

Neuropharmacologie

M. Jacques GLOWINSKI, professeur

Le cours de cette année a été consacré aux ganglions de la base : nouveaux horizons. Trois grands problèmes complémentaires ont été abordés : 1) l'organisation fonctionnelle des ganglions de la base en systèmes parallèles distribués ; 2) le rôle des voies directe et indirecte d'origine striatale qui interviennent dans la régulation des neurones pallidiaux et nigraux efférents en prenant comme référence le circuit moteur des ganglions de la base ; 3) les données récentes sur la compartimentalisation du striatum, c'est à dire l'organisation des réseaux striosomal et matriciel.

En ce qui concerne l'organisation fonctionnelle globale des ganglions de la base, nous nous sommes tout d'abord attachés à distinguer la théorie de l'organisation dite en « entonnoir » proposée à la suite des travaux de Kemp et Powel, et celle des circuits distribués parallèles élaborée par Alexander, Delong et leurs collaborateurs. Cinq circuits cortico-striato-pallido- (ou nigro)-thalamo-corticaux ont été décrits : moteur, oculo-moteur, préfrontal-dorso-latéral, orbito-frontal latéral et limbique, en insistant sur leurs propriétés communes et leurs particularités en fonction de données anatomiques, électrophysiologiques ou comportementales. Des aspects particuliers de l'organisation des ganglions de la base ont ensuite été envisagés. Certaines des propriétés des connexions cortico-striatales et thalamo-striatales ont tout d'abord été évoquées en soulignant l'hétérogénéité de leur distribution puis celles des connexions afférentes et efférentes du pallidum, de la substance noire, du noyau sous-thalamique et enfin du noyau pédonculo-pontin ont été analysées précisément.

Au sein de chacun des circuits des ganglions de la base des voies directe et indirecte d'origine striatale interviennent dans la régulation de l'activité des neurones pallidiaux et nigraux efférents. Ces voies ont été décrites en tenant compte des médiateurs qu'elles contiennent (GABA, neuropeptides) et du rôle primordial du noyau sous-thalamique et de ses neurones glutamatergiques efférents dans la voie indirecte. Ces voies directe et indirecte exercent des effets opposés sur l'activité des neurones nigro-thalamiques ou pallido-thalami-

ques et sont soumises à des régulations distinctes par les neurones nigro-striataux dopaminergiques. Ceci nous a conduit à envisager les rôles respectifs des régulations liées à la présence des récepteurs D1 sur les neurones striataux de la voie directe et des récepteurs D2 sur ceux de la voie indirecte. Des modèles animaux de troubles moteurs ont permis de mieux préciser les contributions respectives de ces voies dans le contrôle des messages délivrés à certains noyaux thalamiques et les dysfonctionnements intervenant dans la maladie de Parkinson et les déficits de type choréique. Dans ce cadre, nous nous sommes également intéressés à des données pharmacologiques récentes permettant d'envisager l'utilisation des antagonistes NMDA dans le traitement de la maladie de Parkinson. Enfin, l'ensemble de ces données fonctionnelles a été complété par un rappel des données anatomiques ultrastructurales et électrophysiologiques éclairant sous un autre angle les modalités d'organisation des voies directe et indirecte.

La présence de réseaux striosomal et matriciel et l'hétérogénéité du réseau matriciel dans le striatum représentent un nouveau degré de complexité d'organisation des ganglions de la base. C'est ce que nous nous sommes efforcés de démontrer en nous référant à plusieurs travaux de A. Graybiel, C. Gerfen et leurs collaborateurs, travaux qui ont été déterminants dans l'évolution de nos connaissances sur les compartiments striataux. Ce nouveau domaine d'investigation en plein développement n'aurait pu être abordé sans un rappel historique préalable, dévoilant la progression des idées et des concepts. Nous nous sommes ensuite attachés à décrire successivement les marqueurs biochimiques, puis les trajectoires des afférences et des efférences permettant de distinguer les compartiments striataux. Ce parcours nous a obligatoirement amené à aborder le problème de l'innervation dopaminergique des populations cellulaires contenues dans les striosomes et la matrice, et celui des relations entre ces compartiments pour arriver enfin succinctement à une description de leurs rôles respectifs dans le traitement des messages originaires des sphères cognitives, limbiques et sensori-motrices.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE
(INSERM U.114)

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

*1. INTERACTIONS CELLULAIRES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT
DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL*

1.1. ÉTUDE DES FONCTIONS ET DE LA DIFFÉRENCIATION DES CELLULES
MICROGLIALES (Responsable de l'équipe : Michel Mallat)

1.1.1. Interactions entre les cellules microgliales et les neurones

a. Neurotoxicité des macrophages cérébraux

Nous avons précédemment observé que l'addition de macrophages cérébraux dans des cultures de neurones embryonnaires de rat entraîne dans un délai de 24 heures une mort neuronale ou des rétractions de neurites ; la neurolyse étant due à une production macrophagique de composés oxygénés toxiques tel que l'ion superoxyde et l'eau oxygénée. Cette année, nous avons étudié la spécificité de cette neurotoxicité microgliale. Les neurones issus du système nerveux immature se sont révélés beaucoup plus sensibles que les astrocytes à des doses croissantes d'eau oxygénée. De plus, les concentrations d'eau oxygénée nécessaires pour détruire les astrocytes cultivés *in vitro* (EC50 = 100 μ M) sont aussi incompatibles avec la survie des macrophages cérébraux. Les neurones embryonnaires sont donc des cibles privilégiées pour une agression microgliale fondée sur la production de composés oxygénés. La mort neuronale observée en présence des macrophages cérébraux ne traduit pas une propriété spécifique des phagocytes du système nerveux central. En particulier, dans les mêmes conditions expérimentales, des macrophages d'origine péritonéale détruisent des neurones embryonnaires selon un même mécanisme moléculaire.

Par ailleurs, en utilisant une méthode cytochimique de détection de l'ion superoxyde, nous avons montré que la production macrophagique de ce composé est stimulée en présence de neurones embryonnaires et que cette stimulation nécessite un contact membranaire entre les neurones et les macrophages cérébraux. Nous tentons actuellement de caractériser les molécules de surface impliquées dans cette stimulation. Des inhibitions significatives de la neurotoxicité microgliale observées en présence de mono- ou disaccharides incorporés dans le milieu de culture suggèrent que les interactions entre les macrophages et les neurones impliquent des récepteurs membranaires de type lectine. L'ensemble de ces observations est en faveur d'une participation active des macrophages cérébraux aux événements régressifs de la neurogenèse (C. Théry, B. Chamak, M. Mallat).

b. Sécrétion de facteurs neurotrophiques par les macrophages cérébraux

La neurotoxicité des macrophages cérébraux est une activité régulée, son expression *in vitro* étant suscitée par des facteurs d'origine neuronale comme nous l'avons envisagé précédemment (cf ci-dessus). Cette activité n'exclut pas, à priori, d'autres modalités d'interaction entre les macrophages et les neurones centraux. En particulier, la présence de macrophages dans des structures cérébrales très immatures nous a incité à rechercher l'influence de ces cellules sur des événements précoces de la neurogenèse. Les effets de milieux de culture préalablement conditionnés par des macrophages cérébraux sur des précurseurs de cellules nerveuses issus de diverses régions cérébrales et ense-

mencés *in vitro* à faible densité cellulaire ont donc été étudiés. Les premières données indiquent que les macrophages cérébraux sécrètent des facteurs solubles qui stimulent la différenciation de précurseurs neuronaux, celle-ci étant évaluée selon des critères morphologiques (émission et croissance de neurites, expression de marqueurs de lignage détectés par immunocytochimie et quantifiés par ELISA) (B. Chamak, M. Mallat).

1.1.2. Différenciation des cellules microgliales

a. Influence des protéines de la matrice extracellulaire sur la différenciation des cellules microgliales

Nous avons montré l'an dernier que la fibronectine ajoutée dans des cultures de macrophages cérébraux entraîne une différenciation des cellules en un phénotype très évocateur de la microglie ramifiée observée dans le cerveau adulte (involution du corps cellulaire associée à la perte de diverses propriétés fonctionnelles et émission de longs prolongements). Les modifications du cytosquelette qui accompagnent cette différenciation ont donc été étudiées. Elles comportent notamment une condensation en faisceaux des filaments intermédiaires de vimentine et une réduction de l'incorporation d'ions phosphate dans la vimentine.

