

LA PLASTICITÉ NEURO-GLIALE DES RÉSEAUX NEUROENDOCRINES

NEURO-GLIAL PLASTICITY OF NEUROENDOCRINE NETWORKS

Par Anne DUITTOZ⁽¹⁾, Isabelle FRANCESCHINI, Yves TILLET, Caroline CHARVET, Pascal VAUDIN
(Communication présentée le 23 Janvier 2014)

RÉSUMÉ

La plasticité neuro-gliale des réseaux neuroendocrines est un élément majeur de la régulation d'évènements clés de grandes fonctions, comme la plasticité du système oxytocinergique lors de la parturition et de la lactation et celle du système GnRH dans le déclenchement du pic pré-ovulatoire de LH. Cette plasticité est décrite par des réarrangements neuroanatomiques des cellules gliales associées aux neurones neuroendocrines. Elle peut se mettre en place en quelques heures. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sont complexes et mettent en jeu une régulation active de l'activité des neurones par les cellules gliales. Dans l'étude présentée ici, nous montrons que la pulsativité de sécrétion des neurones à GnRH étudiés *in vitro* est régulée par la communication des cellules gliales *via* des jonctions gap. Les cellules gliales du microenvironnement des neurones à GnRH pourraient ainsi représenter un nouveau système d'intégration des signaux environnementaux et de régulation de la sécrétion de GnRH.

Mots-clés : GnRH, plasticité neuro-gliale, jonction gap, pulsativité.

SUMMARY

Neuro-glial plasticity of neuroendocrine networks is a major mechanism involved in key events of physiological functions such as parturition and lactation (oxytocinergic system) and preovulatory surge (GnRH system). This type of plasticity is classically described as rearrangements between glial cells and neuroendocrine neurones. Neuro-glial plasticity can occur within several hours. Cellular and molecular mechanisms involved are complex and imply an active regulation of neuroendocrine networks activity. In the present study we show that GnRH pulsatile secretion studied in vitro is regulated by gap junction communication between glial cells. Glial cells forming the microenvironment of GnRH neuronal network could represent a new system for integrating environmental cues and for regulating GnRH secretion.

Key words: GnRH; neuro-glial plasticity, gap junction, pulsatility.

INTRODUCTION

Qu'entend on actuellement sous le terme de plasticité du système nerveux ? Cette notion relativement récente a émergé en 1973 avec les travaux de Bliss et Lomo (1973), montrant une augmentation d'amplitude de la réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation pré-synaptique. Cette plasticité fonctionnelle a été mise en évidence dans l'hippocampe chez le lapin. Il s'agit du phénomène de potentialisation à long terme ou LTP (*Long Term Potentiation*). Traduisant une augmentation durable de la transmission synaptique provoquée par une sti-

mulation brève et intense à fréquence élevée de l'élément pré-synaptique, la LTP a été très étudiée pour son rôle probable dans la consolidation des mécanismes de l'apprentissage et de la mémoire, en effet la LTP peut se maintenir plusieurs heures (études *in vitro*) à plusieurs mois (études *in vivo*) (Bliss & Gardner-Medwin, 1973 ; Abraham *et al.* 2002). Le mécanisme sous-tendant la LTP fait intervenir la transmission glutamatergique. Les récepteurs-canaux au glutamate de type NMDA (ainsi appelés car activés par l'agoniste pharmacologique, le N-méthyl-D-aspartate) commandent spécifiquement la plasticité ; ils n'entrent en jeu que si l'activité du neurone

(1) Anne DUITTOZ, Professeur Université François Rabelais de Tours, PRC INRA UMR7247 CNRS, IFCE, Centre INRA Val de Loire, 37380 Nouzilly.
Tel 02 47 42 77 82
Courriel : duittoz@tours.inra.fr

présynaptique est élevée pour provoquer une forte libération de glutamate qui, par son action sur des récepteurs canaux au glutamate de type AMPA (ainsi appelés car activés par l'agoniste pharmacologique, l'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), entraîne une dépolarisation soutenue du neurone post-synaptique, qui conduit à l'ouverture des canaux NMDA par expulsion d'ions Mg^{2+} obturant le canal. Cette ouverture permet l'entrée massive de calcium dans les dendrites du neurone postsynaptique. Des mécanismes moléculaires impliquant les voies de signalisation MAP kinase (*Mitogen-Activated Protein kinase*) et la protéine CREB (*c-AMP Responsive Element Binding Protein*) conduisent à l'expression de nouveaux récepteurs, de protéines synaptiques dans ces neurones, déterminant alors progressivement des changements morphologiques au niveau des contacts synaptiques : remodelage des épines dendritiques, augmentation du nombre de contacts synaptiques sur les épines existantes, activation de synapses silencieuses (Muller, 2004). Tous ces changements contribuent à la consolidation de nouveaux circuits neuronaux sous-tendant les phénomènes d'apprentissage et de consolidation mnésique (Migaud *et al.* 1998, Andersen & Soleng, 1998).

