

Neuropharmacologie

M. Jacques GLOWINSKI, professeur

Le cours de cette année a été consacré à l'étude des propriétés pharmacologiques des astrocytes. L'objectif essentiel était de décrire des données récentes sur la présence de divers types de récepteurs de médiateurs sur les astrocytes, d'analyser leurs propriétés fonctionnelles et de démontrer par divers exemples, l'hétérogénéité des astrocytes en fonction de leur structure d'origine et même dans certains cas, au sein d'une même structure.

Cette description des récepteurs et de leurs propriétés a été précédée par trois leçons ayant un caractère plus général.

- Après un rappel historique sur l'évolution de la classification des différents types cellulaires de la glie et de leurs origines, certains critères morphologiques, biochimiques ou fonctionnels permettant de distinguer les astrocytes protoplasmiques (substance grise) et fibreux (substance blanche), les astrocytes de type I et II, les oligodendrocytes responsables ou non de la formation de myéline et la microglie amiboïde ou ramifiée ont été précisés. Les méthodes et approches *in vitro* et *in vivo* disponibles pour l'étude des propriétés des astrocytes ont également été discutées en insistant plus particulièrement sur les avantages et les limites des cultures primaires ou secondaires le plus souvent choisies. Nous avons ensuite souligné le rôle des astrocytes dans les processus de différenciation et de migration des populations neuronales et rappelé les principaux facteurs de croissance qu'ils contiennent. Puis, nous nous sommes attachés à décrire quelques unes de leurs propriétés essentielles pouvant éventuellement être régulées par l'action de médiateurs sur les récepteurs gliaux : 1) Rôles des différents systèmes de seconds messagers (cAMP, diacylglycerol, calcium, cGMP) et des processus de phosphorylation qu'ils gouvernent dans les processus de mitose et les changements de forme des astrocytes ; 2) Relations avec les cellules environnantes et entre astrocytes par l'intermédiaire des jonctions de type GAP et fonctions du syncytium modulable ainsi créé ; 3) Présence de différents types de canaux voltage-dépendants et indépendants en soulignant l'intervention primordiale de canaux potassium

non voltage-dépendants dans le maintien de l'équilibre des concentrations de potassium extracellulaire ; 4) Contrôle du pH et de l'espace extracellulaire ; 5) Intervention dans le métabolisme énergétique (à la différence des neurones, les astrocytes possèdent des stocks de glycogène) ; 6) Formation sélective des dérivés de l'acide arachidonique telles que les prostaglandines ; 7) Présence de gliotransmetteurs comme la taurine et enfin 8) Intervention des astrocytes dans les processus immunitaires et dans certains processus dégénératifs ou maladies neurologiques.

Les astrocytes en culture primaire possèdent des récepteurs des acides aminés excitateurs ou inhibiteurs, des amines biogènes, de l'adénosine et de plusieurs neuropeptides. Toutefois, certains types de récepteurs présents sur les neurones tels que les récepteurs de type NMDA, nicotiques, dopaminergiques ou encore de certains neuropeptides n'ont pas été observés sur les astrocytes. Afin d'illustrer les données concernant les grandes classes de récepteurs et d'insister sur leurs similitudes ou spécificités, deux cours ont été consacrés aux récepteurs de l'acide glutamique et du GABA, deux autres aux récepteurs α et β noradrénergiques, et enfin les deux derniers aux propriétés des récepteurs de la substance P, des peptides opioïdes et du VIP. Dans tous les cas, nous avons évoqué les données sur la visualisation autoradiographique de ces récepteurs après liaison de ligands spécifiques, les effets électrophysiologiques des agonistes (dépolérisation ou hyperpolarisation), les caractérisations pharmacologiques pour insister sur les similitudes ou différences entre les récepteurs astrocytaires et neuronaux et enfin envisager les modifications du ou des systèmes de transduction couplés aux récepteurs considérés (adénylate cyclase, phospholipase C et A2, canaux calcium.). Diverses modalités d'hétérogénéité pharmacologiques ont été signalées ; présence ou non de certains transporteurs, récepteurs ou peptides selon la structure d'origine des populations astrocytaires ou encore variations de l'une ou l'autre de ces propriétés au cours de l'ontogénèse ou entre espèces.

De même, plusieurs exemples de coopérativité entre les astrocytes et les neurones ont fait l'objet d'une attention particulière 1) transport à haute affinité du glutamate et du GABA dans les astrocytes, conversion locale en glutamine, navette de la glutamine dans les neurones où elle joue le rôle de précurseur du glutamate ; 2) potentialisation par l'adénosine de la stimulation de l'activité d'une phospholipase C induite par des agonistes muscariniques dans des co-cultures astrocyto-neurales du striatum, les astrocytes étant la cible de l'adénosine et la formation de l'acide arachidonique ou/et de l'un de ses métabolites responsables de la coopérativité ; 3) augmentation de la survie neuronale par une coopérativité astrocyto-neuronale médiée par le VIP.

Certains problèmes plus spécifiques ont été évoqués. C'est ainsi que nous avons particulièrement insisté sur les mécanismes ioniques mis en jeu dans les effets du glutamate et du GABA, ces effets électrophysiologiques ayant été

les mieux étudiés. De même, l'analyse du rôle des récepteurs α et β noradrénergiques nous a permis d'aborder les processus de régulation de la glycolyse ou encore de ceux de la libération de taurine en nous référant à d'autres médiateurs pouvant intervenir dans ces régulations. Enfin, l'étude des propriétés des récepteurs de la substance P nous a incité à souligner l'intervention des récepteurs NK1 dans le contrôle de la synthèse de l'acide arachidonique et de ses dérivés et dans la biosynthèse des protéines. De même, l'intervention des relations astrocyto-neurales dans le contrôle de l'expression des récepteurs au cours de l'ontogenèse a été longuement envisagée, certains de ces récepteurs pouvant disparaître chez l'animal adulte.

En conclusion, la situation stratégique particulière des astrocytes dans les effets régulateurs des systèmes aminergiques a été longuement discutée à la lumière de la diversité des récepteurs découverts sur ces cellules pendant ces dernières années et de la pléiade de fonctions qu'elles peuvent jouer dans des situations physiologiques ou pathologiques.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE (INSERM U.114)

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

1. INTÉRACTIONS CELLULAIRES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

1.1. *Morphogénèse neuronale* (Responsable de l'équipe : Alain Prochiantz)

1.1.1. *Protéines de la matrice*

Au cours des années précédentes nous sommes arrivés à la conclusion suivante : contrairement à celle des axones, la croissance des dendrites est hautement dépendante de l'adhésion des neurones à leur substrat. Cette observation, explicable par des critères physiques faisant jouer les effets combinés de la viscosité et de la tension superficielle indique clairement que la croissance des deux compartiments axonaux et dendritiques peut être régulée indépendamment.

Parmi les facteurs susceptibles de moduler l'adhésion, les protéines de la matrice et leurs récepteurs sont des éléments de première importance. Nous avons donc commencé à étudier les protéines matricielles d'origine astrocytaire qui, sécrétées dans le milieu, peuvent réguler l'adhésion et par là stimuler ou au contraire inhiber la croissance des dendrites (F. Lafont, M. Lévy et A. Rousselet).

1.1.2. Rôle des gènes *rab*

Les gènes *rab* sont les homologues, chez les vertébrés des gènes YPT1 et SEC4 qui, chez la levure, sont impliqués dans le contrôle de la formation et du transport polarisé des vésicules. Par conséquent, il était envisageable que l'établissement de la polarité chez les neurones passe par l'expression plus ou moins importante de ces gènes. Nous avons, en collaboration avec l'équipe d'A. Tavitian, exprimé ces gènes dans des bactéries, puis purifié et injecté dans les cellules nerveuses plusieurs protéines *rab* (*rabp*). Nous avons ainsi démontré que *rab2* augmente l'adhésion et la croissance dendritique alors que *rab1* a l'effet inverse. Les protéines *rab3p*, *rab4p* et *rab6p* sont sans effet (J. Ayala).

1.1.3. Protéines à homéoboite

De nombreuses protéines à homéoboite sont impliquées, chez la drosophile, dans la morphogenèse des tissus. Ces protéines se fixent sur des sites consensus présents dans les régions promotrices ou amplificatrices des gènes dont elles régulent l'expression. La fixation se fait par l'intermédiaire d'une région hautement conservée dans les diverses espèces animales : l'homéoboite.

Chez les vertébrés, ces gènes sont exprimés au cours de l'embryogenèse précoce, mais aussi plus tardivement pendant la formation du système nerveux. Nous avons donc examiné leur rôle éventuel dans la morphogenèse des ensembles neuronaux en culture. Pour ce, nous avons synthétisé l'homéoboite de type antennapedia (pAntp) et l'avons introduite dans les cellules. Cette opération induit une forte modification des interactions entre les neurones et leur environnement dont le résultat est une intense croissance des neurites. Par ailleurs, nous avons démontré que les neurones possèdent un récepteur spécifique pour pAntp, ce qui nous a conduit à proposer que le mode d'action des protéines à homéoboites pourrait n'être pas seulement intracrine mais également autocrine ou paracrine (A. Joliot et E. Hétiér).

