

Neuropharmacologie

M. Jacques GLOWINSKI, membre de l'Institut
(Académie des Sciences), professeur

Cours : Les récepteurs du glutamate : récents développements

Nous avons assisté depuis 1989 à un développement remarquable des recherches sur les propriétés des récepteurs ionotropiques et métabotropiques du glutamate. Ceci résulte essentiellement de l'essor des travaux effectués à l'aide des techniques de biologie moléculaire qui ont permis d'identifier et de déterminer la structure de nombreux récepteurs de ce médiateur chimique. Toutefois les implications du glutamate dans la transmission synaptique excitatrice de très nombreuses synapses centrales, les modifications des connexions synaptiques au cours de l'ontogénèse, les changements d'efficacité synaptique et les phénomènes de mémorisation cellulaire, ou encore le rôle neurotoxique du glutamate dans diverses situations pathologiques, telles que l'ischémie ou les maladies neurodégénératives, ne sont pas étrangers à l'intérêt grandissant de ce domaine de recherche.

*

**

Consacré uniquement aux récepteurs ionotropiques de type AMPA et kainate, le cours de cette année a débuté par un rappel historique dans lequel trois groupes de problèmes ont été discutés.

Après avoir succinctement décrit les principales voies glutamatergiques centrales, indiqué l'existence encore peu connue de voies distinctes riches en aspartate, insisté sur l'identité de leur(s) co-transmetteur(s), nous avons souligné l'importance des relations astrocyto-neurales dans le métabolisme du glutamate.

Les apports progressifs et complémentaires dans la classification des différents types de récepteurs du glutamate, des données électrophysiologiques et chimiques (développement de divers agonistes et antagonistes), et des études

de liaison avec le glutamate ou divers ligands spécifiques, combinées ou non à l'autoradiographie, ont été ensuite mis en évidence. Quatre axes directeurs ont été évoqués : 1) les distinctions pharmacologiques et physiologiques des récepteurs du quisqualate et du kainate, 2) la complication croissante du profil pharmacologique des récepteurs ionotropiques de type NMDA, 3) les propriétés fonctionnelles encore peu élucidées des récepteurs L-AP4 et 4) l'apparition de la classe des récepteurs métabotropiques (couplés à la phospholipase C) découverte à l'aide d'un nouvel agoniste, le t-ACPD.

Enfin, un bilan général des contributions effectuées pendant ces cinq dernières années par les biologistes moléculaires, les biochimistes et les électrophysiologistes, a été présenté. Ceci a permis d'aborder plusieurs problèmes : 1) les stratégies utilisées pour isoler et déterminer les propriétés fonctionnelles des sous-unités des récepteurs de l'AMPA, du kainate, du NMDA et des différentes sous-classes des récepteurs métabotropiques couplés à des protéines G ; 2) les caractéristiques communes et distinctes (importance du fragment extracellulaire N-terminal, présence de 4 ou 5 fragments transmembranaires, site Q/R dans le fragment transmembranaire II intervenant ou non dans la perméabilité vis-à-vis du calcium, etc.) du récepteur nicotinique périphérique et des récepteurs ionotropiques glutamatergiques ; 3) les propriétés structurales et fonctionnelles des sous-unités GluR1 → GluR7, KAI1 et 2, NMDA R1 et NMDA R2 ; 4) la caractérisation pharmacologique des récepteurs couplés à la phospholipase C ou négativement à l'adénylate cyclase ; 5) la clarification de la nomenclature ; 6) certains aspects de la distribution topographique des sous-unités clonées ; 7) les limites des données obtenues avec les récepteurs recombinants.

*

**

La deuxième partie de ce cours a été consacrée à une analyse détaillée des propriétés des récepteurs de type AMPA. Après avoir insisté sur le rôle déterminant des équipes d'Heinemann et de Seeburg dans le clonage et la détermination de la structure des sous-unités GluR1(A), GluR2(B), GluR3(C) et GluR4(D), les propriétés électrophysiologiques et biochimiques (liaison 3H-AMPA) des récepteurs recombinants homomériques ou hétéromériques ont été décrites. L'absence de désensibilisation en présence de kainate et la plus grande amplitude des réponses induites par la stimulation des récepteurs hétéromériques ont été soulignées.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux isoformes FLIP et FLOP de chacune de ces sous-unités en comparant leur structure moléculaire, leurs propriétés électrophysiologiques, leurs évolutions au cours du développement, leurs distributions topographiques dans les structures cérébrales et enfin leurs incidences respectives sur la transmission glutamatergique dans des situations

physiologiques ou pathologiques. Le rôle déterminant de la sous-unité GluR2(B) (plus précisément de l'identité de l'acide aminé du site Q/R dans le fragment TMII) dans les propriétés électrophysiologiques et l'absence de perméabilité vis-à-vis du calcium des récepteurs hétéromériques ont été longuement discutés. Il en fut de même du processus très original d'édition du messenger RNA de la sous-unité GluR(2)B responsable de l'insertion de l'arginine dans le site Q/R.

Enfin, les propriétés des récepteurs recombinants AMPA et celles de certains récepteurs neuronaux et gliaux présentant paradoxalement une perméabilité vis-à-vis du calcium [absence de sous-unité GluR2(B)] ont été comparées. De plus, des données pharmacologiques récentes concernant de nouvelles molécules agonistes et antagonistes qui modulent les processus de désensibilisation des récepteurs AMPA ont été décrites.

*

**

La dernière partie de ce cours a été consacrée aux récepteurs ionotropiques de type kainate qui selon les études topographiques des sites à haute affinité du kainate et des messagers RNA correspondants à leurs sous-unités semblent être présents dans de très nombreux circuits neuronaux. Toutefois leurs propriétés physiologiques sont encore peu connues à la différence de celles des récepteurs AMPA ou NMDA. Cinq sous-unités des récepteurs de type kainate ont été identifiées (GluR5, GluR6, GluR7, KAI1 et KAI2) par les techniques de clonage en utilisant au départ la sous-unité GluR2 comme sonde. Les différences et similitudes des structures moléculaires ainsi que les distributions anatomiques de ces sous-unités ont été discutées et comparées à celles des sous-unités des récepteurs AMPA. Seules les sous-unités GluR5 et GluR6 permettent d'obtenir des récepteurs recombinants homomériques ou hétéromériques fonctionnels. Ces récepteurs qui présentent une haute affinité pour le kainate ou le domoate, et qui néanmoins se distinguent par plusieurs de leurs propriétés électrophysiologiques ou pharmacologiques, ont comme particularité commune de se désensibiliser en présence de kainate, cet effet étant bloqué par la concanavalline A. Certaines propriétés des récepteurs homomériques GluR6, telles que les facteurs intervenant dans la perméabilité vis-à-vis du calcium, la très grande complexité et diversité des processus d'édition du messenger RNA, ou encore les implications des processus de phosphorylation par la protéine kinase dépendante de l'AMP cyclique, ont particulièrement retenu notre attention. Enfin, nous avons insisté sur les analogies des propriétés électrophysiologiques des récepteurs recombinants GluR5/KA2 et des récepteurs kainate présents dans les ganglions des racines dorsales.

Séminaires : (organisés avec P. CORVOL, chaire de Médecine Expérimentale)
Nouvelles données sur les peptides : actions centrales et périphériques

D. F. STEINER (Howard Hughes Medical Institute, Chicago, USA) : Une nouvelle famille d'endopeptidases impliquée dans la maturation des neurohormones

B. ROQUES (Université René Descartes, Paris V, France) : Modélisation des voies peptidergiques par les inhibiteurs de peptidases : données structurales et pharmacocliniques.