La plasticité neuro-gliale a, quant à elle, été découverte en relation avec les neurones à ocytocine (OT) lors du déclenchement de la lactation. Les neurones à ocytocine ont leurs corps cellulaires situés dans les noyaux supra-optiques (NSO) et les noyaux para-ventriculaires (NPV) de l'hypothalamus ; leurs axones courent dans la neuro-hypophyse, leurs terminaisons libérant l'OT dans le réseau capillaire posthypophysaire. La sécrétion d'OT ne se produit qu'au moment de la parturition et lors de l'éjection du lait ; elle peut être chronologiquement corrélée à l'augmentation des juxtapositions entre neurones OT mais aussi entre neurones OT et interneurons GABA-ergiques, permises par la rétraction des fibres de cellules gliales de type astrocytaire (Theodosis & Poulain, 1984). Ces remodelages sont spécifiques des neurones OT et n'affectent pas les neurones à vasopressine (VP) localisés dans les mêmes noyaux hypothalamiques (Theodosis *et al.* 1986). Des remaniements gliaux similaires ont depuis été observés dans d'autres noyaux hypothalamiques, ainsi qu'autour de systèmes neuronaux plus diffus comme, par exemple, le système à GnRH qui contrôle l'axe gonadotrope. Les terminaisons axonales des neurones à GnRH dans l'éminence médiane sont entourées de prolongements gliaux qui s'intercalent entre les axones et les cellules endothéliales des capillaires sanguins. Ces prolongements gliaux se rétractent au moment du pic pré-ovulatoire de LH et les axones des neurones à GnRH sont alors directement en contact des cellules endothéliales (Prévot *et al.* 1999). La plasticité neuro-gliale existe aussi au niveau des corps cellulaires au cours du cycle annuel de reproduction dans l'espèce ovine (Viguié *et al.* 2001). L'ensemble de ces études montre l'importance des remaniements gliaux lors de transitions physiologiques qui impliquent des systèmes neuroendocriniens. Quel est le lien entre plasticité neuro-gliale et plasticité fonctionnelle ? De nombreux groupes de recherche se sont intéressés aux relations neurones-cellules gliales et plusieurs concepts mettant en évidence

un rôle actif des astrocytes sur le contrôle de l'activité neuronale ont émergé. Actuellement, on considère que les astrocytes agissent activement sur l'activité synaptique par deux catégories de mécanismes : recapture et sécrétion. Par leurs transporteurs membranaires spécifiques du glutamate GLT1 et GLAST, les astrocytes peuvent moduler la recapture de ce principal neurotransmetteur excitateur dans le système nerveux central et par tant, contrôler sa concentration dans le milieu extracellulaire local. Ils régulent aussi la concentration locale de K^+ , qui augmente fortement lors de l'activité électrique des neurones. Les cellules gliales sécrètent également des substances qui peuvent agir sur les neurones pré- ou post-synaptiques. On parle de gliotransmetteurs (Ben Achour & Pascual, 2012) : par exemple, la D-sérine qui agit comme co-facteur sur les récepteurs NMDA du glutamate, contribue à la potentialisation de l'activité synaptique NMDA dépendante ; l'ATP, au contraire, diminue l'activité synaptique via les récepteurs purinergiques ; les prostaglandines PGE2, des facteurs de croissance, des neurotrophines, le $TNF\alpha$ participent à la régulation à court terme de l'activité synaptique des neurones mais aussi aux remaniements à long terme des épines dendritiques et des synapses (Sharif *et al.* 2013). Les cellules gliales, en particulier les astrocytes, communiquent par des jonctions gap ou synapses électriques. Plusieurs études ont d'ailleurs montré le rôle majeur de cette forme de communication entre cellules gliales dans la régulation de l'activité des réseaux neuronaux (Rouach *et al.* 2008).

On sait que la plasticité neuro-gliale des systèmes neuroendocriniens est un phénomène nécessaire et important lors de transitions physiologiques majeures comme la lactation, la parturition, le pic pré-ovulatoire, mais qu'en est-il de phénomènes à plus courte échelle de temps comme la sécrétion pulsatile de GnRH ? La pulsatilité de sécrétion des neurones à GnRH présente une période de plusieurs dizaines de minutes qui ne peut pas être expliquée par des phénomènes d'origine purement ionique. L'hypothèse qui prévaut actuellement est que chaque pulse de sécrétion résulte de la synchronisation périodique du réseau ou d'une partie du réseau de neurones à GnRH. Les mécanismes conduisant à cette synchronisation ne sont pas encore connus. On sait cependant que les neurones à GnRH sont dépourvus de jonctions gap entre eux et donc ne sont pas couplés électriquement. L'hypothèse que nous formulons est que les cellules gliales associées aux neurones à GnRH forment un réseau communicant par des jonctions gap, qui pourrait réguler l'activité des neurones à GnRH et en particulier assurer leur synchronisation épisodique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cultures primaires de neurones à GnRH

Les cultures primaires de neurones à GnRH sont obtenues à partir d'explants de placodes olfactives prélevées sur des embryons de souris au stade embryonnaire 11,5 jours après l'accouplement (E11,5). Les placodes sont mises en culture et

maintenues dans un milieu sans sérum SFM (*serum free media*) selon la méthode décrite par Constantin *et al.* 2009. Les neurones à GnRH naissent dans la partie médiale des cavités nasales (futur organe voméro-nasal) à E11,5 chez la souris. Entre E11,5 et E13,5, ils migrent le long du septum nasal en direction des bulbes olfactifs. Entre E13,5 et E16,5, ils pénètrent dans le télencéphale et leur trajet tourne ventro-caudalement pour atteindre leur localisation finale dans l'aire préoptique et l'hypothalamus antérieur. Entre E16,5 et E18,5, ils forment un réseau fonctionnel et émettent des axones en direction de l'éminence médiane. *In vitro*, nous observons un développement similaire avec une phase de migration de trois jours dans l'explant, puis de trois jours hors de l'explant, suivie par une croissance neuritique importante associée à une mise en réseau. Ainsi toutes les expériences présentées dans cette étude ont été réalisées sur des cultures entre sept et 14 jours *in vitro* (7-14 DIV).

