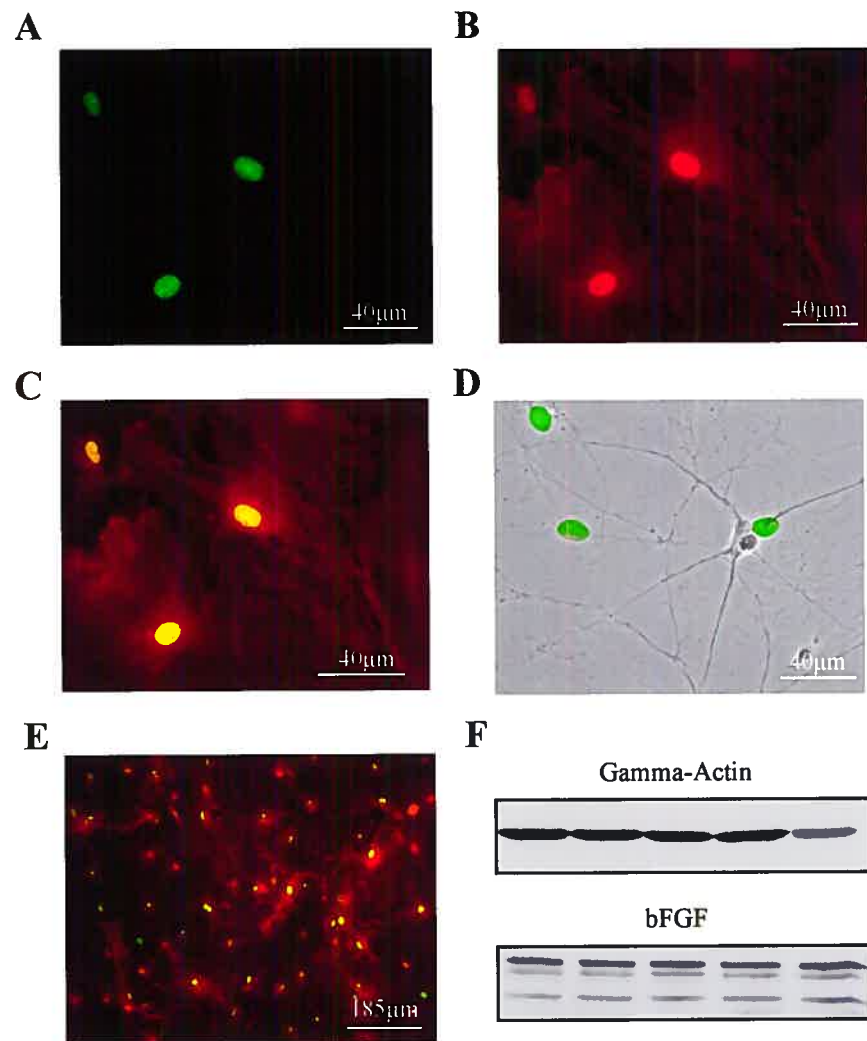
Figure 1

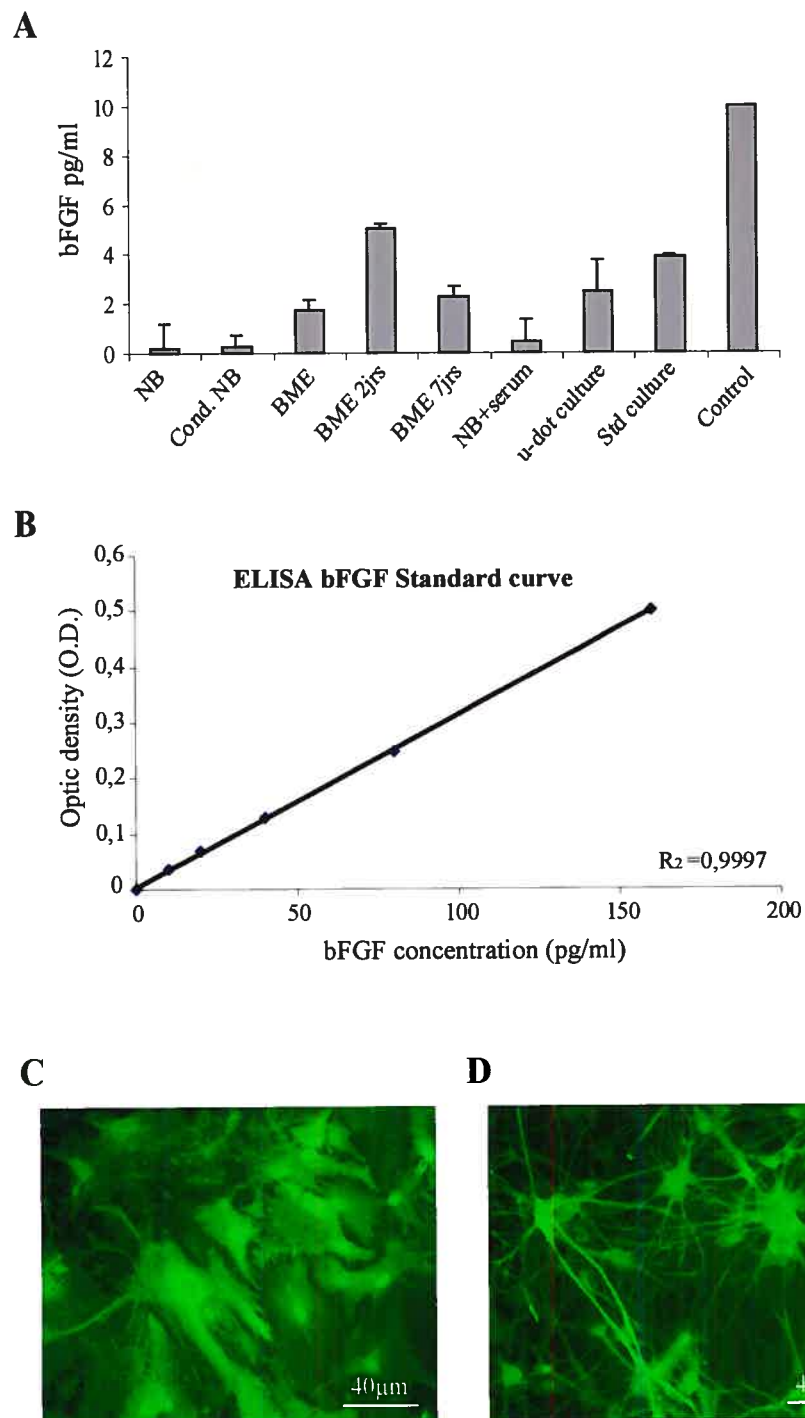
Figure 2

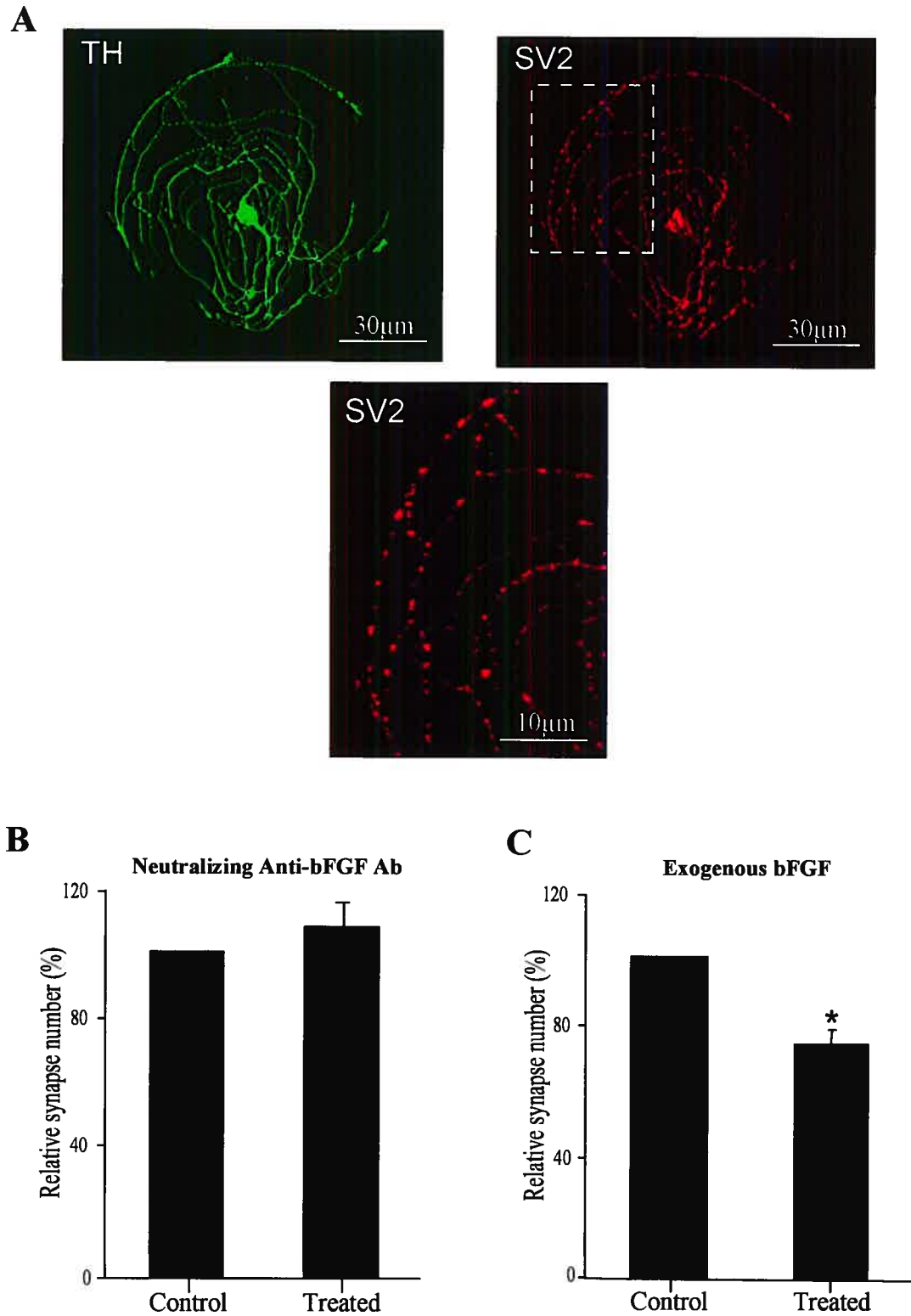
Figure 3

Figure 4

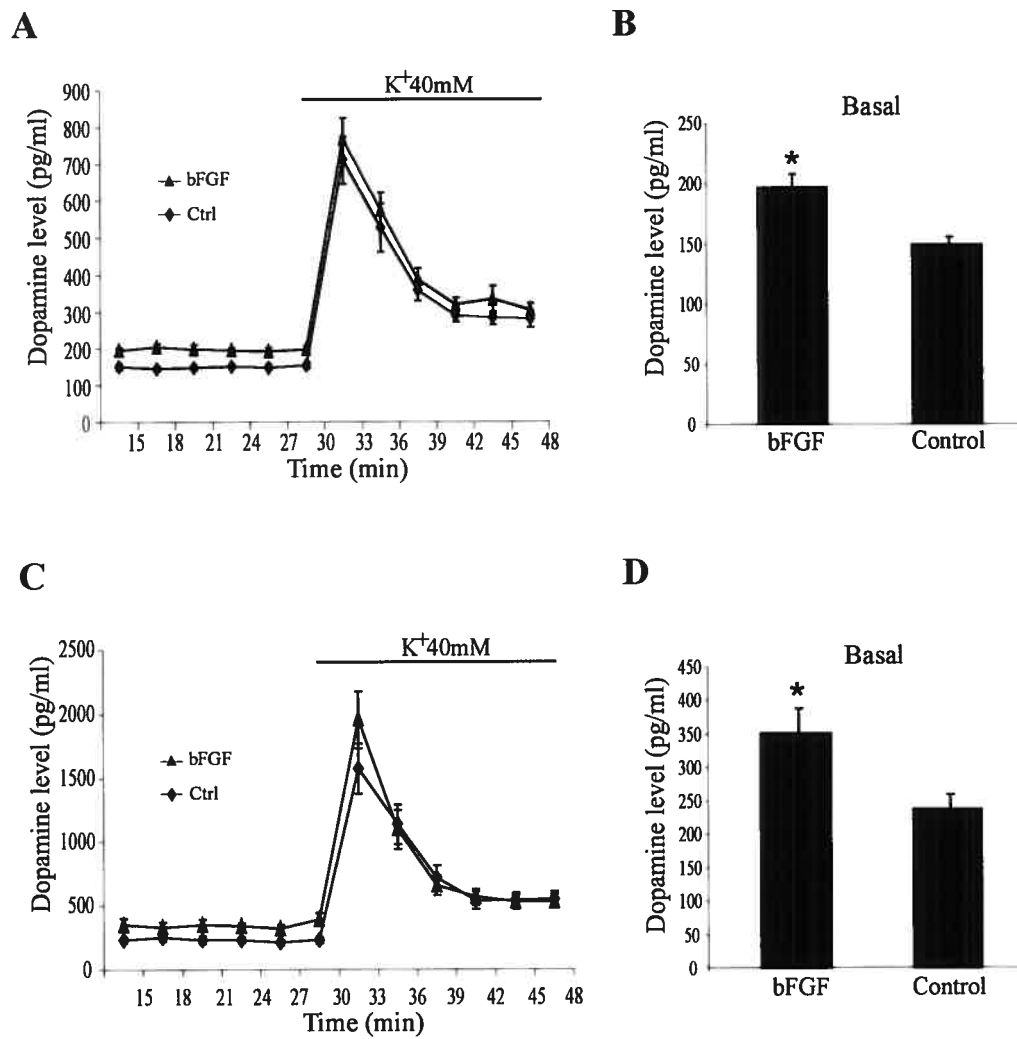
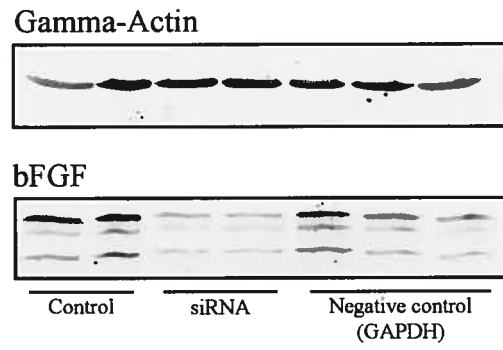


