

Neuropharmacologie

M. Jacques GLOWINSKI, professeur

Le cours n'a pas eu lieu.

Les séminaires ont été consacrés à la Neurogénétique.

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. *Influence des macrophages cérébraux sur la différenciation et la vitalité neuronale*

a. Neurotoxicité des macrophages cérébraux

Nous avons précédemment montré que le contact membranaire entre des neurones et des macrophages cérébraux de rats en culture peut entraîner une mort neuronale ou des rétractions de neurites. Cette neurolyse met en jeu une production macrophagique d'ions superoxydes et d'eau oxygénée dont l'excrétion est stimulée par les neurones. Cette année nous avons étudié des régulations exercées sur cette neurotoxicité macrophagique. En premier lieu,

une hétérogénéité fonctionnelle des macrophages selon leur origine intracérébrale a pu être mise en évidence. Les macrophages issus du cortex cérébral d'embryons de rats se sont révélés systématiquement plus toxiques que leurs homologues provenant du mesencéphale, indépendamment de l'origine mesencéphalique ou cérébro-corticale des neurones cibles. Cette différence ne semble pas due à des variations régionales de la capacité absolue des macrophages à produire des radicaux oxygénés. En effet, les deux populations macrophagiques produisent des quantités d'eau oxygénées du même ordre de grandeur lorsqu'ils sont stimulés par un activateur puissant tel que le TPA (ester de phorbol). Par contre, des données préliminaires confortent l'hypothèse alternative selon laquelle les macrophages mesencéphaliques seraient moins sensibles que ceux du cortex cérébral à des stimuli d'origine neuronale.

Par ailleurs, nous avons recherché des facteurs d'interactions cellulaires susceptibles de moduler la neurotoxicité des macrophages cérébraux. Nous avons ainsi observé qu'un métabolite de l'acide arachidonique, la PGE2 qui peut être synthétisé par les astrocytes et les macrophages cérébraux, réduit significativement la mort neuronale induite par les macrophages lorsqu'il est introduit dans les cultures. Des résultats analogues ont été obtenus avec un agoniste β adrénergique, l'isoprotérénol. Ces résultats suggèrent que les neurones noradrénergiques ou des cellules gliales pourraient limiter la nocivité des macrophages dans le parenchyme cérébral immature (C. Théry, M. Mallat)

b. *Sécrétion de facteurs neurotrophiques par les macrophages cérébraux.*

En dépit de leur capacité à produire des molécules neurotoxiques sous l'influence de divers stimuli, les macrophages semblent aussi capables de favoriser la différenciation neuronale. Précédemment nous avons observé que des milieux de culture préalablement conditionnés par des macrophages cérébraux favorisaient la différenciation morphologique de précurseurs neuronaux. Ces premières expériences suggeraient l'existence d'une production macrophagique constitutive de facteurs solubles actifs sur des neurones. Nous avons confirmé ces données. Tout d'abord, une stimulation prononcée des taux de survie des précurseurs neuronaux est visible lorsque ces précurseurs sont ensemencés *in vitro* à faible densité. Par ailleurs et indépendamment de la densité initiale des précurseurs (dans les limites compatibles avec une observation précise de la morphologie des cellules) des composés d'origine macrophagique stimulent d'un facteur 3 à 4 la proportion de neurones émettant des prolongements dans un intervalle de 48 heures après la mise en culture. Une stimulation peut aussi s'exercer sur des neurones différenciés d'origine striatale, obtenus à l'issue de 8 jours de culture. Dans ce cas, nous avons observé que les facteurs macrophagiques favorisent la régénération de neurites dont l'ablation a été induite par un traitement protéolytique de ces neurones. La stimulation de la régénération apparaît nettement dès 4 heures après le début de l'exposition des neurones lésés aux sécrétions macrophagiques, 30 % des

neurones présentant déjà de nouveaux prolongements (moins de 7 % dans les conditions témoins). Les premières données sur la caractérisation biochimique de ces facteurs macrophagiques indiquent que la majeure partie de cette activité est le fait de protéines (sensibles à la trypsine) d'un poids moléculaire supérieur à 12kd. (B. Chamak, M. Mallat).

1.1.2. *Différenciation des cellules microgliales*

a. *Production astrocytaire d'un facteur de croissance actif sur les cellules microgliales : le M-CSF*

Suite à des premières données sur la régulation de la production astrocytaire de M-CSF, nous avons précisé l'effet de cytokines synthétisées par les macrophages cérébraux (l'interleukine 1 et le TNF) ou d'agents actifs sur des protéines kinases. Les deux cytokines augmentent la concentration des ARNm du CSF-1 dans des cultures d'astrocytes primaires ou immortalisés. En liaison avec le Dr. E.R. Stanley (New York), nous avons montré que l'augmentation des taux de messager est associée à une production accrue du M-CSF dans le milieu de culture des cellules. Par ailleurs, un activateur de la protéine kinase C, le TPA, stimule également les taux d'ARNm du M-CSF dans une lignée d'astrocytes immortalisés, tandis que la staurosporine (inhibiteur de la PKC) exerce un effet inverse. Une réduction des taux est aussi observée lorsque les astrocytes sont incubés avec un analogue lipophile de l'AMPc (le 8-Bromo AMPc).

Ces données suggèrent des rôles antagonistes des protéines kinases A et C dans la régulation de l'expression du gène du M-CSF (C. Théry, M. Mallat)

b. *Influence des neurones sur la croissance des macrophages*

L'influence des neurones sur la différenciation microgliale a également été examinée en étudiant le devenir de précurseurs macrophagiques issus de cultures de moëlle osseuse et introduits en faible quantité dans des cultures de neurones embryonnaires. Dans les conditions de culture adaptées à la croissance neuronale (milieu de culture chimiquement défini), nous avons observé que ces précurseurs macrophagiques dégénèrent, lorsqu'ils sont isolés ou disposés au contact de neurones. Cependant, la survie et la prolifération de ces précurseurs est stimulée si l'on ajoute du M-CSF dans le milieu de culture. En présence de ce facteur de croissance, le contact avec les neurones augmente significativement la prolifération des précurseurs. Cette potentialisation de l'activité mitogène du M-CSF met en jeu des molécules solubles relarguées dans le milieu de cultures par les neurones et dont la nature reste à être précisée. Ces premières observations suggèrent l'existence d'une coopération entre les astrocytes et les neurones dans la stimulation de la croissance microgliale par les astrocytes (mais non les neurones) produisant du M-CSF. (A. Dobbertin, M. Mallat)

1.2. GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES COMPARTIMENTS STRIATAUX
ET ANALYSE MOLÉCULAIRE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES
NIGRO-STRIATAUX SOUMIS À UNE PERTURBATION DU MÉTABOLISME
ÉNERGÉTIQUE

(Responsable de l'équipe : Matthieu Lévi-Strauss)

1.2.1. *Compartiments striataux*

Le but de notre projet est le clonage d'ADN complémentaires spécifiques de chacune des deux populations neuronales qui envahissent le striatum embryonnaire et qui sont ainsi à l'origine de sa compartimentation. Nous avons choisi de cribler une banque d'ADN complémentaire préparée dans un plasmide à partir d'ARN d'hémisphères cérébraux de souriceau nouveau-né, avec, successivement, deux sondes radioactives à haute activité spécifique et correspondant à de l'ARN de striatum prélevé à E17 et à E20, c'est à dire respectivement avant et après l'envahissement de l'ébauche striatale par les neurones qui composeront la matrice.

Nous avons ensuite étudié plus en détail deux ADN complémentaires inconnus, qui, par leur expression spécifiquement neuronale et leur enrichissement dans le striatum embryonnaire, nous ont semblé particulièrement intéressants.

L'analyse de la séquence nucléotidique de l'ADN complémentaire murin 3.1 a révélé l'existence de plusieurs petites phases ouvertes de lecture possibles dont la plus grande ne dépasse pas 315 bases. Afin d'identifier celle effectivement utilisée, nous avons cloné et séquencé l'ADN complémentaire humain correspondant au 3.1. La seule phase ouverte de lecture conservée entre ces deux espèces code pour une protéine de 68 acides aminés qui n'appartient à aucune famille connue. L'ARN messager 3.1 est exprimé par certains neurones durant leur période de prolifération dans la couche germinative bordant le ventricule ainsi que durant les quelques jours qui suivent leur migration. Très curieusement, les neurones capables de se diviser après la naissance en dehors de la couche germinative (cellules des grains du cervelet, de l'hippocampe et bulbe olfactif) sont les seuls à exprimer l'ARN 3.1 à l'âge adulte.

L'ARN 8.5 est également très abondant dans le système nerveux embryonnaire. Il code pour un polypeptide de 24 kDa. dont un segment est homologue à une protéine décrite il y a quelques années comme très enrichie dans les dendrites des neurones du système nerveux central. Sa caractérisation devrait permettre de définir une nouvelle famille de protéines neuronales (J.M. Studler, D. Saberan-Djoneidi, M. Lévi-Strauss).

1.2.2. *Sensibilité des neurones dopaminergiques nigro-striataux à une perturbation du métabolisme énergétique*

Plusieurs observations indiquent que les neurones dopaminergiques nigro-striataux pourraient être particulièrement sensibles à une perturbation de leur métabolisme énergétique. Tout d'abord, la mise en évidence d'anomalies mitochondriales en dehors du système nerveux au cours de la maladie de Parkinson suggère que celles-ci pourraient faire partie des facteurs prédisposant à cette maladie. Ensuite, la sensibilité particulière de la voie nigro-striatale à l'intoxication par le MPTP (un inhibiteur du complexe I mitochondrial) qui affecte peu la voie dopaminergique méso-limbique indique également une fragilité particulière des corps cellulaires dopaminergiques de la substance noire à une diminution du métabolisme énergétique.

Nous avons déjà réalisé plusieurs types d'expériences dont les résultats indiquent effectivement que les neurones dopaminergiques sont spécialement sensibles à l'action de la roténone.