Méthodologie expérimentale

Les cultures sont maintenues pendant deux semaines. Les expérimentations sont réalisées durant la deuxième semaine. Le blocage des jonctions gap est réalisé par l'ajout d'acide glycyrrhétinique, triterpène dérivé de la réglisse, à la concentration de 50 μ M (GA). Il se lie aux connexines cytoplasmiques et empêche leur adressage membranaire lors de la formation des jonctions gap. Comme tous les bloqueurs des jonctions gap, il présente d'autres effets, en particulier un effet inhibiteur de la 15-hydroxyprostaglandin déshydrogénase qui transforme PGE2 et PGF2 α en métabolites inactifs. Un lot de quatre cultures est utilisé pour la mesure de la sécrétion pulsatile de GnRH par perfusion pendant des fenêtres de trois heures, le perfusât étant collecté toutes les cinq minutes à l'aide d'un collecteur de fraction pendant chacune de ces périodes. Chaque culture est ainsi perfusée pendant trois heures par du milieu témoin SFM, puis pendant trois heures par du SFM supplémenté en GA. Elle est ensuite maintenue sans perfusion pendant 12h en présence de GA. La perfusion est à nouveau effectuée pendant trois heures en SFM+GA, puis pendant trois heures en SFM seul. Les échantillons sont conservés à -20°C jusqu'au dosage. Les variations de calcium intracellulaire sont enregistrées dans un lot de huit cultures, quatre en milieu témoin SFM et quatre après 12h d'incubation en SFM+GA suivies d'une période de rinçage en SFM seul. Toutes les cultures sont ensuite fixées et conservées pour analyse immunohistochimique.

Dosage du GnRH

Les concentrations de GnRH sont évaluées en duplicate par dosage radio-immunologique (Constantin *et al.* 2009). Le seuil de détection du dosage à 98%B/B0 est d'un pg/ml. Les coefficients de variation inter- et intra-dosages sont respectivement de 14 et 6%. L'algorithme PULSAR permet de déterminer les paramètres de pulsativité : nombre moyen de pulses, intervalle moyen inter-pulse, amplitude moyenne des pulses, durée moyenne des pulses, niveau moyen de GnRH.

Mesure du calcium intracellulaire

La mesure de calcium intracellulaire [Ca^{2+}]_i est effectuée en utilisant un indicateur fluorescent, le calcium green-AM (Molecular Probes). Une fois chargées en calcium green, les cultures sont déposées dans une chambre de perfusion (Warner Instrument) sur la platine d'un microscope inversé à fluorescence (Leica DM-IRB). Les enregistrements sont réalisés à l'objectif x20. La chambre est perfusée par du SFM avec ou sans acide glycyrrhétinique (50 μ l/min) et des images (512x512 pixels) sont acquises toutes les secondes (durée d'acquisition de 20msec) grâce à une caméra refroidie à haute performance (CoolSNAP HQ2; Roper Instruments). L'ensemble du dispositif est piloté par le logiciel Metafluor (Molecular Devices). Les images sont ensuite analysées par le logiciel Metafluor (Constantin *et al.* 2009).

Électrophysiologie

L'activité des neurones à GnRH est recueillie par la technique du patch-clamp en configuration « *loose patch* » grâce à un amplificateur de patch clamp Axopatch 200A et une carte Digidata 1200A/D, l'ensemble étant piloté par le logiciel Clampex 6. Les courants enregistrés sont les courants capacitaires de la surface membranaire située sous la micro-électrode. Ils donnent une image en miroir des potentiels d'action (PA).

Immunohistochimie

Les cultures sont fixées dans une solution à 4% de paraformaldehyde et conservées à +4°C dans une solution de cryoprotection. Les neurones à GnRH sont caractérisés par un anticorps monoclonal de souris (SMI-41) reconnaissant la partie N-terminale du GnRH. Les cellules gliales sont caractérisées par un anticorps dirigé contre la protéine GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), marqueur d'astrocyte mature, ou par un anticorps dirigé contre la protéine S100 β , marqueur de cellule gliale plus jeune. Les dilutions et temps d'incubation des anticorps primaires et des anticorps secondaires fluorescents Alexafluor sont indiqués dans l'article de Geller *et al.* 2013.

Analyse microscopique

Les marquages immunohistochimiques utilisant des anticorps couplés à des molécules fluorescentes sont observés par microscopie confocale (LSM700 Zeiss) en utilisant le logiciel ZEN (Zeiss). Leur analyse quantitative est réalisée par le logiciel Image J. Par exemple, pour un champ donné, l'image du marquage GnRH est binarisée, les contours des objets (neurones GnRH) sont détectés et agrandis de trois pixels (1 μ m). L'image du marquage GFAP est également binarisée et les contours détectés. La superposition des deux images binaires permet de détecter les coïncidences entre les deux marquages : nous considérons la localisation de la surface de marquage GFAP à moins d'un μ m de celle du marquage GnRH comme représentative d'une association entre un neurone à GnRH et une cellule gliale.

Analyse statistique

Tous les tests statistiques sont réalisés grâce au logiciel R (<http://www.R-project.org>). La normalité des distributions est éprouvée par le test de Shapiro ; l'homogénéité des variances, est appréciée par le test de Fisher pour les comparaisons de deux échantillons et par le test de Bartlett pour les comparaisons multiples. Lorsque les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances sont vérifiées, nous comparons les moyennes deux à deux par le test de Student et les comparaisons multiples sont réalisées par une analyse de variance à un facteur, suivie par des tests *post-hoc* de Student avec la correction de Bonferroni. Lorsque l'hypothèse de normalité ou d'homogénéité des variances n'est pas vérifiée, nous utilisons le test de rang de Mann-Whitney pour comparer deux échantillons et, pour les comparaisons entre échantillons multiples, le test de rang de Kruskal-Wallis suivi par des tests *post-hoc* de Wilcoxon avec la correction de Bonferroni. Pour comparer les associations du marquage GFAP-GnRH, nous réalisons une transformation racine carrée afin d'homogénéiser les variances. Le test de Kolmogorov-Smirnov permet de comparer les distributions des pourcentages de neurones impliqués dans les événements de synchronisation des événements calciques.