1.2. Etude des fonctions et de la différenciation des cellules microgliales (Responsable de l'équipe : M. Mallat)

1.2.1. Interactions entre les cellules microgliales et les neurones

L'étude de l'influence des macrophages cérébraux sur la maturation des neurones de l'embryon de rat a été poursuivie. Précédemment, des observations immunocytochimiques effectuées sur des co-cultures de neurones et de macrophages cérébraux ont permis de mettre en évidence une activité neurotoxique des macrophages cérébraux, la présence de cellules microgliales s'étant traduite par une réduction du nombre de neurones développés (possédant au moins un neurite). Cette année, nous avons précisé les modalités cellulaires et les mécanismes biochimiques de cette neurotoxicité microgliale.

Des observations continues des co-cultures à l'aide d'une caméra vidéo ont montré que la disparition des neurones peut être liée à une rétraction totale des neurites, suivie d'une lyse du corps cellulaire puis de sa phagocytose. Dans d'autres cas, la lyse apparente du corps cellulaire s'effectue sans rétraction neuritique. Par ailleurs, des séquences indiquent une phagocytose de neurones munis de prolongements.

La mise au point d'un microtest biochimique de quantification de la survie neuronale nous a permis d'aborder l'étude de la régulation et des mécanismes biochimiques de cette neurotoxicité microgliale. La régulation de cette toxicité a été étudiée au niveau des cibles (sensibilité des neurones) et des effecteurs (activation des cellules microgliales). Les premiers résultats indiquent une sensibilité maximale des neurones immatures (24 à 48 heures après leur mise en culture) indépendamment de leur origine cérébrale. Les cellules microgliales utilisées issues d'embryons et ayant un phénotype macrophagique, apparaissent spontanément neurotoxiques dans nos conditions expérimentales (milieu de culture synthétique compatible avec un bon développement des neurones). Toutefois, une stimulation de la neurotoxicité microgliale est visible en présence de faibles concentrations de sérum de veau foetal ou après addition de Lipopolysaccharides (modulateur des fonctions macrophagiques) dans le milieu de culture. En ce qui concerne les mécanismes biochimiques de cette neurotoxicité, la participation de composés oxygénés toxiques à courte durée de vie (ion superoxyde, eau oxygénée) a été établie par les faits suivants : 1) la production microgliale de ces agents a été détectée cytologiquement (réduction du Nitrobleu de tetrazolium) dans les co-cultures ; 2) l'addition de catalase dans les milieux de culture, enzyme qui catalyse la destruction de l'eau oxygénée, réduit significativement la neurotoxicité des cellules microgliales.

En conclusion, l'ensemble de ces données confortent l'hypothèse d'un rôle actif de la microglie dans les événements régressifs de la neurogenèse (C. Théry, B. Chamak, M. Mallat).

1.1.2. *Etude de la différenciation microgliale*

— Caractérisation biochimique d'un facteur de croissance des cellules microgliales.

Nous avons montré que des astrocytes cultivés *in vitro* sécrètent dans leur milieu de culture des facteurs de croissance stimulant la multiplication d'un précurseur des cellules microgliales : le monocyte. L'un de ces facteurs a été identifié. Il s'agit du M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor) et nous avons détecté par hybridation sur filtre un transcrite de 4.5 kb codant pour ce facteur de croissance dans le cortex cérébral de souris, cet ARNm étant présent dès le 14^e jour de vie embryonnaire. Son origine astrocytaire a été montré en utilisant des cultures gliales primaires et des lignées clonales immortalisées (C. Théry, M. Mallat).

— Influence des protéines de la matrice extracellulaire sur la différenciation des cellules microgliales :

Dans le système nerveux embryonnaire, les cellules microgliales ont un phénotype macrophagique. Au cours du développement, l'aspect de ces cellules évolue progressivement vers une morphologie « ramifiée » caractéristique du parenchyme adulte. Les cultures de macrophages cérébraux d'origine embryonnaire ont permis d'étudier la participation de composés des espaces extracellulaires dans le contrôle de cette transformation physiologique des cellules microgliales. Les phénotypes microgliaux obtenus *in vitro* ont été définis par des critères morphologiques et par l'expression de divers marqueurs qui différencient *in vivo* les macrophages cérébraux des cellules microgliales ramifiées (récepteurs du complément, activités enzymatiques lysosomiales, aptitude à la phagocytose, composition du cytosquelette, etc.).

Nous avons ainsi observé qu'une fraction minoritaire des macrophages cérébraux maintenus dans un milieu de culture synthétique développe spontanément un phénotype évoquant une transformation partielle en cellules microgliales ramifiées. Après 48 h, la proportion de ces cellules spontanément transformées est en moyenne de 15 % lorsque les macrophages sont issus du cortex cérébral du rat (17^e jour de gestation). L'addition de fibronectine (10 µg/ml) dans le milieu de culture augmente la proportion des cellules ramifiées (55 %). A l'inverse, à la même concentration la laminine réduit la proportion des cellules évoluant vers un phénotype ramifié (6 %). Ces variations ne sont pas liées à une survie sélective de sous-populations microgliales selon les conditions de culture.

Ces données suggèrent que la laminine et la fibronectine régulent les transitions entre les phénotypes amiboïde et ramifié observés *in vivo* et révèlent des rôles opposés pour ces deux molécules (B. Chamak, M. Mallat).

1.3. *Génétique moléculaire des compartiments striataux* (Responsable de l'équipe : M. Lévi-Strauss)

Le projet de recherche de l'équipe de génétique moléculaire, nouvellement installée dans le laboratoire concerne la compartimentation du striatum. Nous cherchons en effet à isoler une série d'ARN messagers spécifiquement exprimés dans chacun des deux compartiments striataux : les striosomes et la matrice. Les sondes moléculaires obtenues permettront de mieux définir l'architecture du striatum et de comprendre ainsi sa mise en place au cours du développement.

La stratégie que nous avons choisie pour l'isolement d'ARN messagers spécifiques des deux compartiments striataux repose sur leur peuplement par deux vagues successives de précurseurs neuronaux. Alors que les neurones striosomaux sont en place chez la souris à partir du 15^e jour de vie embryon-

naire (E15), les neurones de la matrice n'envahissent l'ébauche striatale que vers le 19^e jour de vie embryonnaire (E19). Nous avons donc criblé successivement une banque d'ADN complémentaire obtenue à partir d'ARN d'hémisphères cérébraux de souris avec deux sondes d'ADN complémentaire radio-marqué à haute activité spécifique et correspondant à de l'ARN de striatum prélevé à E17 et à E20. Nous avons ainsi pu isoler une quarantaine de clones dont l'expression est quantitativement différente à ces deux dates. Les clones dont l'expression augmente entre E17 et E20 sont des candidats qui pourraient coder pour des marqueurs de la matrice alors que ceux dont l'expression diminue, pourraient être des messagers striosomaux dilués à E19 lors de l'invasion du striatum par les neurones de la matrice.

Nous allons maintenant analyser l'expression de ces différents candidats dans le système nerveux central, d'abord par hybridation *in situ*, puis, éventuellement à l'aide d'anticorps obtenus après immunisation avec la protéine recombinante correspondante produite dans *E. Coli* (J.M. Studler, M. Lévi-Strauss).

2. RÉGULATION DES SYSTÈMES DE TRANSDUCTION ASSOCIÉS A CERTAINS RÉCEPTEURS MEMBRANAIRES CENTRAUX

2.1. Equipe J. Prémont

2.1.1. Régulation par les œstrogènes des systèmes de transduction couplés à des adénylate-cyclases dans les neurones de striatum en culture primaire

Nous avons antérieurement montré que les modifications importantes de la sensibilité des neurones de striatum à de nombreux neuromédiateurs induites par un traitement œstrogénique sont probablement dues à des modifications biochimiques des protéines G associées aux récepteurs correspondants. Dans cette perspective, nous avons recherché les effets de l'activation des protéines kinases A et C sur les propriétés des protéines G_i et G_o . A cette fin, les neurones striataux ont été incubés avec différents analogues perméants de l'AMP cyclique ou avec des analogues des diacylglycérols. De tels traitements induisent, à l'inverse de l'œstradiol, une réduction de l'ADP ribosylation des sous unités G_{α_i} et G_{α_o} catalysée par la toxine de pertussis. Cependant les sous unités G_{α_i} et G_{α_o} ne semblent pas être les substrats des protéines kinases ainsi stimulées puisque leurs points isoélectriques restent inchangés. Ces substrats pourraient être des enzymes responsables de modifications covalentes des différentes sous unités α , β ou τ . Quoiqu'il en soit, la baisse importante des taux d'AMP cyclique des neurones striataux observée à la fin du traitement stéroïdien, en diminuant l'activité des protéines kinases A, pourrait être responsable des modifications des propriétés biochimiques des protéines G_i et G_o . (Marion Maus)

2.1.2. *Hétérorégulations de diverses réponses médiées par les récepteurs α_1 -noradrénergiques localisés sur les astrocytes striataux*