Figure 5

A



B

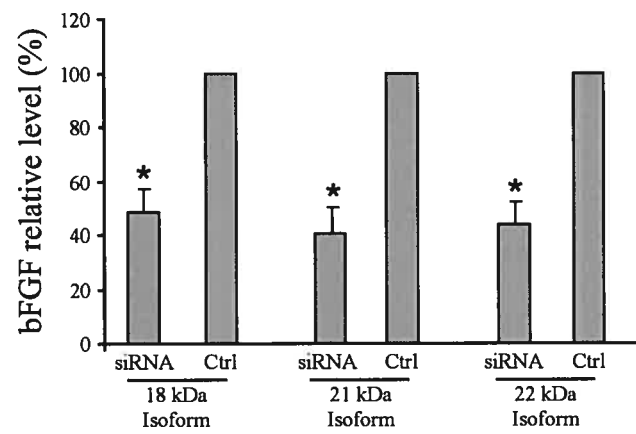
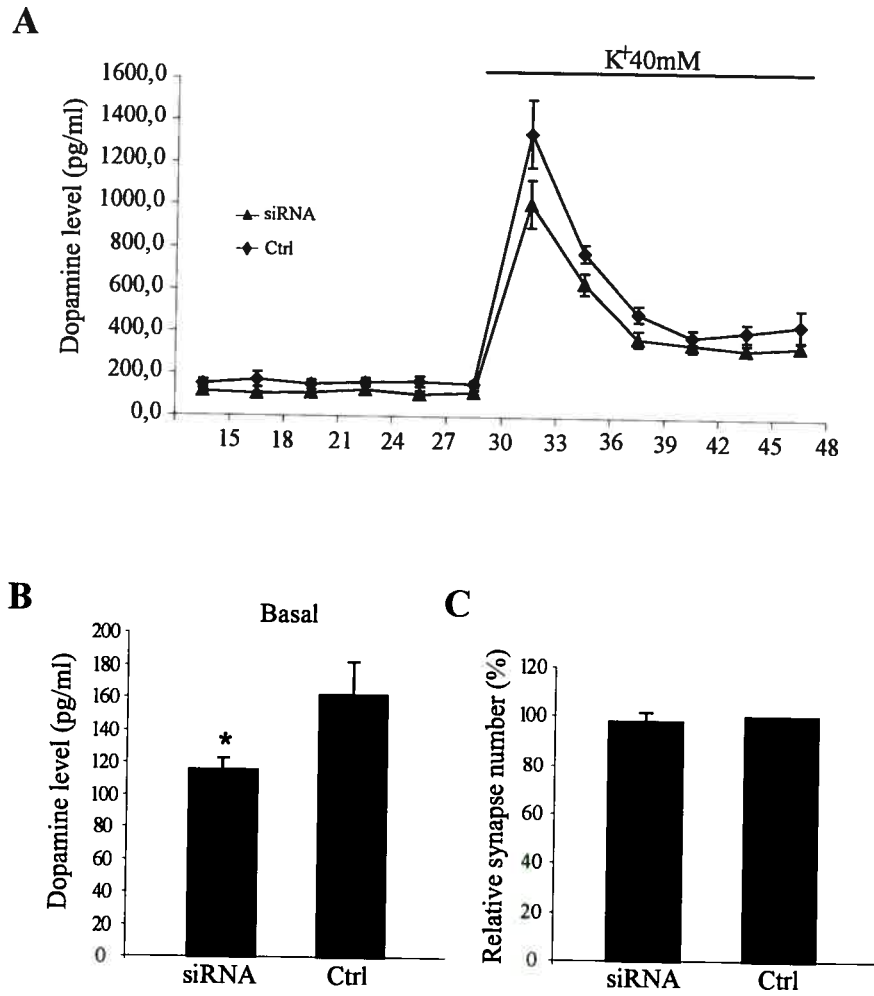


Figure 6



Discussion

6. Considérations méthodologiques

6.1 Utilisation de la culture cellulaire

De nombreux modèles expérimentaux ont été utilisés afin d'étudier les divers aspects de la fonction du bFGF. D'abord, certaines études *in vivo*, concernant la dépendance aux drogues d'abus, ont étudié le rôle du bFGF dans le développement d'une forme de plasticité neuronale en réponse à l'administration intermittente d'AMPH, un phénomène appelé sensibilisation (Kalivas & Stewart, 1991; Stewart & Badiani, 1993). La sensibilisation se traduit par une plus grande réponse de l'animal ou de l'homme aux effets psychomoteurs de la drogue. Une des actions principales de l'AMPH est l'augmentation des niveaux de DA extracellulaire dans les régions terminales et somatodendritiques des neurones DAergiques. Cette augmentation de DA extracellulaire entraîne une cascade d'évènements responsables de la plasticité neuronale que l'on retrouve dans la sensibilisation. Entre autre, Flores et al. (1998), ont proposé que l'induction de l'expression du bFGF dans les astrocytes du mésencéphale soit impliquée dans la sensibilisation. Leur modèle consistait en des animaux prétraités de façon intermittente à l'AMPH dont les changements dans le comportement moteur sont évalués. Suite à ces mesures, les animaux ont été sacrifiés afin d'évaluer l'immunoréactivité astrocytaire contre le bFGF sur des tranches de cerveau contenant l'ATV et la SN. Ces études (Flores et al, 1998; Flores et al, 2000; Flores & Stewart, 2000a) ont permis de démontrer l'implication du bFGF dans le processus de sensibilisation. Cependant, les résultats obtenus avec des modèles *in*

in vivo sont souvent difficiles à interpréter de part les multiples effets indirects potentiels. En effet, alors que ces études ont démontré l'importance du bFGF astrocytaire dans la sensibilisation, le lien entre cette induction de bFGF dans les astrocytes et la plasticité subséquente des neurones dopaminergiques n'est pas clair et sera difficile à établir dans le modèle *in vivo*.

La culture cellulaire quant à elle, est un modèle plus simple où les effets indirects sont plus faciles à contrôler et à interpréter. De plus, une analyse mécanistique est plus facile à effectuer que *in vivo*. Dans le cadre du présent travail, puisque nous désirions étudier les impacts du bFGF d'origine astrocytaire sur le développement et la fonction des neurones DAergiques, l'utilisation de co-cultures primaires d'astrocytes du mésencéphale et de neurones DAergiques s'imposait. Afin d'étudier ce concept nous avons entre autre, évalué le développement synaptique des neurones DAergiques à l'aide d'un modèle de culture μ -goutte. Ce modèle permet d'isoler un seul neurone DAergique sur une goutte de substrat. Ensuite, à l'aide de technique d'immunomarquage nous avons quantifié le nombre de synapses qu'il établit avec lui-même. Cette technique nous permet de compter les synapses appartenant à un seul neurone. La quantification synaptique est difficilement réalisable dans un modèle *in vivo*, puisqu'il devient très complexe voire même impossible de discerner les terminaisons synaptiques d'un neurone donné quand ce dernier est entouré de milliers d'autres prolongements et terminaisons. Évidemment, la culture cellulaire comporte des limites quant à l'intégrité du système : La mise en culture élimine les prolongements existants, les cellules sont étalées et émettent de nouveaux prolongements selon une

autre structure. Cependant, tout en tenant comptes des limitations, c'est un modèle idéal afin de quantifier le développement synaptique. Il facilite aussi l'utilisation de la technique d'interférence à l'ARN ainsi que la mesure de DA extracellulaire par HPLC.

De plus, suite à la sélection de notre modèle, des études préliminaires nous ont permis de sélectionner un type de cellule gliale exprimant de hauts niveaux de bFGF. Comme nous l'avons d'écrit dans la section matériel et méthode, les astrocytes en culture que nous avons utilisé provenaient du mésencéphale. De plus, notre protocole de culture d'astrocytes comportait une étape de passage à froid, qui avait pour but d'éliminer la présence de neurones et de sélectionner un type de cellule gliale adhérente, que nous nommerons cellule gliales purifiées. Afin de nous assurer d'utiliser des cellules gliales exprimant de hauts niveaux de bFGF, nous avons analysé par immunobuvardage le contenu en bFGF des astrocytes purifiés, ainsi que celui des astrocytes primaires. Nous avons aussi comparé les cellules gliales provenant du mésencéphale et celles provenant du cortex. L'annexe I démontre que l'expression du bFGF est plus importante pour les cellules gliales purifiées provenant du mésencéphale.

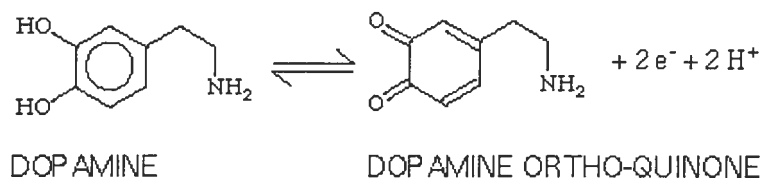
Selon le groupe de Stachowiak, (Stachowiak et al, 1994; Moffett et al, 1996; Joy et al, 1997), l'expression du bFGF par les astrocytes est majoritairement nucléaire. Nos résultats ont confirmé ces observations (Fig. 1). De plus, nous avons noté que la majorité des astrocytes en culture expriment le bFGF (Fig. 1E), ce qui n'est pas le cas

in vivo. De plus, cette expression représente un inconvénient, puisque nous n'avons pas trouvé le moyen d'augmenter les niveaux de bFGF intracellulaire. Pour des raisons encore indéterminées, nous pourrions suggérer que la mise en culture favorise l'expression du bFGF d'origine nucléaire. Cependant, ce désavantage pourrait être, jusqu'à un certain point intéressant, puisque ce modèle peut être un analogue de la sensibilisation sans la nécessité de stimuler les cellules à l'AMPH. Nous pourrions alors suggérer que notre modèle représente le pendant *in vitro* de la sensibilisation.

6.2 Echantillonnage et mesure de la dopamine

Les techniques expérimentales permettant de mesurer la dopamine sont multiples. Les approches couramment utilisées de nos jours sont l'HPLC, la voltamétrie et l'ampérométrie. Ces méthodes d'électrochimie tirent profit de la réaction d'oxydation décrite à la figure 6.0, ci-dessous.

Figure 6.0 Électro-oxydation de la dopamine



Grâce à la mesure de courant induit par la perte de deux électrons pour chaque molécule de DA oxydée, on arrive à une estimation de la quantité de dopamine présente au départ. Reposant sur le même principe électrochimique de base, ces méthodes diffèrent et comportent certains avantages et inconvénients (Finlay & Zigmont, 1995). L'HPLC implique le passage d'un échantillon à travers une colonne de filtration qui en séparera les composantes avant qu'elles ne soient oxydées par un courant électrique. La séparation de l'échantillon nous permettra de connaître en plus de la quantité des diverses composantes de l'échantillon, le temps mis par ces composantes pour traverser la colonne, appelé temps de rétention. Suite à la comparaison avec un échantillon témoin d'une composition connue, la filtration permettra de déterminer avec une précision remarquable la composition chimique de l'échantillon. Le principal inconvénient de l'HPLC vient du fait qu'une quantité assez élevée d'échantillon soit nécessaire au passage à travers la colonne. Au contraire la voltamétrie permet quant à elle de mettre en contact direct l'électrode d'oxydation et le milieu extracellulaire, grâce à son insertion à l'intérieur d'une pipette de verre que l'on peut enfoncer au coeur du tissu nerveux. On peut alors mesurer la dopamine extracellulaire en temps réel. La sensibilité de la voltamétrie est cependant moindre que celle de l'HPLC et ne permet pas de mesurer les niveaux relativement faibles associés à la libération spontanée de la DA. Son utilisation nécessite la stimulation du tissu. L'ampérométrie est aussi un outil efficace. Plus sensible que la voltamétrie, elle permet de mesurer les événements unitaires de relâche vésiculaire (Jaffe et al, 1998). Toutefois, son utilisation dans les tranches et encore davantage *in vivo* est compliquée puisque l'ampérométrie ne permet pas de reconnaître l'identité de la substance

oxydée. Étant donnée leurs caractéristiques distinctes, l'HPLC, la voltamétrie et l'ampérométrie représentent des approches complémentaires plutôt que redondantes.

Puisque notre objectif consistait à étudier la libération spontanée et évoquée de dopamine, l'utilisation de l'HPLC s'imposait. Afin de mettre au point le protocole d'échantillonnage du milieu où reposent les cultures, nous nous sommes inspirés des travaux de Rouge-Pont, (Rouge-Pont et al, 1999). Ils ont montré que les niveaux extracellulaires de DA augmentaient en fonction de l'âge des cultures (entre 9 et 33 jours) et qu'ils étaient proportionnels au nombre de cellules dopaminergiques présentes sur la lamelle (entre 300 et 2300). Nos conditions de culture produisent entre 300 et 800 cellules DAergiques par lamelle, que nous utilisons à 7 ou 10 jours après la mise en culture. Le maintien de l'équilibre extracellulaire sera grandement affecté par la fréquence et l'ampleur de l'échantillonnage. Par exemple, un échantillonnage trop rapide ou trop important pourrait engendrer des niveaux extracellulaires irréguliers si la libération n'arrivait pas à compenser la disparition de la dopamine extracellulaire. Nous avons remarqué que les cellules nécessitaient une période de 15 min suivant le transfert dans le bain expérimental afin que les niveaux ambiants de DA se stabilisent. Finalement, l'échantillonnage au 3 min, comparativement à 5 min pour (Rouge-Pont et al, 1999), nous a permis de maintenir des niveaux de DA stables.

6.3 Interférence à l'ARN : siRNA

Parmi les techniques expérimentales permettant de diminuer l'expression génique dans une cellule donnée, nous aborderons brièvement les techniques utilisant des oligonucléotides antisens et des ARN interférents. Les oligonucléotides antisens, développés durant les vingt dernières années sont largement utilisés afin de réguler l'expression génique tant dans les modèles de culture cellulaire que *in vivo* (Braasch & Corey, 2002). Cette stratégie provient d'un mécanisme de régulation se produisant naturellement chez les cellules bactériennes. L'hybridation de l'ARN antisens complémentaire à un ARNm donné, bloc la reconnaissance du codon d'initiation à la sous unité 30S du ribosome et prévient l'initiation de la traduction. Cette stratégie de contrôle par antisens a été adaptée par les chercheurs afin d'inhiber expérimentalement l'expression génique dans les cellules eucaryotes. Dans cette approche, un vecteur complémentaire à l'ARNm cible est construit et son introduction dans une cellule donnée inactive l'expression du gène encodé par l'ARNm neutralisé.

L'interférence à l'ARN, a d'abord été découverte chez le vers nématode *Caenorhabditis elegans* (Fire et al, 1998). La présence ou l'injection d'un ARN double brin (200 nucléotides) est utilisé afin d'inhiber l'expression d'un gène donné dans une variété d'organismes et de types cellulaires. Comme le démontre le schéma de la figure 6.1 ci-dessous, l'ARN double brin est pris en charge par le système d'interférence à l'ARN. La première étape consiste en l'action enzymatique de la

RNaseIII, aussi nommé *Dicer* qui réduit le long brin d'ARN, en petit ARN contenant entre 20 et 25 nucléotides, nommé petit ARN interférent (siRNA). Ensuite, ces petits siRNA s'assemblent à un complexe d'endoribonucléotide nommé RISC, (*RNA-Induced Silencing Complex*) et entament le processus de déroulement. Finalement, le simple brin d'ARN guide le complexe RISC vers son brin d'ARNm complémentaire, qui sera dégradé par l'action enzymatique du complexe. Cependant, l'introduction d'un ARN double brin plus long que 30 nucléotides dans les cellules de mammifère initie une importante réponse antivirale menant à l'inhibition non spécifique de la synthèse protéique. Cette réponse antivirale est évitée lors de l'introduction des siRNA directement.