RÉSULTATS

Les neurones à GnRH obtenus en culture de placodes olfactives, sont accompagnés par des cellules gliales olfactives (*Olfactory ensheathing cells*, OEC) qui expriment le marqueur astrocytaire GFAP (**figure 1A, B, C**) et le marqueur glial S100 β (**figure 1D**). Au cours du développement de la culture, on peut observer des réarrangements morphologiques entre les neurones à GnRH et les OEC. De longs prolongements gliaux émanent des OEC et viennent s'accoler aux neurones à GnRH (**figure 1A, B, C**). Les neurites des neurones à GnRH s'allongent et certains viennent s'associer de manière étroite avec les corps cellulaires des cellules gliales (**figure 1D**). L'analyse quantitative de l'association du marquage GFAP au voisinage du marquage GnRH montre une augmentation statistiquement significative de cette association avec l'âge de la culture (**figure 1E**).

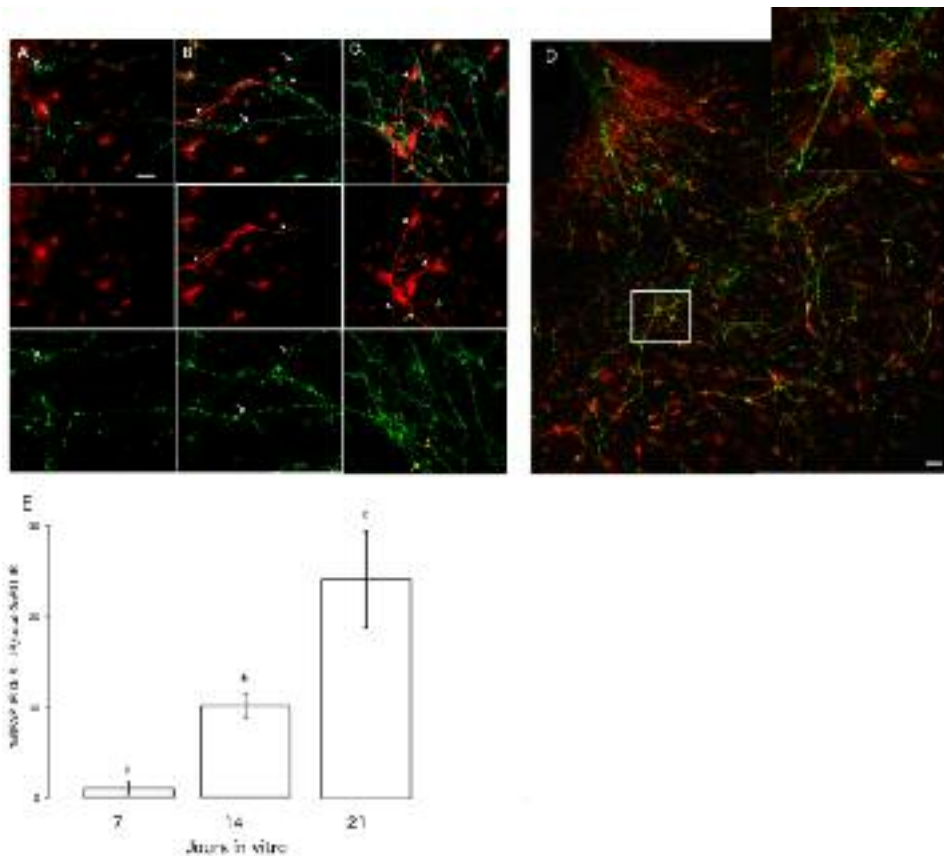


Figure 1 : Mise en évidence de l'association des neurones à GnRH et des cellules gliales olfactives in vitro.

Immunomarquage GnRH en fluorescence verte (Alexa fluor 488). Immunomarquage GFAP en fluorescence rouge (Alexa fluor 546). Images de la ligne inférieure : fluorescence verte immuno marquage GnRH, images de la ligne médiane : fluorescence rouge marquage GFAP, images de la ligne supérieure : superposition des images vertes et rouges. Microphotographies de culture : **A** : après sept jours in vitro (7 DIV), **B** : après 14 DIV, **C** : après 21 DIV. Les flèches blanches indiquent des fibres GnRH. Les flèches jaunes indiquent des fibres GnRH étroitement associées à des fibres GFAP. Les triangles blancs indiquent des prolongements gliaux immunoréactifs pour la GFAP. **D** : photomontage d'une culture d'explant de placode olfactive embryonnaire montrant le point de sortie des neurones de l'explant et le réseau de neurones à GnRH (en vert) en étroite association avec les cellules gliales (anti-S100 révélé en rouge). L'encart montre la proximité des fibres GnRH avec les corps cellulaires des cellules gliales.