Nous avons précédemment observé que la 2-chloroadénosine, bien que dépourvue d'effet propre, augmente sensiblement la production de dérivés phosphorylés de l'inositol induite par la méthoxamine, un agoniste des récepteurs α_1 -noradrénergiques. Les résultats d'une analyse détaillée des processus biochimiques mis en jeu suggèrent la séquence d'événements suivante : la méthoxamine en se liant à des récepteurs α_1 noradrénergiques conduirait, via l'activation d'une phospholipase C, à la production de diacylglycérol qui à son tour stimulerait une protéine kinase C. Les récepteurs de la 2-chloroadénosine seraient couplés à une activité phospholipase A2 soumise à une régulation inhibitrice permanente disparaissant lors de l'activation d'une protéine kinase C. Ainsi, les effets induits par la méthoxamine permettraient à la 2-chloroadénosine de provoquer la libération de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique ainsi formé, en inhibant la recapture de glutamate spontanément libéré par les astrocytes entraînerait son accumulation dans le milieu extracellulaire. Cet acide aminé stimulerait alors la phospholipase C, cette activation s'ajoutant à celle induite par la méthoxamine. La somatostatine reproduit les effets de la 2-chloroadénosine par un mécanisme en tous points identique. (P. Marin, J. Cordier)

En utilisant une technique de microfluorimétrie (Indo-1), nous avons montré que la 2-chloroadénosine provoque, en présence de méthoxamine, une augmentation soutenue de la concentration cytosolique de calcium libre. L'analyse des processus biochimiques mis en jeu confirme l'activation d'une phospholipase A2 par la 2-chloroadénosine, l'acide arachidonique formé induisant l'ouverture de canaux potassiques. L'hyperpolarisation qui en résulte, par une augmentation du gradient électrique pour les ions calciques favoriserait leur influx par des canaux sensibles à l'inositol triphosphate. De nouveau, la somatostatine reproduit, par un processus identique, les effets de la 2-chloroadénosine. Des protéines G sensibles à la toxine de pertussis assurent le couplage à la phospholipase A2 des récepteurs stimulés par la 2-chloroadénosine ou la somatostatine (J.C. Delumeau).

Enfin nous avons mis en évidence que la méthoxamine, *via* des récepteurs α_1 noradrénergiques, potentialise la production de l'AMP cyclique induite par la stimulation des récepteurs β noradrénergiques, cet effet nécessitant la présence de calcium dans le milieu extracellulaire. De fait, l'isoprotérénol prolonge sensiblement l'augmentation de calcium cytosolique induite par la méthoxamine, uniquement en présence de calcium externe (P. Marin, J.C. Delumeau, J. Cordier).

2.1.3. *Etude des propriétés des jonctions de type « gap » entre astrocytes*

L'étude des propriétés des jonctions de type « gap » sur des astrocytes du striatum de la souris en culture primaire a permis de mettre en évidence une

régulation de la perméabilité de ces jonctions par la noradrénaline. L'activation des récepteurs α_1 noradrénergiques provoque leur fermeture, cet effet étant amplifié par la 2-chloroadénosine, tandis qu'une stimulation des récepteurs β -adrénergiques les ouvre. Par ailleurs, en utilisant la technique de patch-clamp, nous avons pu mesurer directement les courants ioniques qui passent à travers ces jonctions. En sélectionnant des conditions appropriées des événements élémentaires correspondant à des ouvertures et des fermetures de canaux jonctionnels ont pu être observés. Leur conductance élémentaire, de 50-60pS, est distincte de celles généralement mesurées dans d'autres types cellulaires (120-150pS), à l'exception des cellules cardiaques. Enfin, une collaboration a été établie avec l'équipe de D. Gros (Faculté des Sciences de Luminy, Marseille) qui étudie différents aspects biochimiques des jonctions gap afin de caractériser la protéine des jonctions gap astrocytaires en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines de jonctions gap et des sondes pour les ARNm codant pour ces différentes protéines (C. Giaume, J. Cordier).

2.2. *Les récepteurs des tachykinines* (Responsable de l'équipe : J.C. Beaujouan)

2.2.1. *Présence de récepteurs de types NK1 couplés à la phospholipase C sur des astrocytes de certaines structures cérébrales du rat.*

Précédemment, nous avons montré chez la souris que toutes les populations astrocytaires cérébrales expriment des récepteurs de type NK1 (substance P). Chez le rat (embryon ou nouveau-né), la présence de sites de liaison fixant spécifiquement le ^{125}I -BHSP n'a pu être démontrée que sur les astrocytes originaires du tronc cérébral et à un moindre degré du cervelet et de la moelle épinière. Les sites de liaison des astrocytes du tronc cérébral ont toutes les propriétés pharmacologiques des sites NK1, l'ordre de potentialité des principales tachykinines étant $\text{SP} > \text{NKA} > \text{NKB}$. Cette hétérogénéité régionale de la liaison ^{125}I -BHSP n'est pas liée à des différences d'inactivation du ligand marqué, à la densité cellulaire ensemencée ou à la présence éventuelle de cellules contaminantes. Elle peut être observée quelque soit l'âge des animaux (embryon, nouveau-né). D'autre part, la SP stimule l'activité de la phospholipase C des astrocytes du tronc cérébral et non celle des populations cellulaires dépourvues de sites de liaison NK1 indiquant la présence de récepteurs NK1 fonctionnels (M. Saffroy, J.C. Beaujouan).

2.2.2. *Récepteurs de type NK1 régulant le transport du myoinositol dans les cellules de la glande parotide du rat*

Dans les tissus périphériques, seules les glandes salivaires possèdent sélectivement des sites de liaison NK1. La stimulation *in vitro* par la substance P (10^{-6}M) des cellules acineuses de la glande parotide de rat provoque une diminution importante (50 %) et rapide de l'accumulation initiale du 3H-

myoinositol dans le cytosol et de son incorporation initiale dans les lipides. L'inhibition du transport du ^3H -myoinositol est sodium- et température-dépendantes. L'EC50 pour la SP est de 5,8 nM, valeur voisine de l'IC50 déterminée dans les études de liaison effectuées sur diverses préparations possédant des sites NK1. Une étude pharmacologique complète et la mise en évidence de l'effet antagoniste du spantide ont permis de conclure que l'inhibition du transport induite par la SP implique des récepteurs NK1. Par l'intermédiaire de récepteurs distincts, la noradrénaline et le carbachol inhibent également le transport de ^3H -myoinositol. L'effet inhibiteur de la SP sur ce processus de transport n'a pas été observé sur d'autres tissus, notamment les astrocytes corticaux de la souris riches en récepteurs NK1. La rapidité, la simplicité et la sélectivité complète du modèle développé pour étudier les propriétés fonctionnelles des récepteurs NK1 en font un outil de choix pour sélectionner des agonistes et des antagonistes de ces récepteurs (Y. Torrens, M. Dietl).

2.2.3 Recherche d'autres tests biologiques des récepteurs NK1

Des études préliminaires indiquent que la SP augmente les concentrations cytosoliques de calcium des astrocytes corticaux ou striataux de la souris embryonnaire en culture primaire. Par ailleurs, la SP potentialise la libération de l'acétylcholine évoquée par le potassium à partir de coupes de striatum de rat. Des études sont en cours pour déterminer si ces réponses mettent sélectivement en jeu des récepteurs NK1 (F. Petitet, J.C. Beaujouan, J.C. Delumeau).

2.2.4 Recherche d'agonistes ou antagonistes sélectifs de récepteurs des tachykinines (NK1, NK2, NK3)

Précédemment, les études structure-affinité et structure-activité effectuées en collaboration avec nos collègues chimistes, S. Lavielle, G. Chassaing et leurs collègues (Jussieu, Paris VI) ont permis de découvrir des agonistes de structure peptidique très sélectifs des récepteurs NK1 et NK3. Cette année, de nouvelles molécules ont été synthétisées qui présentent une bonne affinité et une sélectivité convenable pour les récepteurs NK2.