G. CHASSAING (Univ. Pierre et Marie Curie, Paris VI, France) : Analyse topographique du récepteur NK-1 des tachykinines.

X. EMONDS-ALT (SANOFI Recherche, Montpellier, France) : Antagonistes non-peptidiques des récepteurs des tachykinines

F. MENDELSON (Austin Hospital, Heidelberg, Australia) : Cartographie des récepteurs et diverses actions de l'angiotensine dans le cerveau

M. CLOZEL (Hoffmann la Roche, Bale, Suisse) : Découvertes des premiers antagonistes des récepteurs de l'endothéline actifs par voie orale

G. HAMON (Roussel Uclaf, Romainville, France) : Les récepteurs opiacés kappa hypothalamo-hypophysaires : cibles pour la régulation de la sécrétion de vasopressine

T. HÖKFELT (Karolinska Institutet, Stockholm, Suède) : Plasticité de l'expression des neuropeptides et de leurs récepteurs

Adam DOBLE (Rhône Poulenc Rorer, Vitry, France) : Antagonistes des récepteurs de la cholecystokinine

P KITABGI (Université de Nice-Sophia-Antipolis, France) : Récepteurs de la neurotensine : Développement récent d'antagonistes non peptidiques de la neurotensine.

J. HUGHES (Parke-Davis Neuroscience Research Centre, Cambridge, Angleterre) : Récepteurs opioïdes, développements récents, caractérisation et action thérapeutique

P. MAGISTRETTI (Université de Lausanne, Suisse) : Les neurones VIP du cortex cérébral : leur rôle dans la régulation métabolique

C. GIAUME (Collège de France, Paris, France) : Régulation de la perméabilité des jonctions de type « gap » astrocytaires par les endothélines

M. LE MOAL (Université de Bordeaux II, Bordeaux, France) : Approches fonctionnelle et comportementale du rôle des neuropeptides centraux

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. *Production de facteurs de croissance neuronaux par les macrophages cérébraux*

Nous avons montré que des macrophages cérébraux secrètent spontanément de la thrombospondine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire pouvant stimuler la croissance ou la régénération de prolongements neuronaux. Cette année, l'expression *in situ* de la thrombospondine par les macrophages cérébraux a été étudiée au cours de l'ontogénèse cérébrale. Des analyses immunocytochimiques effectuées sur des coupes de cerveau antérieur du rat à différents stades du développement (entre le 17^e jour de vie embryonnaire et la phase adulte) indiquent que cette protéine ne peut être détectée dans le parenchyme que jusqu'à la fin de la 2^e semaine de vie postnatale. Des amas de macrophages fortement immunoréactifs ont été localisés dans les zones de croissance des faisceaux axonaux, notamment dans le corps calleux et la zone intermédiaire du cortex cérébral. Une intense immunoréactivité a aussi été observée dans l'endothélium des capillaires cérébraux.

Lors de la maturation du SNC, la disparition des macrophages cérébraux est liée à leur transformation en cellules microgliales ramifiées. Cette différenciation cellulaire apparaît associée à une perte progressive de l'expression de thrombospondine.

Ces résultats confirment l'existence d'une production macrophagique de thrombospondine dans le SNC ; sa localisation conforte l'hypothèse d'un rôle promoteur des macrophages dans la croissance de prolongements neuronaux. (B. Chamak, A. Dobbertin).

1.1.2. *Etudes sur le recrutement des cellules microgliales*

Au cours de l'ontogénèse, la croissance de la population microgliale dépend de la prolifération locale de macrophages et de leur infiltration dans le tissu

cérébral. Nous avons montré qu' une cytokine produite par les astrocytes, le M-CSF, intervient dans la prolifération des macrophages cérébraux dans des cultures gliales primaires issues du SNC embryonnaire (souris E16). Récemment, nous avons mis en évidence que le b-FGF, un facteur de croissance produit par différents types de cellules nerveuses, est aussi capable de stimuler la prolifération des macrophages cérébraux.

La mise en œuvre d'un test de migration cellulaire polarisée a révélé que les neurones et les astrocytes en culture produisent des agents chemotactiques actifs sur les macrophages cérébraux ou sur des précurseurs macrophagiques isolés à partir de moëlle osseuse. Les macrophages cérébraux secrètent aussi des facteurs attirant les précurseurs macrophagiques. Un de ces facteurs pourrait être la protéine MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), une chémokine active sur les phagocytes mononucléés. De fait, des analyses par hybridation sur filtre indiquent que l'ARNm de MCP-1 est transcrit par les macrophages cérébraux purifiés *in vitro*. Les taux intracellulaires de cet ARNm sont accrus lorsque les cellules sont exposées au M-CSF ou à des activateurs macrophagiques tel que le lipopolysaccharide (C. Calvo, A. Dobbertin, M. Gelman).

1.2. ÉTUDE DE DEUX ADN COMPLÉMENTAIRES EXPRIMÉS DANS LE SYSTÈME NERVEUX EMBRYONNAIRE ET ANALYSE MOLÉCULAIRE DE LA VULNÉRABILITÉ PARTICULIÈRE DES NEURONES DOPAMINERGQUES (Responsable de l'équipe : Matthieu Lévi-Strauss)

1.2.1. *Etude de deux ADN complémentaires exprimés dans le système nerveux embryonnaire*

L'ARN correspondant à l'ADN complémentaire murin 3.1 est très exprimé dans les neurones embryonnaires au cours de leur période de prolifération et durant les quelques jours qui suivent leur migration. Son expression ne persiste chez l'adulte que dans les cellules des grains du cervelet, du bulbe olfactif et de l'hippocampe. Malgré sa relativement grande taille, l'ARN 3.1 (2000 bases) ne contient que de très petites phases ouvertes de lecture. La protéine codée par la plus probable de ces phases ouvertes de lecture (204 bases, 68 acides aminés) n'a pas pu être mise en évidence bien que nous disposions de deux anticorps (anti-peptide et anti-protéine recombinante) capables de la reconnaître. Nous recherchons actuellement un éventuel rôle non codant pour cet ARN dont la conservation phylogénétique est spectaculaire puisque sa comparaison avec son homologue de poulet montre une similarité de 80 % (J.-M. Studler, M. Lévi-Strauss).

L'ARN correspondant à l'ADN complémentaire 8.5 code pour une polypeptide de 171 acides-aminoés dont la similarité avec un autre polypeptide déjà partiellement caractérisé permet de définir une nouvelle famille de protéines.

Cette protéine de 19 kDa, dénommée "neurogolgine", est spécifiquement exprimée dans les cellules neuroendocrines et dans les neurones où nous avons montré, en collaboration avec Claude Tougard et Renée Picart (Groupe de Biologie de la Cellule Neuroendocrine, Collège de France) qu'elle était localisée dans l'appareil de Golgi. (D. Sabéran-Djoneidi, J.-M. Studler, M. Lévi-Strauss).

1.2.2. *Analyse moléculaire de la vulnérabilité particulière des neurones dopaminergiques*

Le but de cette étude est de mettre en évidence une sensibilité particulière des neurones dopaminergiques nigro-striataux à une perturbation du métabolisme énergétique qui pourrait, par exemple, expliquer leur sensibilité particulière au MPTP. D'autre part, et toujours dans le but de comprendre les responsables de la fragilité de ces neurones, nous tentons d'identifier les bases cellulaires et moléculaires de la mutation weaver de la souris.

Chez des animaux normaux, nous avons montré que la recapture de dopamine était plus sensible à divers inhibiteurs de la phosphorylation oxydative dans les synaptosomes du striatum dorso-latéral (terminaisons des neurones nigro-striataux) que dans ceux préparés à partir du noyau accumbens (terminaisons des neurones meso-limbiques). De plus, une sensibilité particulière des neurones dopaminergiques à l'action toxique conjointe du glutamate et de la roténone a été mise en évidence dans des cultures primaires de neurones mésencéphaliques. Chez les souris weaver nous avons pu observer, sur des neurones mésencéphaliques en culture primaire, l'existence d'un déficit très précoce de la recapture de dopamine qui ne semble pas être du à une diminution du nombre des neurones dopaminergiques (I. Marey-Semper, M. Gelman, M. Lévi-Strauss).

