

Neuropharmacologie

M. Jacques GLOWINSKI, professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'analyse des propriétés des récepteurs pré- et post-synaptiques dopaminergiques (DA). Ce sujet avait déjà été partiellement abordé dans les cours précédents. En effet, nous avons successivement examiné le rôle des autorécepteurs DA localisés sur les corps cellulaires dans le contrôle de l'activité des neurones DA nigro-striataux et celui des récepteurs présynaptiques DA dans la régulation de la biosynthèse de la DA.

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les premières observations biochimiques de Carlsson et de ses collaborateurs en 1963, et les données comportementales de Von Rossum et de ses collègues en 1966 ont été déterminantes puisqu'elles ont suggéré que les neuroleptiques exercent leurs effets pharmacologiques par un blocage des récepteurs DA. Depuis, ce domaine de recherche a fait l'objet de multiples travaux et suscité de nombreuses controverses. Celles-ci concernent essentiellement l'existence ou non de plusieurs classes de récepteurs ayant des caractéristiques pharmacologiques distinctes. De fait, des données complémentaires en faveur d'une multiplicité de récepteurs DA ont été obtenues par des approches électrophysiologiques, biochimiques et comportementales sans oublier les études cliniques qui revêtent un intérêt tout particulier. En effet le champ d'application des substances agonistes et antagonistes DA est très vaste puisqu'il s'étend à la neurologie (maladie de Parkinson, dyskinésies), la psychiatrie (schizophrénie), aux troubles endocriniens (hyperprolactinémie, acromégalie) et au système cardio-vasculaire (états de choc et hypertension).

Retracer brièvement les étapes importantes de l'évolution de ces travaux et dégager au sein d'une littérature prolifique les axes de recherche les plus féconds et les plus significatifs était une nécessité. Il nous a paru également opportun de définir les avantages et les limites des approches utilisées.

Dans ce contexte, nous avons insisté sur la validité des études biochimiques et électrophysiologiques et sur les difficultés d'interprétation des données comportementales. La diversité des modèles expérimentaux choisis par les différents auteurs a été soulignée notamment dans le cas des études biochimiques principalement abordées dans ce cours.

II. MULTIPLICITÉ DES RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES CENTRAUX ET PÉRIPHÉRIQUES

Selon la plupart des auteurs deux types au moins de récepteurs DA existent dans le SNC, les récepteurs de type D_1 couplés positivement à l'adénylate cyclase et les récepteurs de type D_2 associés, ou non, négativement à l'enzyme. Il était donc nécessaire de rappeler les données récentes sur les mécanismes de couplage des récepteurs stimulant ou inhibant l'activité de l'adénylate cyclase et sur le rôle de l'AMP cyclique dans les processus de phosphorylation de diverses protéines neuronales solubles ou membranaires.

C'est en s'inspirant des travaux récents sur le récepteur noradrénergique β que les mécanismes intervenant dans l'activation de l'adénylate cyclase ont été le mieux décrits. Le rôle de navette du complexe protéique membranaire activé par le GTP qui assure, en présence de magnésium, le transfert du signal à l'unité catalytique de l'enzyme a été souligné. Nous avons également précisé comment ce complexe membranaire régulateur se dissocie en deux sous-unités α_s et β lors de la stimulation du récepteur par l'agoniste, et comment l'unité α_s fixe le GTP en présence de magnésium et se lie de façon réversible à l'unité catalytique C. Les mécanismes par lesquels l'adénylate cyclase peut être activée par la toxine cholérique (action sur l'unité α_s) et la forskoline (action sur l'unité catalytique C) ont été également discutés. Par ailleurs, l'intervention d'un complexe $\alpha_1\beta$ (α_1 distinct de α_s) dans l'action d'un agoniste sur un récepteur inhibiteur a été abordée en montrant que l'inhibition de l'activité adénylate cyclase résulte de la réassociation de la sous-unité β , provenant de la dissociation du complexe $\alpha_1\beta$, avec la sous-unité α_s et donc d'un freinage de l'activation, le complexe $\alpha_s\beta$ étant inactif. Les rôles du GTP, du magnésium et l'action spécifique de la toxine de Bordetella Pertussis dans le mécanisme de couplage des récepteurs inhibant l'enzyme ont également été décrits de façon détaillée.

II.1. Récepteurs D_1 et D_2 couplés à l'adénylate cyclase

Kebabian et ses collaborateurs ont joué un rôle déterminant dans ces recherches en identifiant entre 1970 et 1972 des récepteurs DA couplés positivement à l'adénylate cyclase (récepteurs D_1) dans le ganglion cervical, la rétine et le striatum. L'activation de l'enzyme nécessite la présence de

GTP. L'affinité des agonistes DA pour ces récepteurs est voisine de la μM , l'apomorphine est un agoniste partiel et les dérivés de l'ergot (bromocryptine, lisuride) exercent des effets antagonistes. Cette dernière observation fut l'un des arguments utilisés pour exclure l'intervention des récepteurs D_1 dans les réponses comportementales induites par les agonistes, les dérivés de l'ergot étant actifs à faible dose et certains d'entre eux (bromocryptine) étant utilisés en clinique dans le traitement de la maladie de Parkinson. Par ailleurs, les neuroleptiques de la famille du thioxanthène et des phénothiazines antagonisent l'effet de la DA sur l'activité de l'adénylate cyclase avec une affinité voisine de la nM. Dans l'ensemble, les butyrophénones sont moins actives (affinité μM) bien que ces substances soient très efficaces en clinique ou pour bloquer les stéréotypies induites chez le rat par l'apomorphine. Ces considérations ont permis d'envisager l'existence d'une seconde classe de récepteurs, les récepteurs D_2 .

Au niveau du striatum, les récepteurs D_1 se trouvent localisés sur des neurones très vraisemblablement GABAergiques puisque ces récepteurs D_1 sont retrouvés au niveau de la substance noire sur des afférences GABAergiques d'origine striatale. Par ailleurs, les récepteurs D_1 peuvent être également mis en évidence sur des neurones embryonnaires du striatum en culture primaire.

Ne contenant que des récepteurs de type D_2 , l'hypophyse est un matériel de choix pour étudier les propriétés de ces récepteurs. Localisés sur des cellules des lobes antérieur et intermédiaire, ils interviennent respectivement dans le contrôle de la libération de la prolactine et de l' α -MSH. Ces récepteurs D_2 ont une affinité voisine de la nM pour les agonistes et les antagonistes. Les dérivés de l'ergot sont nettement plus efficaces que la DA ou l'apomorphine. Parmi les diverses classes de neuroleptiques, les butyrophénones sont très actives, et les benzamides substituées, notamment le S-sulpiride, s'avèrent être des antagonistes spécifiques. C'est en 1979, en utilisant des cellules dispersées du lobe intermédiaire de l'hypophyse que Keabian et ses collègues ont montré que les récepteurs D_2 sont couplés négativement à l'adénylate cyclase. La DA et les agonistes DA inhibent l'augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase et la libération de α -MSH induite par la stimulation des récepteurs β adrénergiques (Isoprotérénol) et ces effets sont bloqués sélectivement par des antagonistes DA de type D_2 . De la même façon, les agonistes DA inhibent l'activation de l'adénylate cyclase et la sécrétion de prolactine induites par le VIP dans le lobe antérieur de l'hypophyse.

II.2. *Caractérisation des récepteurs DA (D_1 , D_2 , D_4) à l'aide de ligands radioactifs*

Les premières études sur les récepteurs DA effectuées à l'aide de ligands radioactifs, débutèrent en 1975. Le premier ligand fut l'halopéridol tritié,

depuis plus d'une trentaine de ligands ont été utilisés par divers groupes. Les équipes de Creese, Schwartz et Seeman se sont particulièrement illustrées dans ces travaux. Les données obtenues au niveau de l'hypophyse concernant la caractérisation des récepteurs D_2 sont homogènes, par contre celles acquises au niveau du striatum ont suscité plusieurs controverses. Toutefois les travaux des équipes de Creese et Schwartz, particulièrement discutés dans ce cours, ont apporté une certaine clarification pendant ces dernières années.

Hypophyse : Des antagonistes (^3H -spiroperidol, ^3H -domperidone) et des agonistes (^3H -DA, ^3H -apomorphine et ^3H -n-propyl norapomorphine) ont été utilisés pour caractériser les sites de reconnaissance des récepteurs D_2 sur des préparations membranaires de l'hypophyse (lobe antérieur). Les courbes de déplacement des ^3H -antagonistes par des agonistes (DA, apomorphine) révèlent l'existence de deux sites ayant respectivement une haute ($\simeq \text{nM}$) et une basse ($\simeq \mu\text{M}$) affinité pour les agonistes. En accord avec les données obtenues sur les propriétés des récepteurs couplés à l'adénylate cyclase, seuls les sites ayant une basse affinité pour les agonistes sont mis en évidence en présence de GTP (ou d'analogues du GTP) ; ce sont d'ailleurs les seuls qui peuvent être détectés sur des cellules hypophysaires intactes en culture. Les ligands tritiés agonistes ne permettent d'identifier et de caractériser que les sites D_2 à haute affinité.