2.3. Etude de protéines-kinases et phosphatases neuronales et de leurs substrats (équipes de J.A. Girault et H. Chneiweiss)

— *Equipe J.A. Girault*

2.3.1 Phosphoprotéines impliquées dans l'action de la dopamine

La dopamine agit sur les cellules cibles par l'intermédiaire de deux types de récepteurs, D1 et D2. La stimulation des récepteurs D1 entraîne une augmentation des taux intracellulaires de l'AMPc et l'activation de la protéine kinase

dépendante de l'AMPc. Pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'action de la dopamine sur les neurones striataux, il est nécessaire d'identifier les cibles de cette kinase. La DARPP-32 est une protéine phosphorylée par la kinase dépendante de l'AMPc et enrichie dans les neurones qui possèdent le récepteur D1 de la dopamine. Lorsqu'elle est phosphorylée sur une thréonine par la kinase dépendante de l'AMPc, la DARPP-32 devient un puissant inhibiteur de la protéine phosphatase I. Nous avons montré que la DARPP-32 est également phosphorylée sur une serine par la caséine kinase II *in vivo* et *in vitro*. La phosphorylation de la DARPP-32 par la caséine kinase II facilite sa phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMPc *in vitro*. La stimulation des récepteurs de type NMDA du glutamate entraîne une déphosphorylation de la DARPP-32 dans le striatum, probablement du fait de l'activation d'une phosphatase Ca^{++} /Calmoduline dépendante, la calcineurine. Notre travail actuel, réalisé en collaboration avec le laboratoire du Prof. Greengard (Université Rockefeller, New York), porte sur l'étude du rôle de chacun des sites de phosphorylation de la DARPP-32 et de leurs interactions. A l'aide de techniques de génétique moléculaire, nous avons préparé des mutants de DARPP-32 dans lesquels les sites de phosphorylation ont été remplacés par des résidus non phosphorylables. Les propriétés de la protéine sauvage et des différentes formes mutées sont étudiées, soit dans un système d'expression bactérien, soit dans des expériences de transfection de cellules eukaryotes. Nous recherchons également l'existence de phosphorylations de la DARPP-32 par d'autres protéines kinases (D. Cohen, J.A. Girault).

2.3.2. Rôle des tyrosines kinases et phosphatases dans le développement neuronal

Bien que les phosphotyrosines ne représentent qu'une part très faible (moins de 0.1 %) de l'ensemble des acides aminés phosphorylés des protéines cellulaires, elles jouent un rôle clé dans la régulation de la division et de la croissance cellulaire. Les neurones sont des cellules qui arrêtent de se diviser tôt dans l'embryogenèse pour s'impliquer dans un réseau complexe de contacts intercellulaires par l'intermédiaire de leurs axones et de leurs dendrites. Il peut donc sembler paradoxal que le tissu nerveux contienne en abondance des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosil et des tyrosines kinases. En fait, un certain nombre d'arguments nous permettent de proposer, comme hypothèse de travail, que ces tyrosines kinases et leurs substrats puissent intervenir dans la formation et le maintien des prolongements neuritiques et des contacts synaptiques.

Nous avons montré l'existence, dans le tissu nerveux en développement, *in vivo* et *in vitro*, de protéines phosphorylées sur des résidus tyrosine en conditions basale. Des facteurs de croissance comme l'IGF1 (insulin-like growth factor I) ou l'EGF (epidermal growth factor) stimulent la phosphorylation de certaines de ces protéines dans des cultures réaggrégées de cellules

corticales. En collaboration avec B. Chamak, nous étudions la répartition de ces différentes phosphoprotéines dans les neurones et les astrocytes en culture. En collaboration avec D. Hervé, nous recherchons d'éventuelles modifications des phosphorylations de tyrosine dans le tissu nerveux adulte lésé. Enfin, nous développons une approche de génétique moléculaire visant à cloner des tyrosines kinases ou phosphatases préférentiellement exprimées dans les neurones en développement (H. Tixier, J.A. Girault).

2.3.3. *Phosphorylation d'une protéine enrichie dans les neurones : la stathmine (Travail réalisé au sein du groupe d'A. Sobel, INSERM U.153)*

— Equipe H. Chneiweiss

Le groupe d'A. Sobel étudie depuis plusieurs années, les protéines phosphorylées en réponse à des agents pharmacologiques ou hormonaux dans plusieurs systèmes biologiques, et en particulier au niveau hypophysaire. Nous avons donc recherché dans des neurones en culture primaire la présence de certaines phosphoprotéines observées dans l'hypophyse, où leur degré de phosphorylation peut être régulé par le VIP et le TRH. Après incorporation par les neurones de phosphate P32, puis analyse en gel de polyacrylamide à deux dimensions, nous avons pu observer plus particulièrement l'une de ces protéines (poids moléculaire apparent 19 000 Da et point isoélectrique 5,6-6,2). En comparaison avec la lignée hypophysaire GH4C1 ou l'hypophyse normale, elle est apparue très enrichie dans le système nerveux central et particulièrement pendant la période néonatale. Cette protéine a été purifiée à partir du cerveau de rat et des anticorps spécifiques ont été préparés. Dès lors, le travail de l'équipe d'A. Sobel s'est orienté vers une caractérisation approfondie de cette protéine dénommée Stathmine, et la recherche de sa fonction. Notre contribution a été de montrer que cette protéine est très enrichie dans les neurones. Elle est phosphorylée *in vitro* par la protéine kinase dépendante de l'AMPc, et dans les cellules intactes sous l'action de la forskoline, mais également du TPA (qui active la protéine kinase C) et de la ionomycine (qui augmente les concentrations intracellulaires de calcium). La stathmine est détectée dès le 12^e jour embryonnaire. Son expression est maximale pendant la première semaine de vie et diminue ensuite pour atteindre les niveaux observés dans le cerveau adulte vers le 16^e jour post-natal. Ces données suggèrent un rôle de la protéine lors des étapes précoces de la différenciation neuronale.

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation cellulaire de la protéine et à sa régulation par les neurotransmetteurs dans les neurones. Le clonage et le séquençage du cDNA codant pour la stathmine ont permis de préparer des anticorps antipeptides spécifiques de la protéine. Ces anticorps ont permis de confirmer l'abondance de la stathmine dans les neurones et de montrer une expression cinq fois moindre, mais encore très importante, dans les oligodendrocytes, une expression faible dans les astrocytes de type I et

quasi absente dans les cellules microgliales. Les études immunochimiques sur les neurones en culture indiquent une localisation préférentielle de la protéine au niveau somatique et axonale. Les différents aspects pharmacologiques de la phosphorylation de la stathmine dans les neurones striataux traités par le VIP et/ou les monoamines ont également été caractérisés. Comme nous l'avons déjà mentionné, cette régulation fait intervenir plusieurs voies de seconds messagers, permettant en retour de mettre en évidence des effets, en particulier du VIP, indépendant de la voie adénylate-cyclase : AMPc. L'ensemble de ces données suggèrent un rôle de relais de la stathmine dans l'intégration des informations extracellulaires reçues par la cellule.

3. MÉCANISMES INTERVENANT DANS LA RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE DOPAMINE À PARTIR DES TERMINAISONS ET DES DENDRITES DES NEURONES DOPAMINERGIQUES NIGRO-STRIATAUX

3.1. Equipe A. Chéramy

3.1.1. Caractérisation des récepteurs glutamatergiques intervenant dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine

Précédemment, nous avons montré *in vivo* chez le chat anesthésié que le glutamate (GLU) libéré à partir des fibres cortico-striatales intervient directement et indirectement dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine. De plus, l'implication de récepteurs de type quisqualate/kainate (QUI/KAI), vraisemblablement localisés sur les terminaisons nerveuses dopaminergiques, a été mise en évidence dans la facilitation présynaptique directe de la libération de DA. Récemment, nous avons tenté de confirmer *in vitro* ces données et de rechercher la présence de récepteurs de type NMDA en utilisant des synaptosomes purifiés (gradients de percoll) isolés à partir du striatum de rat et en mesurant la libération de ^3H -dopamine synthétisée en continu à partir de ^3H -tyrosine.

Le KAI (10^{-6}M à 10^{-4}M) stimule la libération de ^3H -DA, cette augmentation étant concentration-dépendante. Contrairement à ce que nous avons observé chez le chat *in vivo*, cet effet n'est pas antagonisé par le glutamate-diethyl ester ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) ou le riluzole (10^{-5}M), mais il est réduit par le CNQX (10^{-5}M) et le kynurenate (10^{-5}M). Le QUI (10^{-5}M à 10^{-3}M) n'augmente que faiblement la libération de ^3H -DA, mais réduit considérablement l'effet stimulateur du KAI ($5 \times 10^{-5}\text{M}$). Ceci confirme nos données *in vivo*, indiquant que le QUI induit une désensibilisation rapide des récepteurs de type QUI/KAI. Enfin, l'AMPA s'avère aussi actif que le KAI. Ainsi les effets du QUI et du KAI sur la libération de ^3H -DA semblent médiés par une activation de récepteurs de type AMPA présents sur les terminaisons dopami-

nergiques (nomenclature actuelle permettant de différencier les récepteurs QUI ionotropiques et QUI métabotropiques).

Des récepteurs de type NMDA sont également impliqués dans un contrôle direct présynaptique de la libération de dopamine. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales (présence de Mg^{2+}), le NMDA ($5 \times 10^{-5}M$) provoque une légère augmentation de la libération de 3H -DA. Cet effet est beaucoup plus important en absence de Mg^{2+} et il est potentialisé par la glycine ($10^{-6}M$) en présence de strychnine ($10^{-6}M$). Cette augmentation est antagonisée par l'addition dans le milieu de superfusion d'un antagoniste NMDA, le MK801 ($10^{-6}M$), ou de Mg^{2+} (0.83mM). Ainsi, le glutamate libéré à partir des fibres cortico-striatales peut faciliter directement la libération de dopamine à partir des terminaisons dopaminergiques en agissant sur des récepteurs de type AMPA puis dans un second temps après dépolarisation préalable en stimulant les récepteurs NMDA (J.M. Desce, G. Godeheu, A. Chéramy).