Ce modèle *in vitro* a permis également d'étudier la plasticité des phénotypes microgliaux. Une transformation de cellules microgliales ramifiées en macrophages a pu être observée après addition de sérum ou de laminine dans le milieu de culture. Ceci suggère une participation des cellules microgliales ramifiées au recrutement de macrophages observé lors de pathologies diverses dans le cerveau adulte (B. Chamak, M. Mallat).

b. Synthèse astrocytaire d'un facteur de croissance actif sur les cellules microgliales : le M-CSF

Ayant mis précédemment en évidence une expression du gène codant pour le M-CSF dans le système nerveux central immature, l'étude de la régulation de la production astrocytaire de ce facteur de croissance a été abordée en utilisant des cultures primaires murines ou une lignée astrocytaire immortalisée. Ainsi, des cytokines synthétisées par les macrophages cérébraux (l'interleukine 1 et le TNF) augmentent fortement les concentrations astrocytaires d'ARN messager codant pour le M-CSF. Par ailleurs, des études effectuées à l'aide d'anticorps ont démontré que la prolifération des macrophages cérébraux dans les cultures de cellules nerveuses est stimulée par la production endogène de M-CSF. Ces données sont en faveur d'un rôle du M-CSF dans la croissance de la population microgliale au cours de l'ontogénèse (C. Théry, M. Mallat).

1.2. GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES COMPARTIMENTS STRIATAUX (Responsable de l'équipe : Matthieu Lévi-Strauss)

La stratégie choisie pour l'isolement d'ARN messagers spécifiques de l'un ou l'autre 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 quinzième jour de vie embryonnaire (E15), les neurones de la matrice n'envahissent l'ébauche striatale que vers le dix-neuvième jour de vie embryonnaire (E19). Nous avons donc criblé une banque d'ADN complémentaire effectuée à partir d'ARN d'hémisphères cérébraux de souris avec, successivement, 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. Une quarantaine de clones dont l'expression est quantitativement différente à ces deux dates et qui pourraient donc correspondre à des ARN messagers spécifiques de chacune des populations cellulaires à l'origine des deux compartiments striataux ont pu être isolés.

La séquence nucléotidique de plusieurs des clones ainsi sélectionnés a tout d'abord permis d'en identifier certains comme correspondant à des ARN messagers dont l'expression était déjà connue pour être modulée au cours du développement, démontrant ainsi la validité technique de notre stratégie. Nous disposons par exemple de sondes pour la protéine « SCG10 », la stathmine, la tubuline, et la sous-unité α de la protéine G stimulant l'adénylate cyclase.

Certaines des sondes ainsi obtenues nous permettent d'aborder parallèlement d'autres aspects de l'analyse moléculaire du striatum comme par exemple l'expression de différentes sous-unités α de protéines G (en collaboration avec Denis Hervé et Jean-Antoine Girault).

Nous nous sommes surtout intéressés à deux ARN messagers, différents et tous deux inconnus, mais dont le type d'expression, analysé par « Northern Blot », est semblable. Ces deux ARN sont en effet abondants dans le système nerveux central embryonnaire où leur expression, strictement neuronale, augmente au cours du développement pour disparaître ensuite et ne persister à l'âge adulte que dans le cervelet.

Nous avons déterminé la séquence nucléotidique du plus petit de ces deux ARN messagers (2 000 pb.) qui semble coder pour une protéine d'environ 10 kDa n'appartenant à aucune famille connue. Les expériences d'hybridation « in situ » ont permis d'observer une expression très abondante dans le striatum embryonnaire à E17 que nous n'avons pu, comme prévu par les expériences de « Northern Blot », détecter dans le striatum adulte interdisant ainsi de mettre en évidence une éventuelle compartimentation de son expression. Afin de tirer partie de la plus grande sensibilité de l'immunohistochimie,

surtout marquée pour les protéines à longue demi-vie, cet ADN complémentaire a été exprimé dans *E. Coli* pour immuniser ensuite un lapin avec la protéine recombinante. Les premières expériences réalisées avec cet immun-sérum n'ont pas été très concluantes, et nous sommes en train de les répéter avec un nouvel anticorps dirigé cette fois-ci contre un peptide synthétique correspondant à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine (M. Lévi-Strauss, I. Marey-Semper, J.M. Studler).

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

2.1. COOPÉRATIVITÉ ASTRO-ASTROCYTAIRE ET ASTROCYTO-NEURONALE (Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

2.2.1. *Hétérorégulations de diverses réponses médiées par les récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques, A1 de l'adénosine et de certains peptides au niveau des astrocytes striataux*

Précédemment nous avons démontré que l'adénosine ou la somatostatine potentialisent fortement la production d'inositol phosphates induite par l'activation de récepteurs $\alpha 1$ -noradrénergiques sur des astrocytes de striatum. L'analyse du mécanisme mis en jeu dans ce processus suggère que les récepteurs de la somatostatine ou A1 de l'adénosine sont couplés à une phospholipase A2 via une protéine G sensible à la toxine de pertussis distincte de celle assurant le couplage des récepteurs $\alpha 1$ noradrénergiques à la phospholipase C. L'acide arachidonique ainsi libéré semble avoir deux effets complémentaires : 1 - Il provoque l'ouverture de canaux potassiques ; l'hyperpolarisation ainsi créée favorise une augmentation et une prolongation de l'influx de calcium induit par la stimulation des récepteurs $\alpha 1$ noradrénergiques. Ceci renforce l'activation de la phospholipase A2. 2 - L'acide arachidonique bloque la recapture du glutamate spontanément libéré des astrocytes et provoque ainsi son accumulation dans le milieu extracellulaire. L'augmentation des concentrations de glutamate externe entraîne alors une stimulation des récepteurs du glutamate couplés à la phospholipase C. Cet effet qui s'ajoute à celui induit par l'activation des récepteurs $\alpha 1$ noradrénergiques, est responsable de l'effet « potentialisateur » du nucléoside ou du peptide sur la réponse noradrénergique.

Plus récemment, M. Tencé et P. Marin ont montré que l'endothéline seule est capable de reproduire les effets combinés de l'adénosine (ou de la somatostatine) et de la méthoxamine (agoniste $\alpha 1$ noradrénergique) c'est-à-dire d'activer à la fois une phospholipase C et une phospholipase A2. De nouveau, la stimulation de la phospholipase A2 est totalement dépendante de la présence de calcium externe alors que celle de la phospholipase C ne l'est

que partiellement. De plus, en utilisant une technique microfluorimétrique, C. Delumeau a pu montrer que l'endothéline induit une augmentation prolongée de l'influx et des concentrations cytosoliques de calcium. Comme précédemment, cette augmentation persistante de la concentration cytosolique de calcium semble être liée à la production d'acide arachidonique. De fait, M. Tencé a montré que lorsque des astrocytes striataux sont préalablement incubés avec de l'acide arachidonique tritié, l'endothéline provoque une libération de cet acide gras. Deux protéines G semblent assurer le couplage entre les deux phospholipases (C et A2) et le ou les récepteurs de l'endothéline. En effet, une préincubation des astrocytes pendant 24 heures avec la toxine de pertussis diminue l'amplitude des effets liés à la stimulation des phospholipases C et A2. Cependant, en absence de calcium externe, la stimulation résiduelle de la phospholipase C induite par l'endothéline est insensible à l'action de la toxine pertussique.