Striatum : En plus des sites D_1 et D_2 , des sites D_3 et D_4 ont été caractérisés en utilisant selon les cas, des ligands tritiés agonistes ou antagonistes. Dans certaines conditions, les courbes de déplacement du ^3H -flupentixol (un neuroleptique de la série du thioxanthène) par les agonistes permettent de mettre en évidence des sites à haute et basse affinité pour les agonistes. En présence de GTP, seuls les sites à basse affinité sont détectés. Ils ont une affinité μM pour les butyrophénones et les agonistes, l'efficacité relative de ces substances étant voisine de celle observée en mesurant leurs effets sur l'activité de l'adénylate cyclase (récepteurs D_1). Les courbes de déplacement du ^3H -spiroperidol (qui présente l'inconvénient de marquer également les sites sérotoninergiques, 5-HT_2) et du ^3H -dompéridone par les agonistes (en absence et présence de GTP) ont permis de caractériser des sites à haute et basse affinité pour les récepteurs D_2 qui ont des propriétés identiques à celles décelées dans l'hypophyse. Comme dans le cas des sites D_1 , les sites D_2 se trouvent localisés sur des neurones intrinsèques du striatum. Certains d'entre eux pourraient également correspondre aux sites de reconnaissance des récepteurs présynaptiques DA car la liaison des ^3H -antagonistes observée au niveau de la substance noire diminue après destruction des neurones DA nigro-striataux. Toutefois, ceci doit être confirmé. Le ^3H -spiroperidol et le ^3H -domperidone permettent également de caractériser des sites D_4 qui se distinguent des sites D_2 par leur localisation, leur affinité pour les agonistes et leur sensibilité vis-à-vis du GTP. En effet, ces sites sont distribués sur les fibres afférentes des neurones cortico-striataux,

ils ont une faible affinité pour la DA et l'apomorphine (μM) et leur nombre ne diminue pas en présence de GTP. Dans une certaine mesure, mise à part leur localisation, ces sites pourraient être confondus avec les sites à basse affinité des récepteurs D_2 . Toutefois, J.C. Schwartz et ses collaborateurs ont obtenu toute une série de données complémentaires biochimiques et comportementales suggérant que ces sites représentent effectivement une nouvelle classe de récepteurs dopaminergiques. Ainsi, ils peuvent être dissociés des sites D_2 par leur affinité relativement plus grande pour le S-sulpiride et certaines autres benzamides substituées. Parmi celles-ci le DO-710 tritié s'est révélé être un excellent ligand permettant de caractériser les sites D_4 . Dans le bulbe olfactif, la liaison observée a pour l'essentiel toutes les caractéristiques du site D_4 identifié dans le striatum.

Les agonistes ^3H -DA et ^3H -apomorphine permettent de caractériser dans le striatum les sites D_2 ayant une haute affinité pour les neuroleptiques et des sites D_3 qui ont la particularité d'avoir une faible affinité (μM) pour les butyrophénones ou le S-sulpiride. Le nombre de ces sites (D_3) diminuant après une lésion des neurones DA nigro-striataux, certains auteurs en ont conclu qu'ils correspondaient aux récepteurs présynaptiques localisés sur les fibres DA. Toutefois, ceci ne semble pas être le cas puisqu'une diminution du nombre de ces sites apparaît également chez des animaux prétraités avec de la réserpine et que ces sites D_3 réapparaissent lorsque les membranes striatales des animaux lésés ou traités avec de la réserpine sont préparées en présence de DA. Il semble donc que la présence de DA soit nécessaire pour déceler des sites ayant une faible affinité pour les butyrophénones (ou le S-sulpiride). Selon Creese et ses collaborateurs, ces sites D_3 seraient en grande partie localisés sur des neurones intrinsèques du striatum et représenteraient la conformation à haute affinité des récepteurs D_1 . En effet, une excellente corrélation apparaît lorsque l'on compare les effets inhibiteurs de diverses classes de neuroleptiques sur la liaison correspondant au site D_3 du ^3H -flupentixol et des agonistes tritiés. Si cette conclusion s'avérait exacte, les sites reconnus dans le striatum par les ^3H -agonistes ou les ^3H -antagonistes se réduiraient aux sites à haute et basse affinité des récepteurs D_1 et D_2 et aux sites D_4 . Ajoutons enfin que l'étude des effets de diverses lésions (neurones DA, neurones du striatum, fibres cortico-striatales afférentes) a largement contribué à la clarification des données concernant la multiplicité des récepteurs DA identifiés dans le striatum. Toutefois, il ne faut pas sous-estimer les limites de ces expériences (développement d'une supersensibilité de certains récepteurs, dégénérescence trans-synaptique, etc.).

II.3. Récepteurs périphériques DA_1 et DA_2

— La stimulation des récepteurs DA_1 provoque la relaxation des muscles lisses des artères. Les propriétés pharmacologiques de ces récepteurs ont été étudiées sur différentes préparations *in vitro*. Toutefois, Goldberg et ses

collaborateurs, à qui l'on doit les études les plus substantielles sur ces récepteurs périphériques de type DA_1 , ont mesuré *in vivo* chez le chien les modifications de la vascularisation rénale provoquées par divers agonistes DA après avoir bloqué les récepteurs α_1 adrénergiques. De nombreuses études structure-activité ont été effectuées. Les récepteurs DA_1 qui sont couplés positivement à l'adénylate cyclase ont des propriétés très voisines des récepteurs D_1 centraux, la différence majeure est que le R-sulpiride peu actif sur les récepteurs D_1 , est un antagoniste très efficace des récepteurs DA_1 . Signalons également que le métoclopramide et la bulbocapnine sont de bons antagonistes des récepteurs DA_1 . Des récepteurs DA_1 ont pu être mis en évidence dans le tractus gastro-intestinal, dans le pancreas et les glandes submaxillaires. Des études complémentaires sont nécessaires pour vérifier si leurs propriétés pharmacologiques sont exactement similaires à celles déterminées au niveau du rein.

— Les récepteurs DA_2 , particulièrement étudiés par Langer, sont localisés sur les fibres noradrénergiques postganglionnaires. La stimulation de ces récepteurs présynaptiques bloque la libération de noradrénaline évoquée par la stimulation électrique des fibres noradrénergiques. En dehors de la mesure de la libération de noradrénaline, les modifications des réponses évoquées au niveau des organes cibles (le cœur par exemple) lors de la stimulation des neurones noradrénergiques sont également utilisées pour apprécier les effets des agonistes et antagonistes DA sur les récepteurs DA_2 . En résumé, les données obtenues indiquent que les propriétés pharmacologiques des récepteurs DA_2 sont voisines de celles des récepteurs D_2 centraux.

III. AGONISTES ET ANTAGONISTES DES RÉCEPTEURS D_1 ET D_2

Quelques données relatives à la structure et à la spécificité de divers agonistes D_1 (SKF 38393, SKF 82526, dihydroxynomifensine) et D_2 (RU 24926, RU 24213, N 0434, N 0437, LY 141865) ont été discutées. En ce qui concerne les antagonistes, nous avons brièvement rappelé les propriétés des antagonistes D_2 les plus couramment utilisés (S-sulpiride, domperidone) et insisté sur celles de l'antagoniste D_1 , le dérivé SCH 23390 récemment découvert. L'énantiomère de configuration R confère la sélectivité de l'action antagoniste du SCH 23390 qui est l'analogue 3-méthyl, 7 chloro de l'agoniste SKF 38393 vis-à-vis des récepteurs D_1 et DA_1 . Il s'agit d'une substance dont l'action est assez spécifique n'ayant pas (ou peu) d'effet sur les récepteurs sérotoninergiques ou α_1 -noradrénergiques. Le 3H -SCH 23390 est un excellent ligand des récepteurs D_1 beaucoup plus spécifique que le 3H -cis-(2)-flupentixol ou que le 3H -cis-(2)-piflutixol, ligands qui reconnaissent également les récepteurs D_2 . De plus, sa liaison non spécifique est très faible. Enfin, les effets comportementaux de cet antagoniste D_1 , qui n'augmente pas la se-

création de prolactine ou la vitesse de renouvellement de la DA, ont été décrits de façon détaillée. Cette substance bloque sélectivement le comportement d'évitement chez le rat et le singe, la toxicité de groupe induite chez la souris par métamphétamine, l'hypermotilité induite par l'amphétamine et l'apomorphine. Par contre, elle est sans effet sur l'hypothermie (souris) ou les vomissements (chien) provoqués par l'apomorphine et est dénuée d'action anticholinergique.

IV. ÉTUDES FONCTIONNELLES SUR LES RÉCEPTEURS D_1

IV.1. *Contrôle de la libération de l'hormone parathyroïdienne*

Les cellules dispersées de la glande parathyroïde de bœuf offrent un matériel de choix pour l'étude du rôle fonctionnel des récepteurs DA_1 dans le contrôle de la libération de l'hormone parathyroïdienne. En étudiant l'action de la DA ou de l'isoproterenol, une relation a pu être établie entre la stimulation de la libération de l'hormone et l'activation de la protéine kinase (II) dépendante de l'AMP cyclique. La vitesse d'activation (autophosphorylation) et de désactivation de cette protéine kinase est compatible avec l'intervention d'une phosphorylation d'une protéine substrat, non encore identifiée, jouant un rôle déterminant dans la libération de l'hormone.