3.1.2. *N-Acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG) et libération de dopamine*

Précédemment, dans des expériences *in vivo* effectuées chez le chat (anesthésié avec de l'halothane), nous avons obtenu des données préliminaires indiquant que le NAAG stimule la libération de 3H -DA synthétisée à partir de 3H -tyrosine dans le noyau caudé par un mécanisme TTX-sensible. De fait, des expériences récentes indiquent que le NAAG utilisé à très faible concentration ($10^{-8}M$) ne stimule la libération de 3H -DA que dans la partie postérieure du noyau caudé et n'a pas d'effet dans la partie antérieure. A l'inverse, en présence de TTX ($10^{-6}M$), le NAAG ($10^{-8}M$) réduit la libération résiduelle de 3H -DA, l'effet étant nettement plus prononcé dans la partie postérieure que dans la partie antérieure de la structure. L'acide iboténique reproduit les effets du NAAG en absence et en présence de TTX. Ces effets révélant des régulation présynaptiques directes et indirectes de la libération de 3H -DA par le NAAG et l'acide iboténique se distinguent de ceux du glutamate et du NMDA. Le glutamate stimule la libération de 3H -DA en présence et en absence de TTX. Il en est de même du NMDA ; toutefois, celui-ci n'est actif que lorsqu'il est utilisé à forte concentration ($10^{-4}M$) en présence de glycine ($10^{-6}M$) et en absence de magnésium. De plus, dans ces conditions, le NMDA stimule la libération de 3H -DA dans les parties antérieure et postérieure du noyau caudé. Ainsi le NAAG semble agir par des récepteurs distincts de ceux de l'AMPA ou du NMDA.

Chez le chat, la substance noire est particulièrement riche en NAAG, notamment dans la pars compacta. Ces premières données nous ont incité à étudier l'effet de l'application du NAAG ($10^{-7}M$) dans la pars compacta de la substance noire. Ce traitement induit une augmentation de la libération dendritique de 3H -DA et stimule la libération du médiateur dans le noyau caudé ipsilatéral, aucun effet n'étant observé dans les structures contralatérales.

rales. Ainsi le NAAG pourrait intervenir dans la régulation de l'activité des neurones nigro-striataux dopaminergiques. Confirmant la spécificité des effets observés, un isomère du NAAG, le β -NAAG utilisé à la même concentration est inactif (T. Galli, F. Artaud, G. Godeheu, A. Chéramy).

3.2. Equipe M.L. Kemel et C. Gauchy

3.2.1 Régulation cholinergique de la libération de dopamine dans les striosomes et la matrice du noyau caudé chez le chat.

Nous avons montré que les neurones cholinergiques dont les corps cellulaires sont localisés dans la matrice régulent présynaptiquement la libération de dopamine dans les striosomes et la matrice du striatum. Si une régulation présynaptique directe médiée par des récepteurs muscariniques intervient dans les deux compartiments, des régulations indirectes résultant de la stimulation de récepteurs de type nicotinique et muscarinique existent également dans la matrice. Celle mettant en jeu des récepteurs nicotiniques est facilitatrice alors que celle faisant intervenir des récepteurs muscariniques est inhibitrice et nécessite la présence de neurones utilisant la dynorphine.

Cette année, nous avons montré que la dynorphine, impliquée dans le contrôle indirect inhibiteur de l'effet de l'acétylcholine sur la libération de dopamine dans la matrice, agit sur des récepteurs opiacés de type kappa localisés sur les terminaisons dopaminergiques non seulement dans la matrice, mais également dans les striosomes. En effet, dans les deux compartiments, la libération de $^3\text{H-DA}$ évoquée par l'acétylcholine en présence de TTX est inhibée par les agonistes des récepteurs de type kappa ; la dynorphine ($1\mu\text{M}$) ou le U50488 ($1\mu\text{M}$, agoniste spécifique kappa), l'effet du U50488 étant aboli par la naloxone ($1\mu\text{M}$, antagoniste opiacé).

Par ailleurs, deux zones matricielles ont été décrites pharmacologiquement. En effet les neurones utilisant la dynorphine ou le GABA sont impliqués de manière distincte dans l'effet inhibiteur indirect de l'acétylcholine sur la libération de dopamine au niveau de deux zones matricielles très proches. Dans la première, décrite précédemment, contrairement à la bicuculine, la naloxone s'oppose à l'effet inhibiteur induit par l'acétylcholine. Dans la seconde, la naloxone est sans effet alors qu'en présence de bicuculine ($50\mu\text{M}$, antagoniste GABAergique), l'action transitoire de l'acétylcholine se transforme en un effet stimulateur de longue durée. De plus, dans cette zone, la TTX est sans effet sur la libération transitoire de dopamine évoquée par l'acétylcholine. Ceci suggère la présence de récepteurs cholinergiques sur des terminaisons GABAergiques en contact avec des terminaisons dopaminergiques (C. Gauchy, M. Desban, M.L. Kemel).

3.2.2. Rôle des systèmes glutamatergiques cortico-striataux dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine au niveau des striosomes et de la matrice du striatum chez le rat

Les neurones cortico-striataux innervent de manière distincte les compartiments striataux ; les neurones originaires des couches profondes du cortex frontal innervent les striosomes alors que ceux des couches superficielles des cortex moteur et sensori-moteur innervent la matrice. Précédemment, nous avons montré que le NMDA module *in vitro* la libération de dopamine en agissant sur des récepteurs localisés d'une part sur les terminaisons dopaminergiques et d'autre part, sur des neurones striataux.

Une étude autoradiographique utilisant la fixation de la ^3H -naloxone sur son site opiacé du type mu (visualisant ainsi le compartiment striosomal) nous a permis de définir sur des coupes frontales et sagittales de striatum de rat, des zones enrichies en striosomes ou en matrice. Sur les coupes frontales, la zone enrichie en striosomes est localisée dans les coupes antérieures, la zone matricielle est postérieure et latérale ; sur des coupes sagittales, la zone enrichie en striosomes correspond à la partie antérieure du striatum sur les coupes médianes, la zone matricielle étant particulièrement étendue au centre de la structure dans les coupes les plus latérales.

Les effets du NMDA sur la libération de dopamine ont été reconsidérés en fonction de cette hétérogénéité. L'application locale *in vitro* de NMDA ($50\mu\text{M}$) dans la matrice (coupes sagittale et frontale) provoque une augmentation très importante (270 %) de la libération de dopamine alors que ce même traitement dans des zones enrichies en striosomes induit une plus faible stimulation de la libération du médiateur (160 %). Cette différence dans les amplitudes de réponse est maintenue en présence de concentrations variables de glycine ($1\mu\text{M}$ ou $100\mu\text{M}$). Par ailleurs, l'application de NMDA en présence de TTX augmente de façon identique la libération de dopamine (150 %) dans les différentes zones striosomales et matricielles analysées, suggérant une similitude de l'effet présynaptique direct du NMDA sur la libération de dopamine dans les deux compartiments. Ainsi, l'action du NMDA semble être principalement directe (insensible à la TTX) dans les striosomes alors que dans la matrice, l'effet du NMDA est en grande partie sensible à la TTX et met donc en jeu des circuits neuronaux (M.O. Krebs, M.L. Kemel, C. Gauchy, F. Trovero, M. Desban).

3.2.3. Couplage de certains récepteurs à l'activité de l'adénylate cyclase au niveau des striosomes et de la matrice du noyau caudé chez le rat

La densité de certains récepteurs étant distincte dans les striosomes et la matrice du striatum, leur couplage ou non à l'activité de l'adénylate cyclase a été analysé en mesurant la formation de l'AMPc dans des zones enrichies en striosomes ou en matrice. Celles-ci ont été prélevées (technique des « micro-

punchs ») en fonction des données anatomiques précédentes sur des coupes sagittales de rat (250 μ M, épaisseur).

Rôle des récepteurs noradrénergiques : L'isoprotérénol (10 μ M, agoniste des récepteurs β -noradrénergiques, ISO) stimule l'activité de l'adénylate cyclase dans la matrice (450 %) et dans les striosomes (250 %). L'effet plus prononcé observé dans la matrice est partiellement indirect puisqu'il est réduit (40 %) en présence de TTX (1 μ M). La methoxamine (100 μ M, agoniste des récepteurs α -noradrénergiques) appliquée seule est sans effet sur l'activité de l'adénylate cyclase. Toutefois, elle inhibe (40 %) la stimulation induite par l'ISO uniquement dans la matrice. Cet effet de la methoxamine est indirect puisque totalement sensible à la TTX. De plus, la somatostatine (1 μ M, localisée principalement dans la matrice) inhibe (40 %) la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase évoquée par l'ISO dans la matrice et cet effet semble être direct puisqu'il persiste en présence de TTX. Les effets de la methoxamine et de la somatostatine n'étant pas additifs, la methoxamine pourrait agir par l'intermédiaire des interneurons riches en somatostatine.