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

2.1. *RELATIONS ASTROCYTO-NEURONALES AU SEIN DU STRIATUM* (Responsable de l'équipe : J. Prémont)

2.1.1. *Rôle de l'apport en glucose dans la régulation de la libération d'acide arachidonique induite par le glutamate sur des neurones de striatum*

Des données nombreuses de la littérature suggèrent que le glutamate intervient dans la neurotoxicité lors d'épisodes hypoxiques. De fait, une libération excessive de glutamate s'est révélée létale pour les neurones de différentes régions du cerveau (rétine, cortex cérébral ou cérébelleux et hippocampe, par exemple). Au cours des ischémies expérimentales, les

concentrations extracellulaires de glutamate s'élèvent rapidement et la dégénérescence des neurones est fortement diminuée par des antagonistes glutamatergiques de type NMDA. Ainsi l'activation des récepteurs glutamatergiques NMDA, qui conduit essentiellement à l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs perméables aux ions sodium, potassium et calcium, paraît en grande partie responsable des effets neurotoxiques du glutamate. L'ischémie produit non seulement une hypoxie mais diminue également, voire annule, l'apport de substrats énergétiques, tel que le glucose, aux neurones qui de plus sont soumis à une forte stimulation glutamatergique. Nous avons donc recherché si l'une des réponses des neurones à une stimulation des récepteurs NMDA (la libération d'acide arachidonique) pouvait être augmentée en absence de glucose. En effet, lors d'un épisode hypoxique, une activation excessive des récepteurs NMDA pourrait être renforcée par une augmentation de l'efficacité du glutamate sur ces récepteurs.

Une déprivation de glucose pendant une période de 30 minutes précédant l'incubation (également réalisée sans glucose) avec le NMDA, provoque une augmentation de la quantité d'acide arachidonique libérée des neurones de striatum de souris plus forte que celle observée en présence de glucose. Seule l'efficacité du NMDA sans modification significative de l' EC_{50} (2.10^{-5} M) est augmentée par l'absence de glucose. Dans un milieu contenant du glucose, le déoxyglucose (10 mM) qui empêche vraisemblablement l'entrée de glucose augmente également l'efficacité du NMDA. Lorsque le glutamate endogène est enzymatiquement éliminé, l'absence de glucose ne provoque plus l'augmentation relative de la libération d'acide arachidonique des neurones de striatum induite par le NMDA. L'analyse du mécanisme responsable de cette augmentation apparente de l'efficacité du NMDA suggère fortement et de façon très inattendue que 1) le NMDA induit une libération de glutamate à partir des neurones striataux en culture, qui sont en grande majorité (95 %) GABAergiques. 2) En absence de glucose, le glutamate, libéré par le NMDA, agirait plus efficacement sur les récepteurs glutamatergiques de type AMPA et métabotropiques (R. Williams, J. Prémont).

2.1.2. Rôle de l'interleukine 1 sur la libération d'acide arachidonique par les astrocytes centraux

L'interleukine 1α est l'une des cytokines libérées dans le cerveau, en particulier par les cellules microgliales, lors de processus infectieux et inflammatoires. Cette cytokine induit la synthèse d'une protéine possédant une activité phospholipase A2 dans d'autres types cellulaires que les astrocytes. Par ailleurs, nos précédents travaux ont révélé que plusieurs récepteurs sont couplés à cette phospholipase dans les astrocytes et que l'acide arachidonique produit sous l'action de cette enzyme régule la recapture du glutamate dans les cellules. Compte tenu du rôle de cet acide gras sur la régulation de la transmission glutamatergique, nous avons étudié l'effet de l'interleukine 1 sur

la libération d'acide arachidonique induite par l'ATP, l'endothéline et le glutamate. La libération d'acide arachidonique évoquée par ces trois médiateurs est approximativement doublée 24 heures après l'addition de la cytokine. Des expériences effectuées avec des anticorps spécifiquement dirigés contre une phospholipase A2 cytosolique suggèrent que l'effet observé résulte probablement d'une induction de la lipase (N. Stella, J. Cordier, J. Prémont).

2.1.3. Effets synergiques du glutamate et de l'acétylcholine sur la formation d'acide arachidonique dans les neurones striataux

Des expériences effectuées sur des neurones striataux embryonnaires de la souris en culture primaire ont montré que l'acétylcholine et le carbachol stimulent la libération d'acide arachidonique et que ces effets résultent de l'activation de récepteurs muscariniques de type M1 dont le profil pharmacologique est identique à celui des récepteurs couplés à la phospholipase C. L'activation de la protéine kinase C qui favorise le couplage d'une phospholipase A2 aux récepteurs muscariniques, intervient dans la formation de l'acide arachidonique. Différents agents tels que l'ionomycine, le potassium (dépolariation), l'AMPA, potentialisent la formation d'acide arachidonique induite par le carbachol ou l'acétylcholine et des effets synergiques d'une très grande ampleur sont observés avec le NMDA ou le glutamate. Dans tous les cas, l'activation d'une protéine kinase C est nécessaire et l'influx de calcium ainsi que le couplage des récepteurs muscariniques à une phospholipase A2 jouent un rôle déterminant (N. Tence, N. Murphy, J. Cordier, J. Prémont).

2.1.4. Démonstration d'un effet protecteur de la nicotine sur la cytotoxicité induite par le glutamate sur les neurones de striatum

Le NMDA et l'acétylcholine provoquant des effets synergiques sur la formation d'acide arachidonique dans les neurones striataux de la souris, nous avons recherché dans ces cultures neuronales si l'acétylcholine pouvait aggraver l'effet cytotoxique du glutamate. De façon surprenante, l'acétylcholine a un effet protecteur vis-à-vis de l'action neurotoxique du glutamate, celle-ci ayant été mesurée 24 heures après une application de glutamate (10-3M) pendant 30 minutes. A une concentration de 1 mM, l'acétylcholine réduit de 60 % la mort neuronale évoquée par le glutamate et cet effet neuroprotecteur est reproduit par le carbachol et la nicotine. De plus, il est insensible à l'atropine, mais disparaît en présence d'hexamethonium suggérant qu'un récepteur nicotinique est impliqué dans ce phénomène (d'autant plus que la nicotine est plus efficace que l'acétylcholine) (P. Marin, M. Maus, J. Prémont).

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

2.2.1. *Inhibition par l'acide arachidonique de la perméabilité des jonctions « gap » des astrocytes*

L'acide arachidonique (AA), produit par les neurones ou les astrocytes, est un second messager qui pourrait intervenir dans les interactions neurone-glie. Nous avons montré qu'une application d'AA ($5 \times 10^{-5}M$) sur des astrocytes striataux de la souris en culture primaire bloque la diffusion d'un traceur fluorescent à travers les jonctions « gap ». Cette inhibition totale des canaux jonctionnels est également observée lors de traitements pharmacologiques qui augmentent la formation d'AA dans les astrocytes tels que l'application des endothélines (ET1 et ET3), la co-application de noradrénaline et d'adénosine ou celle de glutamate et d'ATP. Les jonctions « gap » permettent la propagation de vagues calciques intercellulaires générées par stimulation mécanique. En présence d'AA ($10^{-5}M$), ces vagues sont bloquées de manière réversible. Ainsi, la libération d'AA constitue un facteur de régulation du syncytium astrocytaire, en bloquant par exemple la propagation de vagues calciques intercellulaires (C. Giaume, L. Venance, J. Cordier).

2.2.2. *Régulation par les endothélines de la capture et de la distribution intercellulaire du glucose dans les astrocytes*

Les capillaires sanguins cérébraux sont entourés par les terminaisons en pied des astrocytes. De ce fait, les substances nutritives qui atteignent les neurones doivent obligatoirement franchir les cellules gliales ou être transformées dans ces cellules. La propagation de ces substances nutritives vers les neurones pourrait s'effectuer au travers des jonctions « gap ». La technique du « scrape-loading » combinée à l'autoradiographie a été utilisée pour mettre en évidence les mouvements du glucose, du glucose-6-phosphate et du 3-ortho-méthyl-glucose radioactifs entre astrocytes en culture primaire. Nous avons ainsi pu montrer que ces substances transitent à travers les jonctions et que leur diffusion est bloquée par des agents découplants, tels que l'AA ou l'ET1. D'autre part, ces traitements augmentent la capture du 2-deoxyglucose par les astrocytes. Ainsi l'endothéline, en libérant l'AA, semble modifier les mouvements du glucose et de certains de ces métabolites en agissant sur la capture du glucose et son transfert ainsi que celui de ses métabolites dans le syncytium astrocytaire (C. Giaume en collaboration avec A. Tabernero, J.M. Medina Université de Salamanque).