2.1.2. Etude des interactions astro-astrocytaires intervenant par l'intermédiaire des jonctions de type « gap »

Des cultures primaires d'astrocytes de souris ont été utilisées pour caractériser les propriétés biochimiques et électrophysiologiques des canaux jonctionnels. Nous avons montré qu'une seule protéine jonctionnelle (ou connexine), sur les trois identifiées à ce jour chez les mammifères est exprimée par les astrocytes : il s'agit de la connexine 43. La conductance élémentaire des canaux formés par cette connexine est de 50-60 pS. Nous avons établi que la perméabilité des jonctions entre astrocytes est contrôlée par plusieurs systèmes de transduction mettant en jeu des seconds messagers (AMPc, diacylglycérol, eicosanoïdes) associés à des récepteurs membranaires activés par des neurotransmetteurs (noradrénaline), des facteurs de croissance (EGF) ou des peptides synthétisés par les neurones ou les astrocytes eux-mêmes (endothéline). Le rôle fonctionnel de ces régulations a été étudié par une approche microfluorimétrique à l'aide de sondes fluorescentes sensibles aux ions calcium. Au cours d'une stimulation des récepteurs α 1-adrénergiques, les réponses calciques d'une population d'astrocytes sont relativement homogènes lorsque les jonctions sont ouvertes. Par contre, lorsque les canaux jonctionnels ont été préalablement fermés par l'action d'un agent pharmacologique, la réponse du tapis astrocytaire devient hétérogène. Ces observations suggèrent que les régulations de la perméabilité des jonctions « gap » pourraient permettre de démasquer une hétérogénéité fonctionnelle des astrocytes qui n'apparaîtrait pas lorsque les canaux jonctionnels sont ouverts (C. Giaume, J. Cordier, J. Prémont).

2.2. RÉCEPTEURS DES TACHYKININES (Responsable de l'équipe : Jean-Claude Beaujouan)

2.2.1. Recherche d'agonistes ou d'antagonistes sélectifs des récepteurs des tachykinines

Les études structure-affinité et structure-activité sont effectuées en étroite collaboration avec nos collègues chimistes, S. Lavielle et G. Chassaing (Paris VI, Jussieu).

Trois types différents de sites de liaison des tachykinines de mammifères ont été retrouvés dans les systèmes nerveux périphérique ou central. La SP, la NKA et la NKB sont les ligands endogènes des sites NK1, NK2 et NK3, toutefois ceux-ci ne sont pas sélectifs. Les stratégies complémentaires portant sur des études structure-affinité, structure-activité et incluant l'analyse des structures tridimensionnelles par spectroscopie faisant appel à la résonance magnétique nucléaire, ont permis d'orienter la synthèse peptidique d'agonistes sélectifs de chaque classe de sites. Nous disposons maintenant de la (Pro⁹)SP, la (Pro¹⁰)SP et d'analogues cycliques de la SP qui sont sélectifs pour les sites NK1, la (Lys⁵) NKA(4-10) est un bon agoniste soluble de type NK2 et la (Pro⁷)NKB, peptide soluble sélectif des sites NK3, permet de discriminer complètement les sites NK2 et NK3 (S. Lavielle, G. Chassaing, M. Saffroy, Y. Torrens, J.C. Beaujouan).

2.2.2. Un ligand sélectif des récepteurs NK1 : la ³H-(Pro⁹)SP

Nous avons montré la totale sélectivité de la (Pro⁹)SP pour les sites de liaison NK1, cet analogue de la SP ne présentant aucune affinité pour les sites NK2 et NK3. Cette sélectivité a été confirmée en utilisant des essais biologiques spécifiques de chaque classe de récepteurs des tachykinines. Les propriétés biochimiques et pharmacologiques des sites de liaison de la ³H(Pro⁹)SP ont également été étudiées. Les données obtenues sur des membranes cérébrales ainsi que la localisation des sites de liaison de la ³H(Pro⁹)SP dans le cerveau de rat déterminée par autoradiographie se sont avérées identiques à celles obtenues précédemment avec d'autres ligands moins spécifiques des récepteurs NK1 tels que le ¹²⁵I-BHSP ou la ³H-SP. Une liaison spécifique de la ³H(Pro⁹)SP sur des sites NK1 a pu également être observée sur des membranes d'iléon de cobaye. La haute sélectivité de la (Pro⁹)SP fait donc de ce ligand un outil de choix pour les études physiologiques des systèmes impliquant les récepteurs NK1 (F. Petitet, Y. Torrens, M. Saffroy, J.C. Beaujouan).

2.2.3. Modulation par les tachykinines de la libération évoquée de l'acétylcholine dans le striatum du rat

Chez le rat, le striatum est riche en corps cellulaires immunoréactifs à la SP et des fibres contenant de la SP sont en contact avec les interneurons

cholinergiques. Nous avons donc étudié l'influence des tachykinines sur la libération de l'acétylcholine (ACh) dans le striatum.

L'activation des récepteurs NK1 facilite la libération de l'ACh à partir des interneurons cholinergiques striataux. En effet, sur des coupes de striatum de rat, la (Pro⁹)SP (agoniste sélectif NK1) stimule la libération de l'ACh évoquée par le potassium, alors que les agonistes sélectifs de type NK2 et NK3 sont sans effet (F. Petitet, J.C. Beaujouan).

2.2.4. *Effet des tachykinines sur les mouvements de calcium astrocytaires*

Les astrocytes du cortex cérébral de souris en culture primaire possèdent des récepteurs NK1 et ne semblent pas exprimer les autres récepteurs connus des tachykinines. D'autre part, ainsi que nous l'avons montré précédemment, la stimulation de ces récepteurs provoque une activation de la phospholipase C. Des données obtenues par C. Delumeau en mesurant les concentrations du calcium intracellulaire à l'aide de la sonde Indo 1 ont également révélé que la (Pro⁹)SP induit une augmentation transitoire du calcium cytosolique dans les astrocytes et que la durée de cette réponse est raccourcie en absence de calcium externe. Des expériences complémentaires ont permis de montrer que les caractéristiques pharmacologiques du récepteur impliqué sont identiques à celles des récepteurs NK1 responsables de l'augmentation de l'activité de la phospholipase C (F. Petitet, C. Delumeau).

3. *ÉTUDES DE PROTÉINES KINASES ET PHOSPHATASES NEURONALES ET ASTROCYTAIRES ET DE LEURS SUBSTRATS*

3.1. ÉQUIPE DE JEAN-ANTOINE GIRAULT

3.1.1. *La DARPP-32, un inhibiteur de phosphatase intervenant dans l'action de la dopamine*

La protéine phosphatase 1 est une enzyme ubiquitaire dont le rôle majeur dans les régulations cellulaires a été bien étudié dans certains systèmes comme les cellules musculaires, mais reste mal connu dans les neurones. Deux protéines régulatrices ont été décrites qui inhibent puissamment la phosphatase 1 lorsqu'elles sont phosphorylées par la protéine kinase activée par l'AMPc (PKA) sur une thréonine. Ces deux protéines dont la séquence est homologue, sont l'inhibiteur 1 et la DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, Mr = 32 000). La DARPP-32 est enrichie dans certains neurones cérébraux, notamment les neurones striato-nigraux. Dans le striatum, la stimulation des récepteurs D 1 de la DA entraîne la phosphorylation de la DARPP-32 en augmentant l'AMPc intracellulaire. A l'inverse, la stimulation des récepteurs du glutamate de type NMDA provoque la déphos-

phorylation de la DARPP-32, vraisemblablement en activant une phosphatase Ca^{2+} -dépendante, la calcineurine. Dans d'autres organes, comme les plexus choroïdes, la phosphorylation de la DARPP-32 est régulée par d'autres neurotransmetteurs.

La phosphorylation par la PKA et la déphosphorylation par la calcineurine, ainsi que l'inhibition de la phosphatase 1, sont des propriétés communes à l'inhibiteur 1 de phosphatase et à la DARPP-32. Par contre les variations d'expression de ces deux protéines au cours du développement et leur distribution tissulaire chez l'adulte sont très différentes. Nous cherchons donc à caractériser les différences biochimiques entre ces deux protéines. Nous avons précédemment observé que la caséine kinase II phosphoryle la DARPP-32, mais pas l'inhibiteur 1. Plus récemment, en collaboration avec Angus Nairn et Paul Greengard (Rockefeller University), nous avons montré que la DARPP-32, mais pas l'inhibiteur 1, est phosphorylée *in vitro* par la caséine kinase I et par la protéine kinase C. Nous précisons actuellement les paramètres biochimiques de ces phosphorylations et leur éventuel rôle physiologique (D. Cohen, J.A. Girault).