L'acide 18- α -glycyrrhétinique 50 μ M (GA) reste sans effet lorsqu'il est péri-fusé avec le SFM pendant une fenêtre de trois heures. Le blocage des jonctions gap n'est observé qu'au cours des fenêtres de trois heures (SFM + GA) qui suivent la période de 12h d'exposition sans péri-fusion : on observe alors une réduction de la sécrétion pulsatile de GnRH. (**figure 2A**). La valeur moyenne de l'intervalle moyen inter-pulse (IPI) est augmentée de près de 50%, de $20,3 \pm 2,7$ min dans les conditions témoins à $34,0 \pm 6,0$ minutes après 12h de GA. L'amplitude des pulses est diminuée d'environ 40%, de $4,0 \pm 0,2$ pg/ml à $2,3 \pm 1,2$ pg/ml après 12h de GA (**figure 2B**). Le taux moyen de sécrétion de GnRH, de $0,05 \pm 0,02$ pg/min., est significativement diminué en présence de GA à $0,02 \pm 0,02$ pg/min ($p \leq 0,05$). L'ensemble de ces résultats montre une diminution de près de 70% de la sécrétion de GnRH. Après l'élimination de GA par rinçage, on observe une augmentation de la pulsativité avec une valeur de l'IPI de $27,4 \pm 2,1$ minutes ($p \leq 0,05$) et une augmentation de l'amplitude moyenne des pulses à un niveau supérieur que celui observé lors de la période contrôle : $6,5 \pm 1,4$ pg/ml ($p \leq 0,01$) (**figure 2B**). Le taux de sécrétion augmente et devient supérieur au taux de sécrétion de la période témoin : $0,09 \pm 0,04$ pg/min ($p \leq 0,05$).

L'enregistrement de l'activité électrique spontanée des neurones à GnRH montre qu'en conditions témoins, la fréquence des potentiels d'action (PA) est en moyenne de 200 par min. (**figure 2 C et C'**). Après 12 h d'exposition à GA, la fréquence diminue fortement à moins de 20 PA/min. (**figure 2 C et C'**). Le rinçage de GA par du SFM permet un retour de l'activité électrique spontanée avec des fréquences de 100 PA/min observées après 20 minutes de rinçage (**figure 2 C et C'**). L'analyse des variations intracellulaires de $[Ca^{2+}]_i$, à l'échelle du neurone individuel, ne montre pas d'effet notable sur la fréquence des événements calciques (**figure 2 D**). Par contre, à l'échelle du réseau, on observe la disparition des événements de haute synchronisation neuronale (événements de synchronisation impliquant plus de 30% des neurones enregistrés (**figure 2 D et D'**)). Ces événements de haute synchronisation réapparaissent lors du rinçage de GA par le SFM (**figure 2 D et D'**).

DISCUSSION

Nous montrons, dans cette étude, le rôle actif joué par les cellules gliales dans le contrôle de l'activité du réseau de neurones à GnRH. Des cellules gliales sont également étroitement associées aux neurones à GnRH *in vivo* (Prévoit, 2002). Dans notre modèle *in vitro*, les neurones à GnRH se développent à partir de précurseurs neuronaux. Du fait de cette origine embryonnaire précoce, les neurones obtenus après une semaine de culture sont des neurones dits naïfs qui n'ont jamais été dans un environnement hypothalamique et qui ne sont pas physiologiquement en activité. Leurs propriétés ne découlent pas d'une mémoire d'un état antérieur.

La sécrétion pulsatile de GnRH apparaît au cours de la seconde semaine de culture (entre 7 DIV et 14 DIV) (voir également

Constantin *et al.* 2009). Or le changement notable qui se produit entre la 1^{ère} et la 2^{ème} semaine de culture est la modification de l'organisation des cellules gliales olfactives : celles-ci s'associent étroitement avec les neurones à GnRH (Geller *et al.* 2013). Au cours de l'embryogenèse, elles migrent de la placode nasale vers les bulbes olfactifs où elles forment une couche cellulaire dense (*olfactory nerve layer*). Or, une partie d'entre elles reste étroitement associée aux neurones à GnRH et les accompagne dans leur migration intra-nasale et intra-cérébrale (données non publiées).

Les pulses de GnRH dépendent de la synchronisation partielle du réseau de neurones à GnRH

La sécrétion pulsatile de GnRH est corrélée à la synchronisation des événements calciques intracellulaires dans plus de 30% des neurones à GnRH (Constantin *et al.* 2009). On avance actuellement l'hypothèse que les neurones à kisspeptine synchroniseraient périodiquement l'activité sécrétrice des neurones à GnRH (Ohkamura *et al.* 2013). Or les résultats obtenus *in vitro* montrent que le réseau isolé de neurones à GnRH est capable de sécréter de manière pulsatile, alors que les neurones à kisspeptine sont absents (Liposits *et al.* 1991, Terasawa *et al.* 1999, Duittoz & Batailler, 2000, Chappell *et al.* 2003, Constantin *et al.* 2009). Toutefois, il est probable que dans les conditions physiologiques, la kisspeptine en exerçant son effet stimulateur sur les neurones à GnRH, permette des pulses de sécrétion que l'on peut détecter.

Effets du blocage de la communication par les jonctions gap

Sur l'activité électrique neuronale

Les cellules gliales associées aux neurones à GnRH communiquent par des jonctions gap et forment une sorte de syncytium qui pourrait être le substrat physiologique du processus de synchronisation. Le blocage des jonctions gap réduit fortement la sécrétion de GnRH, principalement par une diminution de la fréquence et de l'amplitude des pulses de sécrétion. Cet effet se met en place entre trois et 12 h d'incubation et est réversible. L'important délai entre l'application de GA et l'effet dépresseur sur la sécrétion de GnRH suggère l'implication de mécanismes de régulation transcriptionnelle. Une étude réalisée sur des astrocytes corticaux montre que le blocage des jonctions gap par le GA entraînait une diminution de la transcription des transporteurs gliaux de glutamate GLT1 et GLAST localisés dans la membrane des cellules gliales (Figiel *et al.* 2007). Les neurones à GnRH expriment le transporteur neuronal de glutamate vGlut2 (Hrabovszky *et al.* 2004) et présentent en microscopie électronique des petites vésicules à cœur clair qui peuvent être des vésicules de glutamate. Le défaut de transporteurs spécifiques empêcherait la recapture du glutamate potentiellement libéré par les neurones à GnRH, d'où une augmentation de sa concentration dans le milieu extracellulaire, provoquant une dépolarisation du potentiel membranaire des neurones, une