La recapture de la dopamine, mesurée sur des synaptosomes de striatum de souris, est très fortement inhibée par des doses de roténone de 10^{-5} M. qui affectent beaucoup moins la recapture d'autres neurotransmetteurs tels que la sérotonine ou le GABA. Nous avons obtenu le même type de résultats sur des neurones embryonnaires de mésencéphale en culture primaire chez lesquels de faibles doses de roténone inhibent beaucoup plus la recapture de la dopamine que celle du GABA.

De telles expériences indiquent soit que la recapture de la dopamine consomme beaucoup plus d'énergie que celle d'autres neurotransmetteurs, soit, comme nous le pensons, que les terminaisons dopaminergiques des neurones nigro-striataux sont plus sensibles que celles d'autres neurones à la diminution de la production d'ATP due à l'action de la roténone.

Pour démontrer cette dernière hypothèse, l'inhibition de la recapture de la dopamine par la roténone a été mesurée sur les terminaisons des neurones nigro-striataux et sur celles des neurones méso-limbiques dont les corps cellulaires sont situés dans l'aire tegmentale ventrale. Pour cela, des synaptosomes ont été préparés à partir du striatum dorsal et postérieur (terminaisons nigro-striatales), et à partir du noyau accumbens (terminaisons méso-limbiques). Nous avons ainsi observé une inhibition de 60 % de la recapture de la dopamine dans le striatum par 10^{-5} M. de roténone alors que dans le noyau accumbens cette inhibition n'est que de 30 % (I. Marey-Semper, M. Lévi-Strauss).

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

2.1. RÔLES DES INTERACTIONS NEURO-ASTROCYTAIRES DANS LA RÉGULATION DE LA NEUROTRANSMISSION GLUTAMATERGIQUE

(Responsable de l'équipe : Joël Premont)

Nous avons antérieurement démontré que l'adénosine ou la somatostatine potentialisent fortement la production d'inositol phosphates induite par l'activation des récepteurs α_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. L'acide arachidonique formé en bloquant la libération de glutamate spontanément libéré des astrocytes, provoque une accumulation de cet acide aminé dans le milieu extracellulaire et lui permet ainsi d'atteindre une concentration suffisante pour stimuler des récepteurs couplés à une phospholipase C. Cette stimulation en s'ajoutant à celle induite par l'activation des récepteurs α_1 -noradrénergiques peut expliquer l'effet « potentialisateur » du nucléoside ou du peptide (somatostatine) sur la réponse noradrénergique. Ainsi, les astrocytes, en réponse à des signaux neuronaux, pourraient prolonger l'action du glutamate libéré dans la fente synaptique.

2.1.1. Libération de l'acide arachidonique par les astrocytes en réponse au glutamate

Nephi Stella a montré que le glutamate, lui même, pouvait entretenir le processus décrit ci-dessus. En effet, cet acide aminé excitateur induit, à son tour, dans les astrocytes de striatum (mais également dans ceux provenant du cortex cérébral et de l'hippocampe) une activation d'une phospholipase conduisant à une libération d'acide arachidonique. Le mécanisme mis en jeu par le glutamate est différent de ceux responsables de la libération de cet acide gras par l'adénosine, la somatostatine ou l'endothéline. En effet, il est à la fois indépendant de l'activation d'une protéine kinase C et ne fait pas intervenir de protéines G sensibles à la toxine de pertussis. De plus, les quantités d'acide arachidonique libérées par le glutamate ou l'endothéline sont additives. Une phospholipase A2 pourrait être impliquée dans l'effet du glutamate puisque celui-ci est supprimé par deux inhibiteurs de cette lipase, la mépacrine et le bromo-phénacyl-bromide mais qu'il persiste en présence d'un inhibiteur de diacylglycérol lipase. Une diminution des activités enzymatiques mises en jeu dans les processus de réacylation paraît devoir être écartée, le thimérosal, un inhibiteur des enzymes de réacylation n'affectant pas l'amplitude de l'effet du glutamate.

Martine Tencé et Nephi Stella ont également observé que l'acide arachido-

nique ainsi produit peut être, en partie, métabolisé en eicosanoïdes et plus particulièrement en prostaglandines F_{2α} et D₂ et que ces métabolites induisent dans les astrocytes de striatum une augmentation de la synthèse de dérivés phosphorylés de l'inositol. Une action autocrine de ces eicosanoïdes est vraisemblable. En effet, si l'essentiel de l'action de l'adénosine sur les astrocytes striataux fait intervenir le glutamate (voir ci-dessus), une faible partie de l'effet du nucléoside, sur la formation d'inositol phosphates, est réduite par l'indométhacine, un inhibiteur des cyclooxygénases, enzymes catalysant la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines. De plus, l'addition de glutamate et de l'une des deux prostaglandines, précédemment mentionnées, restaure l'intégralité de l'effet de l'adénosine.

2.1.2. Libération de l'acide arachidonique à partir des neurones striataux en réponse à un agoniste muscarinique, le carbachol

Les astrocytes ne sont pas les seules cellules capables de libérer de l'acide arachidonique dans le SNC. Des 1988, A. Dumuis dans l'équipe du Dr. J. Bockaert avait montré que l'activation d'un récepteur du glutamate (NMDA) induisait une libération de cet acide gras par les neurones striataux. Deux années plus tard, les mêmes auteurs montrèrent que cet effet était reproduit par l'activation conjointe d'autres récepteurs du glutamate (métabotropiques et AMPA). Une telle production d'acide arachidonique pourrait, à nouveau, potentialiser la transmission glutamatergique, non plus en prolongeant la présence de l'acide aminé dans la fente synaptique par une inhibition de sa recapture dans les astrocytes mais en augmentant l'efficacité du glutamate sur l'un de ses récepteurs (NMDA) comme l'a récemment démontré l'équipe d'Attwell à Londres. Une telle régulation, cette fois hétérologue, pourrait intervenir entre la transmission glutamatergique et cholinergique. En effet, Martine Tencé a montré qu'un agoniste muscarinique, le carbachol, provoquait une importante libération d'acide arachidonique dans les neurones striataux qui peut, comme nous l'avons vu, faciliter la transmission glutamatergique en agissant à la fois sur les astrocytes (inhibition de la capture du glutamate) et sur les neurones (facilitation de la réponse NMDA). Le mécanisme impliqué (i.e. identification des protéines G mises en jeu, et rôle des protéine kinases) est en cours d'étude.

2.2. ÉTUDE DES INTERACTIONS GLIALES PAR L'INTERMÉDIAIRE DES JONCTIONS DE TYPE « GAP » (Responsable de l'équipe C. Giaume)

2.2.1. Régulation de la perméabilité des jonctions « gap » des astrocytes

In vivo les astrocytes sont couplés entre eux par des jonctions « gap » qui confèrent à ces cellules une organisation de type syncytiale. En utilisant un modèle *in vitro*, celui des cultures primaires d'astrocytes de striatum, nous

avons démontré précédemment que la perméabilité de ces jonctions était contrôlée par la noradrénaline. Cette étude de la régulation de la perméabilité jonctionnelle a été poursuivie en utilisant les endothélines, une famille de peptides synthétisés dans le cerveau par au moins trois types cellulaires (les cellules endothéliales, les astrocytes et certains neurones). La stimulation des récepteurs de ces peptides provoque dans les astrocytes des augmentations spectaculaires de la concentration de seconds messagers connus pour agir sur la perméabilité des jonctions « gap » dans différents tissus : le calcium intracellulaire, le diacylglycérol et l'acide arachidonique. Nous avons montré sur des astrocytes confluents que deux isoformes de l'endothéline, ET1 et ET3, produisent une inhibition totale de la diffusion intercellulaire d'un traceur fluorescent, le jaune Lucifer. Cet effet est reproduit par la sarafotoxine (SRTX) dont la séquence présente une grande homologie avec celles des endothélines. L'action inhibitrice de ces trois composés (ET1, ET3, SRTX) est bloquée en absence de calcium externe. Cette observation suggère que les produits de l'activation des phospholipases C et/ou A2, dont l'activité dépend du calcium externe, pourraient participer aux mécanismes intracellulaires impliqués dans la fermeture des jonctions « gap ». Par la rapidité et l'ampleur de son action, l'endothéline se révèle un outil précieux pour analyser les événements intracellulaires qui participent à la régulation des échanges astro-astrocytaires par l'intermédiaire des jonctions « gap ». (C. Giaume, J. Cordier)

2.2.2. Caractérisation électrophysiologique des jonctions « gap » entre les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes constituent une autre population de cellules gliales du cerveau qui communiquent par des canaux jonctionnels. A ce jour, seules des données immunologiques permettent de supposer que la connexine exprimée par ces cellules serait différente de celle des astrocytes. Nous avons entrepris une étude électrophysiologique afin de caractériser la nature de la protéine jonctionnelle des oligodendrocytes. Dans ce but, plusieurs types de cultures cellulaires permettant d'obtenir des paires de cellules identifiées par des critères immunohistologiques, morphologiques et électrophysiologiques comme étant des oligodendrocytes ont été développés. Ainsi, des conditions de culture favorisant l'obtention d'un pourcentage élevé (> 80 %) de paires de cellules couplées électriquement ont été définies. Dans ces conditions le courant enregistré entre deux oligodendrocytes est bloqué par un agent découplant, l'octanol, ce qui permet d'affirmer que ce courant est provoqué par le passage des ions à travers des jonctions « gap ». L'utilisation de cette préparation d'oligodendrocytes devrait permettre d'aborder l'étude des propriétés élémentaires de leur canaux jonctionnels. (L. Venance, J. Cordier)

2.3. RECEPTEURS DES TACHYKININES

(Responsable de l'équipe : Jean-Claude Beaujouan).

2.3.1. Recherche d'analogues sélectifs des récepteurs des tachykinines

Les études structure-affinité et structure-activité ont été poursuivies en étroite collaboration avec S. Lavielle et G. Chassaing (Paris VI, Jussieu).