D'autre part, nous étudions les relations structure-fonction de la DARPP-32, par une approche de mutagenèse dirigée des différents sites de phosphorylation de la protéine. La forme sauvage et les formes mutées, dans lesquelles certains résidus phosphorylables ont été remplacés par des acides aminés non phosphorylables, sont exprimées dans *Escherichia coli* pour la production de DARPP-32 en abondance en vue d'études biochimiques et physico-chimiques, ces dernières réalisées en collaboration avec des chercheurs italiens (D^r Benfenati, Neyroz, et Valtorta, des Universités de Modane, Parme et Milan). Ces mêmes formes sauvages et mutées sont placées dans des vecteurs d'expression eukaryotes pour l'étude des propriétés fonctionnelles de la DARPP-32 dans des cellules transfectées (F. Desdouits, J.A. Girault).

3.1.2. *Rôle des phosphorylations de protéines sur des tyrosines dans l'établissement et le maintien des contacts synaptiques*

Un nombre croissant d'arguments suggère que la phosphorylation de protéines sur des tyrosines pourrait jouer un rôle important dans la croissance des neurites et la synaptogénèse. Nous avons étudié les protéines phosphorylées sur des tyrosines lors du développement du cerveau chez les souris *in vitro* et *in vivo*. Les deux principales phosphoprotéines (pp120 et pp180) observées dans ces conditions ont un niveau apparent de phosphorylation maximum durant les premières semaines qui suivent la naissance. Dans les cellules nerveuses en culture, plusieurs facteurs de croissance dont on connaît l'effet sur ces cellules (EGF, IGF-1 et insuline), et dont les récepteurs sont des tyrosine kinases, stimulent la phosphorylation de protéines sur des tyrosines. En collaboration avec B. Chamak, nous avons montré que ces effets des

facteurs de croissance s'exercent directement sur les astrocytes et les neurones, mais que les protéines cibles phosphorylées diffèrent en partie dans les deux types cellulaires. Nous tentons actuellement de développer un modèle permettant l'étude de ces phosphoprotéines lors de la synaptogénèse *in vitro*.

Chez le rat adulte, une protéine phosphorylée sur des tyrosines (pp180) persiste à un niveau détectable dans les régions antérieures du cerveau. Il s'agit d'une protéine spécifiquement neuronale, enrichie dans les membranes synaptiques, où elle fait vraisemblablement partie des densités post-synaptiques. En collaboration avec D. Hervé, nous avons montré que la phosphorylation de cette protéine augmente après lésion spécifique de certaines populations neuronales. Pour pouvoir étudier plus facilement la régulation de ce type de phosphorylation chez l'animal adulte, nous développons un modèle d'étude de la phosphorylation de protéines sur des tyrosines dans des coupes de cerveau incubées *in vitro*. En parallèle avec l'étude des protéines phosphorylées sur des tyrosines, nous mesurons les activités tyrosine kinase et phosphotyrosine phosphatase de façon à préciser les mécanismes en cause dans les variations de phosphorylation observées *in vitro* ou *in vivo* (J.C. Siciliano, L. Robel, J.A. Girault).

3.2. ÉQUIPE DE HERVÉ CHNEIWEISS

3.2.1. Localisation précoce de la stathmine au niveau de l'axone en croissance

Poursuivant le travail effectué précédemment au sein du groupe d'A. Sobel (INSERM U.153), nous avons continué l'analyse de certaines propriétés d'une protéine enrichie dans les neurones : la stathmine.

La stathmine est une phosphoprotéine cytoplasmique de petit poids moléculaire (19-23K) particulièrement enrichie dans les neurones du système nerveux central. L'étude précoce du développement neuronal en culture primaire a permis d'observer la présence de stathmine dans un seul neurite dès le début de la croissance neuritique. Après une semaine, la stathmine est co-localisée avec d'autres marqueurs axonaux tel que la forme phosphorylée de la protéine 200K des neurofilaments. De plus, l'addition de laminine au substrat afin de promouvoir la croissance axonale, ou de fibronectine, pour stimuler celle des dendrites, ont permis de confirmer l'orientation précoce et sélective de la stathmine vers l'axone en développement. Ces résultats suggèrent que la stathmine pourrait jouer un rôle dans les événements précoces de la différenciation neuronale (J. Cordier, H. Chneiweiss).

3.2.2. Caractérisation d'une phosphoprotéine enrichie dans les astrocytes : PEA-15

La recherche de phosphoprotéines spécifiques des astrocytes s'inscrit dans une stratégie visant à déterminer le mécanisme d'action de certains neurotransmetteurs sur les fonctions astrocytaires. Après incorporation de phosphate ^{32}P , nous avons identifié par électrophorèse bidimensionnelle un couple de

phosphopeptides cytoplasmique (PM 15000, pI 5,3-5,4), substrats majeurs de phosphorylation dans les astrocytes du striatum en culture primaire. Il s'agit en fait de deux états de phosphorylation d'une seule protéine, qui présente également une forme déphosphorylée caractérisée après traitement de fractions partiellement purifiées par des phosphatases. Cette protéine nettement enrichie dans les astrocytes et peu visible dans les neurones ou les fibroblastes a été dénommée : PEA 15 (phosphoprotéine de 15kDa enrichie dans les astrocytes). Le degré de phosphorylation de PEA 15 augmente lorsque les astrocytes intacts sont exposés à des esters de phorbol ou des ionophores calciques, cet effet étant antagonisé par un inhibiteur des kinases calcium-dépendantes tel que la staurosporine. Par ailleurs, la protéine peut être mise en évidence par marquage de coupes de cerveau de souris dès les premiers jours après la naissance.

Ces premiers résultats suggèrent que la protéine PEA 15 est une cible privilégiée pour analyser les effets de médiateurs sur des régulations intracellulaires calcium-dépendantes au niveau des astrocytes (H. Araujo, H. Chneiweiss).

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

4.1. ÉQUIPE DE ANDRÉ CHÉRAMY

4.1.1. *Contrôle présynaptique de la libération de dopamine*

Des expériences *in vitro* ont montré que le L-Glutamate (GLU) stimule présynaptiquement la libération de dopamine (DA) en activant des récepteurs des sous-types AMPA et NMDA, localisés sur les terminaisons nerveuses dopaminergiques. Toutefois, la mise en jeu des récepteurs NMDA ne peut être observée qu'en absence de magnésium. L'implication physiologique de ces récepteurs dans le contrôle présynaptique de la libération de DA a donc été recherchée.

Des synaptosomes de striatum de rat sont superfusés en continu avec de la ^3H -tyrosine afin de mesurer la libération de ^3H -DA nouvellement synthétisée. L'augmentation de la libération de ^3H -DA par le GLU (10^{-3}M) est potentialisée par la glycine (10^{-6}M), réduite par le MK801 (10^{-5}M) et pratiquement abolie par le DNQX ($3 \times 10^{-5}\text{M}$). Ces résultats démontrent que le GLU agit sur les récepteurs AMPA et NMDA, même en présence d'une concentration physiologique de magnésium. En fait, l'amplitude de la libération de ^3H -DA évoquée par le GLU est identique en présence et en absence de magnésium. L'AMPA (10^{-3}M) stimule la libération de ^3H -DA, tandis que le NMDA

(10^{-3}M) est sans effet. Par contre, l'application simultanée de ces deux agonistes provoque une augmentation de la libération de $^3\text{H-DA}$ deux fois plus importante que celle de l'AMPA. Ceci indique que la stimulation des récepteurs AMPA élimine le blocage voltage-dépendant induit par le magnésium et permet la stimulation des récepteurs NMDA (J.M. Desce, G. Godeheu, A. Chéramy).