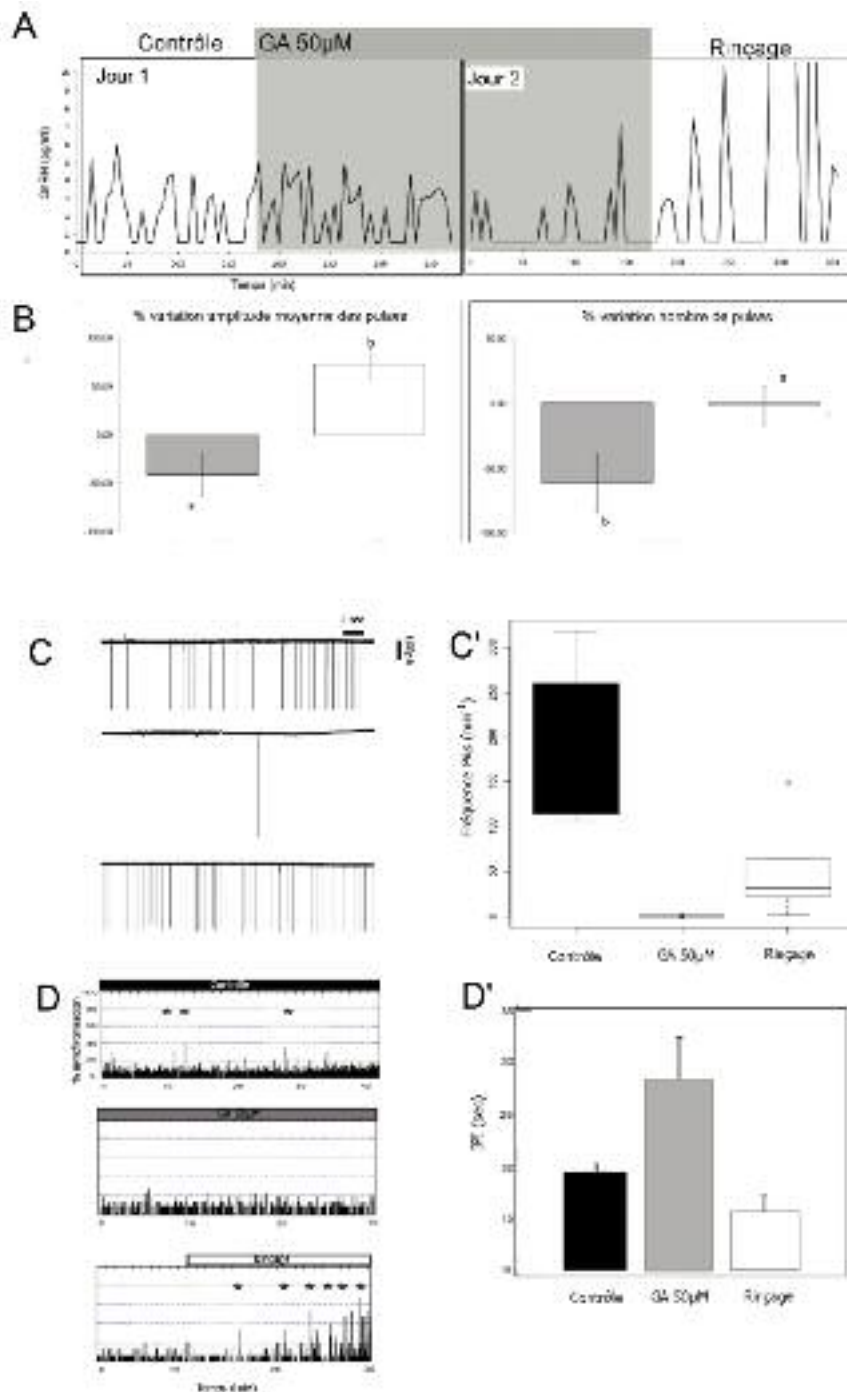


Figure 2 : **A** : Profil de sécrétion de GnRH d'une culture d'explant de placode olfactive embryonnaire. La culture est perfusée à 37°C par du milieu SFM en condition témoin pendant trois heures à une vitesse de 50µl/min. Le milieu est collecté toutes les cinq minutes et la concentration en GnRH de chaque fraction est mesurée. La culture est ensuite perfusée avec du SFM supplémenté par 50µM de GA pendant trois heures, et le milieu est collecté toutes les cinq minutes. La culture est ensuite maintenue sans perfusion pendant 12h en présence de GA. La perfusion est à nouveau effectuée pendant trois heures avec collecte des milieux. Le milieu est alors changé pour du SFM et la collecte se poursuit trois heures. On peut observer sur le graphique la diminution de la fréquence des pulses de GnRH en présence de GA après 12h d'incubation. Lorsque le SFM est perfusé lors du rinçage du GA, la fréquence revient à sa valeur témoin mais l'amplitude des pulses augmente. **B** : Représentation des pourcentages de variation par rapport à la période témoin de l'amplitude moyenne des pulses et du nombre de pulses par période. La même lettre indique des valeurs statistiquement non significativement différentes. **C** : Traces d'enregistrement en patch-clamp de l'activité électrique spontanée d'un neurone à GnRH. **C'** : Diagramme en boîte de la fréquence moyenne de décharge des potentiels d'action. L'application de GA pendant 12h diminue très fortement leur fréquence. Le rinçage par le SFM ne permet qu'un retour partiel après 20 minutes. **D** : Diagramme en bâtons du pourcentage de synchronisation des événements calciques intracellulaires. Les étoiles indiquent des événements de synchronisation de plus de 30% des neurones. Notez l'absence de synchronisation après l'application de GA pendant 12h. Les événements de synchronisation réapparaissent après l'élimination de GA par rinçage. **D'** : Histogramme représentant la valeur moyenne de l'intervalle inter-événement calcique. Les valeurs moyennes ne sont pas différentes de manière statistiquement significative.

diminution de leur excitabilité et la diminution, voire l'arrêt, de l'activité électrique spontanée. De fait, on observe une diminution importante de la fréquence des PA 12h après le début de la périfusion avec le GA, confirmant le rôle des cellules gliales dans le contrôle de l'activité électrique des neurones à GnRH (revue dans Sharif *et al.* 2013).