* Les facteurs structuraux influençant la reconnaissance des sites NK-1 par la SP ont été étudiés après inversion de la conformation absolue de chaque acide aminé dans la séquence de la SP. Le remplacement un à un des acides aminés naturels par des D-énantiomères dans la partie 1 à 5 et en position 10 de la SP n'affecte pas la conformation bioactive de la SP. Par contre, l'introduction de D-énantiomères dans les autres positions C-terminales (partie message de la molécule) provoque une diminution très importante de l'affinité et de l'activité de ces analogues modifiés vis à vis des sites NK-1 (Duplaa et al.).

* La sélectivité restreinte des tachykinines endogènes pour leurs récepteurs respectifs, ainsi que la localisation fréquente dans les mêmes structures cérébrales de ces peptides et de leurs différents récepteurs nécessitent de développer des agonistes et antagonistes sélectifs. Les agonistes NK-1 et NK-3 déjà disponibles étant suffisamment sélectifs, des agonistes NK-2 ont été recherchés.

Parmi les peptides synthétisés, nous avons montré que la [Lys⁵, MeLeu⁹, Nle¹⁰]NKA(4-10) est un agoniste soluble NK-2 sélectif possédant une forte affinité vis-vis des sites NK-2 et une puissante activité contractante sur l'artère pulmonaire de lapin (test NK-2). Les agonistes sélectifs NK-2 développés ont permis de détecter une population de récepteurs NK-2 sur la veine porte de rat considérée jusqu'alors comme une préparation biologique de type purement NK-3 (Chassaing et al.).

2.3.2. Présence sélective des récepteurs NK-1 sur les astrocytes corticaux de souris

La multiplicité des récepteurs des tachykinines et la non sélectivité des molécules endogènes nous ont incité à rechercher une préparation biologique ne possédant, si possible, que des récepteurs NK-1 afin d'approfondir nos connaissances sur leurs caractéristiques pharmacologiques et les systèmes de transduction associés.

Nous avons observé que les astrocytes en culture primaire de cortex cérébral de souris nouveau-nés liaient spécifiquement le ¹²⁵I-BHSP ; ces sites correspondent à des récepteurs fonctionnels, la SP stimulant avec une

très grande efficacité l'activité de la phospholipase C. De fait, cette préparation ne possède que des récepteurs NK-1. En effet, une excellente corrélation est trouvée entre les efficacités des tachykinines et leurs analogues sélectifs pour inhiber la liaison de ^{125}I -BHSP et pour stimuler l'activité phospholipase C, l'ordre de potentialité est caractéristique des récepteurs NK-1. Aucun site de liaison n'est détecté avec des ligands des récepteurs NK-2 et NK-3. D'autre part, les analogues sélectifs NK-2 et NK-3 ne stimulent pas l'activité phospholipase C et ne modulent pas l'action des agonistes NK-1. Des fragments C- ou N-terminaux de la SP, capables de potentialiser ou d'inhiber les effets induits par la SP dans d'autres préparations biologiques, sont dépourvus d'action sur les astrocytes (Beaujouan et al.).

2.3.3. Capture de myo-inositol dans la glande parotide de rat. Mécanisme mis en jeu lors de l'activation de récepteurs NK-1 par la substance P

La substance P (SP) inhibe le transport de ^3H -myo-inositol dans les cellules acineuses de la glande parotide de rat par l'intermédiaire des récepteurs NK-1 ; les analogues sélectifs NK-2 et NK-3 étant peu ou pas actifs. Ce nouveau test biologique très performant permet d'examiner les activités agonistes ou antagonistes de molécules reconnaissant les récepteurs NK-1. Le mécanisme intervenant dans cette inhibition du transport du ^3H -myo-inositol a été étudié.

Le myo-inositol et le glucose sont captés par deux transporteurs différents dans ces cellules. La SP inhibe rapidement l'accumulation initiale de ^3H -myo-inositol dans le cytosol en diminuant sa capture et est dépourvue d'effet sur son efflux. Un co-transport de sodium et de myo-inositol semble être impliqué : le ^3H -myo-inositol pénètre dans la cellule acineuse par deux mécanismes, l'un majoritaire Na^+ -dépendant, saturable, correspondant à un transport actif, l'autre Na^+ -indépendant, non saturable, reflet d'une diffusion facilitée. La SP n'affecte que le processus de capture sodium-dépendant puisque son effet n'est observé qu'en présence de Na^+ extracellulaire. Une diminution du gradient des ions sodium pourrait être responsable de l'effet inhibiteur de la substance P sur la capture de myo-inositol. En effet, la stimulation des récepteurs NK-1 couplés à une PLC entraînerait une augmentation du calcium intracellulaire qui provoquerait une ouverture de canaux K^+ calcium-sensibles, conduisant à un influx massif de Na^+ ce qui aurait pour conséquence de réduire le gradient de Na^+ et de façon concomitante l'influx de myo-inositol (Torrens et al.).

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

3.1. PROTÉINES KINASES ET PHOSPHATASES NEURONALES (Responsable de l'équipe : Jean-Antoine Girault)

3.1.1. Étude des sites de phosphorylation de 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 processus métaboliques comme le métabolisme du glycogène, mais reste mal connu dans les neurones. Deux protéines régulatrices 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 striatonigraux où sa phosphorylation est stimulée par la dopamine et sa déphosphorylation par le glutamate.

Nous poursuivons l'étude des sites de phosphorylation de la DARPP-32, en collaboration avec l'équipe de Paul Greengard (Université Rockefeller, New York). Nous exprimons dans *Escherichia coli* la DARPP-32 de rat de type « sauvage » ou dans laquelle les principaux résidus phosphorylables ont été remplacés par d'autres acides aminés. La protéine recombinante ainsi produite est purifiée jusqu'à l'homogénéité et utilisée pour des études biochimiques. Après phosphorylation par la PKA, la DARPP-32 recombinante de type « sauvage » inhibe la phosphatase 1, de la même manière que la protéine purifiée à partir de striatum de bœuf. La DARPP-32 dans laquelle la thréonine en position 34 est remplacée par une alanine n'est pas phosphorylée par la PKA et perd la capacité d'inhiber la phosphatase 1. La DARPP-32 dans laquelle la thréonine-34 est remplacée par un glutamate n'est pas non plus phosphorylée par la PKA. Toutefois cette forme mutante présente une activité constitutive d'inhibition de la phosphatase, avec un $K_i \sim 1\ 000$ fois supérieur à celui de la forme phosphorylée. Ces résultats indiquent que la présence d'une charge négative en position 34 participe à l'inhibition de la phosphatase, mais que le carboxyle du glutamate est beaucoup moins efficace pour cela que la phosphothréonine.

Nous avons également caractérisé la phosphorylation de la DARPP-32 par la caséine kinase I et fourni l'explication d'une particularité de migration électrophorétique de la DARPP-32 d'origine striatale. En effet, la DARPP-32 immunoprécipitée à partir de tranches de striatum de rat migre en électrophorèse en présence de SDS (« SDS-PAGE ») comme un doublet. Après hydro-

lyse ménagée par la thermolysine et séparation des phosphopeptides en deux dimensions, on constate que les deux bandes du doublet comportent un peptide commun, phosphorylé sur la sérine 102 par la caséine kinase II. La bande inférieure du doublet contient un phosphopeptide supplémentaire, de caractère très acide. Comme la séquence de la DARPP-32 comporte un site consensus de phosphorylation pour la caséine kinase I (sérine 137), situé dans un environnement très acide, nous avons recherché une phosphorylation de la DARPP-32 par la caséine kinase I. Cette sérine n'a pas d'équivalent dans la séquence de l'inhibiteur 1. La caséine kinase I, purifiée à partir de thymus de veau phosphoryle la DARPP-32 avec une K_m apparente de $\sim 2 \mu\text{M}$. La phosphorylation touche trois phosphopeptides différents, dont l'un disparaît lorsque l'on utilise comme substrat la DARPP-32 recombinante dont la sérine 137 a été remplacée par une alanine. Ce phosphopeptide a une migration, en carte peptidique à deux dimensions, identique à celle du phosphopeptide très acide observé dans la DARPP-32 obtenue à partir de tranches de striatum. De plus, la phosphorylation de la DARPP-32 purifiée par la caséine kinase I entraîne sa migration en un doublet dont seule la bande inférieure comporte le peptide très acide. Le dédoublement lors de l'électrophorèse et le peptide très acide ne sont pas observés avec le mutant Ser₁₃₇--Ala. L'ensemble de ces résultats démontre que la DARPP-32 est phosphorylée par la caséine kinase I sur la sérine 137 et que cette phosphorylation est responsable de la migration en doublet de la DARPP-32 d'origine striatale (Frédéric Desdouts, Jean-Antoine Girault).