4.1.2. *Catabolisme du N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate*

Le N-Acetyl-L-aspartyl-L-glutamate (NAAG), un dipeptide présent dans certains neurones, pourrait jouer un rôle de neuromédiateur dans le système nerveux central. Nous avons entrepris avec S. Lavielle et V. Serval (Paris VI, Jussieu) de rechercher des inhibiteurs de l'enzyme d'inactivation du NAAG, la NAALADase. Pour tester leur activité, le $^3\text{H-NAAG}$ a été injecté dans le striatum de rats anesthésiés avec du pentobarbital, et le $^3\text{H-NAAG}$ non catabolisé a été mesuré sept minutes après l'injection.

Chez les animaux témoins, seulement 20 % du $^3\text{H-NAAG}$ est retrouvé dans le striatum, ce qui démontre l'efficacité de la NAALADase *in situ*. Lorsque du cobalt, un activateur de la NAALADase, est ajouté au liquide injecté, ce taux est réduit à 12 %. Au contraire, l'addition d'inhibiteurs de la NAALADase augmente le taux de $^3\text{H-NAAG}$ résiduel : 25 % pour le N-succinyl-glutamate et 30 % pour le N-acetyl- β -aspartyl-glutamate, le N-(2,2 di(acide ethanoïque) acétyl)-L-glutamate ou le N-(3-(carboxyl)-1,4-acide butanedioïque)-L-glutamate. L'inhibition de la NAALADase est concentration-dépendante : la protection atteint 90 % lorsque 10^{-8} moles de ces dérivés sont co-injectées avec le $^3\text{H-NAAG}$. Le D-NAAG (N-acétylaspartyl-D-glutamate) par contre est dépourvu d'activité inhibitrice de la NAALADase (T. Galli, V. Serval, S. Lavielle).

4.1.3. *N-Acetyl-aspartyl-glutamate et libération de dopamine*

Chez le chat anesthésié, nous avons précédemment montré que le NAAG, appliqué dans le noyau caudé à très faible concentration (10^{-8}M) stimule la libération de $^3\text{H-DA}$. Cet effet se différencie nettement de celui du GLU puisqu'il est notamment aboli par la tétrodontoxine (TTX). Cependant, cette préparation *in vivo* se prête assez mal aux études pharmacologiques nécessaires pour caractériser les récepteurs de ce neuropeptide. Un modèle *in vitro* a donc été utilisé. Le NAAG (10^{-7}M), appliqué à l'aide d'une « push-pull » canule sur coupe de striatum de chat, stimule la libération de $^3\text{H-DA}$, et cet effet est inhibé par la TTX (T. Galli, F. Artaud).

4.1.4. *Etude de la libération de dopamine in vivo chez le rat*

Nous avons développé un modèle expérimental permettant d'étudier la libération de DA *in vivo* chez le rat anesthésié avec de l'halothane. Le

striatum est perfusé en continu avec un LCR artificiel contenant de la ^3H -tyrosine à l'aide d'une canule « push-pull » et la libération de ^3H -DA nouvellement synthétisée est mesurée dans les superfusats. Plusieurs essais ont été nécessaires pour optimiser divers facteurs (anesthésie, ventilation artificielle, stabilité des paramètres physiologiques, principe et taille des canules, angle d'implantation, vitesse de superfusion, concentration de la ^3H -tyrosine, etc.). Puis les effets de l'AMPA ont été testés afin de compléter nos expériences précédentes sur le contrôle présynaptique glutamatergique de la libération de DA. L'application striatale d'AMPA (10^{-5}M , 30 mn) provoque une diminution marquée de la libération de ^3H -DA, cet effet est indirect puisqu'un puissant effet stimulateur est observé en présence de TTX. Ces résultats sont cohérents avec les données précédemment obtenues chez le chat. Des expériences sont en cours afin d'étudier la mise en jeu physiologique des récepteurs AMPA et NMDA dans le contrôle de la libération de DA par le GLU libéré des fibres cortico-striatales lors de la stimulation électrique du corps calleux (G. Godeheu, A. Chéramy).

4.2. ÉQUIPE DE MARIE-LOU KEMEL ET CHRISTIAN GAUCHY

4.2.1. *Hétérogénéité du striatum : régulations directes et indirectes de la libération de dopamine dans le noyau caudé chez le chat*

a. *Régulations directes de la libération de dopamine*

Nous avons montré précédemment que la libération de DA dans les striosomes et une zone matricielle (matrice 1) du striatum pouvait être modulée par la mise en jeu de récepteurs cholinergiques de type muscarinique (stimulation) ou de récepteurs opiacés de type kappa (inhibition), ces deux types de récepteurs étant localisés sur les terminaisons nerveuses DA de ces deux régions striatales. Cette année, nous avons observé qu'en présence de TTX, le GABA à forte concentration (10mM), inhibe la libération de DA évoquée par l'acétylcholine (ACh) dans le compartiment striosomal, mais aussi dans une zone matricielle (matrice 2). De plus, dans cette région matrice 2 du striatum, la libération de la DA peut être modulée directement par la mise en jeu de récepteurs cholinergiques de type muscarinique et nicotinique.

b. *Régulations cholinergiques indirectes de la libération de dopamine*

Dans la matrice, les interneurons cholinergiques semblent avoir des cibles différentes selon les régions matricielles considérées. Ces variations dans les régulations cholinergiques de la libération de DA ont été à l'origine de la définition de deux zones matricielles très proches : matrice 1 et 2.

Dans la zone matrice 1, l'ACh agit sur deux boucles neuronales impliquées dans la régulation de la libération de DA, l'une facilitatrice faisant intervenir

des récepteurs nicotiques localisés sur une population encore non identifiée de neurones striataux, et l'autre, inhibitrice, mettant en jeu des récepteurs muscariniques localisés sur des neurones riches en dynorphine. De fait, la dynorphine inhibe directement la libération de DA à partir des terminaisons dopaminergiques en agissant sur des récepteurs de type kappa.

Dans la zone matrice 2, l'effet inhibiteur de l'ACh n'implique pas la dynorphine. Il est antagonisé par la bicuculline (antagoniste des récepteurs GABA A). Ceci suggère que l'ACh stimule la libération de GABA et provoque ainsi une inhibition de longue durée de la libération de DA. L'effet inhibiteur de l'ACh mettant en jeu le GABA persiste en présence de TTX suggérant que ces régulations de la libération de DA peuvent être liées à des contacts axo-axoniques. Des récepteurs cholinergiques muscariniques et nicotiques interviennent dans l'activation de ce circuit local inhibiteur de type GABAergique (C. Gauchy, M.L. Kemel).

4.2.2. *Organisation tridimensionnelle du réseau striosomal dans le striatum chez le rat*

Les récepteurs opiacés de type μ préférentiellement localisés dans les striosomes ont été visualisés par autoradiographie après liaison spécifique de la ^3H -naloxone sur des coupes successives, frontales et sagittales de striatum de rat.

L'organisation rostro-caudale du réseau striosomal est difficile à percevoir toutefois, comme chez le chat, une organisation médiolatérale de ce compartiment peut être mise en évidence. Dans la partie très latérale (L = 4,5 à 3,5), le compartiment striosomal forme un cône dont la bordure antérieure est tapissée de striosomes alors que le centre et la bordure postérieure correspondent à une très grande zone matricielle totalement dépourvue de striosomes. Dans la partie plus centrale du striatum (L = 2,8 à 1,5), nous avons observé une organisation en canaux du compartiment striosomal et dénombré environ 10 canaux striosomaux orientés de la partie latérale vers la partie médiane. Dans la région médiane (L = 1,4) du striatum riche en striosomes aucune organisation particulière de ce compartiment n'a pu être décelée (M. Desban, F. Trovero, M.L. Kemel).

4.2.3. *Rôle des systèmes glutamatergiques cortico-striataux dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine dans les striosomes et la matrice du striatum chez le rat*

Nous avons montré qu'en absence de magnésium, le NMDA stimule de façon différente la libération de DA dans les deux compartiments striataux. Dans les striosomes, cette régulation persiste en présence de TTX. Au contraire, dans la matrice une grande partie de la libération de DA évoquée par le NMDA est indirecte (sensible à la TTX). Les interneurons cholinergi-

ques qui possèdent des récepteurs NMDA et qui sont localisés dans la matrice, pourraient être responsables de cette facilitation indirecte de la libération de DA. Toutefois, l'effet facilitateur du NMDA sur la libération de DA dans la matrice n'est pas réduit, mais au contraire potentialisé en présence des antagonistes muscarinique (atropine) et nicotinique (pempidine). Ceci suggère que l'ACh libérée agit sur une boucle locale exerçant un effet inhibiteur sur la libération de dopamine.