2.2.3. *Hétérogénéité pharmacologique des astrocytes striataux et perméabilité calcique des jonctions « gap »*

Afin de déterminer si la perméabilité des jonctions « gap » intervient dans les réponses calciques évoquées par certains médiateurs ou leurs agonistes au

sein d'une population d'astrocytes striataux nous avons effectué une étude autoradiographique pour définir la distribution de leurs sites de liaison. Celle-ci a été ensuite complétée par la mesure des modifications des concentrations intracellulaires de calcium (réalisée à l'aide de la sonde Indo1), induites par ces médiateurs ou leurs agonistes. Ainsi, les sites de liaison de l'endothéline 1 sont distribués sur toutes les cellules et l'application de ce médiateur provoque dans toutes les cellules (> 90 %) une augmentation intracellulaire de calcium de courte latence, rapide et importante. Par contre, les sites de liaison de ligands $\alpha 1$ -adrénergiques et muscariniques sont distribués de façon hétérogène, un grand nombre de cellules n'étant pas marquées. De plus, la methoxamine et le carbachol n'augmentent les concentrations intracellulaires de calcium que dans 70 % des cellules astrocytaires, ces réponses étant soit rapides avec une latence courte, soit lentes avec des latences plus longues. La fermeture des jonctions « gap » par un agent découplant ne modifie pas le nombre des cellules sensibles à l'endothéline 1, ni le déroulement de ses réponses, mais pas contre diminue (25 %) le nombre des cellules répondant à l'application de la methoxamine ou du carbachol. Cette diminution résulte exclusivement de la disparition des réponses calciques retardées, suggérant que ces réponses interviennent dans des cellules qui n'ont pas été stimulées directement par les agonistes. Ainsi, la perméabilité des jonctions « gap » pour des « signaux » calciques masque dans une certaine mesure l'hétérogénéité pharmacologique (présence ou non de récepteurs) des astrocytes striataux (L. Venance, C. Giaume).

2.3. RÉCEPTEURS DES TACHYKININES

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

2.3.1. Recherche d'un antagoniste spécifique des récepteurs de type « septide »

Ces études ont été poursuivies en étroite collaboration avec l'équipe de S. Lavielle et G. Chassaing du laboratoire de Chimie Biologique (Jussieu, Paris VI).

L'iléon de cobaye possède des récepteurs NK-1 et NK-3 ainsi qu'une faible quantité de récepteurs NK-2. De plus, nous avons montré que l'activité spasmogénique du septide ou celle de fragments C-terminaux de la SP ne peut s'expliquer que par la présence d'une nouvelle classe de récepteur des tachykines dans ce tissu : les récepteurs de type « septide ». Deux antagonistes peptidiques modifiés en position 10 permettent de distinguer les récepteurs NK1 et ceux de type septide. En effet, nous avons pu montrer que la [D-Pro⁹,Pro¹⁰, Trp¹¹]SP bloque l'activité spasmogénique du septide mais pas celle de la [Pro⁹]SP, alors que la [D-Pro⁹,MeLeu¹⁰,Trp¹¹]SP antagonise les contractions induites par les deux agonistes. De plus, l'introduction d'une chaîne latérale de type isopropyl en position 10 [Gly⁹- ϕ (CH₂-CH₂)-Gly¹⁰]SP d'un agoniste de type « septide » restaure complètement les possibilités de liaison

sur les sites NK1. L'activité spasmodique de ce nouveau peptide, comme celle de la [Pro⁹]SP, ne résulte alors que de la stimulation des récepteurs NK1 puisque cette réponse est antagonisée par la [D-Pro⁹,MeLeu¹⁰,Trp¹¹]SP, mais pas par la [D-Pro⁹,Pro¹⁰, Trp¹¹]SP. Des études associées confirment également l'importance de la présence (ou non) d'un groupement isopropyl en position 10 dans les différences pharmacologiques observées entre ces deux molécules. Ces données permettent d'envisager la synthèse de nouvelles molécules agonistes et antagonistes spécifiques des deux types de récepteurs (S. Lavielle et coll.).

2.3.2. Différences de propriétés pharmacologiques des récepteurs NK1 chez le rat et le cobaye

Nous avons confirmé que les propriétés pharmacologiques des récepteurs NK1 du rat diffèrent de celles du cobaye. Ceci a pu être mis en évidence en examinant les effets de deux antagonistes non peptidiques, le (\pm) CP96345 et le RP 67580 sur la liaison de ³H[Pro⁹]SP au niveau de membranes ou de coupes (autoradiographie) de cerveau de ces deux espèces. En effet, dans toutes les aires cérébrales possédant des récepteurs NK1, le (\pm) CP96345 est un antagoniste plus efficace chez le cobaye que chez le rat, et l'inverse est observé avec le dérivé RP 67580 (F. Petitet et coll.). Ces résultats nous ont conduit à comparer la distribution cérébrale des sites de liaison NK1 chez le rat et le cobaye. Si une même localisation est retrouvée dans les ganglions de la base, ceci n'est pas le cas dans d'autres aires cérébrales. Ainsi, le noyau interpedonculaire, le noyau latéral de l'habénula et les couches profondes du cortex sont marquées chez le cobaye mais pas chez le rat, alors que l'inverse est observé dans les colonnes du vermis (lobules 9-10), le noyau raphé dorsal, le noyau médian de l'habénula, les couches superficielles du cortex et l'hippocampe dorsal (M. Saffroy, Y. Torrens, M. Dietl, J.C. Beaujouan).

2.3.3. Recherche d'un test biologique sélectif des récepteurs NK3

L'absence de test biologique sélectif et efficace favorisant l'étude des propriétés des récepteurs NK3 nous a incité à utiliser l'iléon de cobaye qui possède des récepteurs NK3, mais également des récepteurs NK1, NK2 et de type « septide ». Les agonistes sélectifs de chaque classe de récepteurs stimulent l'activité de la phospholipase C dans ce tissu. Sous l'action combinée des antagonistes (\pm) CP96345 (NK1, septide) et MEN 10376 (NK2), les réponses NK1, NK3 et « septide » sont complètement bloquées, mais celle des récepteurs NK3 n'est pas affectée. En absence ou présence des deux antagonistes, plusieurs agonistes sélectifs NK3 stimulent avec une même intensité l'hydrolyse de phospho-inositides, le septide étant le plus efficace. Nous avons également observé qu'un antagoniste NK2 non peptidique, le SR48958 bloque les réponses NK3 dans l'iléon de cobaye mais qu'il n'est pas efficace sur ce

type de réponses chez le rat révélant que les récepteurs NK3 diffèrent par certaines de leurs propriétés chez ces deux espèces.

En conclusion, dans certaines conditions (blocage des récepteurs NK1, NK2 et septide), l'iléon de cobaye et la mesure de l'activité de la phospholipase C peuvent être judicieusement utilisés pour l'étude ou la recherche de molécules agonistes et antagonistes des récepteurs NK3.

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

3.1. ÉTUDE DE PROTÉINES KINASES ET PHOSPHATASES NEURONALES ET DE LEURS SUBSTRATS (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 (Frédéric Desdouts, Jean-Antoine Girault)

La DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated phospho-protein*) est une protéine enrichie dans les neurones striato-nigraux. Dans le striatum, la phosphorylation de la DARPP-32 sur la thréonine 34 est stimulée par la dopamine et sa déphosphorylation par le glutamate alors que dans la substance noire, cette phosphorylation est stimulée par la dopamine (par l'intermédiaire de la protéine kinase activée par l'AMPc) et le NO (*via* la protéine kinase activée par le GMPc). Lorsque la DARPP-32 est phosphorylée par l'une de ces deux protéines kinases sur la thréonine 34, elle devient un puissant inhibiteur de la protéine phosphatase 1. La déphosphorylation de la thréonine 34 est catalysée par la calcineurine, une phosphatase activée par le Ca^{2+} et par la calmoduline, et par la phosphatase 2A.