3.1.2. *Étude de la phosphorylation de protéines sur des tyrosines dans les synapses striatales* (Julio C. Siciliano, Laurence Robel, Mathias Menegoz, Michèle Gelman et Jean-Antoine Girault)

Notre travail porte sur le rôle possible des phosphorylations de protéines sur des tyrosines dans l'établissement et le maintien des contacts synaptiques, dans le système nerveux central, au cours du développement et chez l'adulte, en nous intéressant plus particulièrement aux phénomènes postsynaptiques dans le striatum. Les années précédentes, nous avons mis en évidence les principales protéines phosphorylées sur des tyrosines au cours du développement, dans le tissu nerveux du rat et de la souris et dans les cellules en culture. Nous nous sommes ensuite intéressés à une phosphoprotéine majoritaire, enrichie au niveau postsynaptique (pp180) dont nous avons étudié les variations de phosphorylation en réponse à des lésions neuronales spécifiques, en collaboration avec Denis Hervé. Après lésion des neurones dopaminergiques, par injection de 6-OH-dopamine dans la voie nigrostriatale, la phosphorylation sur des tyrosines de pp180 et de plusieurs autres protéines striatales mineures, augmente de façon significative. Cette augmentation s'accompagne d'une stimulation de l'activité tyrosine kinase dans le striatum lésé, sans modification de l'activité tyrosine phosphatase. Le rôle du déficit en dopamine

dans cette modification de la phosphorylation de protéines sur des tyrosines est montré par la stimulation de la phosphorylation de pp180 après un traitement de 15 jours par différents neuroleptiques (formes retard d'halopéridol, de pipothiazine et de flupentixol). Par des expériences de fractionnement subcellulaire, nous avons montré que pp180 (sous forme phosphorylée) est enrichie dans les densités postsynaptiques. Les modifications de la phosphorylation de pp180 sont donc à mettre en rapport avec les modifications structurales des synapses striatales, en particulier des densités postsynaptiques, décrites en microscopie électronique après traitement neuroleptique chronique. Nous poursuivons actuellement la purification de la protéine pp180 et l'étude de la régulation de la phosphorylation de protéines sur des tyrosines dans des tranches de cerveau adulte et dans des neurones en culture. (Julio C. Siciliano, Laurence Robel, Mathias Menegoz, Michèle Gelman et Jean-Antoine Girault)

3.2. RÔLES DES PHOSPHORYLATIONS ASTROCYTAIRES DANS LES INTERACTIONS NEURO-GLIALES (Responsable de l'équipe : Hervé Chneiweiss)

Les phosphoprotéines astrocytaires peuvent être considérées comme les cibles intracellulaires finales de l'action des neuro-transmetteurs. Une stratégie d'analyse par gels bidimensionnels (2D-SDS-PAGE) des protéines dont le degré de phosphorylation varie en réponse à divers traitements pharmacologiques, nous a conduit à caractériser une protéine de faible poids moléculaire enrichie dans les astrocytes en comparaison des autres cellules cérébrales, pour laquelle nous avons proposé le nom de PEA15 (Protéine Enrichie dans les Astrocytes de 15K, pI 5,2-5,4) (H. Araujo, H. Chneiweiss).

PEA15 est l'une des principales phosphoprotéine astrocytaire. Elle existe sous au moins trois formes qui correspondent à des degrés de phosphorylation différents : un état non-phosphorylé (N) et deux formes phosphorylées (Pa et Pb). L'activation de la protéine kinase C (PKC), directement par des esters de phorbol, ou par activation de récepteurs couplés à un système de transduction stimulant la PKC, tel que le récepteur α 1-noradrénergique, induit la phosphorylation de la protéine. Nous avons pu démontrer in vitro et sur cellules intactes que PEA15 est un substrat direct de la PKC, et séquencer le site de phosphorylation spécifique. Au sein des astrocytes en culture primaire ou sur des tranches de cerveau, il semble que la PKC soit principalement impliquée dans le passage de « Pa » vers « Pb », la kinase responsable de la phosphorylation de « N » en « Pa » reste à déterminer (H. Araujo, H. Chneiweiss).

A partir des séquences peptidiques obtenues, des antisera polyclonaux ont été obtenus chez le lapin, puis purifiés sur colonnes d'affinité. Ils reconnaissent en immunoblots, mono- et bidimensionnelles, les différentes formes de la

protéine. Nous avons pu ainsi confirmer l'augmentation de l'expression de la protéine, dans le système nerveux central, au cours du développement (N. Danziger, J. Cordier, H. Chneiweiss).

Les astrocytes sont couplés par des jonctions étroites de type GAP. C. Giaume et ses collaborateurs ont pu montrer au laboratoire que la connexine 43 était la protéine spécifique des jonctions GAP astrocytaires. L'homologue cardiaque de cette protéine est modulée par phosphorylation, en particulier par la PKC et des tyrosine kinases. Il en résulte une fermeture des jonctions. Des résultats préliminaires suggèrent qu'un tel processus pourrait également rendre compte de l'effet de médiateurs, comme la noradrénaline, qui induisent la fermeture des jonctions GAP astrocytaires (M. Yokoyama, H. Chneiweiss).

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

4.1. ÉQUIPE DE ANDRÉ CHÉRAMY

4.1.1. *Glutamate et recapture de la dopamine*

Nos expériences antérieures, effectuées *in vivo* (chat anesthésié) et *in vitro* (synaptosomes de striatum de rat), ont montré que le glutamate exerce une facilitation présynaptique de la libération de dopamine (DA) dans le striatum, en activant des récepteurs de types AMPA et NMDA, localisés sur les terminaisons nerveuses dopaminergiques. De plus, le glutamate, en agissant sur les récepteurs AMPA, active également les récepteurs NMDA, même en présence d'une concentration physiologique de magnésium. De fait, l'amplitude de la libération de DA, évoquée par le glutamate est identique en présence et en absence de magnésium.

Outre ses effets directs sur la libération de dopamine, confirmés par d'autres auteurs, le glutamate pourrait aussi affecter la recapture de la dopamine. Nous avons donc comparé les effets de la nomifensine (un inhibiteur du transporteur de la dopamine), du KCl (agent dépolarisant), de l'AMPA, du NMDA, du glutamate de sodium et enfin du glutamate de potassium. Comme attendu, la nomifensine inhibe la recapture de $^3\text{H-DA}$ de manière dose-dépendante (K_i apparent d'environ 10^{-7}M). Il en est de même du KCl (K_i 25mM environ). Utilisés jusqu'à la concentration de 10^{-3}M , ni l'AMPA, ni le NMDA, ni le glutamate de sodium n'affectent la recapture de $^3\text{H-DA}$. Toutefois, le glutamate de potassium inhibe la recapture de $^3\text{H-DA}$ (K_i 25mM environ).

En conclusion, le glutamate lui-même est sans effet sur la recapture de dopamine, son action sur le potentiel de membrane (dépolariation par ouverture des canaux AMPA et NMDA) n'étant probablement pas suffisante, contrairement à ce qui se passe lors d'une dépolariation massive, comme celle obtenue avec l'ion K^+ (J.M. Desce et G. Godeheu).

4.1.2. *Glutamate et synthèse de la dopamine*

La tyrosine hydroxylase (TH, enzyme limitante impliquée dans la synthèse de la dopamine) est activée par plusieurs protéines kinases, tandis que plusieurs phosphatases réduisent son activité. Le calcium jouant un rôle primordial dans ces deux processus antagonistes, nous nous sommes demandés si le glutamate pouvait modifier la synthèse de dopamine, ainsi que le suggèrent plusieurs études.

Un nouveau modèle expérimental, permettant de mesurer simultanément la synthèse (efflux d'eau tritiée) et la libération de dopamine (efflux de 3H -DA) dans des synaptosomes de striatum de rat superfusés en continu avec un LCR artificiel enrichi en 3H -tyrosine, a été mis au point. Les effets de l' α -métylparatyrosine (inhibiteur de la TH), du 8-Br-cAMP (activateur de la protéine kinase cAMP-dépendante), d'une dépolariation par le potassium (qui entre autre active la protéine kinase Ca^{++} /calmoduline dépendante), du quinpirole et du sulpiride (agoniste et antagoniste des autorécepteurs dopaminergiques) ont été examinés. Les résultats obtenus, en accord avec ceux de la littérature démontrent la validité de notre méthode.

Le glutamate diminue la synthèse de 3H -DA lorsqu'il est utilisé à des concentrations qui stimulent la libération de 3H -DA. Cet effet est inhibé par l'APV (un antagoniste spécifique des récepteurs NMDA). Le NMDA provoque un effet analogue, qui est bloqué par le magnésium. Dans les mêmes conditions, le kainate, l'AMPA ou le trans-ACPD sont inactifs.

Cet effet, apparemment paradoxal, rappelle celui précédemment décrit par Greengard et al. (1990), qui ont observé que le NMDA réduit l'activité de la DARPP-32 dans des coupes de striatum. L'analyse des sites de phosphorylation de la DARPP-32 a permis à ces auteurs de conclure que l'influx calcique par le canal NMDA provoque une activation de la protéine kinase Ca^{++} /calmoduline dépendante et une phosphorylation de la calcineurine, une phosphatase qui agit sur la DARPP-32 et plus particulièrement sur les sites préalablement phosphorylés par la protéine kinase CAMP dépendante.

Le calcium intracellulaire semble donc avoir deux effets opposés sur l'activité de certaines enzymes, tous deux médiés via la protéine kinase Ca^{++} /calmoduline dépendante : un effet activateur direct (retrouvée lors de dépolariations importantes) et une inhibition indirecte via la calcineurine (observée avec le NMDA).

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'interaction du glutamate et de traitements affectant la phosphorylation de la TH sur les sites cAMP-dépendant. Lorsque la phosphorylation de ces sites est minimisée par réduction de l'activité de l'adénylate cyclase (adénosine déaminase plus quinpirole), l'effet inhibiteur du glutamate est réversé. Au contraire, le glutamate est capable de réduire l'activation de la TH produite par le 8-Br-cAMP (J.M. Desce et G. Godeheu).

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

Notre étude précédente concernant les effets du NAAG sur la libération $^3\text{H-DA}$ *in vivo* (chat anesthésié) ou *in vitro* (push-pull canules sur coupe de striatum de chat) a été transposée chez le rat. En effet, cette dernière espèce se prête mieux aux études pharmacologiques. Comme précédemment, nous avons observé que le NAAG, appliqué à très faible concentration (10^{-7}M) stimule la libération $^3\text{H-DA}$ continuellement synthétisée à partir de $^3\text{H-tyrosine}$. Cet effet n'est pas restreint, comme chez le chat, à la partie postérieure du striatum, et son amplitude est plus faible, ce qui n'a pas permis d'entreprendre la caractérisation pharmacologique des récepteurs du NAAG. La difficulté de ces expériences, nous a conduit à développer une autre approche *in vitro* consistant à prélever des micro-disques de tissu sur des coupes de striatum dans des zones enrichies en striosomes ou en matrice et à les placer dans des micro-chambres de superfusion. Le NAAG (10^{-7}M), stimule la libération de $^3\text{H-DA}$ dans ces deux zones striatales, mais l'amplitude de cette réponse est toujours très faible (30 %) (T. Galli et F. Artaud).