Les neurones inhibiteurs du striatum étant riches en GABA et/ou dynorphine, l'effet du NMDA a été étudié en présence de bicuculline ou de naloxone. Effectivement, la libération évoquée de DA par le NMDA est aussi potentialisée en présence de ces antagonistes. Les effets de la bicuculline et de la naloxone sont plus prononcés dans les striosomes que dans la matrice. Ceci suggère que le NMDA facilite la libération de GABA et de dynorphine et que ces médiateurs inhibent indirectement la libération de DA dans les deux compartiments striataux (M.O. Krebs, M.L. Kemel).

4.2.4. *Rôle des tachykinines dans le contrôle de la libération de dopamine dans les striosomes et la matrice du striatum chez le rat*

Plusieurs populations de neurones GABAergiques localisés dans les deux compartiments striataux contiennent également de la substance P (SP) et de la neurokinine A (NKA). La présence de neurokinine B (NKB) a également été décrite dans le striatum. Ceci nous a conduit à étudier les effets des agonistes sélectifs NK1 (SP), NK2 (NKA) et NK3 (NKB) sur la libération de DA dans les deux compartiments striataux.

— La (Pro⁹)SP (10nM, 1μM), un agoniste spécifique des récepteurs NK1 stimule la libération de DA dans les striosomes et la matrice. Ces effets de la (Pro⁹)SP sont totalement antagonisés par le spantide (1μM, antagoniste de récepteurs NK1) et disparaissent en présence de TTX. Ceci suggère que la (Pro⁹)SP exerce une régulation indirecte de la libération de DA dans les deux compartiments striataux.

— La NKA (100nM) et la Lys⁵, MeLeu⁹, NLe¹⁰ (4-10) (100nM, un agoniste sélectif des récepteurs NK2) stimulent la libération de DA dans le compartiment matriciel mais sont sans action dans la zone enrichie en striosomes. Ces effets persistent en partie en présence de TTX suggérant que des récepteurs NK2 intervenant dans la régulation présynaptique de la DA sont localisés sur les terminaisons dopaminergiques dans la matrice.

— La (Pro⁷)NKB (100nM) un agoniste sélectif des récepteurs NK3 stimule modérément la libération de DA, cet effet n'étant observé que dans le compartiment matriciel (L. Tremblay).

5. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MÉSOCORTICAUX ET MÉSOLIMBIQUES

5.1. ÉTUDES BIOCHIMIQUES ET COMPORTEMENTALES

(Responsable de l'équipe : Jean-Pol Tassin)

5.1.1. *Etudes des interactions noradrénaline/dopamine dans le cortex préfrontal du rat*

La lésion électrolytique de l'aire tegmentale ventrale (ATV) du rat induit un certain nombre de déficits comportementaux qui résultent de la destruction des neurones DA ascendants. Parmi ces déficits comportementaux, l'hyperactivité locomotrice a pu être compensée par une injection intrapéritonéale de prazosin (0,5 mg/kg, i.p.), un antagoniste des récepteurs α 1-adrénergiques.

Nous avons pu montrer que cet effet inhibiteur du prazosin sur l'activité locomotrice est sans doute lié au blocage des récepteurs α 1-adrénergiques du cortex préfrontal. En effet, l'hyperactivité locomotrice obtenue par injection locale d'amphétamine dans le noyau accumbens est totalement antagonisée par l'injection bilatérale de prazosin (0,6 nmole/0,5 μ l/côté) dans le cortex préfrontal (G. Blanc, F. Trovero, J.P. Tassin).

5.1.2. *Présence d'un sous-type de récepteur D2 particulier dans le cortex préfrontal du rat*

Des études électrophysiologiques réalisées dans le laboratoire (Thierry et al., 1986) ainsi que des données autoradiographiques (Martres et al., 1988) ont révélé la présence dans le cortex préfrontal du rat de récepteurs de type D2 présentant une pharmacologie inhabituelle. Après marquage de ces récepteurs par l'iodosulpride I^{125} radioactif et déplacement par différents neuroleptiques non marqués, nous avons pu montrer l'existence d'un récepteur ayant une affinité pour le sulpiride ($K_i = 10^{-9}M$) qui est 10 fois supérieure à celle habituellement obtenue pour les récepteurs D2 striataux. Ces récepteurs représentent environ 40 % de l'ensemble des récepteurs marqués par l'iodosulpride dans le cortex préfrontal (J. Mantz, D. Hervé, J.P. Tassin).

5.1.3. *Etude autoradiographique des récepteurs D1 à haute affinité pour la dopamine*

L'incubation de coupes de cerveau en présence de 3H -DA permet de mettre en évidence certains sites DA à haute affinité pour la DA ($K_d = 1,9nM$). Selon Leff et al., ces sites correspondent à un état conformationnel particulier des récepteurs D1 qui est adopté lorsque ceux-ci sont associés à des protéines liant le GTP, impliquées dans les processus de transduction.

A l'aide de techniques autoradiographiques, nous avons pu montrer que la distribution anatomique de ces sites à haute affinité pour la $^3\text{H-DA}$ (sites D1h) diffère de celles des récepteurs D1 marqués par un antagoniste, le $^3\text{H-SCH 23390}$. Cette différence est particulièrement marquée dans la substance noire, certains noyaux amygdaliens et le cortex préfrontal, structures pour lesquelles le rapport entre la liaison de $^3\text{H-DA}$ et de $^3\text{H-SCH23390}$ est 7 fois plus faible que dans le striatum. De plus, la destruction unilatérale des voies DA ascendantes entraîne des effets distincts sur les liaisons de $^3\text{H-DA}$ et de $^3\text{H-SCH 23390}$ dans le striatum et le noyau accumbens : la fixation de $^3\text{H-DA}$ diminue fortement (entre 70 et 50 %), alors que celle de $^3\text{H-SCH 23390}$ n'est pas significativement affectée. Ces différences pourraient être attribuées à un effet stabilisant de la DA présente dans le tissu cérébral sur l'état D1h des récepteurs D1. D'autre part, les concentrations tissulaires de protéine G susceptibles de se combiner avec les récepteurs D1 pourraient elles aussi intervenir (D. Hervé, F. Trovero, J.P. Tassin).

5.1.4. *Etude de la concentration en protéine G dans le striatum et la substance noire*

En utilisant un anticorps dirigé contre les protéines G activatrices de l'adénylcyclase, nous avons pu montrer l'existence d'une plus grande concentration (5 fois plus) de protéine G dans le striatum que dans la substance noire. Cette observation pourrait expliquer une plus faible activation de l'adénylcyclase par la DA dans la substance noire bien que la concentration de récepteurs D1 mesurée par autoradiographie de $^3\text{H-SCH 23390}$ soit identique dans les deux structures (D. Hervé, J.A. Girault).

5.2. ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES ET ANATOMIQUES (Responsable de l'équipe : A.M. Thierry)

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

Le cortex préfrontal reçoit une innervation dopaminergique issue de l'aire tegmentale ventrale (AVT). Précédemment, nous avons montré que la stimulation de l'AVT induit une inhibition de l'activité des neurones du cortex préfrontal (CPF), due principalement à l'activation du système DA. Les effets inhibiteurs de la DA appliquée par iontophorèse sur les cellules du CPF ou ceux induits par stimulation de l'AVT sont médiés par des récepteurs DA de type D2. Ces inhibitions sont en effet bloquées par application de sulpiride et de différentes benzamides, antagonistes spécifiques des récepteurs D2. Plus récemment, nous avons observé que ces effets inhibiteurs ne sont pas bloqués par l'halopéridol, une butyrophénone qui a une forte affinité pour les récep-

teurs D2. Nos données suggèrent donc l'existence dans le CPF d'un type particulier de récepteurs DA sensibles aux benzamides et insensibles aux butyrophénones.