En plus de sa phosphorylation sur la thréonine 34, la DARPP-32 est phosphorylée sur plusieurs sérines dans les cellules intactes. Nous nous intéressons actuellement à la phosphorylation de la DARPP-32 par la caséine kinase I. Le site de phosphorylation principal pour cette kinase a été identifié comme étant la sérine 137 par séquençage de phosphopeptides et par mutagenèse dirigée. La phosphorylation de la DARPP-32 sur la sérine 137 par la caséine kinase I *in vitro* modifie sa migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Ceci résulte en une migration sous forme de doublet de la DARPP-32 extraite des neurones striato-nigraux du rat .

Nous avons étudié les effets de la phosphorylation de la sérine 137 sur les propriétés de la DARPP-32. Cette phosphorylation n'a aucun effet sur la capacité de la DARPP-32 à inhiber la phosphatase 1 qui dépend uniquement de la phosphorylation de la thréonine 34. Par contre la phosphorylation de la sérine 137 inhibe par un mécanisme intramoléculaire, la déphosphorylation de

la thréonine 34 par la calcineurine. Cette inhibition permet d'expliquer que dans les neurones striato-nigraux, la DARPP-32 déjà phosphorylée sur la sérine 137 est plus fortement phosphorylée sur la thréonine 34 en réponse à la stimulation par le 8-Br-cAMP. Il s'agit du premier exemple de régulation de l'activité d'une protéine phosphatase par le changement de l'état de phosphorylation de son substrat sur un site régulateur. Dans les neurones striato-nigraux, la caséine kinase I déplace donc l'équilibre de la phosphorylation de la DARPP-32 sur son site actif en faveur de l'état phosphorylé. Ceci pourrait avoir pour conséquence une facilitation des effets D1 de la dopamine et une inhibition des effets NMDA du glutamate dans ces neurones.

3.1.2. *Étude de la phosphorylation de protéines sur des tyrosines dans les neurones cérébraux* (Ferran Burgaya, Michèle Gelman, Marc Le Bert, Mathias Menegoz, Julio C. Siciliano et Jean-Antoine Girault)

Au cours d'une étude sur les protéines phosphorylées sur des tyrosines dans le cerveau du rat, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à une phosphoprotéine majoritaire chez l'adulte, d'un poids moléculaire apparent de 180 kDa (pp180), enrichie au niveau postsynaptique. Dans le striatum, la forme phosphorylée de pp180 augmente après lésion des neurones dopaminergiques ou traitement prolongé par les neuroleptiques. pp180 a été partiellement purifiée par affinité sur colonne de lectine et nous avons obtenu des fragments de séquence peptidique, après protéolyse ménagée par la trypsine. Ces séquences ne présentent pas d'homologie avec des protéines connues. Nous avons cloné l'ADNc correspondant à pp180. Son séquençage indique qu'il code pour une protéine nouvelle comprenant notamment des régions riches en cystéines de type EGF. Les premiers résultats obtenus avec des anticorps anti-peptides reconnaissant pp180 suggèrent qu'il s'agit d'une protéine neuronale présente dans les différentes régions du cerveau.

Nous avons montré que la dépolarisation de tranches d'hippocampe de rat ou de neurones en culture, ainsi que l'application d'un certain nombre d'agonistes de neurotransmetteurs, stimulent la phosphorylation de protéines de 110 et 120 kDa (pp110 et pp120) sur des tyrosines. Nous étudions les mécanismes de cette stimulation qui fait intervenir une augmentation du Ca^{++} intracellulaire et une activation de la protéine kinase C. D'autre part nous cherchons à identifier les phosphoprotéines cibles de ces régulations. Une de ces protéines pourrait être pp125-fak (*focal adhesion kinase*), une tyrosine kinase enrichie au niveau des plaques d'adhésion où elle interagit directement avec les récepteurs de la matrice extra-cellulaire (intégrines) et indirectement avec les microfilaments d'actine. Nous avons cloné l'ADNc de pp125-fak chez le rat et montré que l'ARNm et la protéine sont abondants dans les neurones *in vivo* et en culture. Chez l'animal adulte, pp125-fak est particulièrement abondante dans les cortex cérébral et cérébelleux et dans l'hippocampe. Dans les neurones en culture, un enrichissement de pp125-fak est observé au niveau

des cônes de croissance. Nous cherchons donc à déterminer si l'activité neuronale et certains neurotransmetteurs modulent les interactions entre le cytosquelette et la matrice extra-cellulaire au niveau de la membrane neuronale en modifiant l'état de phosphorylation de pp125-fak. Dans d'autres types cellulaires pp125-fak est étroitement associée à *src* et à *fyn*, deux tyrosines kinases abondantes dans les neurones. Pour étudier le rôle de cette cascade de phosphorylation dans les neurones, nous tentons de surexprimer par transgénèse chez la souris une forme mutée hyperactive de *src* sous le contrôle d'un promoteur neuronal.

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

Les différents récepteurs pour les neurotransmetteurs, les facteurs de croissance et les cytokines, présents à la surface des astrocytes, agissent sur la cellule via des cascades de réactions intracellulaires. 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 15 kDa, pI 5,2-5,4). PEA-15 est un substrat endogène pour la protéine kinase C, et le site de phosphorylation a pu être déterminé. Plusieurs approches complémentaires ont été développées afin d'analyser la fonction de PEA-15 et son rôle dans la régulation de l'astrocyte par les signaux extracellulaires. Quatre séquences d'acides aminés de 8 à 19 résidus ont été obtenues, permettant une tentative de clonage de l'ADNc codant pour PEA-15 et la préparation d'anticorps anti-peptides.

Au sein des astrocytes en culture primaire, l'immuno-réactivité antiPEA-15 est associée aux microtubules, une liaison modulée par l'état de phosphorylation de la protéine, et plus particulièrement par la PKC. Le rôle de PEA-15 dans la dynamique des microtubules est à l'étude. Dans le cerveau de l'animal adulte, la protéine est principalement exprimée par les astrocytes, les cellules épendymaires et quelques grands neurones du tronc cérébral. D'autres cellules, comme les cellules de Purkinje du cervelet, pourraient exprimer de façon transitoire la protéine au cours de leur différenciation. PEA-15 pourrait donc jouer un rôle dans la plasticité cellulaire, son enrichissement dans les astrocytes étant corrélé à l'importante capacité de changements morphologiques de ces cellules.

Parallèlement, la poursuite de l'analyse de la protéine met en évidence un grand nombre d'isoformes, nous incitant à proposer un modèle avec au moins quatre sites indépendants de phosphorylation. La kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type 2 est responsable de la régulation d'un de

ces sites. Différentes phosphatases, sensibles à l'acide okadaïque (type 1 et 2a) et dépendante du calcium (type 2b), sont également impliquées dans la régulation de la protéine. PEA-15 s'avère donc une sonde intracellulaire particulièrement intéressante pour l'analyse des cascades intracellulaires modulant les fonctions astrocytaires, et en particulier la forme de la cellule (F. Arnos, J. Cordier, A. Estelles, M. Kubes, M. Yokoyama, H. Chneiweiss).

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

4.1. RÔLE DE LA DOPAMINE DANS LA LIBÉRATION DE GABA ET CONTRÔLE PRESYNAPTIC DE LA LIBÉRATION DE DOPAMINE (Responsable de l'équipe : André Chéramy)

4.1.1. *Contrôle dopaminergique de la libération de GABA dans le striatum chez le rat*

Les neurones épineux GABAergiques du striatum représentent la vaste majorité des neurones de cette structure. Ils sont pourvus de récepteurs dopaminergiques D_1 et D_2 localisés sur les neurones projetant respectivement à la substance noire et au pallidum externe. Ces neurones sont également innervés par les fibres glutamatergiques corticostriatales. La co-localisation des contacts glutamatergiques et dopaminergiques sur les épines dendritiques des neurones GABAergiques striataux nous a incité à étudier l'effet de la dopamine sur la libération spontanée de GABA et celle évoquée par la stimulation des récepteurs NMDA.

Par la méthode de superfusion de micro-disques, sélectivement prélevés sur des coupes de striatum dans des zones enrichies en matrice et pré-incubés en présence de [3 H]-GABA, nous avons montré que la libération de [3 H]-GABA est augmentée par la dopamine et surtout par l'amphétamine, qui libère de la dopamine. Ce dernier effet est dose-dépendant, bloqué par le SCH23390 (antagoniste D_1), mais insensible au sulpiride (antagoniste D_2). Curieusement, ni le SKF38393 (agoniste D_1) ni le quinpirole (agoniste D_2) ne sont actifs.