La libération de l'hormone évoquée par la DA semble indépendante des modifications intracellulaires de la concentration de calcium. En effet, la glande parathyroïde se distingue de la plupart des tissus sécréteurs par le fait que le calcium utilisé à une concentration (1.5-2mM) favorisant la libération des autres hormones ou médiateurs inhibe celle de l'hormone parathyroïdienne. Inversement, à faible concentration (0.5 mM) la libération de cette hormone est augmentée alors que cette concentration de calcium est inefficace dans les autres systèmes. Quelle que soit la concentration de calcium utilisée, aucune modification de l'activité de la protéine kinase AMP cyclique-dépendante ne peut être décelée dans les cellules sécrétrices de la glande parathyroïde. La DA ou le dibutyl AMP cyclique ne semble pas modifier les taux intracellulaires de calcium libre, alors que le niveau de libération de l'hormone parathyroïdienne est inversement relié aux variations cytosoliques des concentrations de calcium. Bien que le mécanisme responsable de l'effet inhibiteur du calcium sur la libération de l'hormone ne soit pas encore élucidé, certaines données récentes suggèrent que la libération de l'hormone nouvellement synthétisée serait sous le contrôle du calcium alors que la DA ou l'isoproterenol favoriseraient la libération d'une forme distincte de l'hormone (préalablement accumulée dans les tissus).

IV.2. *Rôle des récepteurs D₁ dans la rétine*

Après un bref rappel de l'organisation générale de la rétine, nous avons insisté sur les caractéristiques des cellules amacrines DA (10 % de la population totale des cellules amacrines) et sur celles des cellules interplexiformes DA présentes chez certains poissons et vraisemblablement chez la tortue. Ces cellules sont activées sous l'action de la lumière, inversement la libération de DA est inhibée dans l'obscurité. La DA libérée agit donc sur des récepteurs D₁ localisés de façon prédominante dans les couches plexiformes internes et externes (chez certaines espèces). Une hypersensibilité des récepteurs D₁ a pu être mise en évidence lorsque la rétine est soumise pendant une longue période à l'obscurité. Si la DA exerce en général un rôle inhibiteur dans la rétine, un examen plus détaillé de l'effet de la DA sur les divers types de cellules ganglionnaires (ON, OFF, ON-OFF), sur une population des cellules amacrines, sur les cellules bipolaires et les cellules horizontales a permis de décrire diverses modalités d'action de la DA résultant de son interaction avec les récepteurs D₁.

Par exemple, des études récentes effectuées sur des cultures de cellules rétinienne disposées sur des moyblastes ont permis de déterminer l'influence de la DA sur les cellules amacrines cholinergiques. Dans ces conditions, appliquée seule, la DA diminue la libération spontanée de l'ACh, par contre elle amplifie, et de façon prolongée, la dépolarisation des cellules amacrines induite par l'acide glutamique. En d'autres termes, elle augmente l'excitabilité des cellules. Les études effectuées par Gerschenfeld et ses collaborateurs, puis par d'autres auteurs, au niveau des cellules horizontales couplées par des jonctions électrotoniques ont également été décrites en détail. En effet, la DA, par son action sur les récepteurs D₁, diminue le champ récepteur des cellules horizontales, réduit la conductance des « gap » jonctions (ces effets étant toujours observés en présence de cobalt) et diminue considérablement la diffusion du colorant « lucifer yellow » injecté dans une cellule horizontale vers les cellules horizontales avoisinantes couplées par des jonctions électrotoniques. Ce mécanisme de contrôle des propriétés d'une jonction électrotonique par une synapse chimique, qui n'a pu être mis en évidence qu'en de rares occasions, est particulièrement intéressant. D'une certaine façon, il peut être comparé à celui observé dans des études effectuées par Grâce et Bunney. Ces auteurs ont en effet pu montrer l'existence d'un couplage électrotonique entre certaines cellules dopaminergiques nigrales (groupes de 2 à 3 cellules). Ces synapses électriques semblent être contrôlées par des synapses chimiques DA, la DA libérée à partir des dendrites proximales agissant sur les autorécepteurs DA.

D'une manière plus générale, l'étude du rôle des cellules amacrines DA dans le transfert des informations au niveau de la rétine nous a permis par analogie de préciser les fonctions des neurones DA nigro-striataux dans la

régulation du transfert des messages transitant par la boucle polysynaptique-cortex-noyau caudé-substance noire-thalamus.

IV.3. Récepteurs DA_1 au niveau du ganglion cervical supérieur

Les cellules SIF sont des cellules paracrines qui établissent ou non des contacts synaptiques avec les neurones postganglionnaires sympathiques. Elles sont innervées par les fibres préganglionnaires cholinergiques, les récepteurs impliqués étant du type muscarinique. Dans la plupart des espèces, les cellules SIF sont dopaminergiques, toutefois, chez le cobaye, elles contiennent de la noradrénaline ou de l'adrénaline. La DA exerce deux types d'effet au niveau des fibres postganglionnaires noradrénergiques et un effet présynaptique sur les fibres afférentes cholinergiques. Au niveau des neurones noradrénergiques, la DA, par l'intermédiaire des récepteurs DA_1 couplés positivement à l'adénylate cyclase amplifie la réponse excitatrice lente (S-EPSP) provoquée par l'ACh et médiée par les récepteurs muscariniques (second messenger GMP cyclique). Cette effet de longue durée, reproduit par des analogues de l'AMP cyclique et potentialisé par un inhibiteur des phosphodiesterases, est dans certaines conditions bloqué par une élévation des concentrations intracellulaires de GMP cyclique. La DA agit également sur des récepteurs α -adrénergiques localisés sur les neurones postganglionnaires, l'effet produit étant une inhibition de longue durée (S-IPSP). L'action présynaptique de la DA se traduit par une inhibition de la libération de l'ACh, elle est antagonisée par le R-sulpiride, les récepteurs impliqués étant de type DA_1 .

Les mécanismes moléculaires de l'action de la DA au niveau présynaptique ont été particulièrement étudiés par Greengard et ses collaborateurs chez le bœuf (expériences *in vitro*) ou le lapin (expériences *in vivo* et *in vitro*). Ces auteurs ont montré que la DA (ou l'analogue de l'AMP cyclique : 8-bromo-AMP cyclique) provoquait, par l'intermédiaire d'une protéine kinase AMP cyclique-dépendante, une phosphorylation de la sous unité de la protéine I (collagénase insensible) encore appelée synapsine I. Cette protéine associée à la membrane des vésicules synaptiques de petite taille (et non à celles de grande taille riches en peptides) intervient dans le contrôle du mécanisme d'exocytose. Présente dans toutes les terminaisons, elle est phosphorylée *in vitro* ou *in vivo* lors de la dépolarisation calcium-dépendante induite par les ions potassium, la vératridine ou la stimulation électrique des fibres préganglionnaires. Médiée par une protéine kinase calcium-calmoduline dépendante, cette phosphorylation intervient sur les deux sous-unités de la synapsine I, les unités collagénase sensible et insensible. Les effets de la DA et des ions potassium ne sont pas additifs, la majeure partie de la protéine I présente sous une forme déphosphorylée, étant phosphorylée lors de l'application de DA ou des agents dépolarisants. L'effet de la DA semble spécifique, il ne peut être reproduit par la 5-HT ou l'adénosine,

médiateurs qui induisent une phosphorylation de la synapsine I au niveau du ganglion moteur facial. Diverses expériences, incluant l'étude des effets de la dénervation préganglionnaire, de la stimulation antidromique des fibres postganglionnaires ou des substances pharmacologiques bloquant la transmission ganglionnaire ont montré que la synapsine I phosphorylée sous l'action de la DA ou par des agents dépolarisants avait une localisation présynaptique. La synapsine I contenue dans les éléments postsynaptiques (40 %), sensible à l'action du cycloheximide, n'est pas phosphorylée : elle correspond à la forme néosynthétisée de la protéine migrant vers les terminaisons nerveuses.

IV.4. *Propriétés de la DARPP.32*

En présence de l'AMP cyclique, différentes protéines neuronales sont phosphorylées. Si certaines de ces protéines sont retrouvées dans toutes les structures cérébrales, d'autres ont une distribution hétérogène. C'est ainsi que Greengard et ses collaborateurs se sont intéressés à une protéine qui est phosphorylée en présence de DA. Cette protéine dont le poids moléculaire est de 32 500 daltons a la particularité, comme la synapsine I, d'être extraite en milieu acide. Les quantités absolues de cette protéine peuvent être déterminées après extraction, séparation par électrophorèse et phosphorylation en présence d'une protéine kinase AMP cyclique-dépendante, d'ATP et de magnésium. C'est ainsi que la DARPP.32 a été retrouvée dans diverses régions du cerveau riches en DA ou contenant des corps cellulaires DA.