D'autre part, nos études indiquent que les effets inhibiteurs provoqués par l'activation du système DA mésocortical s'exercent sur des cellules efférentes du CPF, identifiées à l'aide de la méthode d'activation antidromique en stimulant des structures cibles du CPF. Nous avons également pu mettre en évidence qu'une partie des inhibitions de l'activité des cellules pyramidales efférentes, induites par l'activation du système DA mésocortical, fait intervenir une composante locale GABAergique, vraisemblablement un interneurone GABA. En effet dans 50 % des cas environ l'effet inhibiteur provoqué par l'application locale de DA ou la stimulation de l'AVT est bloqué par l'application iontophorétique d'un antagoniste des récepteurs GABA, la bicuculline.

Enfin, nos études indiquent également l'existence d'une projection minoritaire non-DA de l'AVT sur le cortex préfrontal. Alors que 85 % des cellules du CPF sont inhibées par stimulation de l'AVT chez des rats témoins, cette proportion n'est que de 30 % chez des animaux traités par un inhibiteur de synthèse de la DA. Dans ce cas, les inhibitions restantes ne sont pas affectées par l'application d'un antagoniste DA au niveau des cellules corticales. Par contre, l'application locale de bicuculline bloque 95 % des inhibitions restantes. Ces résultats suggèrent que la voie non-DA mésocorticale est GABAergique (S. Pirot, J. Mantz, A.M. Thierry).

5.2.2. Distribution des efférences de l'hippocampe au niveau du cortex préfrontal

Après la mise en évidence d'une projection directe unilatérale de l'hippocampe (CA1, subiculum) sur l'aire prélimbique du cortex préfrontal (CPF), nous avons montré que l'hippocampe exerce une influence excitatrice sur l'activité des neurones du CPF et qu'il est possible d'induire une facilitation à long terme de la transmission synaptique de la voie hippocampo-corticale. Plus récemment, la distribution de l'innervation de l'hippocampe dans différentes couches corticales du CPF a été analysée en injectant une lectine (*Phaseolus vulgaris* Leuroagglutinin, marqueur antérograde) à différents niveaux de l'hippocampe. Les projections de l'hippocampe se distribuent sur l'aire prélimbique et le cortex orbital médian. Ces projections sont issues de régions bien délimitées de CA1 et du subiculum. Les cellules pyramidales de CA1 innervent le CPF, à l'exception de la partie la plus dorsale de CA1 qui ne contribue pas à cette projection. Seule la partie proximale du subiculum, c'est à dire la zone adjacente à CA1 innerve le CPF. La densité d'innervation dépend de la localisation dorso-ventrale du site d'injection dans l'hippocampe. La projection la plus dense et la plus diffuse de l'hippocampe sur le CPF est issue de la partie intermédiaire du subiculum.

Au niveau du cortex prélimbique, les fibres sont présentes dans toutes les couches corticales avec quelques différences morphologiques dans leur orientation et leur forme. Celles distribuées dans les couches V et VI sont orientées verticalement alors que les fibres localisées dans les couches II et III sont orientées horizontalement par rapport à la surface médiane de l'hémisphère. L'innervation du cortex prélimbique est comparable dans son extension rostro-caudale, mais des différences dorsoventrales peuvent être observées. La partie ventrale du cortex prélimbique présente des fibres et terminaisons denses dans toutes les couches corticales. L'innervation de la partie dorsale du cortex prélimbique est moins dense et prédomine dans les couches profondes. Cette hétérogénéité du cortex prélimbique (ventral versus dorsal) existe également en ce qui concerne la distribution de l'innervation d'origine thalamique et également la répartition des corps cellulaires projetant dans les différentes zones du striatum.

Au niveau du cortex orbital médian, la distribution des fibres et terminaisons est diffuse, présente dans toutes les couches avec une légère préférence pour les plus profondes.

Ces observations complètent les caractéristiques anatomiques de la projection hippocampe-cortex préfrontal et indiquent que la région CA1 et le subiculum innervent le cortex prélimbique et le cortex orbital médian. L'influence directe de l'hippocampe sur ces deux régions du CPF suggère l'implication de ces deux zones corticales dans l'intégration des fonctions du cortex et de l'hippocampe. Il reste à démontrer comment la projection hippocampe-CPF participe à cette intégration (T. Jay en collaboration avec M.P. Witter, Vrije Universiteit, Amsterdam, Pays-Bas).

PUBLICATIONS

LAVIELLE S., CHASSAING G., LÆUILLET D., CONVERT O., TORRENS Y., BEAUJOUAN J.C., SAFFROY M., PETITET F., BERGSTROM L. & GLOWINSKI J., *Selective agonists of tachykinin binding sites*. (Fundam. Clin. Pharmacol., 4, 257-267, 1990).

MANTZ J., GODBOUT R., TASSIN J., GLOWINSKI J. & THIERRY A.M., *Inhibition of spontaneous and evoked unit activity in the rat medial prefrontal cortex by mesencephalic raphe nuclei*. (Brain Res., 524, n° 1, 22-30, 1990).

MAUS M., HOMBURGER V., BOCKAERT J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Pretreatment of mouse striatal neurons in primary culture with 17 β -oestradiol enhances the pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G α_i protein subunits*. (J. Neurochem., 55, n° 4, 1244-1251, 1990).

HETIER E., AYTALA J., BOUSSEAU A., DENEFLÉ P. & PROCHIANTZ A., *Amoeboid microglial cells and not astrocytes synthesize TNF- α in Swiss mouse brain cell cultures* (Eur. J. Neurosci., 2, n° 9, 762-768, 1990).

CHNEIWEISS H., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Dopamine-induced homologous and heterologous desensitizations of adenylate cyclase-coupled receptors on striatal neurons*. (Eur. J. Pharmacol., 189, 287-292, 1990).

RAVARD S., HERVÉ D., THIEBOT M.H., SOUBRIE P. & TASSIN J.P., *Anticonflict-like effect of a prefrontal dopaminergic lesion in rats : permissive role of noradrenergic neurons* (Behav. Pharmacol., 1, 255-259, 1990).

RAVARD S., CARNOY P., HERVÉ D., TASSIN J.P., THIEBOT M.H. & SOUBRIE P., *Involvement of prefrontal dopamine neurones in behavioural blockade induced by controllable vs uncontrollable negative events in rats*. (Behav. Brain Res., 37, 9-18, 1990).

MARIN P., DELUMEAU J.C., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Both astrocytes and neurons contribute to the potentiation mediated by α 1-adrenoreceptors of the β -adrenergic-stimulated cyclic AMP production in brain*. (Eur. J. Neurosci., 2, 12, 1110-1117, 1990).

TROVERO F., HERVÉ D., DESBAN M., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Striatal opiate mu-receptors are not located on dopamine nerve endings in the rat*. (Neuroscience, 39, 2, 313-321, 1990).

TROVERO F., GLOWINSKI J. & LEVY M., *Evidence for phosphatidyl-inositide anchorage of opioid binding proteins in rat brain*. (Brain Res., 537, 1-2, 381-385, 1990).

KREBS M.O., DESCE J.M., KEMEL M.L., GAUCHY C., GODEHEU G., CHERAMY A. & GLOWINSKI J., *Glutamatergic control of dopamine release in the rat striatum : evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate receptors on dopaminergic nerve terminals*. (J. Neurochem., 56, n° 1, 81-85, 1991).

PETITET F., GLOWINSKI J. & BEAUJOUAN J.C., *Evoked release of acetylcholine in the rat striatum by stimulation of tachykinin NK-1 receptors*. (Eur. J. Pharmacol., 192, 203-204, 1991).

GIAUME C., FROMAGET C., EL AOUMARI A., CORDIER J., GLOWINSKI J. & GROS D., *Gap junctions in cultured astrocytes : single channel currents and characterization of channel-forming protein*. (Neuron, 6, 133-143, 1991).