Comme l'ont démontré nos résultats, l'utilisation des siRNA contre le bFGF réduit l'expression de la protéine de 60%, il en reste donc 40% qui peu agir normalement dans la cellule. Plusieurs laboratoires ont observé différent niveau d'inhibition suite à l'action des siRNA. Par exemple, selon les étude de Tuschl et al., (Tuschl et al, 1999), l'inhibition *in vitro* d'ARNm par des siRNA spécifiques se situe entre 65 et 85%. La transfection de siRNA dans une lignée cellulaire de type HeLa produit une inhibition génique de l'ordre de 80% (Elbashir et al, 2001; Bertrand et al, 2002). Cependant, le groupe de Krichevsky et Kosik (Krichevsky & Kosik, 2002), ont transfecté des neurones en culture primaire avec des siRNA contre la protéine MAP2 et obtiennent une inhibition de l'ordre de 70% de l'expression de la protéine. Donc, les niveaux d'inhibition du bFGF obtenue dans nos travaux sont relativement semblables à ce que l'on retrouve dans la littérature.

Suite aux travaux de (Fire et al, 1998), démontrant que l'inhibition de l'expression génique par les siRNA s'avérait dix fois plus importante que l'action d'oligonucléotide antisens, nous avons opté pour cette technique d'interférence à l'ARN. Malgré le fait que ces deux techniques produisent des effets similaires, elles comportent certaines différences qui confèrent aux siRNA un potentiel d'action plus important. Étant double brin, les siRNA possèdent une plus grande stabilité. De plus, ils ont une plus grande activité *in vitro* puisqu'ils sont très résistants à la biodégradation en présence de sérum, contrairement aux antisens. La demie vie des siRNA en présence de sérum est de plus de 24hrs, tandis que pour les antisens elle n'est que de quelques minutes (Bertrand et al, 2002). Comme nous voulions transfecter des co-cultures primaires d'astrocytes et de neurones DAergiques, nous avons considéré le potentiel de toxicité des différentes techniques. La plupart des travaux effectués avec des siRNA les utilisent à des concentrations de l'ordre des nM, tandis que, pour être aussi efficace, les antisens nécessitent de plus grandes concentrations soit de l'ordre du μM . Cette augmentation de concentration nécessite aussi l'augmentation de la quantité de réactif de transfection, qui consiste généralement en des lipides cationiques. Les travaux du groupe de Krichevsky et Kosik, (Krichevsky & Kosik, 2002), ont observé qu'une augmentation de concentration du rapport siRNA/réactif de transfection était toxique pour les neurones en culture. Donc, l'utilisation des antisens, nécessitant des concentrations plus élevées d'oligonucléotides et de lipides cationiques, avait de plus forte chance de causer une toxicité cellulaire et d'être, par le fait même, beaucoup moins efficace que les ARN interférents.

Figure 6.1 Schéma du mécanisme d'action de l'interférence à l'ARN

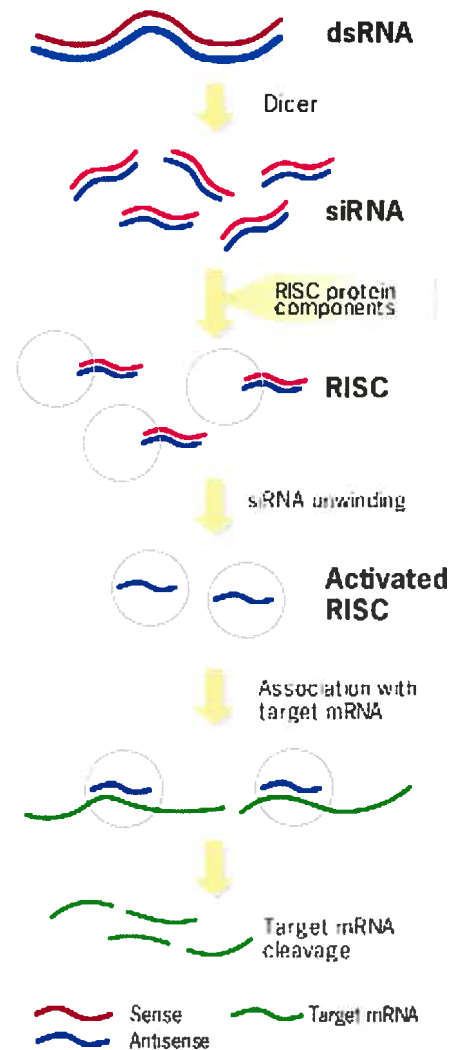


Figure 6.1 L'ARN double brin d'environ 200 nucléotides est pris en charge par la RNase III, aussi nommé *Dicer*, qui le réduit en petit ARN comprenant entre 20 et 25 nucléotides (siRNA). Ces petits brins d'ARN s'assemblent à un complexe enzymatique nommé RISC et se déroulent. L'ARN simple brin déroulé guide le complexe RISC vers son brin d'ARNm complémentaire qui sera dégradé via l'action enzymatique du complexe.

7. L'expression du bFGF dans notre model expérimental

7.1 La controverse continue, le bFGF est-il sécrété?

Comme nous l'avons brièvement mentionné plus tôt, certains travaux concernant le bFGF suggèrent que ce dernier ne soit pas sécrété (Klagsbrun & Vlodavsky, 1988; D'Amore, 1990; Ku & D'Amore, 1995). Plusieurs données expérimentales appuient ces travaux. D'abord, le bFGF ne possède pas de peptide signal (Abraham et al, 1986a), ce qui en principe rend sa sécrétion par la voie du RE et du Golgi impossible. De plus, peu ou pas de bFGF n'est détecté dans le milieu extracellulaire ou associé à la membrane plasmique des cellules produisant le bFGF (Moscatelli et al, 1986; Vlodavsky et al, 1987). Par exemple, Stachowiak et al., (Stachowiak et al, 1994) ont démontré que la lignée cellulaire BAMC (*Bovine adrenal medullae cell*), exprime le bFGF mais que ce dernier n'est pas détecté dans le milieu conditionné par ces cellules. Le milieu conditionné par les astrocytes et certaines lignées cellulaires d'origine gliales est aussi exempt de bFGF (Joy et al, 1997). Les données présentées dans ce mémoire sont donc tout à fait compatibles avec ces travaux antérieurs. Mais alors, comment le bFGF peut-il agir s'il n'est pas sécrété par les cellules qui le synthétisent? Il a été suggéré que le bFGF soit relâché suite à la mort ou à un dommage cellulaire (Klagsbrun & Vlodavsky, 1988; D'Amore, 1990). Plusieurs données supportent cette hypothèse. Par exemple, le traitement de cellules endothéliales d'aorte bovine avec une endotoxine permet la libération du bFGF dans le milieu extracellulaire (Gajdusek & Carbon, 1989; Muthukrishnan et al, 1991). De

plus, une lésion de la membrane plasmique de cellules endothéliales permet la sécrétion de bFGF dans le milieu extracellulaire (McNeil et al, 1989; Ku & D'Amore, 1995).

Malgré ces données, plusieurs indications suggérant l'action extracellulaire du bFGF remettent en perspective les précédentes affirmations. Premièrement, il est important de souligner que de nombreux types cellulaires expriment un récepteur membranaire pour le bFGF (Moscatelli, 1987; Safran et al, 1990). Il doit donc y avoir sécrétion de bFGF pour activer ces récepteurs. Les anticorps neutralisant pour le bFGF altèrent également certaines propriétés des cellules produisant la protéine, comme la morphologie, la croissance et la migration (Sato & Rifkin, 1988; Sasada et al, 1988; Flores et al, 2000). De plus, des niveaux élevés de bFGF sont retrouvés à l'extérieur de certaines cellules en association avec les héparines sulfate protéoglycan (HSPG) de la membrane plasmique (Rogelj et al, 1989; Bashkin et al, 1989). Selon Trudel et al., (Trudel et al, 2000), le bFGF serait transféré à la surface cellulaire et retenu par l'HSPG sans être relâché dans le milieu extracellulaire. Plusieurs études ont démontré que l'interaction du bFGF, de l'HSPG et du récepteur tyrosine kinase induit la dimérisation et la signalisation intracellulaire associée (Rogelj et al, 1989; Bashkin et al, 1989; Mohammadi et al, 1996; Schlessinger et al, 2000; Turnbull et al, 2001; Delehedde et al, 2001; Delehedde et al, 2002). Donc, la présence du bFGF à la surface cellulaire devrait stimuler ses récepteurs TK sans être relâché dans le milieu extracellulaire. Ces données indiquent à tous le moins que dans certaines

circonstances, le bFGF semble agir de façon extracellulaire selon un mécanisme de stimulation autocrine.

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que certaines protéines ne possédant pas de peptide signal peuvent tout de même être excrétées des cellules. Par exemple, les interleukines 1α et 1β sont détectées dans le milieu conditionné suite à une stimulation appropriée des macrophages. De plus, les travaux de Mignatti et al., (Mignatti et al, 1992) et de Florkiewicz et al., (Florkiewicz et al, 1995), proposent que le bFGF pourrait être sécrété indépendamment de la voie impliquant le RE et le Golgi. De plus, Le Roux et Esquenazi ont noté la présence de bFGF dans le milieu conditionné par des astrocytes provenant de cortex de rats (Le & Esquenazi, 2002). Malgré les niveaux d'expression élevés du bFGF, il reste néanmoins que celui-ci est rarement détecté dans le milieu extracellulaire (Bikfalvi et al, 1997; Szebenyi & Fallon, 1999). En ce qui nous concerne, nous avons observé un important changement morphologique de nos astrocytes en culture uniquement lors de l'ajout de bFGF exogène (Article Fig. 2C, 2D). Ces changements morphologiques seraient attribués à la stimulation extracellulaire des récepteurs au bFGF. Donc, en condition normale dans notre modèle expérimental, le bFGF ne semble pas avoir accès à la surface cellulaire.

7.2 Les effets du bFGF exogène et endogène sur le développement neuronal

Le but de la présente étude était de déterminer l'impact du bFGF astrocytaire sur le développement et la fonction synaptique des neurones DAergiques en culture. Plusieurs études ont démontré un effet du bFGF exogène sur le développement de l'arborisation dendritique des neurones provenant du cortex et de l'hippocampe, sans faire allusion directement au développement synaptique (Miyagawa et al, 1993; Aoyagi et al, 1994; Lowenstein & Arsenault, 1996; Szebenyi et al, 2001; Abe et al, 2001; Le & Esquenazi, 2002). Dans ces conditions, l'action du bFGF dépend de sa liaison au FGFR à la membrane cellulaire et à l'activation subséquente de la voie de signalisation des MAPK (Ras/Raf/Mitogen-activated protein Kinase). Plusieurs études ont démontré que la voie des MAPK joue un rôle important dans la modulation de la plasticité synaptique et de la synaptogenèse dans le SNC de l'Aplysie (Jovanovic et al, 1996; Martin et al, 1997; Bailey et al, 1997; Huang et al, 2000; Wu et al, 2001; Di Cristo et al, 2001). De plus, il semblerait qu'une application locale de bFGF sur des neurones provenant de la jonction neuromusculaire de rat et du Xénope, favoriserait la formation de synapses (Peng et al, 1991; English & Schwartz, 1995). Ensemble, ces résultats suggèrent un rôle possible du bFGF dans la formation et le développement synaptique (Li et al, 2002). Les données de Li et al., (Li et al, 2002), représentent une des premières données expérimentales attribuant au bFGF un rôle dans la synaptogenèse. Dans cette étude, ils ont utilisé un modèle de neurones d'hippocampes en culture standard et ont quantifié le développement synaptique en mesurant l'immunoréactivité à la synapsin et /ou à la synaptophysin

suivant l'addition ou non de bFGF dans le milieu de culture. À l'aide d'un modèle de neurone DAergiques isolés (voir matériel et méthode de l'article), nous avons ici étudié le développement synaptique suivant un traitement au bFGF exogène. Ce modèle est particulièrement avantageux puisque la présence d'un seul neurone par gouttelette de substrat permet de quantifier directement le nombre de contacts synaptiques pour chaque neurone. Suite au traitement avec le bFGF à 20ng/ml, nous n'avons pas observé d'augmentation dans le nombre de synapse par neurones mais une faible baisse (Article Fig. 3). Cependant, ce même traitement a augmenté la libération spontanée de dopamine (Article Fig. 4). Puisque nous avons conclu que le bFGF n'est pas sécrété dans notre modèle, l'évaluation de l'implication du bFGF intracellulaire s'imposait. L'utilisation de la technique d'interférence à l'ARN nous a permis de conclure qu'une diminution de 60% de l'expression du bFGF intracellulaire, n'était pas suffisante pour inhiber la synaptogenèse, (Article, Fig. 6), mais suffisamment importante pour affecter la fonction synaptique des neurones DAergiques, en réduisant la libération spontanée de DA (article Fig. 6). Nous pouvons donc conclure que le bFGF intracellulaire est impliqué de façon indirecte, puisque non sécrété, dans la régulation de la fonction des neurones DAergiques en culture.

7.3 L'hypothèse de la signalisation intracrine

Comme nous l'avons démontré, la majorité de nos astrocytes en culture expriment le bFGF de façon nucléaire (Article Fig. 1). De plus, nous avons démontré l'absence du bFGF dans le milieu conditionné par ces mêmes astrocytes (Article Fig. 2). Ce n'est donc pas de façon extracellulaire que le bFGF semble affecter le développement synaptique et/ou la fonction des neurones DAergiques. La diminution intracellulaire de l'expression du bFGF à l'aide de la technique d'interférence à l'ARN (siRNA) diminue la fonction des neurones DAergiques sans affecter leur développement synaptique (Article Fig. 4, Fig. 6). Il a été proposé que le récepteur au bFGF, le FGFR1, soit localisé non seulement sur la membrane plasmique de certaines cellules, mais aussi dans le noyau des cellules gliales exprimant le bFGF (Stachowiak et al, 1996a; Stachowiak et al, 1996b; Joy et al, 1997; Stachowiak et al, 1997a). Un mode de signalisation intranucléaire permettrait d'expliquer les divers rôles biologiques de ce facteur de croissance exprimé dans le noyau des cellules le synthétisant. L'existence d'un tel mode de signalisation intracrine est appuyé par les travaux de Sherman et al., (Sherman et al, 1993) et Clarke et al., (Clarke et al, 2001), qui ont aussi montré l'existence d'une colocalisation du FGFR1 et du bFGF dans le compartiment nucléaire des astrocytes et suggéré un mode de signalisation intracrine. La présence du FGFR1 nucléaire, pourrait également expliquer comment le bFGF intracellulaire supporte la prolifération et la migration cellulaire observé dans plusieurs autres études (Imamura et al, 1990; Wiedlocha et al, 1994; Bikfalvi et al, 1995; Joy et al, 1997).