4.1.4. *Glutamate et libération de GABA*

La difficulté de l'étude des effets du NAAG sur la libération de $^3\text{H-DA}$ nous a incité à utiliser un autre modèle expérimental. Les neurones GABA-ergiques du striatum étant pourvus de récepteurs de type AMPA et NMDA, nous avons examiné les effets des agonistes glutamatergiques sur la libération de $^3\text{H-GABA}$ et recherché un éventuel effet du NAAG. La libération de $^3\text{H-GABA}$ précapté a été étudiée en utilisant la méthode de superfusion de micro-disque de tissu précédemment développée.

Dans un premier temps, la validité de ce modèle expérimental a été vérifiée. Le potassium stimule, de manière concentration-dépendante et calcium-dépendante, la libération de $^3\text{H-GABA}$ dans des zones striatales enrichies en matrice. La vétratridine accroît aussi cette libération, cet effet étant complètement aboli par la tétridotoxine.

L'AMPA augmente la libération de $^3\text{H-GABA}$ évoquée par le potassium ainsi que la libération basale. Ce dernier effet est calcium dépendant, réduit par la tétridotoxine, bloqué par le DNQX (antagoniste des récepteurs AMPA), mais n'est pas affecté par le MK801 (antagoniste des récepteurs

NMDA). L'effet de l'AMPA sur la libération de ^3H -GABA est similaire dans les zones striatales enrichies en striosomes ou en matrice, en présence ou en absence de tétradotoxine.

Dans les zones enrichies en matrice, le NMDA augmente la libération de ^3H -GABA évoquée par le potassium ou par l'AMPA, mais n'a pas d'effet propre. Par contre, un effet stimulateur du NMDA sur la libération basale de ^3H -GABA peut être observé lorsque l'on retire le magnésium du LCR de superfusion. Dans tous les cas (présence ou absence de magnésium), l'effet stimulateur du NMDA est plus important dans les zones striatales enrichies en matrice que dans celles enrichies en striosomes. La glycine ou la D-sérine ne potentialisent pas les effets du NMDA et ceux-ci sont réduits par le 7-chlorokynurénate, ce qui suggère que le site glycine du récepteurs NMDA est déjà saturé dans nos conditions expérimentales. Toutes les réponses NMDA observées sont bloquées par le MK801. Enfin, en présence de tétradotoxine, les réponses NMDA ne sont pas affectées dans les zones striatales enrichies en striosomes, mais sont réduites de manière importante dans les zones striatales enrichies en matrice.

Dans ces diverses conditions expérimentales, le NAAG est dépourvu d'effet tant sur la libération basale, que sur la libération de ^3H -GABA évoquée par le potassium ou les agonistes glutamatergiques. (T.Galli et F. Artaud).

4.2. ÉQUIPE DE MARIE-LOU KEMEL ET CHRISTIAN GAUCHY

4.2.1. *Hétérogénéité de la matrice au sein du noyau caudé chez le chat*

a. *Analyse anatomique*

Précédemment, en utilisant un traceur du flux axonal rétrograde (HRP-WGA), nous avons montré chez le chat que les neurones striato-nigraux sont groupés en îlots au sein de la matrice. Cette étude a été complétée en comparant la localisation des neurones marqués par de multiples injections de HRP-WGA effectuées dans la pars reticulata de la substance noire ou dans le globus pallidus interne, structure qui comme la substance noire est massivement innervée par des neurones striataux riches en GABA, dynorphine et deux tachykinines, la substance P et la neurokinine A. Des expériences de double marquage (HRP-WGA et mélange d'acides aminés- ^{14}C) ont également été réalisées.

Deux populations de neurones striato-nigraux ont pu être identifiées : ceux regroupés en îlots au sein de la matrice et ceux, moins nombreux, distribués en tapis en dehors des îlots dans la matrice. Les neurones striato-globus pallidus interne sont également distribués en tapis en dehors des îlots, ces neurones pourraient éventuellement être des neurones branchés innervant

également la substance noire. Au sein des îlots des neurones striato-nigraux, certaines cellules se projetant dans différentes zones de la substance noire selon un axe rostro-caudal ont pu être identifiées.

b. *Analyse biochimique*

Précédemment nous avons montré des différences dans la régulation présynaptique de la libération de dopamine par l'acétylcholine dans des zones enrichies en striosomes et en matrice. Cette étude a été poursuivie en analysant les effets directs et indirects de l'acétylcholine sur la libération de dopamine formée à partir de ^3H -tyrosine dans deux zones de la matrice adjacente : matrice 1 et matrice 2 correspondant en fait à deux zones riches en neurones striato-nigraux distribués en tapis ou regroupés en îlots respectivement. Dans les deux cas, des circuits locaux complexes interviennent dans la régulation présynaptique de la libération de dopamine, toutefois des différences importantes peuvent être décelées entre les deux zones matricielles. Particulièrement dans la matrice 1, l'effet inhibiteur de l'acétylcholine met en jeu des récepteurs muscariniques et de la dynorphine libérée des collatérales récurrentes des neurones striataux efférents, alors que dans la matrice 2, l'acétylcholine exerce son effet inhibiteur sur la libération de dopamine par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques et nicotiniques et une libération de GABA (Kemel et al., 1992)

4.2.2. *Modifications en présence de bicuculline et de naloxone de la libération de dopamine évoquée par le NMDA dans les deux compartiments striataux chez le rat*

Précédemment, nous avons montré qu'en l'absence de magnésium, le NMDA ($5 \times 10^{-5}\text{M}$) stimule la libération de ^3H -dopamine (formée à partir de ^3H -tyrosine) et que cet effet est plus prononcé dans des zones du striatum enrichies en matrice que dans celles enrichies en striosomes. De plus, une composante de la réponse observée dans la matrice s'est révélée sensible à la tétradotoxine suggérant en plus de l'effet direct (tétradotoxine-résistant) un effet facilitateur indirect. Des récepteurs NMDA se trouvant localisés sur les neurones efférents striataux nigraux riches en GABA et dynorphine, les expériences ont été répétées en présence de bicuculline ou de naloxone afin de mettre éventuellement en évidence des régulations indirectes inhibitrices.

a. *Intervention du GABA*

Utilisée à faible concentration ($5 \mu\text{M}$), la bicuculline potentialise considérablement l'effet facilitateur du NMDA sur la libération de dopamine dans les deux compartiments striataux. Cet effet est moins prononcé lorsque la bicuculline est utilisée à plus forte concentration ($50 \mu\text{M}$) en accord avec des données électrophysiologiques révélant que cet antagoniste peut bloquer le

récepteur NMDA. La potentialisation des réponses évoquées par le NMDA en présence de bicuculline (5 μM) persiste en présence de tétródotoxine, cette potentialisation étant toutefois moins prononcée dans les striosomes. Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces phénomènes : présence de contacts axo-axoniques, libération dendritique de GABA tétródotoxine insensible. Toutefois, l'ensemble de ces données indique que l'activation des neurones GABAergiques met en jeu des circuits locaux inhibiteurs dans les deux compartiments régulant présynaptiquement la libération de dopamine.

b. *Intervention de la dynorphine*

La naloxone utilisée à une concentration (10^{-6}M) qui bloque les récepteurs kappa opiacés potentialise également l'effet facilitateur du NMDA sur la libération de dopamine. Ces potentialisations persistent en présence de tétródotoxine. L'effet provoqué par la naloxone peut être antagonisé totalement par un agoniste kappa (U50488) dans les deux compartiments en présence de tétródotoxine. Dans la zone enrichie en striosomes (mais pas dans celle enrichie en matrice), en l'absence de tétródotoxine, l'effet de l'agoniste kappa n'inverse pas totalement la réponse potentialisée par la naloxone suggérant que celle-ci peut agir sur d'autres types de récepteurs opiacés (μ ou σ).

Enfin, des expériences d'additivité ont révélé que les effets potentialisateurs de la bicuculline et de la naloxone vis-à-vis des réponses évoquées par le NMDA sont additifs dans la matrice alors qu'aucune additivité n'est observée dans les striosomes. L'hétérogénéité de la matrice (démontrée chez le chat) pourrait expliquer les effets particuliers (additivité) intervenant dans la matrice (Krebs et al.)

4.2.3. *Rôle des tachykinines dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine dans les compartiments striataux chez le rat*

A l'aide d'agonistes spécifiques des récepteurs NK1, NK2 et NK3 des tachykinines ((Pro⁹)SP, (Lys⁵ MeLeu⁹, NLe¹⁰)NKA(4-10) et (Pro⁷)NKB, nous avons précédemment montré que les tachykinines correspondantes : substance P, neurokinine A et neurokinine B exercent des effets différents sur la régulation présynaptique de la libération de dopamine dans les compartiments striataux. Si les trois agonistes (10^{-7}M) stimulent la libération de dopamine dans la matrice, seule la (Pro⁹)SP exerce un effet similaire dans les striosomes. De plus les réponses évoquées par l'agoniste NK1 disparaissent en présence de tétródotoxine, tandis que celles induites par les agonistes NK2 et NK3 sont respectivement partiellement et totalement insensibles à l'effet de la tétródotoxine, suggérant que des récepteurs NK2 et NK3 sont localisés sur les terminaisons dopaminergiques dans la matrice.

Complétant cette étude, nous avons récemment montré que ces effets sont effectivement spécifiques. En effet, les réponses évoquées par l'agoniste NK1

sont bloquées par un antagoniste NK1 sélectif (RP 67580) et celle induite par l'agoniste NK2 disparaît en présence d'un antagoniste NK2 sélectif (SR 48968) alors que ces antagonistes ne s'opposent pas à la libération de dopamine évoquée par l'agoniste NK3. De plus, l'intervention des interneurons cholinergiques dans la stimulation de la libération de dopamine évoquée par la (Pro⁹)SP a pu être mise en évidence dans la matrice mais pas dans la zone striatale enrichie en striosomes.

5. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MÉSOCORTICAUX ET MÉSOLIMBIQUES

5.1. ÉTUDES BIOCHIMIQUES ET COMPORTEMENTALES (Responsable de l'équipe : Jean-Pol Tassin)

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

a. *Études comportementales*

Les systèmes dopaminergiques (DA) ascendants qui innervent le cortex préfrontal et le noyau accumbens ont des effets opposés sur l'activité locomotrice. En effet, l'injection d'amphétamine dans le noyau accumbens accroît l'activité locomotrice et cet effet est inhibé par l'injection simultanée d'amphétamine dans le cortex préfrontal. Nous avons montré que cet effet comportemental lié à une modification de la transmission DA corticale fait intervenir la stimulation des récepteurs de type D1. Des études biochimiques nous ont indiqué par ailleurs que la sensibilité des récepteurs DA de type D1 du cortex préfrontal était sous le contrôle d'un récepteur adrénergique de type alpha-1 bloqué par le prazosin. Nous avons montré que des injections bilatérales de doses excessivement faibles de prazosin dans le cortex préfrontal reproduisaient l'effet inhibiteur de l'amphétamine sur l'activité locomotrice lorsque celle-ci est injectée dans le cortex préfrontal. Plus précisément, l'hyperactivité locomotrice (+ 80 %), induite par une injection de 4 nmoles d'amphétamine dans le noyau accumbens, est totalement abolie par une injection bilatérale de 60 pg de prazosin dans le cortex préfrontal. Un autre antagoniste alpha-1 adrénergique, le WB 4101, à des doses aussi faibles (50 pg/côté), a le même effet.

Ces résultats ont été reproduits en utilisant des injections systémiques : l'hyperactivité locomotrice (+ 214 %) obtenue par une injection intrapéritonéale d'amphétamine (0,75 mg/kg) n'est plus que de + 66 % lorsqu'une injection de prazosin (60 µg/kg i.p.) a été réalisée auparavant. L'injection de prazosin n'a aucun effet par elle-même (G. Blanc, F. Trovero, J.P. Tassin).

b. *Etudes biochimiques*

L'étude de l'interaction DA/NA au niveau du cortex frontal a été approfondie en utilisant des cultures de cellules corticales de rats embryonnaires de 16 jours. Les récepteurs D1 couplés positivement à l'adénylate cyclase sont présents dans cette préparation. L'addition de DA (5×10^{-5} M) dans les milieux de culture entraîne une désensibilisation (perte de l'effet activateur de la DA sur l'adénylate cyclase) des récepteurs D1. Après élimination de la DA les récepteurs D1 se resensibilisent. Lorsque les cellules sont mises en présence de méthoxamine (10^{-4} M), un agoniste alpha-1 adrénergique, la vitesse de resensibilisation est augmentée d'un facteur 2. Plus précisément, 20 minutes après le retrait de la DA, l'activité de l'adénylate cyclase sensible à la DA a retrouvé 40 % de sa valeur dans les échantillons contrôles et 80 % de sa valeur en présence de méthoxamine. Ces résultats fournissent des éléments supplémentaires concernant le rôle régulateur de la stimulation des récepteurs alpha-1 adrénergiques sur la sensibilité des récepteurs D1 corticaux (F. Trovero, P. Marin).

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

L'étude autoradiographique du récepteur DA de type D2 ayant une très haute affinité pour le sulpiride mis en évidence dans le cortex s'est poursuivie. En utilisant de la clozapine nous avons vérifié qu'il ne s'agissait pas d'un récepteur de type D4. Ce dernier existe néanmoins dans le cortex préfrontal et représente environ 30 % des récepteurs DA marqués par l'iodo-sulpride. En utilisant de l'épidépride, un ligand particulièrement sélectif des deux récepteurs D2 actuellement clonés, nous avons montré qu'il ne s'agissait pas non plus de ce type de récepteur. Dans le cortex préfrontal du rat, les récepteurs D2 actuellement clonés ne représentent que 15 % de l'ensemble des sites marqués par l'iodo-sulpride. Enfin, la très faible affinité du récepteur D3 pour le sulpiride exclut qu'il s'agisse d'un récepteur de ce type. Le récepteur DA mis en évidence n'ayant pas encore été cloné il se pourrait que celui-ci fasse partie de la classe des récepteurs-canaux (J. Mantz, D. Hervé, J.P. Tassin).

5.1.3. *Étude des protéines G stimulant l'adénylate cyclase dans le striatum et la substance noire*

Une nouvelle protéine G nommée Golf, activatrice de l'adénylate cyclase et découverte dans l'épithélium olfactif a été récemment décrite en grande quantité dans le striatum. Le développement d'anticorps dirigés sélectivement contre les sous-unités alpha des protéines Gs et Golf ainsi que les sondes correspondantes d'ADN complémentaire, nous ont permis d'étudier la locali-

sation cellulaire de ces protéines au niveau du striatum. Une approche lésionnelle montre que Golf serait la protéine majoritaire activatrice de l'adénylate cyclase dans les neurones striataux qui se projettent dans la substance noire et qui possèdent les récepteurs D1. Cette coexistence suggère que Golf pourrait assurer le couplage des récepteurs D1 avec l'adénylate cyclase. De plus, une localisation somatodendritique préférentielle de Golf expliquerait un meilleur couplage des récepteurs D1 dans le striatum que dans les terminaisons axonales de la substance noire. Sans exclure son existence dans les neurones, la protéine Gs est observée dans les cellules gliales du striatum (D. Hervé, J.A Girault, M. Lévi-Strauss).

5.1.4. *Action des produits toxicophiliques sur les voies dopaminergiques ascendantes*

Il est généralement admis que l'action psychotrope des psychostimulants (amphétamine, cocaïne) implique une stimulation des voies dopaminergiques ascendantes. Nous avons étudié l'action sur ces voies DA d'autres produits, présentant les mêmes caractéristiques addictives chez l'homme, mais n'agissant pas directement sur la transmission DA.

Des traitements aigus de morphine et de nicotine augmentent le métabolisme de la DA dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal. Lors d'injections chroniques, l'activation de la voie DA méso-limbique est augmentée par la morphine alors qu'au contraire elle disparaît dès la troisième injection de nicotine. A l'opposé, des injections chroniques de nicotine augmentent l'activation de la voie DA méso-corticale alors que celles de morphine sont de moins en moins actives. Ces deux produits, lorsqu'ils sont injectés en chronique, induisent donc des effets opposés sur l'équilibre DA cortico-sous-cortical.

Nous avons vérifié qu'il n'existait effectivement pas de sensibilisation croisée entre la nicotine et la morphine, alors que celle-ci existe entre la morphine et les psychostimulants.

Enfin, nous avons montré qu'une lésion des fibres DA méso-limbiques ne modifiait pas les phénomènes de sensibilisation provoqués par la nicotine. L'ensemble de ces résultats suggère que les effets addictifs de la nicotine ne sont pas dus à l'activation de la voie DA méso-limbique. Le rôle de la voie DA méso-corticale reste à être déterminé (D. Hervé, P. Vézina, G. Blanc, J.P. Tassin).

5.2. ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES ET ANATOMIQUES (Responsable de l'équipe : Anne-Marie Thierry)

5.2.1 *Caractérisation pharmacologique des réponses excitatrices induites par la stimulation du noyau médiodorsal du thalamus au niveau du cortex préfrontal*

L'innervation thalamique du cortex préfrontal (CPF) est principalement issue du noyau médiodorsal du thalamus (MD). La stimulation électrique du MD à la fréquence de 5 à 10 HZ induit une réponse excitatrice au niveau du CPF. Différentes données suggèrent que le neuromédiateur des voies thalamo-corticales serait un acide aminé excitateur. Afin de vérifier cette hypothèse dans le cas de la projection MD-CPF, les effets de l'application iontophorétique d'antagonistes des deux principaux sous-types de récepteurs du glutamate (récepteurs AMPA/kainate et NMDA) sur les réponses excitatrices induites par la stimulation du MD ont été analysés. Cette étude a été réalisée à l'aide d'enregistrements unitaires extracellulaires chez le rat anesthésié avec de l'hydrate de chloral.

La latence des réponses excitatrices induites par la stimulation du MD (5-10HZ) est de 17,9ms. Toutes les cellules du CPF qui répondent à la stimulation du MD sont activées par l'application iontophorétique de NMDA et d'AMPA. Les réponses excitatrices induites par la stimulation du MD sont bloquées de façon réversible dans 67 % des cas par l'application de l'antagoniste des récepteurs NMDA, l'APV, et dans 47 % des cas par le CNQX, un antagoniste des récepteurs AMPA/kainate. L'APV et le CNQX ont été utilisés à des doses qui bloquent respectivement et de façon sélective les effets du NMDA et de l'AMPA.

Ces données suggèrent que le neuromédiateur de la voie MD-CPF est un acide aminé excitateur et montrent que les récepteurs NMDA et AMPA/kainate interviennent dans les réponses excitatrices induites par la stimulation du MD sur les neurones du CPF (S. Pirot).

5.2.2. *Identification du neuromédiateur de la projection hippocampe-cortex préfrontal*

Après avoir mis en évidence, chez le rat, une projection directe entre l'hippocampe et le cortex préfrontal (CPF), nous avons montré que l'hippocampe exerce une influence excitatrice sur l'activité spontanée des neurones du CPF et qu'il est possible d'induire une facilitation à long terme de la transmission synaptique de la voie hippocampe-CPF. Les données électrophysiologiques suggéraient qu'un acide aminé excitateur était probablement le neuromédiateur de la voie hippocampe-CPF. Une double approche anatomique et pharmacologique a donc été utilisée afin d'identifier ce médiateur et de caractériser le récepteur impliqué dans la transmission corticale.