GAUCHY C., DESBAN M., KREBS M.O., GLOWINSKI J. & KEMEL M.L., *Role of dynorphin-containing neurons in the presynaptic inhibitory control of the acetylcholine-evoked release of dopamine in the striosomes and the matrix of the cat caudate nucleus*. (Neuroscience, 41, 2/3, 449-458, 1991).

DELUMEAU J.C., MARIN P., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Synergistic effects in the α 1 and β 1 adrenergic regulations of intracellular calcium levels in striatal astrocytes*. (Cellular and Molecular Neurobiology, 11, 2, 263-276, 1991).

PETITET F., BEAUJOUAN J.C., SAFFROY M., TORRENS Y., CHASSAING G., LAVIELLE S., BESSEYRE J., GARRET C., CARRUETTE A. & GLOWINSKI J., *Further demonstration that (Pro9)-substance P is a potent and selective ligand of NK-1 tachykinin receptors.* (J. Neurochem., 56, 3, 879-889, 1991).

GALLI T., GODEHEU G., ARTAUD F., DESCE J.M., PITTALUGA A., BARBEITO L., GLOWINSKI J. & CHERAMY A., *Specific role of N-acetyl-aspartyl-glutamate in the in vivo regulation of dopamine release from dendrites and nerve terminals of nigrostriatal dopaminergic neurons in the cat.* (Neuroscience, 42, 1, 19-28, 1991).

MAUS M., HOMBURGER V., CORDIER J., PANTALONI C., BOCKAERT J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Treatment of intact striatal neurones with cholera toxin or 8-bromo-adenosine 3',5'-(cyclic) phosphate decreases the ability of pertussis toxin to ADP-ribosylate the α -subunits of inhibitory and other guanine-nucleotide-binding regulatory proteins, Gi and Go. Evidence for two distinct mechanisms.* (Eur. J. Biochem., 196, 313-320, 1991).

MARIN P., DELUMEAU J.C., DURIEU-TRAUTMANN O., LE NGUYEN D., PREMONT J., STOSBERG A.D. & COURAUD P.O., *Are several G proteins involved in the different effects of endothelin-1 in mouse striatal astrocytes?* (J. Neurochem., 56, 1270-1275, 1991).

KREBS M.O., TROVERO F., DESBAN M., GAUCHY C., GLOWINSKI J. & KEMEL M.L., *Distinct presynaptic regulation of dopamine release through NMDA receptors in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum.* (J. Neurosci., 11, n° 5, 1256-1262, 1991).

Différents chercheurs ont présenté leurs travaux dans les congrès suivants :

J. GLOWINSKI, J.M. DESCE, M.O. KREBS, M. DESBAN, C. GAUCHY, A. CHERAMY & M.L. KEMEL, *Control of dopaminergic transmission within the striatum : direct and indirect presynaptic regulations.* Basal ganglia mechanisms in health and disease. Santilana, Espagne, 30/08-03/09/90.

J.A. GIRAULT, *Second National Parkinson Foundation International Conference on Parkinson disease.* Miami USA, 16-23/01/91.

S. LAVIELLE, J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, G. CHASSAING, M. DIETL, F. PETITET, M. SAFFROY, J. GLOWINSKI, *Tachykinin receptors in the central nervous system.* First International Meeting of the European Neuropeptide Club, Iglo (Autriche), 23-26/01/91.

A.M. THIERRY, *Influence des systèmes modulateurs sur les réseaux exécutifs dans les processus cognitifs et d'apprentissage.* Grands Colloques de Prospective : Sciences de la Cognition, Paris, 28-31/01/91.

M.F. POIRIER, J.P. TASSIN, *Acceptabilité de fortes doses de neuroleptiques,* Neuropsychopharmacologie, Marseille, 01/02/91.

H. CHNEIWEISS, *Les récepteurs dopaminergiques : données récentes. Maladies de Parkinson : Données actuelles, une nouvelle thérapeutique.* Berlin, 02-04/02/91.

M.L. KEMEL, M.O. KREBS, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, C. GAUCHY, *Distinct presynaptic regulation of dopamine release through NMDA and cholinergic receptors in the striosome and matrix-enriched areas of the striatum*, EWCBR, Crans Montana, session : From cellular interaction to behaviour : looking at the striatal puzzle, 9-16/03/91.

J. GLOWINSKI, *Une famille de peptides : les tachykinines*. 7^e Réunion Peptides, Aussois, 18-22/03/91.

F. PETITET, C. DELUMEAU, J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, J. PREMONT & J. GLOWINSKI, *Mesure microfluorimétrique du calcium intracellulaire. Etude de l'effet des tachykinines sur des astrocytes en culture primaire*. 7^e Réunion Peptides, Aussois, 18-22/03/91.

J.P. TASSIN, F. TROVERO, D. HERVÉ, G. BLANC, J. GLOWINSKI, *NE/DA interactions in rat prefrontal cortex*, Workshop on schizophrenia, Pittsburgh, USA, 05-08/05/91.

J. GLOWINSKI, *Astrocyte receptors : involvement in astrocyte/astrocyte and astrocyte/neuron interactions*, Neuroscience Society, CIBA-Geigy lecture, Göteborg, Suède, 23/05/91.

M. MALLAT, *Influence of brain macrophages on neuronal growth and survival : an in vitro study*. Invité pour un séminaire au Dept Developmental Biology and Cancer, Albert Einstein College of medicine, New York, USA, 28-31/05/91.

H. CHNEIWEISS, *Astrocytes et neurotransmetteurs*, « Recherche clinique sur l'astrocyte », Bruxelles, 24-25/05/91.

J. GLOWINSKI, M.O. KREBS, M. DESBAN, C. GAUCHY, M.L. KEMEL, *Functional heterogeneity of the striatum : presynaptic regulation of dopamine release in striosomes and matrix*, 5th World Congress of Biological Psychiatry, Florence, 9-14/06/91.

J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, F. PETITET, B. TEUTSCH, M. DIETL, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, *Unique expression of NK-1 tachykinin receptors on mouse cortical astrocytes*. The Peptidergic Neuron, 11th International Symposium on Neurosecretion, Amsterdam, 10-14/06/91.

C. GIAUME, J. CORDIER, C. FROMAGET, H. EL AOUMARI, D. GROS, P. MARIN, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, *Gap junctions in cultured astrocytes : characterization and regulation*, 1991, Asilomar International Gap Junction Meeting, June 1991.

LISTE DES DIPLÔMÉS - 1990-1991

DESBAN Marcel :

Etude de l'hétérogénéité du noyau caudé chez le chat : analyse spatiale du compartiment striosomal et mise en évidence d'une organisation modulaire dans le compartiment matriciel.

Thèse d'Etudes Doctorales Paris VI, soutenue le 9 novembre 1990.

DIETL Monika :

Contribution à l'étude anatomique et fonctionnelle des récepteurs des tachykinines.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, soutenue le 12 décembre 1990.

COHEN David (sous la direction de J.A. Girault) :

Phosphorylation de la DARPP-32 (« dopamine and cAMP regulated phosphoprotein PM : 32000) par la caséine kinase I.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Paris VI, sept. 1990.

LESAFFRE Brigitte (sous la direction de J. Prémont) :

Recherche d'une hétérogénéité des astrocytes.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, sept. 1990.

BOUVIER Muriel (sous la direction de M.L. Kemel et J. Prémont) :

Hétérogénéité du striatum de rat : étude du couplage de certains récepteurs à l'activité de l'adénylate cyclase.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Paris VI, sept. 1990.

PIROT Sylvain (sous la direction de A.M. Thierry) :

Influence inhibitrice du système dopaminergique mésocortical sur les neurones du cortex préfrontal : étude électrophysiologique et pharmacologique chez le rat.

DEA en Neurosciences, Univ. P. et M. Curie, Paris VI, sept. 1990.

TROVERO Fabrice :

Analyse fonctionnelle et biochimique de l'hétéro-régulation de récepteurs : étude des récepteurs D1 dopaminergiques du cortex préfrontal et des récepteurs mu opiacés du striatum.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, soutenue le 14 juin 1991.