Aucun des agents dopaminergiques utilisés ne modifie de façon notable la libération de [3 H]-GABA évoquée par le NMDA en absence de magnésium. Le SKF38393 tend à l'augmenter, mais uniquement en présence de sulpiride, qui lui même a un léger effet stimulateur. Des effets inhibiteurs inconsistants ont été observés avec le quinpirole, même en présence de SCH23390. L'augmentation de GABA évoquée par co-application d'amphétamine et de NMDA est réduite par le SCH23390. L'effet résiduel correspond à la réponse évoquée par le NMDA et peut être bloqué par le MK-801 (antagoniste NMDA).

Afin de supprimer l'action de la dopamine endogène libérée par le NMDA, ces expériences ont été reproduites chez des animaux ayant été traités par la réserpine (2,5 mg/kg/jour, 4 jours). Dans ces conditions, le SKF38393 augmente très significativement la libération évoquée par le NMDA, tandis que le quinpirole produit l'effet opposé.

Ces expériences suggèrent que les stimulations des récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ présents sur les neurones épineux GABAergiques provoquent des effets opposés (respectivement facilitateur et inhibiteur) sur la libération de GABA dans le striatum (E. Gheorvassaki, F. Artaud et A. Chéramy).

4.1.2. *Potentialisation par l'acétylcholine (ACh) des effets du N-méthyl-D aspartate (NMDA) sur la libération de dopamine dans le striatum chez le rat*

Des synaptosomes de striatum de rat ont été superfusés avec de la [³H]-tyrosine afin d'étudier les interactions cholinergiques et glutamatergiques dans le contrôle de la libération de [³H]-dopamine ([³H]-DA) nouvellement synthétisée.

La libération de [³H]-DA est augmentée par l'ACh, la nicotine ou l'oxotrémorine. L'effet de l'ACh est dose-dépendant, réduit par l'atropine (antagoniste muscarinique) et/ou la mécamylamine (antagoniste nicotinique). En présence de magnésium, un effet stimulateur du NMDA peut être observé lorsque les terminaisons dopaminergiques sont dépolarisées par l'ACh, la nicotine ou l'oxotrémorine, l'amplitude de la réponse évoquée par le NMDA étant dépendante de la concentration de l'agoniste cholinergique appliqué simultanément et cette réponse peut être bloquée selon les cas, par l'atropine et/ou la mécamylamine.

Les récepteurs nicotiniques sont perméants au calcium et les récepteurs muscariniques sont couplés à la phospholipase C, nous avons donc tenté de reproduire les effets des agonistes cholinergiques par application combinée de NMDA et de ionomycine (ionophore calcique) et/ou d'activateurs de la protéine kinase C (PMA ou OAG). Le PMA ou l'OAG suppriment le bloc magnésium des récepteurs NMDA et cet effet est potentialisé par la ionomycine. Enfin, l'augmentation de la libération de [³H]-DA évoquée par le NMDA en présence de nicotine ou d'oxotrémorine est bloquée par des inhibiteurs de protéine kinase C (chelerythrine, Ro 317549 ou staurosporine).

Ainsi, en agissant sur les récepteurs nicotiniques et muscariniques, l'ACh réduit le bloc magnésium des récepteurs NMDA impliqués dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine, et ce phénomène résulte entre autre de l'activation d'une protéine kinase C (G. Godeheu, M. L'hirondel et A. Chéramy).

4.2. ÉTUDE ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DU STRIATUM (Responsables de l'équipe : Equipe de Marie-Lou Kemel et Christian Gauchy)

4.2.1. *Topographie de la vascularisation et de l'hétérogénéité du striatum* (M. Desban, M.L. Kemel, C. Gauchy)

Précédemment, nous avons montré chez le chat et le rat que le compartiment striosomal (30 ou 15 % du volume total du noyau caudé ou du striatum), est organisé en un réseau labyrinthe constitué de canaux orientés dans les axes rostro-caudal et médio-latéral chez le chat et principalement médio-latéral chez le rat. Ayant remarqué que la distribution des différents vaisseaux était hétérogène dans le noyau caudé du chat et le striatum du rat, nous avons comparé l'organisation de la vascularisation avec celle des compartiments striataux chez ces deux espèces.

Chez le rat, les compartiments striataux ont été identifiés par la liaison de la ^3H -naloxone sur son site opiacé de type mu (ces récepteurs étant presque exclusivement localisés dans le compartiment striosomal), et par la révélation de l'activité de la NADPH diaphorase localisée dans les neurones à somatostatine distribués dans le compartiment matriciel. L'activité des butyrylcholinestérases a été révélée afin de marquer spécifiquement l'endothélium du réseau capillaire, les vaisseaux de large diamètre (pas concernés par ce marquage) ont été identifiés par leur taille à l'aide d'un agrandisseur d'images. Chez le chat, les compartiments striataux ont été identifiés par révélation histochemique de l'acétylcholinestérase (AChE) essentiellement localisée dans la matrice. Le réseau capillaire a été visualisé à l'aide du marquage histochemique des parois vasculaires par la phosphatase alcaline, les vaisseaux de large diamètre étant observés à l'aide d'un agrandisseur d'images.

Chez le chat et le rat, le compartiment matriciel est vascularisé par le réseau capillaire alors que le compartiment striosomal est principalement irrigué par les vaisseaux de large diamètre et partiellement par le réseau capillaire. La reconstruction tridimensionnelle des larges vaisseaux a aussi révélé une organisation labyrinthe orientée dans les axes rostro-caudal et médio-latéral chez le chat et principalement médio-latéral chez le rat. De plus, le réseau des larges vaisseaux est situé dans le compartiment striosomal.

4.2.2. *Circuits locaux impliqués dans l'interaction glutamate-dopamine dans les deux compartiments striataux : rôle des neurotransmetteurs contenus dans les efférences striatales* (M.L. Kemel, C. Gauchy, M. Desban)

Précédemment, nous avons montré sur des coupes de striatum de rat que le NMDA en absence de magnésium, stimule avec une plus forte amplitude la libération de ^3H -dopamine (DA) (synthétisée en continu à partir de ^3H -tyrosine) dans les zones enrichies en matrice que dans celles enrichies en

striosomes. En plus de son effet excitateur mettant en jeu les récepteurs présynaptiques de type NMDA localisés sur les terminaisons dopaminergiques, le NMDA agit également sur des récepteurs distribués sur les neurones épineux riches en GABA et en peptides (tachykinines, dynorphine et enképhaline). Ainsi, le GABA et la dynorphine libérés localement par le NMDA exercent un contrôle inhibiteur sur la libération de DA dans les deux compartiments striataux, celui-ci étant toutefois de plus forte amplitude dans les striosomes.

Les tachykinines sont co-localisées avec le GABA dans les neurones efférents du striatum : la substance P et la neurokinine A dans les neurones innervant la substance noire pars réticulata et le globus pallidus interne et la neurokinine B dans les neurones innervant le globus pallidus externe. Afin de déterminer si des tachykinines endogènes interviennent dans le contrôle indirect de la libération de DA évoquée par le NMDA, l'effet du NMDA a été étudié en présence des antagonistes sélectifs de la substance P (RP 67580) ou de la neurokinine A (SR 48968). Le RP 67580 (0.1 μM) et le SR 48968 (1 μM) augmentent la réponse du NMDA, ces effets étant plus importants dans les striosomes que dans la matrice ce qui suggère que les neurones des striosomes ont une réactivité plus grande vis-à-vis du NMDA. Curieusement, la co-application du RP 67580 (0.1 μM) et du SR 48968 (1 μM) non seulement supprime les effets de désinhibition de la réponse NMDA obtenue en présence d'un seul antagoniste dans les deux compartiments, mais de plus, inhibe l'effet du NMDA sur la libération de dopamine dans le compartiment matriciel.