La méthode de transport rétrograde du D-[³H]aspartate, nous a semblé la méthode la plus adaptée pour identifier des voies neuronales utilisant comme neuromédiateur un acide aminé excitateur. Après injection de D-[³H]aspartate dans le CPF médian, des corps cellulaires marqués ont été observés au niveau de CA1 et du subiculum avec une densité plus forte au niveau du subiculum ventral et intermédiaire. D'autres neurones marqués par le D-[³H]aspartate sont également présents dans les noyaux thalamiques, le cortex entorhinal et l'amygdale. Par contre, l'aire tegmentale ventrale, le raphé dorsal ou le locus coeruleus qui innervent le CPF ne présentent pas de neurones marqués par le D-[³H]aspartate, ce qui montre la spécificité du marquage.

Une analyse pharmacologique de la réponse excitatrice des neurones du CPF provoquée par la stimulation de l'hippocampe a ensuite été effectuée. Les neurones du CPF répondant à cette stimulation (par simple ou double choc) sont également activés par l'application iontophorétique des agonistes sélectifs des sous-types de récepteurs du glutamate, α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4isoxazolepropionique acide (AMPA) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ces effets sont antagonisés respectivement par le 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2-3-dione (CNQX) et le 2-amino-5-phosphonopentanoïque acide (APV). L'application de CNQX bloque les réponses excitatrices des neurones du CPF induites par la stimulation de l'hippocampe en simple choc (dans 67 % des neurones du CPF enregistrés) ou au double choc (dans 72 % des neurones enregistrés). L'APV bloque ces réponses excitatrices que dans respectivement 7 % et 13 % des cas.

Ces résultats suggèrent que 1) les afférences du CPF issues du subiculum ventral et intermédiaire utilisent l'aspartate et/ou le glutamate comme neuromédiateur 2) les récepteurs AMPA et NMDA sont présents sur les neurones du CPF qui répondent à la stimulation de l'hippocampe 3) l'activation de ces neurones par une stimulation basse fréquence de l'hippocampe évoque une réponse excitatrice corticale médiée principalement par des récepteurs AMPA (T. Jay).

PUBLICATIONS

CHASSAING G., LAVIELLE L., LÆUILLET D., ROBILLARD P., CARRUETTE A., GARRET C., BEAUJOUAN J.C., SAFFROY M., PETITET F., TORRENS Y. & GLOWINSKI J., *Selective agonists of NK-2 binding sites highly active on rat portal vein (NK-3 bioassay)* (Neuropeptide, 19, 91-95, 1991).

TROVERO F., HERVE D., BLANC G., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Different regulations of dopaminergic (D1) receptors and neurotensinergic binding sites in the rat prefrontal cortex.* (Neuroscience Lett., 127, 198-202, 1991).

TORRENS Y., DIETL M., BEAUJOUAN J.C. & GLOWINSKI J., *Inhibitory effects of substance P and carbachol on the saturable sodium-dependent uptake process of myo-inositol in rat parotid gland.* (JPET, 258, n° 2, 639-646, 1991).

GODBOUT R., MANTZ J., PIROT S., GLOWINSKI J. & THIERRY A.M., *Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic neurons on their target cells : electrophysiological and pharmacological characterization.* (J. Pharmacol. exp. Ther., 258, n° 2, 728-738, 1991).

GIAUME C., MARIN P., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Adrenergic regulation of intercellular communications between cultured striatal astrocytes from the mouse.* (PNAS, 88, 5577-5581, 1991).

LANTIN LE BOULCH N., TRUONG-NGOC N.A. & GAUCHY C., *Role of dendritic dopamine of the substantia nigra in the modulation of nigrocollicular-g-aminobutyric acid release ; in vivo studies in the rat.* (J. Neurochem., 57, 3, 1080-1083, 1991).

LE GOUVELLO S., CHNEIWEISS H., TARANTINO N., DEBRE P. & SOBEL A., *Sthamin phosphorylation patterns discriminate between distinct transduction pathways of human T lymphocyte activation through CD2 triggering.* (FEBS Lett., 287, 1, 2, 80-84, 1991).

DUPLAA H., CHASSAING G., LAVIELLE S., BEAUJOUAN J.C., TORRENS Y., SAFFROY M., GLOWINSKI J., D'ORLÉANS JUSTE P., REGOLI D., CARRUETTE A. & GARRET C., *Influence of the replacement of amino acid by its D-enantiomer in the sequence of substance P. 1. Binding and pharmacological data.* (Neuropeptides, 19, 4, 251-258, 1991).

DELUMEAU J.C., TENCE M., MARIN P., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Synergistic regulation of cytosolic Ca²⁺ concentration by adenosine and α 1-adrenergic agonists in mouse striatal astrocytes.* (Eur. J. Neurosci., 3, n° 6, 539-550, 1991).

LANTIN LE BOULCH N., TRUONG-NGOC N.A., GAUCHY C. & BESSON M.J., *In vivo release of newly synthesized (3H)GABA in the substantia nigra of the rat : relative contribution of GABA striato pallido nigral afferents and nigral GABA neurons.* (Brain Research, 559, 200-210, 1991).

VEZINA P., BLANC G., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Opposed behavioural outputs of increased dopamine transmission in prefronto-cortical and subcortical areas : a role for the cortical D-1 dopamine receptor.* (Eur. J. Neurosci., 3, 10, 1001-1007, 1991).

MALLAT M., CHAMAK B., THERY C., *Les macrophages cérébraux : rôle dans les remaniements morphologiques et la dégénérescence des neurones.* (Médecine/Sciences, 7, n° 8, 768-774, 1991).

BEAUJOUAN J.C., TEUTSCH B., SAFFROY M., PETITET F., TORRENS Y. & GLOWINSKI J., *NK-1 receptors are the only class of tachykinin receptors found on mouse cortical astrocytes.* (Peptides, 12, 813-820, 1991).

MARIN P., DELUMEAU J.C., TENCE M., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Somatostatin potentiates the $\alpha 1$ -adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate.* (P.N.A.S., 88, 9016-9020, 1991).

CHNEIWEISS H., CORDIER J. & GLOWINSKI J., *Cyclic AMP accumulation induces a rapid desensitization of the cyclic AMP-dependent protein kinase in mouse striatal neurons.* (J. Neurochem., 57, n° 5, 1708-1715, 1991).

TROVERO F., HERVE D., VEZINA P., DESBAN M., GLOWINSKI, J. & TASSIN J.P., *Dopaminergic control of striatal opiate receptors : evidence for an exclusive postsynaptic location of the mu-receptor subtype.* (Posters in Neurosciences, 1, 19-22, 1991).

GODBOUT R., MANTZ J., GLOWINSKI J. & THIERRY A.M., *The novel 5-HT₂ receptor antagonist, RP 62203, selectively blocks serotonergic but not dopaminergic-induced inhibition in the rat prefrontal cortex.* (Eur. J. Pharmacol., 204, n° 1, 97-100, 1991).

CHAMAK B. & MALLAT M., *Fibronectin and laminin regulate the in vitro differentiation of microglial cells.* (Neuroscience, 45, n° 3, 513-527, 1991).

THERY C., CHAMAK B. & MALLAT M., *Cytotoxic effect of brain macrophages on developing neurons.* (Eur. J. Neurosci., 3, 1155-1164, 1991).

DELUMEAU J.C., PETITET F., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PREMONT J., *Synergistic regulation of cytosolic Ca²⁺ concentration in mouse astrocytes by NK1 tachykinin and adenosine agonists.* (J. Neurochem., 57, n° 6, 2026-2035, 1991).

DESCE J.M., GODEHEU G., GALLI T., ARTAUD F., CHÉRAMY A. & GLOWINSKI, J., *Presynaptic facilitation of dopamine release through D,L-amino-3H-hydroxy-6-methyl-4-isoxazole propionate receptors on synaptosomes from the rat striatum.* (J.P.E.T., 259 n° 2, 692-698, 1991).

JAY T.M. & WITTER M.P., *Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of phaseolus vulgaris-leucoagglutin.* (J. Comp. Neurol., 313, 574-586, 1991).

CHNEIWEISS H., CORDIER J. & SOBEL A., *Stathmin phosphorylation is regulated in striatal neurons by vasoactive intestinal peptide and monomamines via multiple intracellular pathways.* (J. Neurochem., 58, 1, 282-289, 1992).

HERVE D., TROVERO F., BLANC G., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Autodiagraphic identification of D1 dopamine receptors labelled with (3H)dopamine : distribution, regulation and relationship to coupling.* (Neuroscience, 46, n° 3, 687-700, 1992).

GIRAULT J.A., CHAMAK B., BERTUZZI G., TIXIER H., WANG J.K.T., PANG D.T. & GREENGARD P., *Protein phosphotyrosine in mouse brain : developmental changes and regulation by epidermal growth factor, type I*

insulin-like growth factor, and insulin. (J. Neurochem., 58, n° 2, 518-528, 1992).

TROVERO F., BLANC G., HERVE D., VEZINA P., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Contribution of an $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtype to the expression of the « ventral tegmental area syndrome ».* (Neuroscience, 47, n° 1, 69-76, 1992).

DESCE J.M., GODEHEU G., GALLI T., ARTAUD F., CHÉRAMY A. & GLOWINSKI J., *L-Glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum : involvement of AMPA and N-methyl-d-aspartate receptors.* (Neuroscience, 47, n° 2, 333-339, 1992).

SERVAL V., GALLI T., CHÉRAMY A., GLOWINSKI J. & LAVIELLE S., *In vitro and in vivo inhibition of N-acetyl-l-aspartyl-l-glutamate catabolism by N-acylated L-glutamate analogs.* (J.P.E.T., 260, n° 3, 1093-1100, 1992).