Figure 7.0 Schéma hypothétique de la signalisation intranucléaire du bFGF et du FGFR1

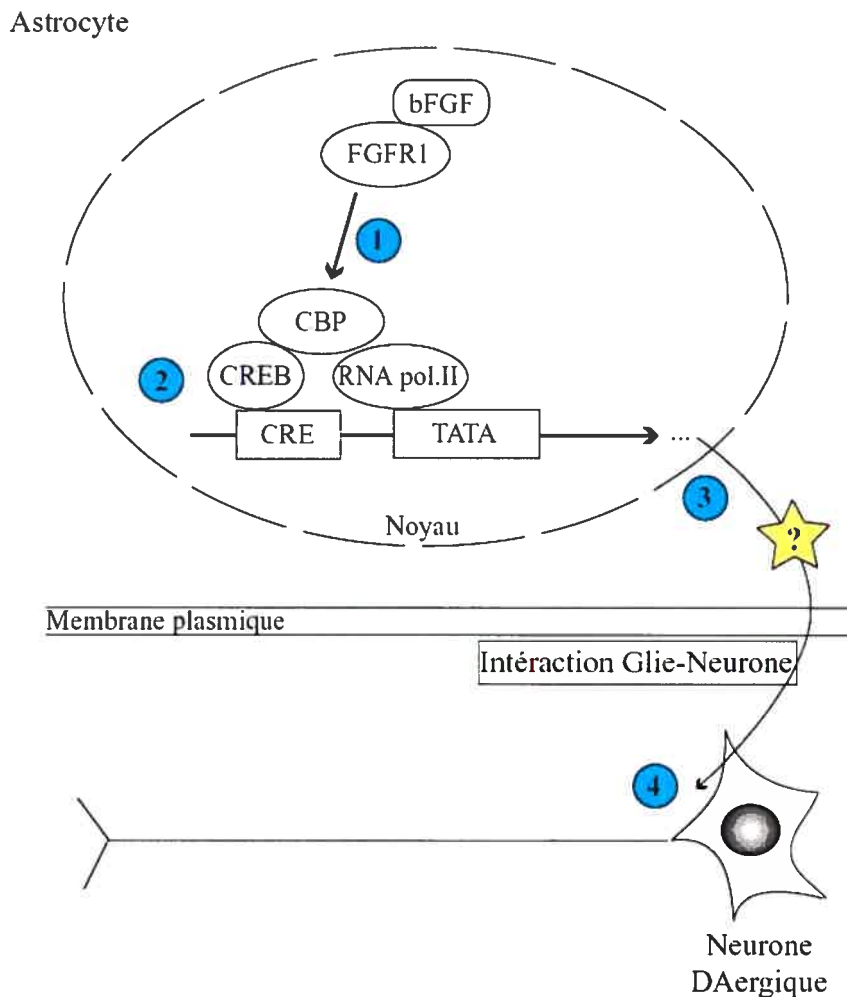


Figure 7.0 Ce schéma illustre l'hypothèse de la signalisation intranucléaire et de l'interaction glie-neurone qui en découle. (1) D'abord la liaison du bFGF à son récepteur active la cascade de signalisation. (2) La cascade de signalisation permet le recrutement de CBP qui facilite l'activité du facteur de transcription CREB. (3) Il y a transcription génique. (4) Finalement, un substrat X est produit et ce dernier semble affecter la fonction synaptique des neurones dopaminergiques.

Il a été rapporté par plusieurs laboratoires que les effets biologiques produits par les facteurs de croissance situés dans le compartiment nucléaire se produisent via une interaction directe avec les effecteurs nucléaires (Jans, 1994; Olsnes et al, 2003). Comme nous venons de l'aborder, le FGFR1 pourrait être considéré comme l'effecteur du bFGF dans la signalisation intracrane. En fait, il semble que le FGFR1 agissent comme régulateur de la transcription génique. Il a d'abord été suggéré qu'il puisse traduire divers signaux extracellulaires directement au génome (Stachowiak et al, 2003a). Par la suite, il a été démontré que le FGFR1 n'interagissait pas directement avec l'ADN, mais stimulerait certains effecteurs nécessaires à la réplication de l'ADN (figure 7.0) (Stachowiak et al, 2003a). La présence du FGFR1 dans la région nucléaire, suggère à tous le moins que ce récepteur puisse agir de façon générale comme régulateur de la transcription contrôlant différents gènes. En effet, le FGFR1 semble réguler l'expression de différents gènes incluant celui du bFGF (Peng et al, 2001), de la tyrosine hydroxylase (TH) (Stachowiak et al, 2003b), du neurofilament-1 (NF-1), de c-Jun et de la cyclin D1 (Reilly & Maher, 2001). Ces effets du récepteur FGFR1 semblent nécessiter l'activation du facteur de transcription CREB (figure 7.0). La phosphorylation de CREB par différentes protéines kinases est une étape culminante dans le processus qui régule la croissance des prolongements neuronaux, la différenciation neuronale, la synthèse de neurotransmetteur et la plasticité neuronale (Ginty et al, 1994; Tang et al, 1996; Schmid et al, 1999; White et al, 2000; Impey & Goodman, 2001; West et al, 2002). De plus, l'activité maximale de CREB nécessite l'association à son co-facteur CBP (*Creb-binding-protein*) (figure 7.0). C'est CBP qui permet à CREB de se lier à l'ADN et de recruter

le complexe d'ARN polymérase II. Le FGFR1 pourrait donc stimuler la transcription génique via l'activation de CREB et de CBP (figure 7.0) (Stachowiak et al, 2003a). Dans notre modèle, il serait donc tentant de conclure que le bFGF astrocytaire régule la transcription de certains gènes dans les astrocytes qui sont en contact avec les neurones DAergiques. Ceci pourrait ensuite influencer la fonction synaptique des neurones dopaminergiques par l'intermédiaire d'interactions gliales-neurones qui restent à définir (figure 7.0).

8. Perspectives

Nous avons d'abord démontré l'expression nucléaire du bFGF dans notre modèle d'astrocytes en culture primaire. Par la suite, nous avons conclu que malgré cette importante expression le bFGF ne se retrouvait pas dans le milieu extracellulaire conditionné par ces mêmes astrocytes. Nous savons que le bFGF est impliqué dans l'induction de la sensibilisation comportementale à l'AMPH (Flores et al, 1998; Flores et al, 2000; Flores & Stewart, 2000a). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact d'un traitement à l'AMPH sur la sécrétion du bFGF par nos astrocytes en culture. Nous pourrions prétraiter les astrocytes à l'AMPH et effectuer des mesures de leur milieu conditionné à l'aide de la technique d'ELISA.

Comme nous l'avons abordé plus tôt, les travaux du groupe de Stachowiak (Stachowiak et al, 2003a), ont permis d'attribuer un rôle important au bFGF et au FGFR1 nucléaire dans la régulation de la transcription génique. Il serait donc intéressant de vérifier la présence, par immunomarquage, du FGFR1 dans notre modèle d'astrocytes en culture primaire.

Nos travaux rapportent un effet indirect du bFGF d'origine astrocytaire sur la fonction synaptique des neurones DAergiques. Les mesures, en HPLC, de la libération spontanée et induite par le potassium de DA, nous ont permis d'observer ces modifications fonctionnelles. Il serait intéressant de poursuivre l'évaluation des modifications fonctionnelles en étudiant les propriétés électrophysiologiques des

neurones DAergiques suivant les divers traitements pour lesquels nous avons observé des changements dans la libération du neurotransmetteur. Ces mesures permettront de mieux cibler les éléments pouvant être responsables des modifications fonctionnelles dans la libération de DA. D'abord, une hausse des niveaux de libération spontanée pourrait être dû à une augmentation du taux de décharge, une augmentation de l'efficacité synaptique ou même d'une baisse de la recapture par le DAT. À l'aide de techniques d'enregistrements électrophysiologiques il serait donc possible de quantifier le taux de décharge des neurones DAergiques suite aux divers traitements, soit avec le bFGF exogène ou bien suite à une transfection aux siRNA contre le bFGF.

Par la suite, nous pourrions évaluer l'efficacité du DAT suivant ces divers traitements. Comme nous l'avons déjà abordé, la recapture via le DAT constitue le principal processus d'inactivation de la DA suivant sa libération dans l'espace extracellulaire (Thibaut et al, 1995). Une diminution de son efficacité se traduirait par une augmentation de DA extracellulaire tandis qu'une augmentation favoriserait la recapture et une diminution rapide des niveaux extracellulaire. Par exemple, les travaux de Mason (Mason et al, 2005), démontrent qu'il est possible d'évaluer la fonction du transporteur membranaire DAT à l'aide d'un substrat fluorescent le 4-(4-diethylamminostyryl)-N-methylpyridinium Iodide (ASP^+). Il serait intéressant de quantifier, à l'aide de l' ASP^+ et de la microscopie confocale, la recapture en temps réel via le DAT suivant les différents traitements pour lesquels nous avons noté l'augmentation, ou la baisse, de DA extracellulaire.

La dépendance aux drogues d'abus, comme l'alcool, le tabac, les opiacées et les psychostimulants, est un trouble qui se définit selon des critères d'ordre physiologique et comportemental. Il existe présentement très peu d'options pharmacologiques pour le traitement de ces maladies. Il existe principalement trois types de pharmacothérapies pour ces différentes dépendances. Dans la dépendance aux opiacés, il y a les agonistes comme la méthadone. Dans la dépendance au tabac il y a les timbres de nicotine. Dans les deux cas, il s'agit d'agents qui miment les effets de la drogue et permettent de minimiser les effets secondaires associés à l'arrêt de la consommation. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs opiacés, comme le naltrexone, a pour but de bloquer le récepteur et d'éliminer les effets pharmacologiques directs produits par l'abus de la drogue. Finalement, l'utilisation de modulateur de métabolisme tel le disulfiram, contre la dépendance à l'alcool, permet de bloquer le métabolisme de la drogue et/ou permet l'accumulation de métabolites toxiques (Stitzer & Walsh, 1997). Les classes de médicaments citées plus haut servent de modèle dans le développement de traitement pour contrer la dépendance aux drogues psychostimulantes. En dépit de la recherche très étendue sur le sujet, aucune de ces pharmacothérapies ne peut réellement être considérée comme efficace. Comme nous l'avons déjà abordé, l'abus chronique de cocaïne et d'amphétamine produit plusieurs adaptations d'ordre neurobiologiques. Ce phénomène d'ordre physiologique est complexe et mal compris. À la lumière, d'une part, de certains résultats récents sur l'implication du bFGF dans la sensibilisation à l'amphétamine, et d'autre part, des résultats présentés dans ce mémoire, il est maintenant possible de suggérer qu'un des effecteurs moléculaire pouvant influencer la plasticité synaptique lors de l'abus de

drogues psychostimulantes serait le bFGF. Évidemment de plus amples investigations seront nécessaires afin de comprendre l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués. Ces nouvelles connaissances pourraient éventuellement nous permettre de mettre au point des traitements plus spécifiques à la problématique de la dépendance aux psychostimulants. Cependant, il sera nécessaire de tenir compte des rôles multiples du bFGF dans de nombreux processus physiologiques normaux comme par exemple la division cellulaire (tableau 4.0). Dans ce contexte, et à titre d'exemple, il semble probable que des antagonistes du récepteur au bFGF seraient susceptibles de causer de multiples effets secondaires indésirables si ceux-ci étaient utilisés dans le traitement de la dépendance.

9. Conclusion

Nos travaux ont permis d'approfondir les effets du bFGF astrocytaire sur les neurones DAergiques. Grâce à notre modèle de co-culture de neurones DAergiques et d'astrocytes nous avons pu établir que la majorité des astrocytes en culture expriment le bFGF de façon nucléaire. Nous avons par ailleurs confirmé que le bFGF n'était pas présent dans le milieu extracellulaire et donc, non sécrété. Par ailleurs, la diminution de l'expression endogène du bFGF a affecté la fonction synaptique des neurones DAergiques en diminuant la libération spontanée de DA.

Une contribution potentielle de ce facteur de croissance dans la dépendance aux drogues d'abus a déjà été établie. Le bFGF semble jouer un rôle dans l'induction de la sensibilisation aux drogues psychostimulantes. Une meilleure compréhension de son fonctionnement pourrait permettre d'intervenir plus efficacement dans la prévention et même dans le traitement de la dépendance aux drogues affectant le système dopaminergique.

Bibliographie

Abe, K., Aoyagi, A. & Saito, H. (2001) Sustained phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is required for basic fibroblast growth factor-mediated axonal branch formation in cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem Int*, **38**, 309-15.

Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.H., Castillo, P.E., Shinsky, N., Verdugo, J.M., Armanini, M., Ryan, A., Hynes, M., Phillips, H., Sulzer, D. & Rosenthal, A. (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*, **25**, 239-52.

Abi-Dargham, A., Gil, R., Krystal, J., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Bowers, M., van Dyck, C.H., Charney, D.S., Innis, R.B. & Laruelle, M. (1998) Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*, **155**, 761-7.

Abraham, J.A., Mergia, A., Whang, J.L., Tumolo, A., Friedman, J., Hjerrild, K.A., Gospodarowicz, D. & Fiddes, J.C. (1986a) Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*, **233**, 545-8.

Ahn, B.H., Rhim, H., Kim, S.Y., Sung, Y.M., Lee, M.Y., Choi, J.Y., Wolozin, B., Chang, J.S., Lee, Y.H., Kwon, T.K., Chung, K.C., Yoon, S.H., Hahn, S.J., Kim, M.S., Jo, Y.H. & Min do, S. (2002) alpha-Synuclein interacts with phospholipase D isozymes and inhibits pervanadate-induced phospholipase D activation in human embryonic kidney-293 cells. *J Biol Chem*, **277**, 12334-42.

Akerud, P., Alberch, J., Eketjall, S., Wagner, J. & Arenas, E. (1999) Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin on developing and adult

substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neurochem*, **73**, 70-8.

Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, **12**, 366-75.

Albin, R.L., Young, A.B. & Penney, J.B. (1995) The functional anatomy of disorders of the basal ganglia. *Trends Neurosci*, **18**, 63-4.

Andreasen, N.C. (1987) The diagnosis of schizophrenia. *Schizophr Bull*, **13**, 9-22.

Andreasen, N.C. (1990) Positive and negative symptoms: historical and conceptual aspects. *Mod Probl Pharmacopsychiatry*, **24**, 1-42.