Sur la diminution de la fréquence et de l'amplitude des pulses de GnRH

L'effet du blocage des jonctions gap sur la sécrétion pulsatile se manifeste par une diminution de la fréquence et de l'amplitude des pulses. La diminution de l'activité électrique spontanée des neurones à GnRH peut expliquer la diminution de la fréquence et l'arrêt de la sécrétion. Le phénomène de neurosécrétion dépend du calcium intracellulaire. En effet, la migration des vésicules de sécrétion (pool cytosolique) vers la membrane (pool membranaire) nécessite des concentrations de $[Ca^{2+}]_i$ supérieures à $10\mu M$ dans le cytoplasme. Les vésicules appontées à la membrane peuvent fusionner avec la membrane du neurone et cette fusion nécessite des concentrations locales de $[Ca^{2+}]_i$ très importantes ($>25\mu M$). On considère que de telles concentrations ne sont atteintes que dans un périmètre restreint au pore d'un ou de plusieurs canaux calciques (Matveev *et al.* 2009). Les variations de $[Ca^{2+}]_i$ que nous avons mesurées représentent celles du Ca^{2+} libéré par les stocks intracellulaires. Ces élévations transitoires et diffuses de $[Ca^{2+}]_i$ dans le cytoplasme jouent un rôle dans la mobilisation des vésicules de sécrétion vers la membrane mais pas dans le phénomène de fusion membranaire. L'arrêt de l'activité spontanée électrique et donc l'arrêt de la sécrétion, devraient aboutir à l'accumulation des vésicules de sécrétion dans le pool membranaire. Or expérimentalement, quand le blocage des jonctions gap gliales est levé, nous observons un retour de la pulsativité et une augmentation importante de l'am-

plitude moyenne des pulses de GnRH, qui pourrait être due à cette augmentation du pool membranaire.

Rôle physiologique des cellules gliales dans la sécrétion de GnRH

Notre étude a été réalisée exclusivement *in vitro*. Les mécanismes impliqués dans la régulation de la sécrétion pulsatile de GnRH mis en évidence peuvent-ils avoir un rôle physiologique avéré chez l'animal ? Le gène codant la connexine 43 (Cx-43), la principale isoforme impliquée dans les jonctions gap des cellules gliales, est régulé directement par l'oestradiol. Son promoteur comporte un élément de réponse aux œstrogènes (Yu *et al.* 1994). Des souris femelles hétérozygotes portant l'inactivation de Cx-43 sur un allèle (Cx43+/-) sont infertiles et présentent des cycles anormaux (Gulinello *et al.* 2005). L'expression de Cx-43 et la formation de jonctions gap ou d'hémi-canaux est régulée par des signaux métaboliques environnementaux comme le glucose, les dérivés de l'acide arachidonique (Contreras *et al.* 2002 ; Allard *et al.* 2013,). Ces données permettent de penser que le réseau glial du microenvironnement des neurones à GnRH pourrait jouer un rôle dans l'adaptation rapide de leur réseau aux signaux métaboliques.

En conclusion, les cellules gliales sont capables de réguler *in vitro* l'activité du réseau de neurones à GnRH et la sécrétion pulsatile. Un des mécanismes impliqués repose sur la communication entre les cellules gliales par des jonctions gap. Cette communication au sein du réseau glial joue un rôle important dans la plasticité et est potentiellement régulée par différents facteurs métaboliques. Les cellules gliales associées aux neurones à GnRH représentent donc un élément intégrateur des signaux environnementaux en complément des autres systèmes neuroendocriniens connus.

REMERCIEMENTS

Tous ces travaux n'existeraient pas sans la participation des étudiants de master et de doctorat. Je remercie tout particulièrement Elodie Desroziers, Sarah Geller. Un remerciement tout particulier à Alain Caraty pour son aide inestimable pour la réalisation des dosages de GnRH et son expertise sur les anticorps. Enfin, un remerciement tout spécial à Monique Ottogalli pour son aide technique, ses soins apportés aux cultures cellulaires, son implication dans les nombreux dosages.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham WC, Logan B, Greenwood JM, Dragunow M. Induction and experience-dependent consolidation of stable long-term potentiation lasting months in the hippocampus. *J Neurosci.* 2002; 22: 9626–34.
- Allard C, Carneiro L, Grall S, Cline BH, Fioramonti X, Chrétien C et al. Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J Cerebral Blood Flow Metab.* 2013; doi:10.1038/jcbfm. 2013–206.
- Andersen P & Soleng AF Long-term potentiation and spatial training are both associated with the generation of new excitatory synapses. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 ; 26(2-3): 353–9.
- Andersen P, Moser E, Moser MB, Trommald M. Cellular correlates to spatial learning in the rat hippocampus. *J Physiol. (Paris)* 1996: 90(5-6): 349.
- Ben Achour S & Pascual O. Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochem Res.* 2012; 37(11); 2464–73.
- Bliss TVP & Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of an anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol. (London)* 1973; 232: 331–56.
- Bliss TVP & Gardner-Medwin AR. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol. (London)* 1973; 232: 357–74.
- Chappell PE, White RS, Mellon PL. Circadian Gene Expression Regulates Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Secretory Patterns in the Hypothalamic