PETITET F., BEAUJOUAN J.C., SAFFROY M., TORRENS Y., LAVIELLE S., CHASSAING G., LÉUILLET D. & GLOWINSKI J., *Un nouveau récepteur des tachykines révélé par des analogues de la substance P dans l'iléon de cobaye.* (C.R. Acad. Sci. Paris, t. 314, série III, 299-303, 1992).

GIRAULT J.A., SICILIANO J.C., ROBEL L. & HERVE D., *Stimulation of protein-tyrosine phosphorylation in rat striatum after lesion of dopamine neurons or chronic neuroleptic treatment.* (P.N.A.S., 89, n° 7, 2769-2773, 1992).

VEZINA P., BLANC G., GLOWINSKI J. & TASSIN J.P., *Nicotine and morphine differentially activate brain dopamine in prefronto-cortical and subcortical terminal fields : effects of acute and repeated injections.* (J.P.E.T., 261, n° 2, 484-490, 1992).

EL ETR M., MARIN P., TENCE M., DELUMEAU J.C., CORDIER J., GLOWINSKI J. & PEMONT J., *2-Chloroadenosine potentiates the $\alpha 1$ -adrenergic activation of phospholipase C through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate in striatal astrocytes.* (The J. Neurosci., 12, n° 4, 1363-1369, 1992).

PETITET F., SAFFROY M., TORRENS Y., LAVIELLE S., CHASSAING G., LÉUILLET D., GLOWINSKI J. & BEAUJOUAN J.C., *Possible evidence of a new tachykinin receptor subtype in the guinea pig ileum.* (Peptides, 13, n° 2, 383-388, 1992).

Différents chercheurs ont présenté leurs travaux dans les congrès suivants :

TASSIN J.P., *Y'a-t-il des voies neuronales pour l'anticipation.* L'anticipation : clef du temps de déprime, Lisbonne, Portugal, 17-19/01/92.

MALLAT M., *Interactions between brain macrophages and neuronal or astroglial cells.* International Titisee Conference on Neuroimmune networks : cell-cell communication and response to injury and regeneration in the CNS, Titisee, Allemagne, 02-07/03/92.

CHAMAK B., MALLAT M., *Neurotrophic activities of brain macrophages*, 12th EWCBR, La Plagne, 14-21/03/92.

CHAMAK B., MALLAT M., *Activités neurorégénérative et neurotrophique des macrophages cérébraux*. (Poster), Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

THERY C., MALLAT M., *L'interleukine 1 et le « tumor necrosis factor α » stimulent l'expression du gène du « colony-stimulating factor 1 » dans les astrocytes*. (Poster), Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

STELLA N., TENCE M., MAGISTRETTI P., GLOWINSKI J., PREMONT J., *Implication des prostaglandines dans un processus de régulation autocrine dans des astrocytes de striatum en culture*. (Poster), Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

TENCE M., CORDIER J., GLOWINSKI J., PREMONT J., *Libération d'acide arachidonique par l'endothéline dans les astrocytes de striatum en culture primaire*. (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

ROBERT N., CORDEAU-LOSSOUARN L., GLOWINSKI J., GIAUME C., *Analyse de l'activité synaptique de neurones corticaux en culture primaire*. (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

CHNEIWEISS H., ARAUJO H., CORDIER J., DANZIGER N., GLOWINSKI J., *PEA-15 : caractérisation d'une phosphoprotéine majeure des astrocytes du système nerveux central, substrat de la protéine kinase C*. (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

CORDIER J., ARAUJO H., DANZIGER N., GLOWINSKI J., CHNEIWEISS H., *PEA-15 : purification partielle, localisation cellulaire et tissulaire d'une phosphoprotéine majeure des astrocytes*. (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

PIROT S., GLOWINSKI J., THIERRY A.M., *Caractérisation pharmacologique des réponses excitatrices induites par la stimulation du noyau médo-dorsal du thalamus au niveau du cortex préfrontal chez le rat*. Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

MARIN P., TENCE M., TELLA N., DELUMEAU J.C., CORDIER J., GLOWINSKI J., PREMONT J., *Rôle des astrocytes dans la neurotransmission glutamatergique*. (Présentation orale). Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

DESCE J.M., GALLI T., GODEHEU G., ARTAUD F., CHÉRAMY A., GLOWINSKI J., *Contrôle présynaptique de la libération de dopamine par le glutamate au niveau de synaptosomes striataux : implication des récepteurs AMPA et NMDA*. (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

HUBERT J.P., DELUMEAU J.C., PREMONT J., DOBLE A., GLOWINSKI J., *Mobilisation du calcium intracellulaire dans des neurones de mésencéphale de*

souris en culture induite par une dépolarisation. Antagonisme par le riluzole. (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

KREBS M.O., KEMEL M.L., DESBAN M., GLOWINSKI J., GAUCHY C., *Contrôle présynaptique de la libération de dopamine par le NMDA dans les compartiments du striatum de rat : implication des neurones gabaergiques.* (Poster) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

KEMEL M.L., GAUCHY C., KREBS M.O., TREMBLAY L., DESBAN M., GLOWINSKI J., *Contrôle présynaptique de la libération de dopamine au niveau du striatum.* (Présentation orale) Société des Neurosciences, Strasbourg, 04-07/05/92.

MAUS M., VERNIER P., VALDENNAIRE O., GLOWINSKI J., MALLET J., *D2-Dopaminergic agonist quinpirole and 8-bromo-c-AMP regulate in opposite ways GOa GTP-binding protein mRNAs without changing D2 dopamine receptor mRNAs levels in striatal neurones in primary culture.* 5th Swiss Workshop of Methodology in Receptor Research, Lugano, 10-14/05/92.

BEAUJOUAN J.C., PETITET F., SAFFROY M., HEUILLET E., TORRENS Y., GLOWINSKI J., *Efficiency of tachykinin NK-1 antagonists on cultured mouse cortica astrocytes.* 5th Swiss Workshop of Methodology in Receptor Research, Lugano, 10-14/05/92.

GALLI T., *Effect of glutamatergic agonists on the release of 3H-GABA in the rat striatum.* (Poster) Conference J. Monod : « Exocytose » Aussois, 10-15/05/92.

TASSIN J.P., *Effets biochimiques et comportements de la nicotine.* « Jean Nicot », La Baule, 15-17/05/92.

GLOWINSKI J., GAUCHY C., KREBS M.O., TREMBLAY L., KEMEL M.L., *Local circuits involved in the control of dopamine release in striatal compartments.* DA 92 « From neurobiology to neuropathology », Forte Hotel Village, Sargaigue, 16-20/05/92.

TASSIN J.P., *Architectures et fonctions dans le système nerveux central : l'importance des neuromodulateurs.* NSI 92, Neurosciences et Sciences de l'Ingénieur, Ile d'Oléron, 26-28/05/92.

THIERRY A.M., PIROT S., MANTZ J., GODBOUT R., GLOWINSKI J., *Inhibitory influence of the mesocortical dopaminergic system on the rat prefrontal cortex.*, 7th International CA symposium, Amsterdam, 22-26/06/92.

GLOWINSKI J., DESBAN M., KEMEL M.L., GAUCHY C., TREMBLAY L., *Modulation by tachykinins of dopamine release in patches (striosomes) and matrix of the rat striatum.*, 7th International CA symposium, Amsterdam, 22-26/06/92.

KEMEL M.L., GAUCHY C., DESBAN M., GLOWINSKI J., *Functional heterogeneity of the matrix compartment in the cat caudate nucleus : involvement of*

GABA or dynorphin neurons in the cholinergic presynaptic regulations of dopamine release., 7th International CA symposium, Amsterdam, 22-26/06/92.

KEMEL M.L., DESBAN M., GAUCHY C., GLOWINSKI J., *Heterogeneous organization of striato-nigral and striato-pallidal neurons in the matrix compartment of the cat caudate nucleus.* 7th International CA symposium, Amsterdam, 22-26/06/92.

TROVERO F., BLANC G., HERVE D., GLOWINSKI J., TASSIN J.P., *Blockade of an $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtype reduces behavioural consequences of mesocorticolimbic dopamine depletion.* 7th International CA symposium, Amsterdam, 22-26/06/92.

THIERRY A.M., GODBOUT R., MANTZ J., PIROT S., GLOWINSKI J., *Differential influence of dopaminergic and noradrenergic afferents on their target cells in the rat prefrontal cortex.*, XVIIth CINP Congress, Nice, 28/06-02/07/82.

LISTE DES DIPLÔMÉS - 1991-1992

DELUMEAU Jean-Christophe :

Interaction des activités phospholipases C & A2 dans la régulation du Ca²⁺ cytosolique des astrocytes.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, soutenue le 3 décembre 1991.

MANTZ Jean :

Influence des systèmes monoaminergiques ascendants sur l'activité spontanée et les réponses évoquées des neurones du cortex préfrontal chez le rat anesthésié.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, soutenue le 26 mai 1992.

THERY Clotilde :

Les cellules microgliales amiboïdes du système nerveux central des muridés : interactions avec les astrocytes et les neurones *in vitro*.

Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI, soutenue le 30 juin 1992.

STELLA Nephi (sous la direction de J. Prémont) :

Rôles de l'acide arachidonique et du glutamate dans les interactions astrocyto-astrocytaires et astrocyto-neurales.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 1991.

MAREY-SEMPER Isabelle (sous la direction de M. Lévi-Strauss) :

Clonage de marqueurs moléculaires impliqués dans l'ontogénèse du striatum de rat.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 1991.

ROBEL Laurence (sous la direction de J.A. Girault) :

Activités tyrosine kinase et phosphotyrosine phosphatase dans le striatum du rat : effets de la lésion des neurones dopaminergiques et des traitements neuroleptiques.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 1991.

DESDOITS Frédéric (sous la direction de J.A. Girault) :

La DARPP-32, un inhibiteur de la phosphatase 1 impliqué dans l'action de la dopamine. Expression dans *Escherichia coli* et les cellules COS.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P. et M. Curie, Sept. 1991.