Rôle des récepteurs opiacés : Le couplage des récepteurs opiacés de type mu à l'activité de l'adénylate cyclase a été montré sur des cellules striatales en culture prélevées au stade embryonnaire E15. Toutefois, cet effet n'est pas retrouvé au niveau du striatum adulte. Ceci pourrait être lié à la présence unique de striosomes riches en récepteurs opiacés de type mu au stade embryonnaire (E15) (la matrice apparaissant plus tard au cours du développement) et au faible volume (25 %) du compartiment striosomal au stade adulte. Confirmant cette hypothèse, le DAGO (agoniste des récepteurs mu) inhibe de façon concentration-dépendante (1 μ M à 0,1nM) la stimulation de l'activité de l'adénylate cyclase évoquée par l'ISO uniquement dans le compartiment striosomal et cet effet est totalement antagonisé par la naloxone. Par contre le BUBU (0,1 μ M, agoniste des récepteurs opiacés de type delta) réduit (35 %) l'effet de l'ISO dans les deux compartiments ce qui est en accord avec la distribution diffuse de ces récepteurs dans le striatum (M. Bouvier, M.L. Kemel, J. Prémont).

3.2.4. *Etude in vitro de la libération de dopamine à partir des dendrites proximaux et distaux dans la substance noire du chat*

Dans une étude précédente, nous avons montré que les dendrites dopaminergiques proximaux (pars compacta SNC) et distaux (pars reticulata, SNR) de la substance noire représentent des unités fonctionnelles distinctes. La sensibilité de notre technique de perfusion *in vitro*, nous a incité à analyser les mécanismes de régulation de la libération de dopamine au niveau de la SNC et de la SNR, ainsi que le rôle des différentes afférences nigrales dans le contrôle direct ou indirect de la libération dendritique de dopamine chez le chat.

La libération dendritique de $^3\text{H-DA}$ (synthétisée à partir de $^3\text{H-tyrosine}$) est considérablement augmentée dans la SNC et la SNR lors d'une application d'amphétamine ($1\mu\text{M}$, 400 % SNC, 350 % SNR) alors qu'elle semble inchangée en présence de TTX. Outre les afférences striato-nigrales qui utilisent le GABA, les tachykinines et/ou la dynorphine, la substance noire reçoit un contrôle excitateur (peut être glutamatergique) en provenance du noyau subthalamique. L'application de NMDA ($50\mu\text{M}$) dans un milieu dépourvu de Mg^{2+} , entraîne une stimulation de la libération de $^3\text{H-DA}$ (460 % pour la SNC, 500 % pour la SNR) qui peut être bloquée par le MK801 ($1\mu\text{M}$, antagoniste spécifique du récepteur NMDA) (M.L. Kemel, C. Gauchy, M. Desban).

4. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MESOCORTICAUX ET MESOLIBMIQUES

4.1. *Etudes biochimiques et comportementales* (Responsable de l'équipe : J.P. Tassin)

4.1.1. *Rôle des neurones dopaminergiques mésocorticaux dans le blocage comportemental induit par des événements contrôlés et incontrôlés chez le rat*

Trois semaines après la destruction spécifique de l'innervation dopaminergique corticale, nous avons montré que des événements contrôlés (tests de boisson ou de nourriture associés à une punition) sont modifiés alors que des événements non contrôlés (test de nage forcée et de désespoir acquis à l'occasion d'un traitement antidépresseur) ne le sont pas. En effet, la destruction de l'innervation dopaminergique mésocorticale entraîne une augmentation du nombre de punitions reçues dans les deux premiers tests alors que les effets d'un traitement antidépresseur ne sont pas modifiés par cette lésion. Ces résultats suggèrent non seulement que les neurones dopaminergiques mésocorticaux interviennent spécifiquement sur les comportements « contrôlables » mais aussi que leur lésion semble associée à un comportement de persévération (D. Hervé et J.P. Tassin en collaboration avec S. Ravard, . Carnoy, M.H. Thiébot et P. Soubrié).

4.1.2. *Rôle permissif de l'innervation noradrénergique corticale sur l'effet de « blocage comportemental » de la destruction des neurones dopaminergiques mésocorticaux*

Les résultats que nous venons de décrire (test de nourriture ou de boisson associés à une punition) ont été comparés avec ceux obtenus chez des rats dont l'innervation noradrénergique corticale n'a pas été protégée lors de l'injection de 6-OHDA effectuée dans le cortex préfrontal afin de détruire l'innervation dopaminergique. Les animaux lésés dépourvus des deux innerva-

tions catécholaminergiques ont présenté des comportements identiques à ceux des contrôles non opérés. L'effet anxiolytique du diazepam (2 mg/kg) sur ces trois groupes d'animaux (contrôles, sans innervation dopaminergique et noradrénergique) est identique. Ces résultats suggèrent que l'effet anxiolytique du diazepam n'est probablement pas médié par ces faisceaux catécholaminergiques mais que l'effet anxiolytique de la lésion des faisceaux dopaminergiques mésocorticaux nécessite la présence des neurones noradrénergiques (D. Hervé et J.P. Tassin, en collaboration avec S. Ravard, M.H. Thiébot et P. Soubrié). Cette interrelation entre les neurones dopaminergiques et noradrénergiques ascendants peut être rapprochée de résultats obtenus précédemment tant au niveau de la régulation des récepteurs D1 corticaux par les récepteurs $\alpha 1$ noradrénergiques que sur des comportements liés à des déficits dopaminergiques (hyperactivité locomotrice et disparition de l'alternance spontanée).

4.1.3. Actions différentielles de la nicotine et de la morphine sur les neurones dopaminergiques ascendants

L'injection aiguë de nicotine augmente l'utilisation de dopamine (DOPAC/DA) dans le noyau accumbens et le striatum anteromedian, mais n'a pas d'effet dans le striatum dorso-latéral. Des injections répétées de nicotine diminuent et font disparaître les effets observés dans les structures sous-corticales. Au contraire, l'utilisation de dopamine dans le cortex préfrontal, faiblement accrue lors de la première injection, est de plus en plus augmentée au fur et à mesure des injections.

L'injection aiguë de morphine produit une augmentation très importante de l'utilisation de dopamine dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal. Contrairement à ce qui est observé dans le cas des injections répétées de nicotine, des injections chroniques de morphine augmentent l'effet sur l'utilisation de dopamine dans le noyau accumbens et le diminuent dans le cortex préfrontal.

Compte tenu des différences qualitatives et quantitatives observées sur les phénomènes de sensibilisation comportementale (en particulier sur l'activité locomotrice), il est possible que la nicotine exerce ses effets comportementaux en modifiant l'activité de neurones non dopaminergiques ou par l'intermédiaire de neurones dopaminergiques projetant dans d'autres structures du système limbique telles que le septum ou l'amygdale (P. Vésina, G. Blanc et J. Tassin).

4.1.4 Modifications à moyen terme de la transmission dopaminergique dans le noyau accumbens à la suite du blocage des récepteurs dopaminergiques de type D1 dans le cortex préfrontal

Une injection bilatérale de SCH 23390, un antagoniste des récepteurs D1, dans le cortex préfrontal entraîne 48 h plus tard : 1) une baisse de l'hyperacti-

vité locomotrice induite par une injection bilatérale d'amphétamine dans le noyau accumbens ; 2) une augmentation de l'hyperactivité locomotrice induite par une injection bilatérale de SKF 38393, un agoniste des récepteurs D1 ; 3) une augmentation (30 %) de l'activité adénylate cyclase sensible à la dopamine dans le noyau accumbens (P. Vézina, G. Blanc et J.P. Tassin).

4.1.5. Augmentation des récepteurs mu-opiacés dans le striatum et le noyau accumbens par des injections répétées d'amphétamine

Contrairement à ce qui avait été proposé par d'autres auteurs, nous avons montré précédemment que les récepteurs mu-opiacés ne sont pas localisés sur les terminaisons dopaminergiques nigrostriatales. En effet, la réduction de la densité de ces récepteurs (30 %) dans le striatum induite par la lésion des fibres dopaminergiques nigro-striatales résulte de l'interruption de la transmission dopaminergique qui intervient dans la régulation des récepteurs mu-opiacés. Nous venons de montrer, par autoradiographie quantitative, en utilisant de la naloxone tritiée, que l'activation chronique de la transmission dopaminergique obtenue par un traitement à l'amphétamine augmente la densité (40 %) des récepteurs mu-opiacés dans le striatum et le noyau accumbens. Ce résultat confirme l'existence d'une hétéro-régulation des récepteurs mu-opiacés par les fibres dopaminergiques (P. Vézina, F. Trovero, D. Hervé et J.P. Tassin).