Plus précisément, un certain parallélisme existe entre la distribution de la DARPP.32 et celle des récepteurs D_1 , cette protéine étant présente dans les corps cellulaires, les fibres ou les terminaisons des neurones dopaminocéptifs. La plus forte concentration de DARPP.32 se trouve dans la substance noire, la protéine étant localisée dans les terminaisons des neurones striato-nigraux. Ceci a pu être montré en étudiant les effets de lésions provoquant la dégénérescence de ces neurones. La phosphorylation de la DARPP.32 est spécifique, d'autres médiateurs tels que la noradrénaline ou la 5-HT n'ont aucune action et la phosphorylation induite par la DA peut être antagonisée par des bloqueurs des récepteurs D_1 . La DARPP.32 a été purifiée et des anticorps obtenus. Ceci a permis une étude immunohistochimique plus précise de sa distribution. C'est ainsi que les zones corticales riches en DA contiennent des neurones présentant de la DARPP.32 localisée au sein des corps cellulaires et des dendrites. Toutefois, la DARPP.32 est également retrouvée en moindre abondance dans d'autres aires corticales faiblement innervées par des fibres dopaminergiques. De plus, dans certaines structures (noyaux de l'habenula, noyau arqué, éminence médiane), la DARPP.32 semble être également localisée dans certaines cellules gliales.

L'une des particularités de la DARPP.32 est son analogie de structure avec l'inhibiteur de la protéine phosphatase 1. De fait, la séquence des

acides aminés autour du site de phosphorylation (thréonine) est identique suggérant que la DARPP.32 agit comme un inhibiteur d'un certain type de phosphatase. Nous avons examiné les données indiquant que la DARPP.32 phosphorylée (après interaction de la DA avec le récepteur D_1) inhibe la protéine phosphatase 1 et n'a aucun effet sur les protéines phosphatases 2 A,B,C. Cette action peut se traduire par une amplification des effets d'autres médiateurs qui, à la suite d'une interaction avec leur(s) récepteur(s) respectif(s) induisent par des mécanismes AMP cyclique-dépendant, ou non, la phosphorylation de certaines protéines neuronales membranaires ou solubles. Ajoutons enfin que la DARPP.32 phosphorylée (forme active) est un substrat de la protéine phosphatase 2B (calcineurine) qui est présente en grande quantité dans les ganglions de la base, notamment dans les cellules riches en DARPP.32. La protéine phosphatase 2B est activée (phosphorylée) par une protéine kinase calcium-calmoduline-dépendante. On voit ainsi aisément comment les effets cellulaires de la DA médiés par les récepteurs D_1 peuvent être régulés par d'autres médiateurs dont le second messager n'est pas l'AMP cyclique.

VI. ÉTUDES FONCTIONNELLES DES RÉCEPTEURS D_2 : RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ ADÉNYLATE CYCLASE

VI.1. Lobes intermédiaire et antérieur de l'hypophyse

Comme ceci a pu être mis en évidence *in vitro* au niveau de la pars intermedia de l'hypophyse de rat, la DA et les agonistes DA inhibent l'augmentation de l'activité adénylate cyclase et la libération de α -MSH ainsi que celle de β -endorphine induites par la stimulation des récepteurs β -adrénergiques ou par le CRF. Ces effets, qui résultent d'une interaction avec des récepteurs D_2 , sont bloqués par des antagonistes de type D_2 , le S-sulpiride notamment. Par ailleurs, les concentrations tissulaires de α -MSH et de β -endorphine sont modifiées à la suite de traitements chroniques effectués avec des agonistes ou des antagonistes DA. Ces données suggèrent que ces substances sont susceptibles de modifier la biosynthèse de la pro-opiomélanocortine, le précurseur de l' α -MSH et de la β -endorphine. De fait, des travaux récents ont montré que les agonistes DA inhibent la synthèse de ce précurseur ainsi que celle du RNA messenger correspondant, alors que les antagonistes exercent un effet inverse. Ces effets qui peuvent être observés assez rapidement après administration des agonistes DA de type D_2 ou des neuroleptiques sont spécifiques car aucune modification des taux du RNA messenger de la pro-opiomélanocortine n'a pu être observée dans le lobe antérieur de l'hypophyse. Par contre dans cette structure, l'interaction des agonistes DA avec les récepteurs D_2 , conduisant à une diminution de la libération de prolactine, est également associée à une inhibition de la synthèse

de l'hormone et du RNA messenger de son précurseur. Ces effets semblent résulter initialement de l'inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase.

Il est bien établi que la DA inhibe la sécrétion de prolactine et la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase induites par le VIP au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse. Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus concernant l'effet de la DA sur l'activité de l'adénylate cyclase de base et sur les potentialités inhibitrices des dérivés de l'ergot vis-à-vis de la sécrétion de l'hormone et de l'activité de l'enzyme. Certains auteurs en ont déduit que les récepteurs mis en jeu pourraient représenter une sous-classe des récepteurs D_2 et que l'effet sur la sécrétion de l'hormone n'était pas lié à l'inhibition de l'enzyme. Dans une étude récente, Enjalbert et Bockaert ont levé cette ambiguïté en montrant l'existence d'une étroite corrélation entre l'ordre d'efficacité de divers agonistes DA de type D_2 , incluant des dérivés de l'ergot, pour inhiber, d'une part, l'activité de base de l'adénylate cyclase et, d'autre part, la libération de l'hormone.

VI.2. *Striatum*

La mise en évidence du couplage des récepteurs D_2 au système adénylate cyclase s'est révélée être relativement aisée dans l'hypophyse. Du fait de la présence des récepteurs D_1 , il n'en fut pas de même au niveau du striatum. C'est en étudiant les effets d'un agoniste sélectif D_2 (LY 141865) et d'un antagoniste D_2 , le S-sulpiride, sur l'augmentation de l'efflux de l'AMP cyclique induite par un agoniste D_1 (SKF 38393) au niveau de coupes de striatum de rat que Stoof et Kebebian ont suggéré que les récepteurs D_2 striataux étaient également couplés négativement à l'adénylate cyclase. Cette hypothèse a été confirmée en mesurant l'activité de l'adénylate cyclase sur des fractions membranaires originaires du striatum de rat adulte ou de cultures primaires de neurones striataux embryonnaires de la souris après avoir bloqué la réponse D_1 à l'aide du dérivé SCH 23390, l'antagoniste sélectif des récepteurs D_1 . Cette réponse de type D_2 (inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase) a également été montrée après avoir stimulé complètement l'activité de l'enzyme par le VIP au niveau de neurones striataux en culture primaire.

VI.3. *Réponses électrophysiologiques induites par stimulation des récepteurs D_1 et D_2 chez les invertébrés*

Après avoir décrit quelques études révélant la diversité des réponses induites par la DA (mettant en jeu des modifications des conductances sodium, potassium ou calcium voltage-dépendante), nous nous sommes particulièrement intéressés aux travaux de Stoof et collaborateurs sur les cellules sécrétrices de l'hormone de croissance de l'escargot *Lymnaea stagnalis*. En effet, ces cellules possèdent des récepteurs D_1 et D_2 . L'analyse des effets

induits par des agonistes D_1 et D_2 et de leur blocage sélectif par des antagonistes D_1 et D_2 a révélé que la stimulation des récepteurs D_1 se traduisait par une augmentation de l'excitabilité des cellules et que celle des récepteurs D_2 conduisait inversement à une hyperpolarisation.

J. G.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE
(Groupe NB, I.N.S.E.R.M. U. 114)

Plusieurs axes de recherches ont été poursuivis. Ils peuvent être brièvement résumés.

1. *INTERACTIONS CELLULAIRES LORS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES ASCENDANTS* (Responsable de l'équipe : A. PROCHIANTZ).

1.1. *Morphogenèse des neurones dopaminergiques mésencéphaliques*

C'est plus particulièrement vers l'étude des interactions neurones-cellules gliales que se sont portés les efforts récents de l'équipe. En effet, comme nous l'avons montré précédemment, selon qu'ils sont cultivés *in vitro* sur des tapis d'astrocytes issus du striatum ou du mésencéphale, les neurones dopaminergiques (DA) adoptent une morphologie bien différente : apparition d'un long neurite d'aspect axonal dans le premier cas, développement de nombreux neurites évoquant des dendrites dans le second. L'étude plus approfondie de ce type d'interaction se poursuit de différentes façons :

— Etude en microscopie électronique (en collaboration avec le laboratoire du Professeur Seité, Marseille) : la mise au point d'une méthode autoradiographique en microscopie électronique adaptée à l'étude des propriétés morphologiques des neurones DA *in vitro* (cultures primaires) a permis de montrer que les prolongements des neurones DA embryonnaires de la souris cultivés sur un tapis astrocytaire mésencéphalique présentaient les caractéristiques ultrastructurales de dendrites (M. Autillo-Touati, A. Prochiantz, B. Chamak).

— Localisation immunocytochimique des protéines associées aux microtubules (MAP 2) : les prolongements des neurones cultivés sur un tapis astrocytaire mésencéphalique présentent un marquage plus intense en faveur

de leur nature dendritique comme le montrent d'autres observations *in vivo*. De fait, l'apparition de nombreux neurites branchés de type dendritique de neurones mésencéphaliques cultivés sur un tapis astrocytaire originaire de la même structure semble être une caractéristique générale ne se limitant pas aux neurones DA (A. Rousselet, B. Chamak en collaboration avec A. Fellous).