Aoyagi, A., Nishikawa, K., Saito, H. & Abe, K. (1994) Characterization of basic fibroblast growth factor-mediated acceleration of axonal branching in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res*, **661**, 117-26.

Araque, A., Carmignoto, G. & Haydon, P.G. (2001) Dynamic signaling between astrocytes and neurons. *Annu Rev Physiol*, **63**, 795-813.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P. & Haydon, P.G. (1998a) Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, **10**, 2129-42.

Araque, A. & Perea, G. (2004) Glial modulation of synaptic transmission in culture. *Glia*, **47**, 241-8.

Arcuino, G., Lin, J.H., Takano, T., Liu, C., Jiang, L., Gao, Q., Kang, J. & Nedergaard, M. (2002) Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP.

Proc Natl Acad Sci U S A, **99**, 9840-5.

Auld, D.S. & Robitaille, R. (2003) Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron*, **40**, 389-400.

Auluck, P.K., Chan, H.Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. & Bonini, N.M. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, **295**, 865-8.

Bailey, C.H., Kaang, B.K., Chen, M., Martin, K.C., Lim, C.S., Casadio, A. & Kandel, E.R. (1997) Mutation in the phosphorylation sites of MAP kinase blocks learning-related internalization of apCAM in *Aplysia* sensory neurons. *Neuron*, **18**, 913-24.

Bal, A., Bachelot, T., Savasta, M., Manier, M., Verna, J.M., Benabid, A.L. & Feuerstein, C. (1994) Evidence for dopamine D2 receptor mRNA expression by striatal astrocytes in culture: in situ hybridization and polymerase chain reaction studies. *Brain Res Mol Brain Res*, **23**, 204-12.

Baldessarini, R.J. (1975) Editorial: Metabolic hypotheses in schizophrenia. *N Engl J Med*, **292**, 527-8.

Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C.M., Folkman, J. & Vlodavsky, I. (1989) Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry*, **28**, 1737-43.

Berger, T., Muller, T. & Kettenmann, H. (1995) Developmental regulation of ion channels and receptors on glial cells. *Perspect Dev Neurobiol*, **2**, 347-56.

Bertrand, J.R., Pottier, M., Vekris, A., Opolon, P., Maksimenko, A. & Malvy, C. (2002) Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo.

Biochem Biophys Res Commun, **296**, 1000-4.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Quarto, N., Mignatti, P. & Rifkin, D.B. (1995)

Differential modulation of cell phenotype by different molecular weight forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by the high molecular weight forms. *J Cell Biol*, **129**, 233-43.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G. & Rifkin, D.B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev*, **18**, 26-45.

Bjijou, Y., Stinus, L., Le Moal, M. & Cador, M. (1996) Evidence for selective involvement of dopamine D1 receptors of the ventral tegmental area in the behavioral sensitization induced by intra-ventral tegmental area injections of D-amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, **277**, 1177-87.

Bleuler, E.P. (1950) In Zinkin, J. (ed), *Dementia Praecox or the group of schizophrenia*. International University Press, New York.

Bourque, M.J. & Trudeau, L.E. (2000) GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture. *Eur J Neurosci*, **12**, 3172-80.

Bouvier, M.M. & Mytilineou, C. (1995) Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors in vitro. *J Neurosci*, **15**, 7141-9.

Braasch, D.A. & Corey, D.R. (2002) Novel antisense and peptide nucleic acid strategies

for controlling gene expression. *Biochemistry*, **41**, 4503-10.

Breier, A., Su, T.P., Saunders, R., Carson, R.E., Kolachana, B.S., de Bartolomeis, A., Weinberger, D.R., Weisenfeld, N., Malhotra, A.K., Eckelman, W.C. & Pickar, D. (1997) Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2569-74.

Bushong, E.A., Martone, M.E. & Ellisman, M.H. (2003) Examination of the relationship between astrocyte morphology and laminar boundaries in the molecular layer of adult dentate gyrus. *J Comp Neurol*, **462**, 241-51.

Bushong, E.A., Martone, M.E. & Ellisman, M.H. (2004) Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*, **22**, 73-86.

Cador, M., Bjiou, Y. & Stinus, L. (1995) Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to amphetamine. *Neuroscience*, **65**, 385-95.

Cameron, D.L. & Williams, J.T. (1993) Dopamine D1 receptors facilitate transmitter release. *Nature*, **366**, 344-7.

Carlsson, A., Falck, B. & Hillarp, N.A. (1962) Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol Scand*, **56(Suppl 196)**, 1-28.

Carlsson, A. & Lindqvist, M. (1963) Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation

of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain.

Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), **20**, 140-4.

Carlsson A., Lindqvist M., Magnusson T. & Waldeck B. (1958) On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, **127**, 471.

Castonguay, A., Levesque, S. & Robitaille, R. (2001) Glial cells as active partners in synaptic functions. *Prog Brain Res*, **132**, 227-40.

Chadi, G., Moller, A., Rosen, L., Janson, A.M., Agnati, L.A., Goldstein, M., Ogren, S.O., Pettersson, R.F. & Fuxe, K. (1993) Protective actions of human recombinant basic fibroblast growth factor on MPTP-lesioned nigrostriatal dopamine neurons after intraventricular infusion. *Exp Brain Res*, **97**, 145-58.

Cheng, B., Furukawa, K., O'Keefe, J.A., Goodman, Y., Kihiko, M., Fabian, T. & Mattson, M.P. (1995) Basic fibroblast growth factor selectively increases AMPA-receptor subunit GluR1 protein level and differentially modulates Ca²⁺ responses to AMPA and NMDA in hippocampal neurons. *J Neurochem*, **65**, 2525-36.

Chung, K.K., Zhang, Y., Lim, K.L., Tanaka, Y., Huang, H., Gao, J., Ross, C.A., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2001) Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*, **7**, 1144-50.

Clarke, W.E., Berry, M., Smith, C., Kent, A. & Logan, A. (2001) Coordination of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2)

trafficking to nuclei of reactive astrocytes around cerebral lesions in adult rats. *Mol Cell Neurosci*, **17**, 17-30.

Cook, C.E. (1991) Pyrolytic characteristics, pharmacokinetics, and bioavailability of smoked heroin, cocaine, phencyclidine, and methamphetamine. *NIDA Res Monogr*, **115**, 6-23.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S. & Smith, S.J. (1990) Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science*, **247**, 470-3.

Criswell, H.E., Mueller, R.A. & Breese, G.R. (1990) Long-term D1-dopamine receptor sensitization in neonatal 6-OHDA-lesioned rats is blocked by an NMDA antagonist. *Brain Res*, **512**, 284-90.

Crow, T.J. (1980) Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J*, **280**, 66-8.

D'Amore, P.A. (1990) Modes of FGF release in vivo and in vitro. *Cancer Metastasis Rev*, **9**, 227-38.

Dahlstroem A., a.F.K. (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system.I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand*, **62**, SUPPL 232:1-55.

Dani, J.W., Chernjavsky, A. & Smith, S.J. (1992) Neuronal activity triggers calcium waves in hippocampal astrocyte networks. *Neuron*, **8**, 429-40.

Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., Trillat, A.C., Goodchild, R., Larsen, K.E., Staal, R., Tieu, K., Schmitz, Y., Yuan, C.A., Rocha, M., Jackson-Lewis, V., Hersch, S., Sulzer, D., Przedborski, S., Burke, R. & Hen, R. (2002) Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14524-9.

Dauer, W. & Przedborski, S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, **39**, 889-909.

Decavel, C., Lescaudron, L., Mons, N. & Calas, A. (1987) First visualization of dopaminergic neurons with a monoclonal antibody to dopamine: a light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem*, **35**, 1245-51.

Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J.T., Rudland, P.S. & Fernig, D.G. (2002) Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts. *Biochem J*, **366**, 235-44.

Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H. & Fernig, D.G. (2001) Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **6**, 253-73.

Demellweek, C. & Goudie, A.J. (1983) Behavioural tolerance to amphetamine and other psychostimulants: the case for considering behavioural mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*, **80**, 287-307.

Di Chiara, G. (1995) The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend*, **38**, 95-137.

Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 5274-8.

Di Chiara, G. & North, R.A. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci*, **13**, 185-93.

Di Cristo, G., Berardi, N., Cancedda, L., Pizzorusso, T., Putignano, E., Ratto, G.M. & Maffei, L. (2001) Requirement of ERK activation for visual cortical plasticity. *Science*, **292**, 2337-40.

Dougherty, G.G. Jr & Ellinwood, E.H. Jr (1981) Chronic D-amphetamine in nucleus accumbens: lack of tolerance or reverse tolerance of locomotor activity. *Life Sci*, **28**, 2295-8.

Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-8.

English, A.W. & Schwartz, G. (1995) Both basic fibroblast growth factor and ciliary neurotrophic factor promote the retention of polyneuronal innervation of developing skeletal muscle fibers. *Dev Biol*, **169**, 57-64.

Eranko O. (1955) Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. *Endocrinology*, **57**, 363-8.

Fallon, J.H. (1988) Topographic organization of ascending dopaminergic projections.

Ann N Y Acad Sci, **537**, 1-9.

Fallon, J.H., Koziell, D.A. & Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. II. Amygdala, suprarhinal cortex and entorhinal cortex. *J Comp Neurol*, **180**, 509-32.

Fallon, J.H. & Moore, R.Y.a. (1978a) Catecholamine innervation of the basal forebrain. III. Olfactory bulb, anterior olfactory nuclei, olfactory tubercle and piriform cortex. *J Comp Neurol*, **180**, 533-44.

Fallon, J.H. & Moore, R.Y.b. (1978b) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J Comp Neurol*, **180**, 545-80.

Fibiger & Phillips (1986) The nervous system IV. In Bloom, Williams & and Wilkins (eds), *Handbook of physiology*. Baltimore, pp. 647-75.

Fink, J.S. & Smith, G.P. (1980) Relationships between selective denervation of dopamine terminal fields in the anterior forebrain and behavioral responses to amphetamine and apomorphine. *Brain Res*, **201**, 107-27.

Finlay, J.M. & Zigmont, M.J. (1995) Critical analysis of neurochemical methods for monitoring transmitter dynamics in the brain. In Bloom F.E & and Kupfer D.J. (eds), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Raven Press, NewYork, pp. 29-40.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998)

Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-11.

Flores, C., Rodaros, D. & Stewart, J. (1998) Long-lasting induction of astrocytic basic fibroblast growth factor by repeated injections of amphetamine: blockade by concurrent treatment with a glutamate antagonist. *J Neurosci*, **18**, 9547-55.

Flores, C., Samaha, A.N. & Stewart, J. (2000) Requirement of endogenous basic fibroblast growth factor for sensitization to amphetamine. *J Neurosci*, **20**, RC55.

Flores, C. & Stewart, J. (2000a) Changes in astrocytic basic fibroblast growth factor expression during and after prolonged exposure to escalating doses of amphetamine. *Neuroscience*, **98**, 287-93.

Flores, C. & Stewart, J. (2000b) Basic fibroblast growth factor as a mediator of the effects of glutamate in the development of long-lasting sensitization to stimulant drugs: studies in the rat. *Psychopharmacology (Berl)*, **151**, 152-65.

Florkiewicz, R.Z., Baird, A. & Gonzalez, A.M. (1991) Multiple forms of bFGF: differential nuclear and cell surface localization. *Growth Factors*, **4**, 265-75.

Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D. & Florkiewicz, E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol*, **162**, 388-99.

Florkiewicz, R.Z. & Sommer, A. (1989) Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl*

Acad Sci U S A, **86**, 3978-81.

Fuxe, K. (1965) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system *Acta Physiol Scand*, **64**, SUPPL 247:37+.

Fuxe, K., Agnati, L.F., Kalia, M., Goldstein, M., Andersson, K. & Harfstrand, A. (1985) Dopaminergic system in the brain and pituitary. In Flückiger, E., Müller, E.E. & Thorrer, M.O. (eds), *Basic and clinical aspects of neurosciences: the dopaminergic system*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 11-25.

Gajdusek, C.M. & Carbon, S. (1989) Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol*, **139**, 570-9.

Gash, D.M., Zhang, Z., Ovadia, A., Cass, W.A., Yi, A., Simmerman, L., Russell, D., Martin, D., Lapchak, P.A., Collins, F., Hoffer, B.J. & Gerhardt, G.A. (1996) Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*, **380**, 252-5.

Geffard, M., Buijs, R.M., Seguela, P., Pool, C.W. & Le Moal, M. (1984) First demonstration of highly specific and sensitive antibodies against dopamine. *Brain Res*, **294**, 161-5.

German, D.C. & Manaye, K.F. (1993) Midbrain dopaminergic neurons (nuclei A8, A9, and A10): three-dimensional reconstruction in the rat. *J Comp Neurol*, **331**, 297-309.

Gibb, W.R. (1992) Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes. *Neurol Clin*, **10**, 361-76.

Ginty, D.D., Bonni, A. & Greenberg, M.E. (1994) Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell*, **77**, 713-25.

Giordano, S., Sherman, L., Lyman, W. & Morrison, R. (1992) Multiple molecular weight forms of basic fibroblast growth factor are developmentally regulated in the central nervous system. *Dev Biol*, **152**, 293-303.

Giros, B., el Mestikawy, S., Bertrand, L. & Caron, M.G. (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett*, **295**, 149-54.

Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M. & Caron, M.G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, **379**, 606-12.

Goedert, M. (2001) Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 492-501.

Gomez-Pinilla, F., Lee, J.W. & Cotman, C.W. (1992) Basic FGF in adult rat brain: cellular distribution and response to entorhinal lesion and fimbria-fornix transection. *J Neurosci*, **12**, 345-55.

Grimm, J., Mueller, A., Hefti, F. & Rosenthal, A. (2004) Molecular basis for catecholaminergic neuron diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13891-6.

Halliday, G.M. & Tork, I. (1986) Comparative anatomy of the ventromedial mesencephalic tegmentum in the rat, cat, monkey and human. *J Comp Neurol*, **252**, 423-

45.

Haydon, P.G. (2001) GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 185-93.

Hornykiewicz, O. (1977) Psychopharmacological implications of dopamine and dopamine antagonists: a critical evaluation of current evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **17**, 545-59.

Hornykiewicz, O. & Kish, S.J. (1984) Neurochemical basis of dementia in Parkinson's disease. *Can J Neurol Sci*, **11**, 185-90.

Hosli, E. & Hosli, L. (1993) Receptors for neurotransmitters on astrocytes in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, **40**, 477-506.

Hou, J.G., Cohen, G. & Mytilineou, C. (1997) Basic fibroblast growth factor stimulation of glial cells protects dopamine neurons from 6-hydroxydopamine toxicity: involvement of the glutathione system. *J Neurochem*, **69**, 76-83.

Huang, Y.Y., Martin, K.C. & Kandel, E.R. (2000) Both protein kinase A and mitogen-activated protein kinase are required in the amygdala for the macromolecular synthesis-dependent late phase of long-term potentiation. *J Neurosci*, **20**, 6317-25.

Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y.A., Juhasz, M., Yancopoulos, G.D., Squinto, S.P. & Lindsay, R.M. (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, **350**, 230-2.

Hökfett, T., Johansson & Goldstein (1984) Central catecholamine neurons as

revealed by immunocytochemistry with special reference to adrenaline. In Björklund, A. & Hökfelt, T. (eds), *Handbook of chemical neuroanatomy, Vol 2, classical transmitters in the CNS, Part I*. Elsevier, Amsterdam, pp. 157-276.

Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. & Takahashi, R. (2001) An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, **105**, 891-902.

Imamura, T., Engleka, K., Zhan, X., Tokita, Y., Forough, R., Roeder, D., Jackson, A., Maier, J.A., Hla, T. & Maciag, T. (1990) Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science*, **249**, 1567-70.

Imperato, A., Honore, T. & Jensen, L.H. (1990) Dopamine release in the nucleus caudatus and in the nucleus accumbens is under glutamatergic control through non-NMDA receptors: a study in freely-moving rats. *Brain Res*, **530**, 223-8.

Impey, S. & Goodman, R.H. (2001) CREB signaling--timing is everything. *Sci STKE*, **2001**, PE1.

Jaffe, E.H., Marty, A., Schulte, A. & Chow, R.H. (1998) Extrasynaptic vesicular transmitter release from the somata of substantia nigra neurons in rat midbrain slices. *J Neurosci*, **18**, 3548-53.

Jans, D.A. (1994) Nuclear signaling pathways for polypeptide ligands and their membrane receptors? *FASEB J*, **8**, 841-7.

Jaye, M., Schlessinger, J. & Dionne, C.A. (1992) Fibroblast growth factor receptor

tyrosine kinases: molecular analysis and signal transduction. *Biochim Biophys Acta*, **1135**, 185-99.

Jeon, B.S., Jackson-Lewis, V. & Burke, R.E. (1995) 6-Hydroxydopamine lesion of the rat substantia nigra: time course and morphology of cell death. *Neurodegeneration*, **4**, 131-7.

Johnson, D.E. & Williams, L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res*, **60**, 1-41.

Jovanovic, J.N., Benfenati, F., Siow, Y.L., Sihra, T.S., Sanghera, J.S., Pelech, S.L., Greengard, P. & Czernik, A.J. (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 3679-83.

Joy, A., Moffett, J., Neary, K., Mordechai, E., Stachowiak, E.K., Coons, S., Rankin-Shapiro, J., Florkiewicz, R.Z. & Stachowiak, M.K. (1997) Nuclear accumulation of FGF-2 is associated with proliferation of human astrocytes and glioma cells. *Oncogene*, **14**, 171-83.

Joyce, E.M. & Iversen, S.D. (1984) Dissociable effects of 6-OHDA-induced lesions of neostriatum on anorexia, locomotor activity and stereotypy: the role of behavioural competition. *Psychopharmacology (Berl)*, **83**, 363-6.

Kahle, P.J., Haass, C., Kretschmar, H.A. & Neumann, M. (2002) Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases. *J Neurochem*, **82**, 449-57.

- Kahn, R.S. & Davis, R.L. (1995) New development in dopamine and schizophrenia. In Bloom F.E. & Kupfer D.J. (eds), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Raven Press, New York, pp. 1193-1204.
- Kalivas, P.W. (1993) Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev*, **18**, 75-113.
- Kalivas, P.W. & Duffy, P. (1991) A comparison of axonal and somatodendritic dopamine release using in vivo dialysis. *J Neurochem*, **56**, 961-7.
- Kalivas, P.W. & Duffy, P. (1995) D1 receptors modulate glutamate transmission in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **15**, 5379-88.
- Kalivas, P.W. & Stewart, J. (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev*, **16**, 223-44.
- Kalivas, P.W. & Weber, B. (1988) Amphetamine injection into the ventral mesencephalon sensitizes rats to peripheral amphetamine and cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*, **245**, 1095-102.
- Kandel, E.R. (1991) Disorders of thought: Schizophrenia. In Kandel E.R, Schwartz J.H & Jessel T.M (eds), *Principles of neural sciences*. Elsevier science publishing co, New York, pp. 853-858.
- Kang, H. & Schuman, E.M. (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*, **267**, 1658-62.

Karler, R., Calder, L.D., Chaudhry, I.A. & Turkanis, S.A. (1989) Blockade of "reverse tolerance" to cocaine and amphetamine by MK-801. *Life Sci*, **45**, 599-606.

Karler, R., Chaudhry, I.A., Calder, L.D. & Turkanis, S.A. (1990) Amphetamine behavioral sensitization and the excitatory amino acids. *Brain Res*, **537**, 76-82.

Keefe, K.A., Zigmond, M.J. & Abercrombie, E.D. (1993) In vivo regulation of extracellular dopamine in the neostriatum: influence of impulse activity and local excitatory amino acids. *J Neural Transm Gen Sect*, **91**, 223-40.

Kelley, A.E., Lang, C.G. & Gauthier, A.M. (1988) Induction of oral stereotypy following amphetamine microinjection into a discrete subregion of the striatum.

Psychopharmacology (Berl), **95**, 556-9.

Kelly, P.H., Seviour, P.W. & Iversen, S.D. (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res*, **94**, 507-22.

Kish, S.J., Rajput, A., Gilbert, J., Rozdilsky, B., Chang, L.J., Shannak, K. & Hornykiewicz, O. (1986) Elevated gamma-aminobutyric acid level in striatal but not extrastriatal brain regions in Parkinson's disease: correlation with striatal dopamine loss. *Ann Neurol*, **20**, 26-31.

Kish, S.J., Shannak, K. & Hornykiewicz, O. (1988) Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. Pathophysiologic and clinical implications. *N Engl J Med*, **318**, 876-80.

Klagsbrun, M. & Vlodavsky, I. (1988) Biosynthesis and storage of basic fibroblast growth factor (bFGF) by endothelial cells: implication for the mechanism of action of angiogenesis. *Prog Clin Biol Res*, **266**, 55-61.

Knepper, S.M., Grunewald, G.L. & Rutledge, C.O. (1988) Inhibition of norepinephrine transport into synaptic vesicles by amphetamine analogs. *J Pharmacol Exp Ther*, **247**, 487-94.

Kolb & Wishaw (1990) *Fundamentals of neuropsychology, (third ed.)*. Freeman, NewYork.

Koob, G.F. (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci*, **654**, 171-91.

Korf, J., Grasdijk, L. & Westerink, B.H. (1976) Effects of electrical stimulation of the nigrostriatal pathway of the rat on dopamine metabolism. *J Neurochem*, **26**, 579-84.

Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H. & Bonhoeffer, T. (1995) Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8856-60.

Kraepelin, E. (1913) In Barclay, R.M. (ed), *Textebook of psychiatry*. Livingston, Edinburgh.

Kreek, M.J., Bart, G., Lilly, C., LaForge, K.S. & Nielsen, D.A. (2005) Pharmacogenetics and human molecular genetics of opiate and cocaine addictions and their treatments. *Pharmacol Rev*, **57**, 1-26.

Krichevsky, A.M. & Kosik, K.S. (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11926-9.

Ku, P.T. & D'Amore, P.A. (1995) Regulation of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene and protein expression following its release from sublethally injured endothelial cells. *J Cell Biochem*, **58**, 328-43.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L. & Innis, R. (1999) Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol Psychiatry*, **46**, 56-72.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C.H., Gil, R., D'Souza, C.D., Erdos, J., McCance, E., Rosenblatt, W., Fingado, C., Zoghbi, S.S., Baldwin, R.M., Seibyl, J.P., Krystal, J.H., Charney, D.S. & Innis, R.B. (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9235-40.

Le, R. & Esquenazi, S. (2002) Astrocytes mediate cerebral cortical neuronal axon and dendrite growth, in part, by release of fibroblast growth factor. *Neurol Res*, **24**, 81-92.

Lee, C.S., Tee, L.Y., Dusenbery, S., Takata, T., Golden, J.P., Pierchala, B.A., Gottlieb, D.I., Johnson, E.M. Jr, Choi, D.W. & Joy Snider, B. (2005) Neurotrophin and GDNF family ligands promote survival and alter excitotoxic vulnerability of neurons derived from murine embryonic stem cells. *Exp Neurol*, **191**, 65-76.

Lee, F.J., Liu, F., Pristupa, Z.B. & Niznik, H.B. (2001) Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced

apoptosis. *FASEB J*, **15**, 916-26.

Levine, E.S., Dreyfus, C.F., Black, I.B. & Plummer, M.R. (1995) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8074-7.

Li, A.J., Suzuki, S., Suzuki, M., Mizukoshi, E. & Imamura, T. (2002) Fibroblast growth factor-2 increases functional excitatory synapses on hippocampal neurons. *Eur J Neurosci*, **16**, 1313-24.

Lieberman, J., Jody, D., Geisler, S., Vital-Herne, J., Alvir, J.M., Walsleben, J. & Woerner, M.G. (1989) Treatment outcome of first episode schizophrenia. *Psychopharmacol Bull*, **25**, 92-6.

Lin, L.F., Doherty, D.H., Lile, J.D., Bektesh, S. & Collins, F. (1993) GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, **260**, 1130-2.

Lincoln, S., Wiley, J., Lynch, T., Langston, J.W., Chen, R., Lang, A., Rogaeva, E., Sa, D.S., Munhoz, R.P., Harris, J., Marder, K., Klein, C., Bisceglia, G., Hussey, J., West, A., Hulihan, M., Hardy, J. & Farrer, M. (2003) Parkin-proven disease: common founders but divergent phenotypes. *Neurology*, **60**, 1605-10.

Lowenstein, D.H. & Arsenault, L. (1996) The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. *J Neurosci*, **16**, 1759-69.

Luthman, J., Fredriksson, A., Sundstrom, E., Jonsson, G. & Archer, T. (1989) Selective

lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res*, **33**, 267-77.

Mack, F. & Bonisch, H. (1979) Dissociation constants and lipophilicity of catecholamines and related compounds. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **310**, 1-9.

Mansour, A., Meador-Woodruff, J.H., Zhou, Q., Civelli, O., Akil, H. & Watson, S.J. (1992) A comparison of D1 receptor binding and mRNA in rat brain using receptor autoradiographic and in situ hybridization techniques. *Neuroscience*, **46**, 959-71.

Martin, K.C., Michael, D., Rose, J.C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H. & Kandel, E.R. (1997) MAP kinase translocates into the nucleus of the presynaptic cell and is required for long-term facilitation in *Aplysia*. *Neuron*, **18**, 899-912.

Mason, J.N., Farmer, H., Tomlinson, I.D., Schwartz, J.W., Savchenko, V., Defelice, L.J., Rosenthal, S.J. & Blakely, R.D. (2005) Novel fluorescence-based approaches for the study of biogenic amine transporter localization, activity, and regulation. *J Neurosci Methods*, **143**, 3-25.

Matsuo, A., Tooyama, I., Isobe, S., Oomura, Y., Akiguchi, I., Hanai, K., Kimura, J. & Kimura, H. (1994) Immunohistochemical localization in the rat brain of an epitope corresponding to the fibroblast growth factor receptor-1. *Neuroscience*, **60**, 49-66.

McNeil, P.L., Muthukrishnan, L., Warder, E. & D'Amore, P.A. (1989) Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J Cell Biol*, **109**, 811-22.

Meltzer, H.Y. (1987) Biological studies in schizophrenia. *Schizophr Bull*, **13**, 77-111.

Meltzer, H.Y. & Stahl, S.M. (1976) The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull*, **2**, 19-76.

Messer, C.J., Eisch, A.J., Carlezon, W.A. Jr, Whisler, K., Shen, L., Wolf, D.H., Westphal, H., Collins, F., Russell, D.S. & Nestler, E.J. (2000) Role for GDNF in biochemical and behavioral adaptations to drugs of abuse. *Neuron*, **26**, 247-57.

Mignatti, P., Morimoto, T. & Rifkin, D.B. (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J Cell Physiol*, **151**, 81-93.

Miller, H.H., Shore, P.A. & Clarke, D.E. (1980) In vivo monoamine oxidase inhibition by d-amphetamine. *Biochem Pharmacol*, **29**, 1347-54.

Miller, N.S. & Gold, M.S. (1989) The diagnosis of marijuana (cannabis) dependence. *J Subst Abuse Treat*, **6**, 183-92.

Miyagawa, T., Saito, H. & Nishiyama, N. (1993) Branching enhancement by basic fibroblast growth factor in cut neurite of hippocampal neurons. *Neurosci Lett*, **153**, 29-31.

Mizuno, Y., Hattori, N., Mori, H., Suzuki, T. & Tanaka, K. (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, **14**, 477-82.

Moffett, J., Kratz, E., Florkiewicz, R. & Stachowiak, M.K. (1996) Promoter regions involved in density-dependent regulation of basic fibroblast growth factor gene expression in human astrocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 2470-5.

Mohammadi, M., Schlessinger, J. & Hubbard, S.R. (1996) Structure of the FGF receptor tyrosine kinase domain reveals a novel autoinhibitory mechanism. *Cell*, **86**, 577-87.

Moore, R.Y. (1978) Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. The septal area. *J Comp Neurol*, **177**, 665-84.

Moscatelli, D. (1987) High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol*, **131**, 123-30.

Moscatelli, D., Presta, M., Joseph-Silverstein, J. & Rifkin, D.B. (1986) Both normal and tumor cells produce basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, **129**, 273-6.

Muchowski, P.J. (2002) Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron*, **35**, 9-12.

Muthukrishnan, L., Warder, E. & McNeil, P.L. (1991) Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells. *J Cell Physiol*, **148**, 1-16.

Negus, S.S., Burke, T.F., Medzihradsky, F. & Woods, J.H. (1993) Effects of opioid agonists selective for mu, kappa and delta opioid receptors on schedule-controlled responding in rhesus monkeys: antagonism by quadazocine. *J Pharmacol Exp Ther*, **267**, 896-903.

Newman, E.A. (2003) Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci*, **23**,

1659-66.

Olsnes, S., Klingenberg, O. & Wiedlocha, A. (2003) Transport of exogenous growth factors and cytokines to the cytosol and to the nucleus. *Physiol Rev*, **83**, 163-82.

Patterson, S.L., Abel, T., Deuel, T.A., Martin, K.C., Rose, J.C. & Kandel, E.R. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, **16**, 1137-45.

Patterson, S.L., Grover, L.M., Schwartzkroin, P.A. & Bothwell, M. (1992) Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron*, **9**, 1081-8.

Paulson, P.E. & Robinson, T.E. (1995) Amphetamine-induced time-dependent sensitization of dopamine neurotransmission in the dorsal and ventral striatum: a microdialysis study in behaving rats. *Synapse*, **19**, 56-65.