4.2.3. *Mise en évidence d'un nouveau site d'action des tachykinines dans le striatum : le récepteur de type septide* (C. Gauchy, M.L. Kemel, M. Desban)

Plusieurs données du laboratoire (équipe J.C. Beaujouan) suggèrent l'existence dans certains tissus périphériques de récepteurs des tachykinines de type « septide » (un analogue C-terminal court de la SP) distincts des récepteurs NK1, NK2 et NK3. Ceci a été particulièrement mis en évidence au niveau de l'iléon de cobaye et plus récemment de la vessie de rat, les récepteurs « septide » étant couplés à la phospholipase C dans ce tissu. De plus, la SP(6-11) pourrait être le ligand endogène de ces récepteurs non encore identifiés par les techniques de liaison ou de clonage moléculaire.

Ayant déjà montré que des agonistes sélectifs des récepteurs NK1, NK2 et NK3 exercent un contrôle présynaptique sur la libération de DA distinct dans les compartiments striataux chez le rat, nous avons comparé les effets du septide et de la (Pro)⁹SP (un agoniste NK1) sur la libération spontanée et évoquée (NMDA) de DA. Ces expériences ont été effectuées en présence de serum albumine de bœuf (BSA 0,02 %) qui empêche la dégradation peptidasi- que de peptides et évite leur adsorption sur les cathéters. Dans ces conditions,

à notre grande surprise, la réponse induite par le NMDA est très augmentée dans le compartiment striosomal (+ 500 % avec BSA, + 100 % sans BSA) et plus légèrement dans le compartiment matriciel (+ 300 % avec BSA, + 200 % sans BSA). Les deux peptides (0.1 μM) augmentent la libération spontanée de DA dans les deux compartiments striataux. Le septide provoque par ailleurs une augmentation importante de la libération de DA évoquée par le NMDA (+ 200 % dans les striosomes, + 150 % dans la matrice). A l'inverse, la (Pro⁹)SP (0.1 μM) inhibe la libération évoquée de DA dans les striosomes (- 150 %), mais n'a aucun effet dans la matrice. De plus, l'effet induit par le septide (dans les deux compartiments) est totalement bloqué en présence de la (Pro⁹)SP, en accord avec des données récentes obtenues par Y. Torrens sur la vessie de rat, suggérant que la (Pro⁹)SP est un agoniste partiel des récepteurs « septide ». Enfin, le RP 67580 (1 μM , antagoniste des récepteurs septide et NK1) bloque l'effet du septide dans les deux compartiments striataux. Ces diverses données sont en faveur de l'existence de récepteurs « septide » distincts des récepteurs NK1 dans le striatum du rat.

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 et de leurs conséquences sur la transmission dopaminergique sous-corticale*

L'hyperactivité locomotrice induite chez le rat par l'amphétamine résulte essentiellement de l'augmentation de la libération de dopamine dans les structures sous-corticales. Toutefois, nous avons constaté qu'un antagoniste $\alpha 1$ -adrénergique, le prazosin, pouvait bloquer cette hyperactivité locomotrice évoquée par l'amphétamine. Cet effet du prazosin peut être considéré comme spécifique dans la mesure où ce produit n'a aucun effet sur l'hyperactivité locomotrice induite par la scopolamine, un antagoniste muscarinique.

Précédemment, nous avons montré d'une part qu'une activation dopaminergique corticale diminue l'activité locomotrice induite par une activation dopaminergique sous-corticale et d'autre part qu'il existe un antagonisme entre les actions noradrénergique et dopaminergique au niveau du cortex frontal. Le prazosin pourrait donc faciliter la transmission dopaminergique corticale. Pour vérifier cette hypothèse, le prazosin a été injecté *in situ*, au niveau du cortex frontal, chez des animaux recevant simultanément une injection d'amphétamine dans le noyau accumbens. Dans ces conditions, le prazosin mais aussi le WB 4101 (autre antagoniste $\alpha 1$ -adrénergique), bloquent l'hyperactivité locomotrice induite par l'injection sous-corticale d'amphétamine. Ainsi, la trans-

mission noradrénergique corticale de type $\alpha 1$ semble nécessaire pour obtenir une transmission dopaminergique sous-corticale fonctionnelle (Gérard Blanc, Fabrice Trovero, Denis Hervé, J.P. Tassin).

5.1.2. *Étude des libérations de monoamines dans le cortex frontal au cours du cycle veille-sommeil*

Plusieurs études électrophysiologiques ont montré que l'activité des neurones noradrénergiques et sérotoninergiques diminue le sommeil lent et est totalement abolie pendant le sommeil paradoxal. En revanche, l'activité des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale ne semble pas varier au cours des cycles veille-sommeil. Néanmoins dans ces expériences, l'activité des neurones dopaminergiques méso-corticaux qui ne représentent que 3 % des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale, n'a vraisemblablement pas été mesurée. Nous avons donc étudié par microdialyse la libération de la dopamine corticale chez le rat au cours du cycle veille-sommeil en collaboration avec le groupe du D^r Nicolaïdis (M. Orosco, Z. de St Hilaire, C. Rouch).

Une méthode HPLC couplée à une détection électrochimique par coulométrie permettant de déceler jusqu'à 0,2 pg de monoamine dans des échantillons de dialysat prélevés toutes les minutes a tout d'abord été développée. Des libérations phasiques de monoamines extrêmement intenses (jusqu'à 1 000 fois le niveau de base pour la dopamine) ont pu être observées au cours du sommeil. Des expériences *in vitro* nous ont permis de montrer que ces pics apparaissent pendant des périodes très courtes (de l'ordre de la seconde) et exceptionnellement pendant des phases de sommeil paradoxal (1 % des cas). En revanche ces pics sont présents (21 % des cas) à l'occasion de phases de sommeil lent et lors de phases de micro-éveils (78 % des cas) immédiatement consécutives à des phases de sommeil lent ou paradoxal. Les pics de noradrénaline sont contemporains de ceux de la dopamine, les seules différences observées pour les pics de sérotonine étant une apparition légèrement plus fréquente pendant les phases de sommeil paradoxal (4 % des cas). Ainsi, les libérations de dopamine, noradrénaline et sérotonine dans le cortex préfrontal du rat présentent des phénomènes phasiques identiques durant le cycle veille-sommeil, ces libérations apparaissant tout particulièrement pendant les phases de micro-éveil (Cécile Gillibert, Gérard Blanc, Jean-Pol Tassin).

5.1.3. *Étude de l'activation locomotrice induite par la nicotine*

Nous avons montré précédemment que l'injection chronique de nicotine provoque une activation plus intense des systèmes dopaminergiques méso-corticaux que sous-corticaux, ce qui n'est pas en faveur d'une intervention directe des systèmes ascendants dopaminergiques dans l'activation locomotrice observée chez des rats soumis à ce traitement. Confirmant cette hypothèse, la

destruction quasi-totale des neurones dopaminergiques ascendants par des injections bilatérales de 6-OHDA dans le faisceau médian du télencéphale n'a pas bloqué l'activation locomotrice induite par la nicotine, ni l'effet de sensibilisation comportementale induit par des injections répétées. Ainsi, les effets comportementaux produits par des injections chroniques de nicotine ne sont pas liés à l'activation des neurones dopaminergiques ascendants, contrairement à ce qui a pu être observé pour d'autres produits entraînant des phénomènes de dépendance, tels que la morphine, l'amphétamine ou la cocaïne (P. Vezina, D. Hervé, J.P. Tassin).

5.1.4. *Étude de la protéine Golf du striatum*

Dans le striatum du rat, les récepteurs dopaminergiques D1 stimuleraient l'activité de l'adényl cyclase par l'intermédiaire de la protéine Golf et non par celui de la protéine Gs classique. Initialement découverte dans l'épithélium olfactif, Golf se distingue de Gs par une sous-unité particulière (G α olf). Cette année, nous avons donc poursuivi l'étude de cette sous-unité et de ses ARNm dans le striatum.