— Caractérisation biochimique des cellules gliales mésencéphaliques et striatales : en utilisant différentes méthodes de marquage et de séparation par électrophorèse mono- ou bi-dimensionnelles, une hétérogénéité importante entre les deux populations de cellules gliales, notamment en ce qui concerne leurs glycoprotéines de surface a pu être mise en évidence chez la souris et le rat (G. Barbin, A. Rousselet).

— Etablissement et caractérisation de lignées astroblastiques d'origine mésencéphalique ou striatale : la transformation par le virus simien 40 de cellules embryonnaires mésencéphaliques ou striatales, nous a permis de générer des clones possédant des caractères biochimiques et ultrastructuraux spécifiques des lignées astrocytaires. Des analyses morphométriques des neurones DA cultivés sur divers types de cellules montrent que l'un de ces clones (F12-NC) d'origine striatale, conserve les propriétés fonctionnelles des cellules gliales homologues en culture primaire. Avec un temps de doublement de la population cellulaire de l'ordre de 12 heures, ce clone fournit rapidement les quantités de matériel compatibles avec une analyse moléculaire des interactions glio-neurales. Ces travaux ont été effectués en collaboration avec les équipes du P^r F. Gros et du D^r R. Seite (V. Moura Neto, M. Mallat, A. Prochiantz).

1.2. Greffes intracérébrales de cellules nerveuses (en collaboration avec le laboratoire du Prof. A. BJORKLUND, Lund, Suède)

L'équipe suédoise a mis au point une technique permettant l'injection intracérébrale de suspensions de cellules nerveuses embryonnaires. Le succès de ces greffes (récupération fonctionnelles chez l'animal) dépend de nombreux paramètres dont l'importance est encore mal comprise. Des résultats préliminaires ont montré qu'il était possible d'injecter avec succès des neurones DA mésencéphaliques embryonnaires de rat cultivés au préalable pendant quelques jours. Les effets de l'adjonction de cellules gliales de différentes origines sont à l'étude (A. Prochiantz, M. Mallat, G. Barbin).

1.3. Etude des isoformes de la tubuline

Précédemment, l'obtention de populations neuronales et gliales pures en culture primaire nous avait permis de préciser la répartition des isoformes de la tubuline dans ces deux types cellulaires. En collaboration avec l'équipe du D^r B. Pessac, nous avons poursuivi cette analyse en utilisant trois lignées

astrocytaires issues d'explants de cervelet postnatal, maintenus en culture. Avec ces cellules, une synthèse des isoformes β' de la famille des β tubulines, observée uniquement dans les neurones au cours de nos premières études, a pu être mise en évidence (V. Moura Neto, M. Mallat, F. Alliot, B. Pessac, A. Prochiantz).

2. IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE CERTAINES PROPRIÉTÉS DES RÉCEPTEURS CENTRAUX

2.1. Récepteurs couplés à une adénylate cyclase au niveau de cellules neuronales et gliales embryonnaires de la souris en culture primaire

(Responsable de l'équipe : J. PRÉMONT)

La caractérisation et l'étude de la localisation des récepteurs de la somatostatine et du VIP couplés à une adénylate cyclase sur des populations de cellules neuronales ou gliales en culture primaire issues du cortex cérébral, du striatum ou du mésencéphale ont été poursuivies.

— En collaborant avec A. Enjalbert et J. Epelbaum, des expériences comparatives concernant les caractéristiques de liaison de divers agonistes de la somatostatine et de leur effet inhibiteur sur l'activité de l'adénylate cyclase ont été effectuées. Les résultats obtenus indiquent la présence d'un seul type de récepteur dans le SNC. La densité de ces récepteurs varie en fonction de l'origine et du type des cellules étudiées (neurones du cortex cérébral > striatum > mésencéphale > cellules gliales du striatum et du mésencéphale) (H. Chneiweiss, J. Prémont).

— Parmi les peptides de la famille du VIP, la secrétine a été particulièrement étudiée, ce peptide augmentant les concentrations intracellulaires d'AMP cyclique. Les données obtenues à la suite d'expériences effectuées sur les cultures primaires (neurones) et sur une lignée de cellules transformées (neuroblastome-gliome, NG 108-15) indiquent que ces deux peptides (VIP, secrétine) agissent sur des récepteurs distincts (H. Chneiweiss, J. Prémont).

— L'étude des récepteurs des opiacés couplés à une adénylate cyclase a été entreprise. Les neurones du striatum présentent des récepteurs dont la stimulation inhibe l'activité de l'enzyme membranaire. La caractérisation de ces récepteurs et la comparaison de leurs propriétés avec celles des récepteurs de type δ présents dans le striatum de l'animal adulte sont en cours. A cet effet, des agonistes spécifiques (récepteurs μ et δ) synthétisées dans le laboratoire du Professeur B. Roques sont utilisés (étude effectuée en collaboration avec C. Zazac et B. Roques).

Afin d'approfondir nos études sur les propriétés fonctionnelles des récep-

teurs des neuropeptides, les méthodes nécessaires à la mise en évidence de la phosphorylation de certaines protéines membranaires ou solubles ont été mises au point.

2.2. *Récepteurs des tachykinines* (Responsable de l'équipe : J.C. BEAUJOUAN)

Précédemment, en utilisant deux ligands iodés ^{125}I -Bolton-Hunter Substance P (^{125}I -BHSP) et ^{125}I -Bolton-Hunter eledoisine (^{125}I -BHE) et des préparations synaptosomales de diverses régions du cerveau de rat, nous avons mis en évidence l'existence de deux types de récepteurs des tachykinines dans le SNC. Ces deux classes de récepteurs se distinguent par leurs propriétés biochimiques et pharmacologiques. De plus, leur distribution régionale dans le cerveau est différente.

— Récemment, des études de compétition effectuées avec diverses tachykinines dont la substance K (ou NKA) et la neuroméline K (ou NKB), deux nouvelles tachykinines identifiées dans le SNC des mammifères, ont révélé que la substance P (SP) et la NKB sont respectivement les ligands endogènes des sites de liaison spécifiques de ^{125}I -BHSP et de ^{125}I -BHE. D'autre part, une étude pharmacologique plus approfondie, a mis en évidence que l'hexapeptide C terminal de la SP et que le DiMeC7 (analogue stable de la SP) ont une affinité plus grande pour le site ^{125}I -BHE alors que l'ester méthylique de la SP reconnaît plus particulièrement le site ^{125}I -BHSP (J.C. Beaujouan, Y. Torrens).

— La collaboration entreprise depuis plusieurs années avec l'équipe du P^r A. Marquet (Faculté des Sciences, Paris VI) s'est amplifiée. G. Chassaing et S. Lavieille et leurs collègues, sur la base d'études conformationnelles des tachykinines (SP notamment) réalisées par les méthodes de résonance magnétique nucléaire et de dichroïsme circulaire ont synthétisé divers analogues cycliques ou non cycliques des tachykinines. De ce fait, de nombreuses études de structure-activité ont été effectuées en déterminant particulièrement l'affinité de ces analogues des tachykinines vis-à-vis des sites reconnus par ^{125}I -BHSP et ^{125}I -BHE. Un modèle d'interaction de la SP avec son récepteur a pu être établi et certains dérivés cycliques se sont avérés particulièrement efficaces pour inhiber la liaison ^{125}I -BHSP. Ces travaux devraient déboucher sur l'obtention de molécules agonistes ou antagonistes de la SP et de la NKB (J.C. Beaujouan, Y. Torrens).

— L'étude de la distribution des sites de liaison ^{125}I -BHSP et ^{125}I -BHE dans diverses régions du cerveau et dans la moelle épinière de rat a été poursuivie par une analyse autoradiographique quantitative effectuée sur coupes. Des différences très importantes dans la localisation topographique de ces deux classes de sites ont été observées notamment dans le cortex cérébral, le septum, l'amygdale, l'hypothalamus, certains noyaux mésencéphaliques et la moelle épinière (J.C. Beaujouan, M. Saffroy, Y. Torrens).

3. RÉGULATION PRÉSYNAPTIQUES ET RÉGULATIONS BILATÉRALES DE CERTAINS SYSTÈMES NEURONAUX DES GANGLIONS DE LA BASE

3.1. Mécanismes présynaptiques impliqués dans la régulation de la libération de DA au niveau des terminaisons des neurones DA nigro-striataux chez le chat (Responsable de l'équipe : A. CHÉRAMY).

Dans des études précédentes, nous avons montré que divers noyaux thalamiques moteurs et intralaminaires sont impliqués dans des régulations bilatérales de la libération de DA au niveau des terminaisons ou des dendrites des neurones DA nigro-striataux. Diverses études sur le rôle des noyaux moteurs thalamiques (VM-VL) innervés par les neurones nigro-thalamiques GABAergiques avaient été effectuées chez le chat anesthésié avec de l'halothane. Nous avons particulièrement analysé les mécanismes mis en jeu dans l'augmentation bilatérale de la libération de DA dans les deux noyaux caudés observée à la suite de l'application unilatérale de GABA (10^{-5} M) dans les noyaux VM-VL. Les effets de diverses sections sagittales et les enregistrements unitaires de l'activité des neurones DA nous ont conduit à envisager que les modifications de libération de DA observées résultaient de la mise en jeu d'une boucle thalamo-cortico-striatale et plus précisément de régulations présynaptiques médiées par les neurones cortico-striataux glutamatergiques.