- GnRH-Secreting GT1-7 Cell Line. *J Neurosci.* 2003; 23(35): 11202-13.
- Clasadonte J, Poulain P, Hanchate N K, Corfas G, Ojeda SR, Prevot, V. Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *PNAS* 2011 ; 108(38): 16104-9.
 - Constantin S, Caraty A, Wray S, Duittoz, AH. Development of gonadotropin-releasing hormone-1 secretion in mouse nasal explants. *Endocrinol.* 2009; 150(7): 3221-7.
 - Contreras JE, Sánchez HA, Eugenin EA, Speidel D, Theis M, Willecke K, *et al.* Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture. *PNAS* 2002 ; 99(1): 495-500.
 - Cooke SF & Bliss TVP. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006 ; 129(7) : 1659-73.
 - Duittoz AH & Batailler M. Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *J Reprod Fert.* 2000 ; 120(2) : 391-6.
 - Dziedzic B, Prevot V, Lomniczi A, Jung H, Cornea A, Ojeda SR. Neuron-to-glia signaling mediated by excitatory amino acid receptors regulates ErbB receptor function in astroglial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci.* 2003; 23(3): 915-26.
 - Figie, M, Allritz C, Lehmann C, Engele J. Gap junctional control of glial glutamate transporter expression. *Mol Cell Neurosci.* 2007; 35(1): 130-7.
 - Funabashi T, Daikoku S, Shinohara K, Kimura F. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion is an inherent function of GnRH neurons, as revealed by the culture of medial olfactory placode obtained from embryonic rats. *Neuroendocrinol.* 2000; 71(2): 138-144.
 - Geller S, Kolasa E, Tillet Y, Duittoz A, Vaudin P. Olfactory ensheathing cells form the microenvironment of migrating GnRH-1 neurons during mouse development. *Glia* 2013; 61(4): 550-66.
 - Gies U & Theodosis DT. Synaptic plasticity in the rat supraoptic nucleus during lactation involves GABA innervation and oxytocin neurons: a quantitative immunocytochemical analysis. *J Neurosci.* 1994 ; 14(5): 2861-9.
 - Gulinello M & Etgen A M. Sexually dimorphic hormonal regulation of the gap junction protein, CX43, in rats and altered female reproductive function in CX43[±] mice. *Brain Res.* 2005 ; 1045(1-2): 107-15.
 - Han Y, Yu H-X, Sun M-L, Wang Y, Xi W, Yu Y-Q.. Astrocyte-restricted disruption of connexin-43 impairs neuronal plasticity in mouse barrel cortex. *Eur J Neurosci.* 2013; doi:10.1111/ejn.12394
 - Hrabovszky E, Turi GF, Kallo I, Liposits Z.. Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotropin-releasing hormone neurons of the adult male rat. *Endocrino.* 2004; 145: 4018-21.
 - Liposits Z, Merchenthaler I, Wetsel WC, Reid JJ, Mellon PL, Weiner RI, Negro-Vilar A. Morphological characterization of immortalized hypothalamic neurons synthesizing luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinol.* 1991; 129(3): 1575-83.
 - Matveev V, Bertram R, Sherman A. Ca²⁺ current versus Ca²⁺ channel cooperativity of exocytosis. *J Neurosci.* 2009; 29(39): 12196-209.
 - Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, Webster LC, Watabe AM, Makhinson M, *et al.* Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature* 1998; 396: 433-9.
 - Okamura H, Tsukamura H, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Maeda K. Kisspeptin and GnRH pulse generation. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 784:297-323.
 - Prevot V. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol.* 2002; 14(3): 247-55.
 - Prévot V, Croix D, Bouret S, Dutoit S, Tramu G, Stefano GB, Beauvillain J-C. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neurosci.* 1999; 94(3): 809-19.
 - Prevot V, Cornea A, Mungenast A, Smiley G, Ojeda SR. Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J Neurosci.* 2003a; 23(33): 10622-32.
 - Prévot V, Rio C, Cho GJ, Lomniczi A, Heger S, Neville CM *et al.* Normal female sexual development requires neuregulin-erbB receptor signaling in hypothalamic astrocytes. *J Neurosci.* 2003b; 23(1): 230-9.
 - Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* 2008; 322(5907): 1551-5.
 - Sharif A, Baroncini M, Prévot V. Role of glia in the regulation of gonadotropin-releasing hormone neuronal activity and secretion. *Neuroendocrinol.* 2013; 98(1): 1-15.
 - Terasawa E, Keen KL, Mogi K, Claude P. Pulsatile release of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in cultured LHRH neurons derived from the embryonic olfactory placode of the rhesus monkey. *Endocrinol.* 1999; 140: 1432-41.
 - Theodosis DT & Poulain DA. Evidence for structural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus in relation to gestation and lactation. *Neurosci.* 1984 ; 11(1): 183-93.
 - Theodosis DT, Chapman DB, Montagnese C, Poulain DA, Morris JE. Structural plasticity in the hypothalamic supraoptic nucleus at lactation affects oxytocin-, but not vasopressin-secreting neurones. *Neurosci.* 1986; 17(3): 661-78.
 - Trommald M, Hulleberg G, Andersen P. Long-term potentiation is associated with new excitatory spine synapses on rat dentate granule cells. *Learning & Memory* 1996 ; 3(2-3): 218-28.
 - Viguie C, Jansen HT, Glass JD, Watanabe M, Billings HJ, Coolen L *et al.* Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinol.* 2001; 142(3): 1317-24.
 - Yu W, Dahl G, Werner R. The connexin 43 gene is responsive to oestrogen. *Proc Biol Sci.* 1994; 255(1343): 125-32.