4.1.6. Accrochage membranaire d'une population de récepteurs muet delta-opiacés par un groupement phosphatidyl-inositol

Selon les données pharmacologiques actuelles, plusieurs sous-types de récepteurs opiacés peuvent être distingués (mu, delta et kappa). Les études biochimiques mettant en évidence l'existence d'un couplage entre les récepteurs de type mu et delta et l'adénylate cyclase suggèrent l'existence de 7 segments transmembranaires dans la structure protéique de ces récepteurs. Cependant, les premières données de l'analyse moléculaire des protéines liant les opiacés ne révèlent pas ce type de domaine transmembranaire mais suggèrent plutôt un ancrage à la membrane par un groupement phosphatidyl-inositol. Cette hypothèse a été testée en appréciant la sensibilité de ces sites à l'action d'une phosphatidyl-inositol-phospholipase C (PIPLC). Un tel traitement provoque une baisse importante (40-60 %) de la fixation de ligands spécifiques aux sites opiacés mu et delta sur des coupes et des préparations membranaires de striatum et de thalamus de rat. Cette dégradation enzymatique n'affecte pas d'autres types de sites comme l'indique des expériences parallèles réalisées en présence de ligands spécifiques d'autres récepteurs tels que le SCH 23390 tritié (récepteur D2) ou la neurotensine iodée. L'ensemble de ces résultats semble indiquer l'existence d'une population spécifique de sites de liaison aux opiacés attachés à la membrane par un groupement phosphatidyl-inositol (F. Trovero, M. Lévy).

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

4.2.1. *Etude pharmacologique de l'influence du système dopaminergique mésocortical sur l'activité des neurones du cortex préfrontal*

Le cortex préfrontal reçoit une innervation dopaminergique issue de l'aire tegmentale ventrale (AVT) et des afférences noradrénergiques originaires du locus coeruleus, dont les fibres traversent la région dorsale de l'AVT. D'autre part, l'application iontophorétique de dopamine ou de noradrénaline inhibe l'activité des cellules corticales. Précédemment, nous avons montré que la stimulation de l'AVT induit une inhibition de l'activité spontanée des neurones du cortex préfrontal chez le rat anesthésié avec de la kétamine. Cet effet est lié à l'activation du système dopaminergique et non des fibres noradrénergiques ascendantes : l'inhibition induite par la stimulation de l'AVT persiste lorsque les différents types de récepteurs noradrénergiques sont bloqués par l'application iontophorétique des antagonistes de ces récepteurs : propranolol (β), prazosin (α_1) ou yohimbine (α_2).

D'autre part, les réponses inhibitrices induites par la stimulation de l'AVT ou l'application locale de dopamine sont supprimées par l'application iontophorétique des antagonistes sélectifs de récepteurs dopaminergiques de type D2-D4 ((-)-sulpiride, LUR 2366, RIV 2093). Ces effets inhibiteurs ne sont pas affectés par le (+)sulpiride, isomère inactif du sulpiride, ou le SCH 23390, antagoniste sélectif des récepteurs D1. Enfin, l'application iontophorétique d'un agoniste des récepteurs D2 (quinpirole) induit une inhibition de l'activité spontanée des cellules du cortex préfrontal, alors que celle d'un agoniste de type D2 (SKF 38393) est sans effet. En conclusion, le récepteur dopaminergique impliqué dans les réponses inhibitrices induites par la stimulation de l'AVT ou l'application de dopamine dans le cortex préfrontal possède les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs dopaminergiques de type D2 ou D2-D4 (J. Mantz, S. Pirot, A.M. Thierry).

4.2.2. *Influence de la projection de l'hippocampe sur le cortex préfrontal*

Pendant ces dernières années, nous avons mis en évidence l'existence d'une projection directe de la région CA1/Prosubiculum de l'hippocampe sur l'aire prélimbique du cortex préfrontal. La stimulation électrique de la région CA1 ou du prosubiculum induit une réponse excitatrice dans le cas de 42 % des cellules testées dans l'aire prélimbique chez le rat anesthésié avec du nembutal. La latence moyenne des réponses est de 18,3 ms. L'application de doubles chocs espacés de 40 à 200 ms entraîne une facilitation de ces réponses. Enfin la stimulation (0,03 Hz) de la région CA1/prosubiculum induit au niveau de l'aire prélimbique un potentiel de champ stable comprenant une faible onde positive suivie d'une importante onde négative, la latence du pic négatif étant de 19,4 ms. Après application d'une stimulation tétanique, l'amplitude de la composante négative du potentiel de champ évoqué par la stimulation test

(0.03 Hz) est augmentée (64 %) pendant au moins une heure. La mise en évidence d'une potentialisation à long terme de la transmission synaptique au niveau du cortex préfrontal de la projection de l'hippocampe sur cette structure devrait faciliter l'analyse du rôle des relations hippocampo-corticales dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (T. Jay, A.M. Thierry en collaboration avec S. Laroche).

PUBLICATIONS

KREBS M.-O., KEMEL M.L., GAUCHY C., DESBAN M. & GLOWINSKI J., *Glycine potentiates the NMDA-induced release of dopamine through a strychnine-insensitive site in the rat striatum*. (Eur. J. Pharmacol., 166 : 567-570, 1989).

CHNEIWEISS H., BERETTA L., CORDIER J., BOUTTERIN M.-C., GLOWINSKI J. & SOBEL A., *Stathmin is a major phosphoprotein and cyclic AMP-dependent protein kinase substrate in mouse brain neurons but not in astrocytes in culture : regulation during ontogenesis*. (J. Neurochem., 53, 3 : 856-863, 1989).

CHAMAK B. & PROCHIANTZ A., *Influence of extracellular matrix proteins on the expression of neuronal polarity*. (Development, 106 : 483-491, 1989).

TORRENS Y., DIETL M., BEAUJOUAN J.C. & GLOWINSKI J., *Réduction par la substance P de l'accumulation initiale du myo(³H)inositol dans les cellules acineuses de la glande parotïde de rat*. (C.R. Acad. Sci., 309, III : 295-300, 1989).

DIETL M., TORRENS Y., BEAUJOUAN J.C. & GLOWINSKI J., *Substance P-induced reduction in the initial accumulation of cytosolic myo-(³H)inositol in rat parotid acinar cells mediated by the NK1 tachykinin receptor*. (J. Neurosci., 53, 5 : 1640-1643, 1989).

HOULGATE R., MALLAT M., BRACHET P. & PROCHIANTZ A., *Secretion of nerve growth factor in cultures of glial cells and neurons derived from different regions of the mouse brain*. (J. Neurosci. Res., 24 : 143-152, 1989).

KEMEL M.L., DESBAN M., GLOWINSKI J. & GAUCHY C., *Distinct presynaptic control of dopamine release in striosomal and matrix areas of the cat caudate nucleus*. (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86 : 9000-9010, 1989).

JAY T.M., GLOWINSKI J. & THIERRY A.M., *Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat*. (Brain Res., 505 n° 2 : 337-340, 1989).

SOBEL A., BOUTTERIN M.C., BERETTA L., CHNEIWEISS H., DOYE V. & PEYRO-SAINT PAUL H., *Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin)*. (J. Biol. Chem., 264 n° 7 : 3765-3772, 1989).

HERVE D., TROVERO G., BLANC G., THIERRY A.M., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Non-dopaminergic prefrontocortical efferent fibers modulate DA receptor denervation supersensitivity in specific regions of the rat striatum.* (J. Neurosci., 9, n° 11 : 3699-3708, 1989).

BEAUJOUAN J.C., DAGUET DE MONTETY M.C., TORRENS Y., SAFFROY M., DIETL M. & GLOWINSKI J., *Marked regional heterogeneity of ¹²⁵I-Bolton Hunter substance P binding and substance P-induced activation of phospholipase C in astrocyte cultures from the embryonic or newborn rat.* (J. Neurochem., 54 n° 2 : 669-675, 1990).

ROUSSELET A., AUTILLO-TOUATI A., ARAUD D. & PROCHIANTZ A., *In vitro regulation of neuronal morphogenesis and polarity by astrocyte-derived factors.* (Dev. Biol., 137 : 33-45, 1990).

BARBEITO L., CHERAMY A., GODEHEU G., DESCE J.M. & GLOWINSKI J., *Glutamate receptors of a quisqualate-kainate subtype are involved in the presynaptic regulation of dopamine release in the cat caudate nucleus in vivo.* (The Eur. J. Neurosci., 2 n° 4 : 304-311, 1990).

EVRRARD C., BORDE I., MARIN P., GALIANA E., PREMONT J., GROS F. & ROUGET P., *Immortalization of biopotential and plastic glio-neuronal precursor cells.* (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87 : 3062-3066, 1990).

AYALA J., TOUCHOT N., ZAHRAOUI A., TAVITIAN A. & PROCHIANTZ A., *The product of rab2, a small GTP binding protein, increases neuronal adhesion, and neurite growth in vitro* (Neuron, 4, 797-805, 1990).

THERY C., HETIER E., EVRRARD C. & MALLAT M., *Expression of macrophage colony-stimulating factor gene in the mouse brain during development* (J. Neurosci. Res., 26, 1, 129-133, 1990).

HERVE D., TROVERO F., BLANC G., VEZINA P., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Involvement of dopamine neurons in the regulation of 3-adrenergic receptor sensitivity in rat prefrontal cortex* (J. Neurochem., 54, 6, 1864-1869, 1990).