— Le rôle des neurones cortico-striataux glutamatergiques dans un contrôle présynaptique facilitateur de la libération de DA a été confirmé. En effet, l'augmentation de la libération de DA. Induite par l'application de GABA (10^{-5} M) dans les noyaux VM-VL persiste à la suite d'une section de la voie nigro-striatale DA effectuée en avant de la substance noire. De plus celle-ci est abolie après lésion du cortex péri-crucial où se trouvent localisés les neurones cortico-striataux glutamatergiques. Par ailleurs, nous avons montré que l'acide glutamique (10^{-8} M) appliqué localement dans le noyau caudé stimule la libération de DA, cet effet persistant en présence de tétrotoxine et étant antagonisé par un bloqueur des récepteurs glutamatergiques. Enfin une régulation présynaptique indirecte a été mise en évidence. En effet, à forte concentration, l'acide glutamique (10^{-4} M) inhibe la libération de DA ; cette réponse disparaît en présence de tétrotoxine et est antagonisée par la bicuculline suggérant la mise en jeu de circuits locaux et l'intervention de neurones GABAergiques (A. Chéramy, R. Romo, G. Godeheu).

— Signalons d'autre part que des études *in vitro* sur des coupes de striatum de rat, effectuées par F. Petit, ont apporté des arguments complémentaires en faveur de l'existence de récepteurs opiacés de type δ impliqués dans une régulation présynaptique de la libération de DA. De plus ce

chercheur a pu montrer que les tachykinines facilitent la libération de DA, les récepteurs mis en jeu n'étant vraisemblablement pas localisés sur les terminaisons DA.

3.2. *Analyse des propriétés des neurones nigro-thalamiques GABAergiques chez le chat.* (Responsable de l'équipe : M.J. BESSON).

— *Etude anatomique* : Des injections d'un mélange d'acides aminés ^{14}C effectuées dans la partie réticulée de la substance noire, et une analyse autoradiographique de la migration des protéines radioactives ont permis de mettre en évidence plusieurs zones de projection, une très dense dans le noyau ventralis medialis, de plus éparées dans les noyaux intralaminaires se distribuant particulièrement dans le noyau intralaminaire externe et dans la zone paralamellaire du noyau médio-dorsal. La projection sur la région paracentralis est bilatérale. Les fibres innervant le colliculus supérieur se répartissent en colonnes dans la zone intermédiaire. Des « patches » sont visibles dans le striatum, ils correspondent au transport rétrograde d'acides aminés dans les neurones éfferents striato-nigraux.

Lorsque les injections d'acides aminés ^{14}C sont effectuées dans la partie compacte de la substance noire, aucune radioactivité n'est décelée dans le thalamus et le colliculus. En revanche, une radioactivité répartie de façon assez homogène est visible dans le striatum reflétant une distribution assez uniforme des fibres DA (M. Desban, C. Gauchy, M.L. Kemel, M.J. Besson).

— *Etudes biochimiques et électrophysiologiques* : Les effets de la DA d'origine dendritique sur l'activité des neurones nigrothalamiques ont été étudiés chez le chat anesthésié avec de l'halothane en évoquant une libération locale de DA par une application d'amphétamine (10^{-6}M) dans la substance noire compacte (SNC) ou réticulée (SNR). Les changements de l'activité des neurones GABAergiques nigro-thalamiques ont été déterminés en mesurant la libération de GABA au niveau des terminaisons et l'activité des cellules nigrales (enregistrements unitaires ou multi-unitaires).

La facilitation de la libération dendritique de DA dans la SNR inhibe l'activité des cellules nigrales et réduit la libération de GABA dans le noyau VM du thalamus. Par contre dans ces conditions, une augmentation de la libération de GABA est décelée dans la zone paralamellaire des noyaux intralaminaires (IP). Ceci indique que les modifications de la transmission GABAergique dans cette zone ne reflètent pas directement celles de l'activité des cellules nigrales. Une augmentation de la libération de GABA est observée dans le VM et le IP, zone paralamellaire lorsque l'amphétamine (10^{-6}M) est appliquée dans le SNC. Dans ce cas également, les effets observés ne semblent pas devoir être attribués aux modifications de l'activité des cellules nigrales localisées dans la partie réticulée (C. Gauchy, M.L. Kemel).

3.3. *Etude de la libération in vivo de DA, de GABA et des acides glutamique et aspartique au niveau du striatum chez le rat*

(Responsable de l'équipe : M.J. BESSON)

Dans des études précédentes nous avons mis au point une méthode de superfusion locale en adaptant la technique des canules « pushpull » chez le rat. Cette nouvelle approche nous a permis de poursuivre des recherches dans trois directions.

— *Etude de la libération de $^3\text{H-DA}$ synthétisée en continu à partir de $^3\text{H-tyrosine}$.* Nous avons précédemment montré chez l'animal anesthésié avec de l'halothane que l'apomorphine (un agoniste DA) injectée à la périphérie réduisait la libération de $^3\text{H-DA}$ dans le striatum, cet effet étant antagonisé par les neuroleptiques. Curieusement, les neuroleptiques se sont avérés inefficaces pour augmenter la libération spontanée du médiateur. Ceci nous a conduit à développer, en collaboration avec J. Danguir (groupe du D^r Nicolaidis) une méthode adaptée à l'animal libre de ses mouvements. Sur cette préparation, l'apomorphine réduit la libération de $^3\text{H-DA}$ et les neuroleptiques exercent l'effet inverse. De plus, la libération spontanée du médiateur est nettement plus faible que chez l'animal anesthésié. De ce fait, il est vraisemblable que l'absence d'action des neuroleptiques chez l'animal anesthésié résulte d'une activation des neurones DA induite par l'halothane (J.A. Girault, U. Spampinato, H. Savaki, M.J. Besson).

— *Rôle de la DA dans la régulation de l'activité des neurones GABAergiques striataux.* Précédemment, en mesurant la libération de $^3\text{H-GABA}$ synthétisé à partir de $^3\text{H-glutamine}$, nous avons entrepris d'analyser le rôle des récepteurs DA de type D₁ et D₂ dans le contrôle de la libération locale de $^3\text{H-GABA}$. Cette étude effectuée chez l'animal anesthésié (halothane) a permis d'aboutir aux conclusions suivantes : les agonistes DA de type D₁ (SKF 38393, ADTN) stimulent la libération spontanée de $^3\text{H-GABA}$ alors que l'antagoniste D₁ SCH 23390 exerce l'effet inverse. L'agoniste de type D₂ RU 25926 réduit la libération de $^3\text{H-GABA}$, cet effet est antagonisé par le S-sulpiride (antagoniste D₂) qui n'a aucun effet lorsqu'il est appliqué seul. On peut en conclure que les neurones DA exercent une régulation complexe sur les neurones GABAergiques striataux, activatrice et tonique par l'intermédiaire des récepteurs D₁, inhibitrice et phasique par l'intermédiaire des récepteurs D₂ (J.A. Girault, U. Spampinato, M.J. Besson).

— *Etude de la libération de l'acide glutamique et de l'acide aspartique.* Une méthode de dosage de différents acides aminés après leur séparation par HPLC a été également développée. Des résultats préliminaires indiquent qu'une dépolarisation induite par le potassium (30 mM) favorise la libération par un mécanisme calcium-dépendant des acides glutamique et aspartique, mais également du GABA (J.A. Girault, L. Barbeito).

3.4. *Etude de la libération de ³H-GABA synthétisé à partir de ³H-glutamine au niveau de neurones striataux embryonnaires du rat en culture primaire* (Responsable de l'équipe : M.J. BESSON)

Cette approche expérimentale vient d'être récemment développée afin d'étudier les effets des agonistes glutamatergiques sur l'activité des neurones GABAergiques striataux. Des données préliminaires indiquent une dissociation entre l'apparition des processus de synthèse et de libération du ³H-GABA en fonction du stade de développement des neurones embryonnaires. Le processus de libération calcium-dépendant évoqué par dépolarisation potassique apparaît après 15 jours en culture (C. Gauchy, M.L. Kemel, M.C. de Montety).

4. PROPRIÉTÉS DES NEURONES DA MÉSOCORTICO-PRÉFRONTAUX ET MÉSOLIMBIQUES ET DE CERTAINES DE LEURS CELLULES CIBLES

4.1. *Etudes biochimiques* (Responsable de l'équipe : J.P. TASSIN)

— Précédemment, nous avons montré que des fibres non DA interviennent dans la régulation de l'hypersensibilité de dénervation des récepteurs D₁ au niveau du cortex préfrontal et du noyau accumbens chez le rat. Des études effectuées au niveau du cortex préfrontal chez des animaux ayant subi différents types de lésions, nous ont permis de confirmer que l'hypersensibilité de dénervation des récepteurs D₁ (lésion des fibres afférentes DA) ne peut se développer après destruction sélective et concomitante des afférences noradrénergiques (J.P. Tassin, J.M. Studler, D. Hervé, G. Blanc).