Pechan, P.A., Chowdhury, K., Gerdes, W. & Seifert, W. (1993) Glutamate induces the growth factors NGF, bFGF, the receptor FGF-R1 and c-fos mRNA expression in rat astrocyte culture. *Neurosci Lett*, **153**, 111-4.

Peng, H., Moffett, J., Myers, J., Fang, X., Stachowiak, E.K., Maher, P., Kratz, E., Hines, J., Fluharty, S.J., Mizukoshi, E., Bloom, D.C. & Stachowiak, M.K. (2001) Novel nuclear signaling pathway mediates activation of fibroblast growth factor-2 gene by type 1 and type 2 angiotensin II receptors. *Mol Biol Cell*, **12**, 449-62.

Peng, H., Myers, J., Fang, X., Stachowiak, E.K., Maher, P.A., Martins, G.G., Popescu,

- G., Berezney, R. & Stachowiak, M.K. (2002) Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) pathway mediates activation of the tyrosine hydroxylase gene by angiotensin II, depolarization and protein kinase C. *J Neurochem*, **81**, 506-24.
- Peng, H.B., Baker, L.P. & Chen, Q. (1991) Induction of synaptic development in cultured muscle cells by basic fibroblast growth factor. *Neuron*, **6**, 237-46.
- Perez-Reyes, M., White, W.R., McDonald, S.A., Hicks, R.E., Jeffcoat, A.R., Hill, J.M. & Cook, C.E. (1991) Clinical effects of daily methamphetamine administration. *Clin Neuropharmacol*, **14**, 352-8.
- Perugini, M. & Vezina, P. (1994) Amphetamine administered to the ventral tegmental area sensitizes rats to the locomotor effects of nucleus accumbens amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther*, **270**, 690-6.
- Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P.J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J. & Cookson, M.R. (2002) Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, **36**, 1007-19.
- Petry, N., Furnidge, L., Tong, Z.Y., Martin, C. & Clark, D. (1993) Time sampling observation procedure for studying drug effects: interaction between d-amphetamine and selective dopamine receptor antagonists in the rat. *Pharmacol Biochem Behav*, **44**, 167-80.
- Philippu, A. & Beyer, J. (1973) Dopamine and noradrenaline transport into subcellular vesicles of the striatum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **278**, 387-402.

Pierce, R.C., Pierce-Bancroft, A.F. & Prasad, B.M. (1999) Neurotrophin-3 contributes to the initiation of behavioral sensitization to cocaine by activating the Ras/Mitogen-activated protein kinase signal transduction cascade. *J Neurosci*, **19**, 8685-95.

Pijnenburg, A.J., Honig, W.M., Van der Heyden, J.A. & Van Rossum, J.M. (1976) Effects of chemical stimulation of the mesolimbic dopamine system upon locomotor activity. *Eur J Pharmacol*, **35**, 45-58.

Pijnenburg, A.J., Honig, W.M. & Van Rossum, J.M. (1975) Effects of antagonists upon locomotor stimulation induced by injection of dopamine and Noradrenaline into the nucleus accumbens of nialamide-pretreated rats. *Psychopharmacologia*, **41**, 175-80.

Porter, J.T. & McCarthy, K.D. (1997) Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol*, **51**, 439-55.

Pronin, A.N., Morris, A.J., Surguchov, A. & Benovic, J.L. (2000) Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem*, **275**, 26515-22.

Randrup, A. & Munkvad, I. (1967) Stereotyped activities produced by amphetamine in several animal species and man. *Psychopharmacologia*, **11**, 300-10.

Reilly, J.F. & Maher, P.A. (2001) Importin beta-mediated nuclear import of fibroblast growth factor receptor: role in cell proliferation. *J Cell Biol*, **152**, 1307-12.

Renko, M., Quarto, N., Morimoto, T. & Rifkin, D.B. (1990) Nuclear and cytoplasmic localization of different basic fibroblast growth factor species. *J Cell Physiol*, **144**, 108-14.

Reuss, B., Dono, R. & Unsicker, K. (2003) Functions of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF-5 in astroglial differentiation and blood-brain barrier permeability: evidence from mouse mutants. *J Neurosci*, **23**, 6404-12.

Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 228-36.

Robinson, T.E. (1988) Stimulant drugs and stress: factors influencing individuals differences in the susceptibility to sensitization. In P.W. Kalivas & C.D. Barnes (eds), *Sensitization in the nervous system*. Telford Press, Caldwell, NJ, pp. 145-173.

Robinson, T.E. & Berridge, K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, **18**, 247-91.

Robitaille, R. (2002) Multilevel regulation of synaptic efficacy by schwann cells at the vertebrate neuromuscular junction. In Volterra A, Magistretti PJ & Haydon PG (eds), *The tripartite synapse: glia in synaptic transmission*. Oxford University Press, New York, pp. 224-236.

Rogelj, S., Klagsbrun, M., Atzmon, R., Kurokawa, M., Haimovitz, A., Fuks, Z. & Vlodavsky, I. (1989) Basic fibroblast growth factor is an extracellular matrix component required for supporting the proliferation of vascular endothelial cells and the differentiation of PC12 cells. *J Cell Biol*, **109**, 823-31.

Ross, S.B.a.R.A.L. (1964) Blocking action of sympathomimetic amines on the uptake of tritiated noradrenaline by mouse cerebral cortex tissues in vitro. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, **21**, 226-39.

Rouge-Pont, F., Abrous, D.N., Le Moal, M. & Piazza, P.V. (1999) Release of endogenous dopamine in cultured mesencephalic neurons: influence of dopaminergic agonists and glucocorticoid antagonists. *Eur J Neurosci*, **11**, 2343-50.

Safran, A., Avivi, A., Orr-Urtreger, A., Neufeld, G., Lonai, P., Givol, D. & Yarden, Y. (1990) The murine flg gene encodes a receptor for fibroblast growth factor. *Oncogene*, **5**, 635-43.

Sasada, R., Kurokawa, T., Iwane, M. & Igarashi, K. (1988) Transformation of mouse BALB/c 3T3 cells with human basic fibroblast growth factor cDNA. *Mol Cell Biol*, **8**, 588-94.

Sato, Y. & Rifkin, D.B. (1988) Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *J Cell Biol*, **107**, 1199-205.

Schlessinger, J., Plotnikov, A.N., Ibrahimi, O.A., Eliseenkova, A.V., Yeh, B.K., Yayon, A., Linhardt, R.J. & Mohammadi, M. (2000) Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell*, **6**, 743-50.

Schmid, R.S., Graff, R.D., Schaller, M.D., Chen, S., Schachner, M., Hemperly, J.J. & Maness, P.F. (1999) NCAM stimulates the Ras-MAPK pathway and CREB phosphorylation in neuronal cells. *J Neurobiol*, **38**, 542-58.

Schultz, W., Dayan, P. & Montague, P.R. (1997) A neural substrate of prediction and reward. *Science*, **275**, 1593-9.

Schulz, J.B. & Falkenburger, B.H. (2004) Neuronal pathology in Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, **318**, 135-47.

Schwartz, J.H. (1991) Chemical messengers: Small molecules and peptides. In Kandel E.R, Schwartz J.H & Jessel T.M (eds), *Principles of neural sciences*. Elsevier science publishing co., NewYork, pp. 213-224.

Sherman, L., Stocker, K.M., Morrison, R. & Ciment, G. (1993) Basic fibroblast growth factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development*, **118**, 1313-26.

Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. & Suzuki, T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, **25**, 302-5.

Smith, S.J. (1994) Neural signalling. Neuromodulatory astrocytes. *Curr Biol*, **4**, 807-10.

Solomon, P.R. & Staton, D.M. (1982) Differential effects of microinjections of d-amphetamine into the nucleus accumbens or the caudate putamen on the rat's ability to ignore an irrelevant stimulus. *Biol Psychiatry*, **17**, 743-56.

Somanathan, S., Stachowiak, E.K., Siegel, A.J., Stachowiak, M.K. & Berezney, R. (2003) Nuclear matrix bound fibroblast growth factor receptor is associated with splicing factor rich and transcriptionally active nuclear speckles. *J Cell Biochem*, **90**, 856-69.

Stachowiak, E.K., Fang, X., Myers, J., Dunham, S. & Stachowiak, M.K. (2003a) cAMP-induced differentiation of human neuronal progenitor cells is mediated by nuclear

fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1). *J Neurochem*, **84**, 1296-312.

Stachowiak, E.K., Maher, P.A., Tucholski, J., Mordechai, E., Joy, A., Moffett, J., Coons, S. & Stachowiak, M.K. (1997a) Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors in human glial cells--association with cell proliferation. *Oncogene*, **14**, 2201-11.

Stachowiak, M.K., Fang, X., Myers, J.M., Dunham, S.M., Berezney, R., Maher, P.A. & Stachowiak, E.K. (2003b) Integrative nuclear FGFR1 signaling (INFS) as a part of a universal "feed-forward-and-gate" signaling module that controls cell growth and differentiation. *J Cell Biochem*, **90**, 662-91.

Stachowiak, M.K., Maher, P.A., Joy, A., Mordechai, E. & Stachowiak, E.K. (1996a) Nuclear accumulation of fibroblast growth factor receptors is regulated by multiple signals in adrenal medullary cells. *Mol Biol Cell*, **7**, 1299-317.

Stachowiak, M.K., Maher, P.A., Joy, A., Mordechai, E. & Stachowiak, E.K. (1996b) Nuclear localization of functional FGF receptor 1 in human astrocytes suggests a novel mechanism for growth factor action. *Brain Res Mol Brain Res*, **38**, 161-5.

Stachowiak, M.K., Moffett, J., Joy, A., Puchacz, E., Florkiewicz, R. & Stachowiak, E.K. (1994) Regulation of bFGF gene expression and subcellular distribution of bFGF protein in adrenal medullary cells. *J Cell Biol*, **127**, 203-23.

Stachowiak, M.K., Moffett, J., Maher, P., Tucholski, J. & Stachowiak, E.K. (1997b) Growth factor regulation of cell growth and proliferation in the nervous system. A new intracrine nuclear mechanism. *Mol Neurobiol*, **15**, 257-83.

Staropoli, J.F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E. & Abeliovich, A. (2003) Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, **37**, 735-49.

Stewart, J. & Badiani, A. (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol*, **4**, 289-312.

Stewart, J. & Vezina, P. (1989) Microinjections of Sch-23390 into the ventral tegmental area and substantia nigra pars reticulata attenuate the development of sensitization to the locomotor activating effects of systemic amphetamine. *Brain Res*, **495**, 401-6.

Stitzer, M.L. & Walsh, S.L. (1997) Psychostimulant abuse: the case for combined behavioral and pharmacological treatments. *Pharmacol Biochem Behav*, **57**, 457-70.

Stolerman, I.P. & Jarvis, M.J. (1995) The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology (Berl)*, **117**, 2-10; discussion 14-20.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration Office of Applied Studies (2003) Result from the 2002 National Survey on Drug Use and Health: National Findings. NHSDA Series H-22, DHHS Publication No. SMA 03-3836, Rockville, MD.

Sulzer, D., Maidment, N.T. & Rayport, S. (1993) Amphetamine and other weak bases act to promote reverse transport of dopamine in ventral midbrain neurons. *J Neurochem*, **60**, 527-35.

Sulzer, D. & Rayport, S. (1990) Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of

action. *Neuron*, **5**, 797-808.

Szebenyi, G., Dent, E.W., Callaway, J.L., Seys, C., Lueth, H. & Kalil, K. (2001) Fibroblast growth factor-2 promotes axon branching of cortical neurons by influencing morphology and behavior of the primary growth cone. *J Neurosci*, **21**, 3932-41.

Szebenyi, G. & Fallon, J.F. (1999) Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol*, **185**, 45-106.

Takayama, H., Ray, J., Raymon, H.K., Baird, A., Hogg, J., Fisher, L.J. & Gage, F.H. (1995) Basic fibroblast growth factor increases dopaminergic graft survival and function in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med*, **1**, 53-8.

Tang, K., Wu, H., Mahata, S.K., Taupenot, L., Rozansky, D.J., Parmer, R.J. & O'Connor, D.T. (1996) Stimulus-transcription coupling in pheochromocytoma cells. Promoter region-specific activation of chromogranin a biosynthesis. *J Biol Chem*, **271**, 28382-90.

Tanner, C.M. (1992) Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*, **10**, 317-29.

Thibaut, F., Vaugeois, J.M. & Petit, M. (1995) [The dopamine transporter: characterization and physiopathologic implications]. *Encephale*, **21**, 445-51.

Tomac, A., Lindqvist, E., Lin, L.F., Ogren, S.O., Young, D., Hoffer, B.J. & Olson, L. (1995) Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature*, **373**, 335-9.

Trudel, C., Faure-Desire, V., Florkiewicz, R.Z. & Baird, A. (2000) Translocation of FGF2 to the cell surface without release into conditioned media. *J Cell Physiol*, **185**, 260-

8.

Turnbull, J., Powell, A. & Guimond, S. (2001) Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol*, **11**, 75-82.

Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P. & Sharp, P.A. (1999) Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*, **13**, 3191-7.

Ungerstedt, U. (1971) Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand Suppl*, **367**, 1-48.

Verkhratsky, A., Orkand, R.K. & Kettenmann, H. (1998) Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev*, **78**, 99-141.

Vezina, P. (1993) Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res*, **605**, 332-7.

Vezina, P. (1996) D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *J Neurosci*, **16**, 2411-20.

Vezina, P. (2004) Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev*, **27**, 827-39.

Vezina, P. & Queen, A.L. (2000) Induction of locomotor sensitization by amphetamine requires the activation of NMDA receptors in the rat ventral tegmental area. *Psychopharmacology (Berl)*, **151**, 184-91.

Vezina, P. & Stewart, J. (1989) The effect of dopamine receptor blockade on the

development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. *Brain Res*, **499**, 108-20.

Vezina, P. & Stewart, J. (1990) Amphetamine administered to the ventral tegmental area but not to the nucleus accumbens sensitizes rats to systemic morphine: lack of conditioned effects. *Brain Res*, **516**, 99-106.

Vlodavsky, I., Fridman, R., Sullivan, R., Sasse, J. & Klagsbrun, M. (1987) Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which remains cell associated and platelet-derived growth factor-like protein which is secreted. *J Cell Physiol*, **131**, 402-8.

Wallach, M.B. (1974) Proceedings: Drug-induced stereotyped behavior: similarities and differences. *Psychopharmacol Bull*, **10**, 12-3.

Weinberger, D.R. (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, **44**, 660-9.

Weinberger, D.R. (1995) Neurodevelopmental perspective on schizophrenia. In Bloom F.E & Kupfer (eds), *Psychopharmacology: The fourth generation of progress*. Raven Press, New York, pp. 1171-1183.

Weise, B., Janet, T. & Grothe, C. (1993) Localization of bFGF and FGF-receptor in the developing nervous system of the embryonic and newborn rat. *J Neurosci Res*, **34**, 442-53.