SERVAL V., BARBEITO L., PITTALUGA A., CHERAMY A., LAVIELLE S. & GLOWINSKI J., *Competitive inhibition of N-acetylated-a linked acidic dipeptidase activity by N-acetyl-L-aspartyl-B-linked L-glutamate.* (J. Neurochem., 55, 1, 39-46, 1990).

LAROCHE S., JAY T.M. & THIERRY A.M., *Long term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region* (Neurosci. Lett., 114, 2, 184-190, 1990).

Différents chercheurs ont présenté leurs travaux dans les congrès suivants :

GLOWINSKI J., MAUS M. & PREMONT J., *In vitro effects of 17 β - α estradiol on the sensitivity of receptors coupled to adenylate cyclase on striatal neurones in primary culture. Steroids and Neuronal activity, Ciba Foundation Symposium n° 153, Londres, UK, 22-25/01.90.*

CHERAMY A., *Nerve activity and presynaptic mechanisms in the control of the in vivo release of dopamine in the cat caudate nucleus*. Winter Conference on Brain Research, Vail, USA, 27/01-03/02.90.

GIAUME C., CORDIER J., PREMONT J. & GLOWINSKI J., *Adrenergic regulation of gap junctions permeability between mouse brain astrocytes in primary culture*. 10th EWCBR, Les Arcs, 03-10/03.90.

GAUCHY C., KEMEL M.L., DESBAN M., KREBS M.O., & GLOWINSKI J., *Contrôle de la libération de dopamine par les récepteurs opiacés de type kappa au niveau des compartiments striataux*. Colloque des Noyaux Gris Centraux, Hyères, 29-31/03.90.

THIERRY A.M., MANTZ J., GODBOUT R. & GLOWINSKI J., *Rôle des systèmes monoaminergiques corticaux*. Colloque des Noyaux Gris Centraux, Hyères, 29-31/03.90.

THIERRY A.M., JAY T. & LAROCHE S., *Tetanic stimulation of the hippocampal CA1/subicular region induces long-term potentiation in the prefrontal cortex*. « *Neural mechanisms of Learning and Memory* », ESF, Londres, 4-6/04/90.

J. GLOWINSKI, *Pharmacological properties of astrocytes. Heterogeneity and functional application*. Swammerdam Lecture, Amsterdam, 10 mai 1990.

DESCE J.M., GODEHEU G., CHERAMY A., & GLOWINSKI J., *Different types of glutamate receptors contribute to the presynaptic regulation of dopamine release from synaptosomes of the rat striatum*. « *Excitatory Amino Acids 1990* », Padoue, 21-26/05/90.

KREBS M.O., KEMEL M.L., DESBAN M., GLOWINSKI J. & GAUCHY C., *Involvement of NMDA receptors in the presynaptic regulation of dopamine release in striosomal- and matrixenriched areas of the rat striatum*. « *Excitatory Amino Acids 1990* », Padoue, 21-26/05/90.

JAY T., THIERRY A.M., GLOWINSKI J. & WIKLUND L., *Excitatory amino acids as possible transmitters in hippocampal projections to prelimbic cortex investigated with D-(³H)aspartate retrograde labelling*. « *Excitatory Amino Acids 1990* », Padoue, 21-26/05/90.

GLOWINSKI J., EL. ETR M., MARIN P., DELUMEAU C., PREMONT J., *Neuro-glial cooperativity and pharmacological heterogeneity of astrocytes. Cerebral Circulation and Metabolism and the Biology of Mental Illness*, Bethesda, USA, 08-09/06/90.

DESCE J.M., GODEHEU G., CHERAMY A. & GLOWINSKI J., *Presynaptic regulation of dopamine release from synaptosomes of the rat striatum is controlled by different types of glutamate receptors*. Int. Symp. Presynaptic Receptors & Neuronal transporters, Rouen, 26-29/06/90.

TROVERO F., HERVE D., DESBAN M., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Striatal opiate mu-receptors are not located on dopamine nerve endings in the rat*. Int. Symp. Presynaptic Receptors & Neuronal transporters, Rouen, 26-29/06/90.

GLOWINSKI J., DESCE J.M., KREBS M.O., CHERAMY A., KEMEL M.L. & GAUCHY C., *Direct and indirect glutamatergic and cholinergic presynaptic regulation of dopamine release in the striatum : towards and analysis of local circuits*. Int. Symp. Presynaptic Receptors & Neuronal transporters, Rouen, 26-29/06/90.

KREBS M.O., KEMEL M.L., DESBAN M., GLOWINSKI J. & GAUCHY C., *Involvement of NMDA receptors in the presynaptic regulation of dopamine release in striosomal- and matrixenriched areas of the rat striatum*. Int. Symp. Presynaptic Receptors & Neuronal transporters, Rouen, 26-29/06/90.

BLANC G., TROVERO F., VEZINA P., HERVE D., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Contribution of alpha-adrenergic receptors to the behavioural expression of the « VTA syndrom »*. 3rd EBPS Meeting, Noordwijkerhout, Pays-Bas 27/06-01/07 90.

MAUS M., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *8-Bromo cyclic AMP differently regulates astrocytic Go,i proteins depending on the cell culture conditions*. XIth Int. Cong. Pharmacology, IUPHAR, Amsterdam, Hollande, 1-6/07/90.

GAUCHY C., DESBAN M., KREBS M.O., GLOWINSKI J. & KEMEL M.L., *Involvement of K-opioid receptors in the direct and indirect presynaptic control of dopamine release by ACh in striosomal and matrix compartments of the cat caudate nucleus*. XIth Int. Cong. Pharmacology, IUPHAR, Amsterdam, Hollande, 1-6/07/90.

MANTZ J., GODBOUT R., PIROT S., GLOWINSKI J., THIERRY A.M., *Inhibitory effect of mesocortical dopaminergic neuronson their target cells : electrophysiological and pharmacological characterization*. « Dopamine 90 », Satellite Meeting XIth Int. Congress of Pharmacology, 08-11/07/90.

HERVE D., TROVERO F., PIAZZA P.V., AMATO G., BLANC G., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Contribution of the mesocortical dopamine pathway to the control of D1 receptor denervation supersensitivity in the rat striatum*. Europ. Conf. on Parkinson's disease and extrapyramidal disorders, Rome, Italie, 10-14/07/90.

TORRENS Y., DIETL M., BEAUJOUAN J.C. & GLOWINSKI J., *Myo-inositol uptake in parotid gland : a selective bioassay for NK1 receptors. Substance P and Related Peptides*. Int. Symposium, Worcester, Mass. USA, 18-21/07/90.

DELUMEAU C., PETITET F., BEAUJOUAN J.C., PREMONT J. & GLOWINSKI J., *Increased cytosolic calcium by activation of NK1 receptors on mouse cortical astrocytes in primary culture : potentiation by 2-chloro-adenosine. Substance P and Related Peptides*. Int. Symposium, Worcester, Mass. USA, 18-21/07/90.

THERY C., HETIER E., EVRARD C., CHAMAK B. & MALLAT M., *Detection of macrophage colony-stimulating factor mRNA in the developing mouse brain*. Eur. Sty Neurochem., 8th General Meeting, Leipzig, 23-27/07/90.

DELUMEAU C., MARIN P., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *2-Chloroadenosine prolongs the cytosolic Ca⁺⁺ increase evoked by alpha-adrenergic agonists via a mechanism involving arachidonic acid on striatal astrocytes*. Eur. Sty Neurochem., 8th General Meeting, Leipzig, 23-27/07/90.

MARIN P., DELUMEAU C., EL ETR M., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Potentiating effects of 2-chloroadenosine and somatostatin on alpha-sensitive phospholipase C in striatal astrocytes*. Eur. Sty Neurochem., 8th General Meeting, Leipzig, 23-27/07/90.

DIETL M., TORRENS Y., GLOWINSKI J. & BEAUJOUAN J.C., *Mechanism of myo-inositol uptake in rat paritod acinar cells : control by substance P*. Eur. Sty Neurochem., 8th General Meeting, Leipzig, 23-27/07/90.

LISTE DES DIPLÔMÉS - 1989-1990

MARIN Philippe (sous la direction de J. Prémont)

Régulation de la synthèse de l'AMPc par des récepteurs non couplés à l'adénylate cyclase.

— DEA de Pharmacologie moléculaire et cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 89.

GALLI Thierry (sous la direction de A. Chéramy)

N-Acetyl-Aspartyl-Glutamate (NAAG) : Effets de lésions sur les taux de NAAG endogène dans différentes structures cérébrales.

— DEA de Pharmacologie moléculaire et cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 89.

LAFONT Frank (sous la direction de A. Prochiantz)

Influence des molécules de la matrice extracellulaire sur la morphogenèse neuronale in vitro.

— DEA de Pharmacologie moléculaire et cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 89.

KREBS Marie-Odile :

Systèmes glutamatergiques et pathologies neuro-psychiatriques.

Thèse de Médecine, soutenue le 25 avril 1990.

MAUS Marion :

Etudes des régulations par les œstrogènes des propriétés fonctionnelles de certains récepteurs de neuromédiateurs couplés à des protéines G de transduction dans le striatum. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, soutenue le 3 mai 1990.