— En collaboration avec les D^{rs} W. Rostène (I.N.S.E.R.M. U. 55) et P. Kitabgi (C.N.R.S., Nice), nous avons examiné l'influence de la lésion des neurones DA ascendants et de l'interruption chronique de la transmission DA (traitements par un neuroleptique retard) sur les récepteurs de la neurotensine dans des régions riches en terminaisons et en corps cellulaires DA. Cette étude a été effectuée par autoradiographie en utilisant la ¹²⁵I-neurotensine comme ligand. Trois conclusions peuvent être formulées à l'issue de ces travaux. La présence de récepteurs de la neurotensine sur les corps cellulaires et les terminaisons des neurones DA ascendants a été confirmée. La proportion des récepteurs présynaptiques de la neurotensine présents sur les fibres DA pourrait varier d'une structure à l'autre, celle-ci paraissant plus élevée dans le striatum. L'interruption prolongée de la transmission DA induit sélectivement une augmentation du nombre de sites de liaison de la ¹²⁵I-neurotensine dans les cellules cibles des neurones DA au niveau du cortex préfrontal (effet le plus prononcé), du cortex entorhinal, et du noyau accumbens. Il n'en est pas de même au niveau du striatum latéral. Cette

augmentation des récepteurs de la neurotensine particulièrement évidente au niveau du cortex préfrontal fournit un autre exemple de régulation des récepteurs de certains médiateurs par des fibres hétérologues (D. Hervé, W. Rostène, P. Kitabgi, J.P. Studler, J.P. Tassin).

— Dans des études précédentes, nous nous sommes intéressés à l'analyse des propriétés des neurones originaires de l'aire tegmentale ventrale et innervant le noyau accumbens, riches en DA, cholecystokinine 8S (CCK 8S) ou contenant les deux médiateurs. Nous avons notamment montré que les neurones mixtes innervent la partie postero-médiane de cette structure alors que les non-mixtes se projettent dans sa zone antérieure. Ceci nous a conduit à étudier les effets de la CCK 8S sur l'activation de l'adénylate cyclase induite par la DA (récepteurs D_1) dans ces deux régions du noyau accumbens. La CCK 8S exerce des effets opposés dans ces deux zones puisqu'elle a un rôle activateur sur la réponse évoquée par la DA dans la partie postero-médiane (zone mixte) et à l'inverse un rôle inhibiteur dans la partie antérieure (zone non mixte) (J.M. Studler, D. Hervé, G. Blanc, J.P. Tassin).

4.2. *Etudes électrophysiologiques* (Responsable de l'équipe : A.M. THIERRY)

Nous avons poursuivi l'analyse des effets de divers neuroleptiques sur la transmission DA au niveau de deux structures cibles des neurones DA (groupes A10) localisés dans le tegmentum mésencéphalique ventro-médian (VMT) : le cortex préfrontal médian et le noyau accumbens. Cette étude a été réalisée à l'aide d'une approche électrophysiologique consistant à analyser l'activité unitaire, extracellulaire des neurones de ces deux structures chez le rat anesthésié avec de la kétamine.

Au niveau du noyau accumbens, la stimulation du VMT induit différents types d'effet sur l'activité spontanée des cellules, soit une excitation ou une inhibition ou une réponse complexe (excitation suivie d'une inhibition). Seules les réponses inhibitrices sont médiées par l'activation du système DA, en effet, ces réponses disparaissent en grande partie après lésion du système DA et sont bloquées après administration de sulpiride ou de l'haloperidol, en revanche, les réponses excitatrices persistent après destruction des neurones DA ou administration de neuroleptiques.

Au niveau du cortex préfrontal médian, la stimulation du VMT induit une inhibition de l'activité spontanée de la majorité des neurones localisés dans les couches intermédiaires et profondes. Cet effet est lié à l'activation du système DA. L'administration systémique de sulpiride ainsi que celle de neuroleptiques de différents types tels que le spiroperidol, le pimozide ou la fluphenazine entraîne un blocage de la réponse inhibitrice. Par contre, l'administration de l'haloperidol, contrairement à ce qui a été observé au

niveau du noyau accumbens, ne bloque pas la réponse inhibitrice au niveau cortical. De même après administration de levomepromazine ou traitement par un neuroleptique à longue durée d'action, l'ester palmitique de pipotiazine, l'inhibition corticale persiste.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées afin d'expliquer l'action différentielle de divers neuroleptiques utilisés. Nous retiendrons l'hypothèse fondée sur l'existence de deux principaux types de récepteurs DA : l'un (D_1) couplé de façon positive l'autre (D_2) couplé de façon négative au système adénylate cyclase. En effet, le sulpiride, substance la plus efficace dans notre modèle expérimental, est un antagoniste spécifique des récepteurs D_2 suggérant que l'inhibition induite par l'activation du système DA mésocortical est médiée par l'action de la DA sur les récepteurs de type D_2 . (A.M. Thierry, A. Ferron, C. Le Douarin, J. Penit).

PUBLICATIONS

M.L. KEMEL, C. GAUCHY, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON, *In vivo release of 3H -GABA in cat caudate nucleus and substantia nigra. II. Involvement of different thalamic nuclei in the bilateral changes induced by a nigral application of muscimol.* (*Brain Research*, 303, 203-213, 1984).

M. REIBAUD, G. BLANC, J.M. STUDLER, J. GLOWINSKI et J.P. TASSIN, *Non-DA prefronto-cortical efferents modulate D_1 receptors in the nucleus accumbens.* (*Brain Research*, 305, 43-50, 1984).

Y. TORRENS, S. LAVIELLE, G. CHASSAING, A. MARQUET, J. GLOWINSKI et J.C. BEAUJOUAN, *Neuromedin K, a tool to further distinguish two central tachykinin binding sites.* (*Eur. J. Pharmacol.*, 102, 381-382, 1984).

R. ROMO, A. CHÉRAMY, G. GODEHEU et J. GLOWINSKI, *Distinct commissural pathways are involved in the enhanced release of dopamine induced in the contralateral caudate nucleus and substantia nigra by unilateral application of GABA in the cat thalamic motor nuclei.* (*Brain Research*, 308, 43-52, 1984).

T.D. REISINE, P. SOUBRIE, A. FERRON, C. BLAS, R. ROMO et J. GLOWINSKI, *Evidence for a dopaminergic innervation of the cat lateral habenula : its role in controlling serotonin transmission in the basal ganglia.* (*Brain Research*, 308, 281-288, 1984).

F. CESSÉLIN, S. BOURGOIN, F. ARTAUD et M. HAMON, *Basic and regulatory mechanisms of in vitro release of met-enkephalin from the dorsal zone of the rat spinal cord.* (*J. Neurochem.*, 43, 763-774, 1984).

C. POUJADE, S. LAVIELLE, Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI et A. MARQUET, *A peptidase-resistant glycosylated analogue of substance P-(5-11). Specificity towards substance P receptors.* (*Neuropeptides*, 4, 361-368, 1984).

H.E. SAVAKI, J.A. GIRAULT, M. DESBAN, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON, *Local cerebral metabolic effects induced by nigral stimulation following ventromedial thalamic lesions. I : Basal ganglia and related motor structures.* (*Brain Research Bull.*, 12, 609-616, 1984).

J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, A. VIGER et J. GLOWINSKI, *A new type of tachykinin binding site in the rat brain characterized by specific binding of a labeled eledoisin.* (*Molecular Pharmacol.*, 26, 248-254, 1984).

M. NINKOVIC, J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, M. SAFFROY, M.D. HALL et J. GLOWINSKI, *Differential localization of tachykinin receptors in rat spinal cord.* (*Eur. J. Pharmacol.*, 106, 463-464, 1984).

R. ROMO, P. SOUBRIE et J. GLOWINSKI, *Role of thalamic motor nuclei in bilateral regulation of serotonergic transmission in cat basal ganglia.* (*Brain Research*, 322, 297-300, 1984).

H.E. SAVAKI, J.A. GIRAULT, M. DESBAN, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON, *Adaptive reaction of nigral neurons following lesion of their ventromedial-thalamic projection field.* (*Brain Research*, 302, 190-195, 1984).

J.A. GIRAULT, H.E. SAVAKI, M. DESBAN, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON, *Bilateral cerebral metabolic alterations following lesion of the ventromedial thalamic nucleus. Mapping by the ¹⁴C-deoxyglucose method in conscious rats.* (*J. Comp. Neurol.*, 231, 137-149, 1985).

H. CHNEIWEISS, J. GLOWINSKI et J. PREMONT, *Vasoactive intestinal polypeptide receptors linked to an adenylate cyclases and their relationship with biogenic amine and somatostatin-sensitive adenylate cyclases on central neuronal and glial cells in primary cultures* (*J. Neurochem.*, 44, 779-786, 1985).

Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN et J. GLOWINSKI, *Pharmacological characterization of two tachykinin binding sites in the rat cerebral cortex* (*Neuropeptides*, 6 (1), 59-70, 1985).