West, A.E., Griffith, E.C. & Greenberg, M.E. (2002) Regulation of transcription factors

by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci*, **3**, 921-31.

White, D.M., Walker, S., Brenneman, D.E. & Gozes, I. (2000) CREB contributes to the increased neurite outgrowth of sensory neurons induced by vasoactive intestinal polypeptide and activity-dependent neurotrophic factor. *Brain Res*, **868**, 31-8.

White, N.M. & Milner, P.M. (1992) The psychobiology of reinforcers. *Annu Rev Psychol*, **43**, 443-71.

Wiedlocha, A., Falnes, P.O., Madshus, I.H., Sandvig, K. & Olsnes, S. (1994) Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell*, **76**, 1039-51.

Wise, R.A. & Hoffman, D.C. (1992) Localization of drug reward mechanisms by intracranial injections. *Synapse*, **10**, 247-63.

Wise, R.A. & Rompre, P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu Rev Psychol*, **40**, 191-225.

Wolf, M.E. (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol*, **54**, 679-720.

Wolf, M.E. & Xue, C.J. (1998) Amphetamine and D1 dopamine receptor agonists produce biphasic effects on glutamate efflux in rat ventral tegmental area: modification by repeated amphetamine administration. *J Neurochem*, **70**, 198-209.

Wolkin, A., Sanfilipo, M., Wolf, A.P., Angrist, B., Brodie, J.D. & Rotrosen, J. (1992) Negative symptoms and hypofrontality in chronic schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*,

49, 959-65.

Wong, D.T., van Frank, R.M., Horng, J.S. & Fuller, R.W. (1972) Accumulation of amphetamine and p-chloroamphetamine into synaptosomes of rat brain. *J Pharm Pharmacol*, **24**, 171-3.

Wu, G.Y., Deisseroth, K. & Tsien, R.W. (2001) Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci*, **4**, 151-8.

Zanassi, P., Paolillo, M., Montecucco, A., Avvedimento, E.V. & Schinelli, S. (1999) Pharmacological and molecular evidence for dopamine D(1) receptor expression by striatal astrocytes in culture. *J Neurosci Res*, **58**, 544-52.

Zhang, Y., Gao, J., Chung, K.K., Huang, H., Dawson, V.L. & Dawson, T.M. (2000) Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13354-9.

Annexes

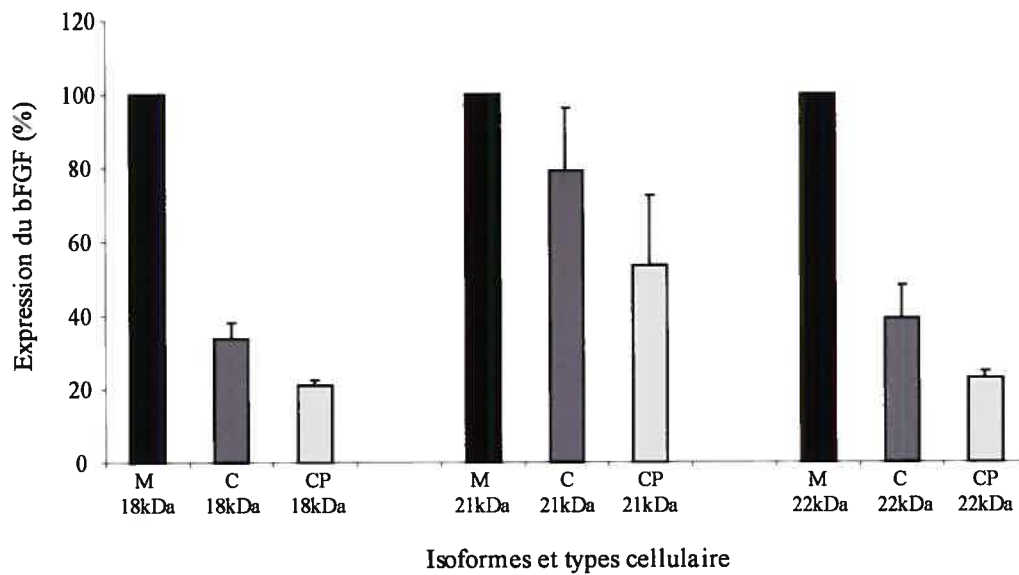
Annexe I

La première étape de ce projet de recherche consistait à déterminer l'expression du bFGF dans différents types de cellules gliales. D'abord, comme nous l'avons décrit dans la section matériels et méthodes de l'article, les cellules gliales se développent en flasque, puis après 48hrs subissent un passage à froid permettant d'éliminer les neurones et de sélectionner une sous-population d'astrocytes plus adhérents. Ces cellules sont alors qualifiées de « glie purifiée ». Nous avons alors évalué la présence d'une différence dans l'expression du bFGF selon que les cellules aient subi ou non ce passage à froid. Les cellules n'ayant pas eue de passage à froid sont nommées « glie primaire ». De plus, nous avons comparé l'expression du bFGF entre différents types de cellules gliales, provenant soit du mésencéphale ou du cortex. Le graphique A de la figure de l'annexe I, compare les niveaux d'expression du bFGF dans les cellules gliales purifiées et primaires provenant du cortex ainsi que dans les cellules gliales purifiées provenant du mésencéphale. Nous pouvons constater que l'expression du bFGF est plus importante dans les glies purifiées provenant du mésencéphale, comparativement à celles provenant du cortex. Par la suite, nous avons comparé les glies mésencéphaliques purifiées et primaires (graphique B de la figure de l'annexe I). Nous avons alors observé que les glies mésencéphaliques purifiées exprimaient de plus hauts niveaux de bFGF que les cellules gliales primaires. La suite des expériences a été accomplie en utilisant les cultures de cellules gliales purifiées provenant du mésencéphale.

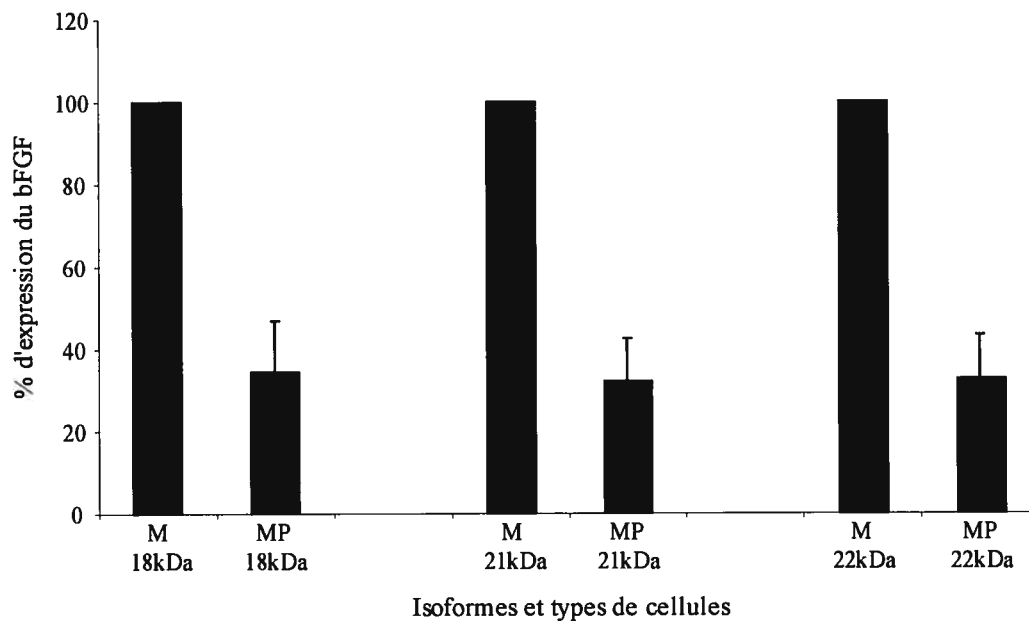
Figure Annexe I

M : Glie Mésencéphalique Purifiée
 MP : Glie Mésencéphalique Primaire
 C : Glie Corticale Purifiée
 CP : Glie Corticale Primaire

A.



B.



Annexe II

En nous inspirant des travaux de Skaper et al., 2000¹, nous avons effectué des études préliminaires à l'aide du SU5402, un bloqueur de l'activité kinase du FGFR1. Notre objectif était de déterminer l'effet du blocage de la fonction du récepteur du bFGF sur la libération de dopamine et la formation de synapses par les neurones dopaminergiques. En utilisant le modèle de co-culture en μ -gouttes, prétraitées à une concentration de 50 μ M de SU5402, il nous a été possible de quantifier le développement synaptique. Comme le démontre la section A de la figure de l'annexe II, un traitement au SU5402 a inhibé le développement synaptique de plus de 25% ($p < 0.05$). Dans ces expériences pharmacologiques, le SU5402 a normalement inhibé la signalisation de la majorité des récepteurs FGFR1, ce qui pourrait expliquer, en partie, l'importante inhibition du développement synaptique par rapport aux précédentes expériences avec les siRNA. Rappelons à ce propos que dans nos travaux précédents avec les siRNA contre le bFGF, nous avons été en mesure d'inhiber une partie seulement de l'expression endogène du bFGF (60%). Dans ces conditions, une interprétation possible de l'absence d'effet sur le développement synaptique des siRNA est que l'expression résiduelle du bFGF était suffisante au maintien du développement synaptique.

Suite à cette inhibition importante du développement synaptique produit par le SU5402, nous aurions pu prédire que le SU5402 aurait un effet important sur la

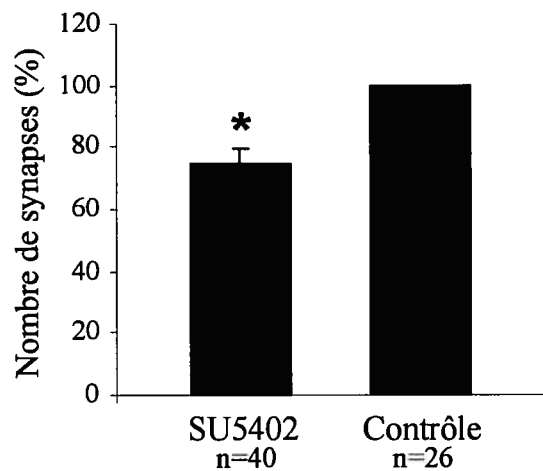
¹ Skaper, S. D., Kee, W. J., Facci, L., Macdonald, G., Doherty, P., and Walsh, F. S. (2000) The FGFR1 inhibitor PD 173074 selectively and potently antagonizes FGF-2 neurotrophic and neurotropic effects. *J Neurochem*, 75 (4), 1520-7

fonction synaptique des neurones DAergiques. Le modèle de co-culture standard de cellules gliales et de neurones DAergiques a été utilisé afin d'évaluer la capacité des neurones à libérer la DA suite au traitement avec le SU5402. La figure de l'annexe II (B et C) démontre que les traitements avec le SU5402 ($50\mu\text{M}$) aux jours deux et quatre en culture (avec échantillonnage au septième jour) n'a pas diminué de façon significative la libération spontanée et évoquée de DA. Les mêmes traitements ont été effectués sur des co-cultures plus âgées, soit au jour cinq et sept (avec échantillonnage aux jour dix) (figure annexe II, D et E). Malgré que la quantité de DA mesurée ait été plus importante à ce niveau de maturation des cultures, les effets du SU5402 sur la fonction synaptique, autant spontanée qu'évoquée, sont faibles et non significatifs. Dans l'ensemble, ces résultats sont difficiles à interpréter puisque tant un traitement avec du bFGF exogène (voir article) qu'avec un antagoniste du récepteur du bFGF réduiraient la formation de synapses par les neurones DAergiques. Dans ce contexte, il y aurait peut-être lieu de s'inquiéter à propos de la spécificité du SU5402. Peut-être qu'à la concentration utilisée, le SU5402 a bloqué la fonction de d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase en plus du FGFR1.

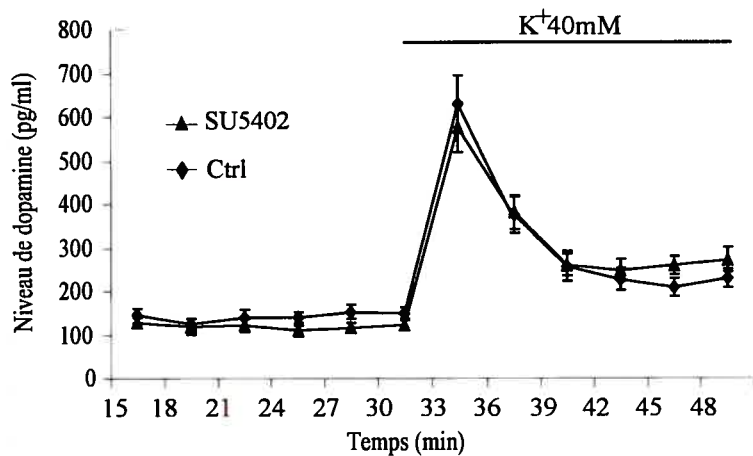
Figure

Annexe II

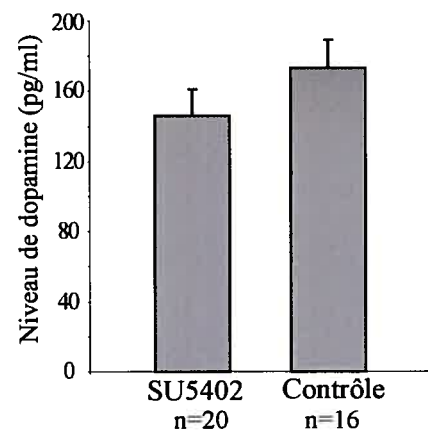
A.



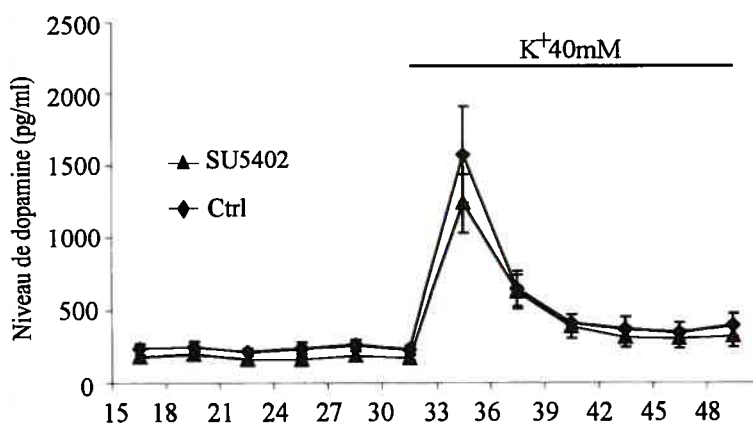
B. Échantillonnage 7 jours



C. Échantillonnage 7 jours



D. Échantillonnage 10 jours



E. Échantillonnage 10 jours