Y. MOROT-GAUDRY, R. ROMO, B. LESBATS, A. CHÉRAMY, G. GODEHEU, J. GLOWINSKI et M. ISRAEL, *Acetylcholine release in the cat caudate nucleus measured with the choline oxidase method* (*Eur. J. Pharmacol.*, 110 (1), 81-88, 1985).

H. CHNEIWEISS, J. GLOWINSKI et J. PREMONT, *Modulation by monoamines of somatostatin-sensitive adenylate cyclase on neuronal and glial cells from the mouse brain in primary cultures* (*J. Neurochem.*, 44, 1825-1831, 1985).

Différents chercheurs ont présenté leurs travaux dans les congrès suivants :

J.M. STUDLER et J.P. TASSIN, *Origin and sites of storage of CCK8 in the nucleus accumbens*. Neuronal Cholecystokinin, Bruxelles, July 3-6 1984.

J.M. STUDLER et F. JAVOY-AGID, *CCK8-immunoreactivity distribution in human brain : modifications in parkinsonian patients*. Neuronal Cholecystokinin, Bruxelles, July 3-6 1984.

J. GLOWINSKI, *In vivo regulation of the dendritic release of dopamine in the substantia nigra : functional significance*. I.U.P.H.A.R., 9th Int. Cong. Pharmacology, Londres, 29/07-03/08 1984.

S. LAVIELLE, J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, A. VIGER, G. CHASSAING, A. MARQUET et J. GLOWINSKI, *C.N.S. receptors for tachykinins : structure-activity relationships and biochemical studies*. I.U.P.H.A.R. 9th Int. Pharmacol. Cong., Satellite symposium : « Substance P », Maidstone, Kent, UK 6-8/08 1984.

J. PREMONT, H. CHNEIWEISS et J. GLOWINSKI, *Somatostatin modulation of biogenic amines sensitive adenylate cyclase of neuronal or glial cells in primary culture from mouse brain embryo*. I.U.P.H.A.R. 9th Int. Cong. Pharmacology, Londres, 29/07-03/08 1984.

C. GAUCHY, R. ROMO, M.L. KEMEL, G. GODEHEU, A. CHÉRAMY, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON. *Role of dendritic dopamine released in substantia nigra on the activity of nigro-thalamic GABAergic neurons*. I.U.P.H.A.R. 9th Int. Cong. Pharmacology, Londres, 29/07-03/08 1984.

S. EL MESTIKAWY, J. GLOWINSKI et M. HAMON. *Dopaminergic antagonists enhance tyrosine hydroxylase activation in depolarized striatal slices*. I.U.P.H.A.R. Satellite Symposium. Dopamine 1984. Southampton, 5-8/08 1984.

J.A. GIRAULT, U. SPAMPINATO, H. SAVAKI, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON, *In vivo release of newly synthesized ³H-GABA in the rat striatum : dopaminergic regulation*. 8th Annual Meeting E.N.A., La Haye, 11-15 sept. 1984.

M. MALLAT, S. DENIS-DONINI, M.C. DAGUET-DE' MONTETY, V. MOURA NETO, J. GLOWINSKI et A. PROCHIANZ, *In vitro studies of cell interactions involved in the maturation of dopaminergic ascending neurons from the mouse brain*. 8th Annual Meeting E.N.A., La Haye, 11-15 sept. 1984.

H. CHNEIWEISS, J. PREMONT et J. GLOWINSKI, *Somatostatin as a modulator of adenylate cyclase activity of neuronal or glial cells in primary culture from mouse brain embryo*. 8th Annual Meeting E.N.A., La Haye, 11-15 sept. 1984.

M.J. BESSON, J.A. GIRAULT, U. SPAMPINATO, J. GLOWINSKI et H.E. SAVAKI, *Action of dopaminergic agonists on the in vivo neosynthesized ³H-GABA release in the rat striatum*. Society of Neuroscience, oct. 10-15, 1984.

J. GLOWINSKI, *Tachykinins receptor in the C.N.S.* Colloque Rhône Poulenc, Paris-Courbevoie, 22-23/11/1984.

A. PROCHIANTZ, *Cellular interactions and biochemical and morphological maturation of dopaminergic central neurons in culture.* Colloque Rhône Poulenc, Paris-Courbevoie, 22-23/11/1984.

M. MALLAT, *Etudes in vitro sur la maturation de neurones centraux.* Colloque de Biologie Cellulaire Spatiale, Hauvillers, 3-5/12/1984.

J.P. TASSIN, *Approche biologique du fonctionnement du système nerveux central et sa modulation par les facteurs environnementaux.* Association des Epidémiologistes de Langue Française, XI^e réunion « Les Marqueurs Biologiques de Risques », C.I.R.C., Lyon, 4-5/03/1985.

D. HERVÉ, J.M. STUDLER, C. DANA, P. KITABGI, J.P. VINCENT, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN et W. ROSTENE, *Interactions of ascending dopaminergic fibers and neurotensine binding sites.* 5th Europ. Winter Conference on Brain Research, Vars, March 11-16, 1985.

J.P. TASSIN, G. BLANC, J.P. STUDLER, D. HERVÉ, K. TAGHZOUTI, H. SIMON et J. GLOWINSKI, *Non-DA fibers modulate dopaminergic (D₁) receptors in the prefrontal cortex and the nucleus accumbens : relationship with the control of rat locomotor activity.* 5th Europ. Winter Conference on Brain Research, Vars, March 11-16, 1985.

J. GLOWINSKI, *Regulations of dopamine release from nerve terminals and dendrites.* Physiopharmacology of the synaptic transmission, Rome, March 20-22, 1985.

J. GLOWINSKI et A. CHÉRAMY, *Activity of catecholamines in the caudate nucleus and other subcortical structures.* New York Academy of Sciences : « Neurochemical analysis of the conscious brain : voltammetry and push-pull perfusion ». Session II : *In vivo* analysis of the brain's CA system. New York, U.S.A., April 17-19, 1985.

M.J. BESSON, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, R. ROMO et J. GLOWINSKI, *In vivo release studies on GABAergic systems in the basal ganglia and in the thalamus.* New York Academy of Sciences : « Neurochemical analysis of the conscious brain : voltammetry and push-pull perfusion ». Session II : *In vivo* analysis of the brain's CA system. New York, U.S.A., April 17-19, 1985.

J. PREMONT, H. CHNEIWEISS et J. GLOWINSKI, *The use of neuronal and glial primary cell cultures to study the interaction and functional properties of amine and peptide receptors.* Regulatory Peptides : Mode of action on digestive, nervous and endocrine systems, Chantilly, May 9-11, 1985.

J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, M. SAFFROY et J. GLOWINSKI, S. LAVIELLE, G. CHASSAING et A. MARQUET, *Different properties of two tachykinin receptors in the C.N.S.* Regulatory Peptides : Mode of action on digestive, nervous and endocrine systems, Chantilly, May 9-11, 1985.

J. GLOWINSKI, *Nerve terminals and dendrites of dopaminergic neurones : independant functional units modulating the processing of information through executive neurones*. MSD, Inaugural Symposium : « Fast and slow chemical signalling in the nervous system », Hoddeston, UK, May 15-17, 1985.

J.A. GIRAULT, H. SAVAKI, M. DESBAN, J. GLOWINSKI et M.J. BESSON, *Conséquences de la lésion du noyau ventro-médian du thalamus sur le métabolisme cérébral : étude expérimentale par la méthode du ¹⁴C-desoxyglucose*. Réunion sur le Thalamus, Société de Neurologie, 6-7 juin 1985.

A.M. THIERRY, *Connexions entre les aires préfrontales et le thalamus (médio-dorsal) : anatomie et physiologie*. Réunion sur le Thalamus, Société de Neurologie, 6-7 juin 1985.

J. GLOWINSKI, *L'organisation neurochimique du cerveau*, EUROMED, Neurone 1985 (Nouvelles approches de la recherche neurobiologique), Table Ronde, Montpellier, 9 juin 1985.

H. CHNEIWEISS, J. PREMONT et J. GLOWINSKI, *VIP and secretin receptors linked to an adenylate cyclase on central neuronal and glial cells in primary cultures*. VIP and related peptides, Cap d'Agde, France, 18-22 juin 1985.

J. GLOWINSKI, *Récepteurs des tachykinines du système nerveux central*. Journées PIRMED, C.N.R.S., Paris, 13-14 juin 1985.

LISTE DES DIPLOMÉS - 1984-1985

Hervé CHNEIWEISS : Approche des mécanismes d'action de la somatostatine dans le système nerveux central.

— Thèse de Doctorat en Médecine, Paris VI, soutenue le 16 novembre 1984.

Claire LE DOUARIN : Influence des neurones dopaminergiques meso-corticaux et meso-limbiques sur leurs cellules-cibles.

— Thèse de Doctorat de 3^e cycle, Paris VI, soutenue le 23 avril 1985.

Ranulfo ROMO : Rôle du thalamus dans les régulations bilatérales de la transmission dopaminergique au niveau des ganglions de la base.

— Thèse de Doctorat d'Etat, Paris VI, soutenue le 5 juillet 1985.