Quatre transcrits de Golf de longueurs différentes avaient été observés dans le striatum et nous avons pu montrer qu'ils présentaient la même région codante et ne différaient que par leurs régions 5' et 3' non traduites. Les variations dans la région 5' sont liées à l'utilisation alternative de deux promoteurs dans le gène de G α olf. Le promoteur amont dont nous avons montré l'existence, est responsable de 20 % des ARNm G α olf dans le striatum et de seulement 4 % dans l'épithélium olfactif. De manière intéressante, il est apparu qu'en majorité les ARNm issus de l'utilisation de ce promoteur étaient partiellement épissés et que la séquence d'un intron subsistait dans l'ARNm. Des études complémentaires de traduction *in vitro* et d'hybridation *in situ* ont montré que ce type de transcrits ne peut être traduit en protéine G α olf mais est présent dans toutes les régions cérébrales qui expriment abondamment G α olf. La signification fonctionnelle de tels transcrits reste à déterminer. Ce point n'a pu être éclairci ni par des lésions des systèmes dopaminergiques ascendants ni par le développement post-natal qui sont sans effet sur la proportion de l'ARNm G α olf contenant cette séquence intronique.

D'autre part, un nouveau site de polyadénylation ayant une séquence non-canonique (AATACA) est impliqué dans la formation des ARNm G α olf de petite taille (2,2 et 1,6 kbases). En outre, nous avons observé que ce site est relativement moins utilisé dans l'épithélium olfactif mature et dans le striatum à la naissance que dans le striatum adulte. Ceci suggère que des mécanismes de régulation peuvent influencer la polyadénylation des ARNm G α olf (D. Hervé et M.Lévi-Strauss).

5.2. ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES ET ANATOMIQUES

(Responsable de l'équipe : Anne-Marie Thierry)

5.2.1. *Étude électrophysiologique des connexions entre le noyau médiodorsal du thalamus et le cortex préfrontal : influence des anesthésiques*

Des relations réciproques existent entre le cortex préfrontal (CPF) et le noyau médiodorsal du thalamus (MD). Précédemment, les réponses excitatrices évoquées au niveau du CPF par l'activation de la voie MD-CPF ont pu être distinguées de celles induites par l'activation des collatérales récurrentes des fibres corticales qui se projettent sur le thalamus. Ces deux voies utilisent un acide aminé exciteur comme neuromédiateur. Les récepteurs impliqués dans ces deux types de réponses ont été caractérisés par une approche micropharmacologique chez des rats anesthésiés avec de l'halothane ou de la kétamine. Sous halothane, les réponses dues à l'activation de la voie MD-CPF mettent principalement en jeu les récepteurs AMPA, alors que celles provoquées par l'activation des collatérales récurrentes résultent principalement de la stimulation des récepteurs NMDA et dans une moindre mesure des récepteurs AMPA. Sous kétamine (substance qui bloque spécifiquement les récepteurs NMDA) ces deux types de réponses excitatrices sont observées dans un plus grand nombre de cellules corticales et mettent en jeu les récepteurs AMPA puisque l'application iontophorétique de CNQX, un antagoniste des récepteurs AMPA, bloque la majorité des réponses excitatrices alors que celle d'APV, un antagoniste des récepteurs NMDA est inefficace. Ainsi, l'halothane et la kétamine, à des doses requises pour le maintien de l'anesthésie, exercent une influence différente sur les transmissions synaptiques mettant en jeu les récepteurs AMPA et NMDA. La kétamine bloque sélectivement les réponses synaptiques faisant intervenir les récepteurs NMDA alors que l'halothane diminue préférentiellement les réponses synaptiques mettant en jeu les récepteurs AMPA (S. Pirot, A.M. Thierry).

5.2.2. *Influence du système dopaminergique mésocortical sur les réponses évoquées par la stimulation du noyau médiodorsal du thalamus*

Les effets de la stimulation de l'aire tegmentale ventrale (AVT), où sont localisés les neurones dopaminergiques qui innervent le CPF, et de l'application locale de dopamine (DA) ont été analysés sur les deux types de réponses excitatrices évoquées par la stimulation du MD chez des animaux anesthésiés avec de la kétamine. Les réponses excitatrices à courte latence induites par l'activation de la voie MD-CPF principalement observées dans les couches superficielles du CPF ne sont pas affectées par la stimulation de l'AVT et bloquées que dans 20 % des cas par l'application iontophorétique de DA. Par contre, les réponses excitatrices à longue latence dues à l'activation des collatérales récurrentes des projections du CPF sur le MD, enregistrées dans

les couches profondes du CPF, sont inhibées par la stimulation de l'AVT et l'application locale de DA dans respectivement 67 % et 58 % des cas.

Ainsi, le système dopaminergique n'affecte pas les réponses excitatrices transmises par la voie MD-CPF mais inhibe celles évoquées par l'activation des collatérales récurrentes des projections CPF-MD. Il pourrait donc bloquer la propagation et le transfert des informations à travers le réseau de collatérales récurrentes, et de ce fait permettre une focalisation spatiale des signaux excitateurs afférents au CPF (S. Pirot, A.M. Thierry).

5.2.3. Étude anatomique et électrophysiologique du système cortico-striatonigral impliquant le cortex préfrontal

Le striatum est la structure par laquelle les différentes aires corticales ont accès à la circuitrie des ganglions de la base. Le noyau accumbens (NAcc) est l'une des principales cibles striatales du CPF. Des données neuroanatomiques et histochimiques ont permis de subdiviser le NAcc en deux régions le « core » et le « shell ». Précédemment, nous avons mis en évidence que le « core » du NAcc projette sur la substance noire réticulata (SNR) et exerce un effet inhibiteur sur les neurones de la partie médio-dorsale de la SNR qui innervent les noyaux dorso-médian et ventro-médian du thalamus.

Récemment, par une approche neuroanatomique utilisant le transport de WGA-HRP, nous avons montré que le « core » du NAcc reçoit une importante innervation du CPF ipsi et contralatéral ayant pour origine les aires prélimbique et agrulaire insulaire. D'autre part, après injection de WGA-HRP dans l'aire prélimbique de nombreuses terminaisons marquées sont visibles dans le « core » du NAcc et dans la région du striatum qui lui est adjacente dorsalement. Après injection de WGA-HRP dans l'aire agrulaire insulaire les terminaisons marquées sont strictement localisées dans le « core » du NAcc.

L'influence du CPF sur les neurones du striatum qui se projettent sur la région médio-dorsale de la SNR a été étudiée chez le rat anesthésié avec de la kétamine. La stimulation de l'aire prélimbique ipsi- ou contra-latérale et de l'aire agrulaire insulaire induit des réponses excitatrices sur les neurones du striatum (identifiés par la méthode d'activation antidromique), qui innervent la SNR médio-dorsale. La localisation des cellules répondant à ces stimulations corticales est en accord avec la topographie des projections de ces différentes aires du CPF sur le « core » du NAcc et la région du striatum qui lui est adjacente dorsalement. Ainsi, les neurones du « core » du NAcc, qui exercent une influence inhibitrice sur la SNR, reçoivent des informations excitatrices de deux régions du CPF : l'aire prélimbique et l'aire agrulaire insulaire (M.F. Montaron ; cette étude a été réalisée en collaboration avec J.M. Deniau, Université Paris VI).

5.2.4. Caractérisation du récepteur impliqué dans l'induction de la LTP évoquée dans le cortex préfrontal après stimulation de l'hippocampe

Le CPF reçoit une projection directe de la région CA1/subiculum de l'hippocampe dont le neuromédiateur est un acide aminé excitateur. Après avoir mis en évidence qu'il est possible d'induire une facilitation à long terme (LTP) de la transmission synaptique corticale après stimulation tétanique de l'hippocampe, nous nous sommes proposés de déterminer si l'induction de la LTP de la voie hippocampe-CPF dépend de l'activation de récepteurs NMDA.

Le potentiel de champ cortical évoqué par la stimulation (0.3 Hz) de l'hippocampe a été enregistré à l'aide d'une électrode accolée à une cannule « push-pull » permettant une perfusion locale de liquide céphalorachidien artificiel en présence ou non de D-APV, un antagoniste des récepteurs NMDA. Tous les animaux reçoivent deux séries de trains de stimulation haute fréquence (250 Hz, 200 ms). Chez les rats contrôles, la première série de trains induit une augmentation de l'amplitude du potentiel de champ de 50 %, cette augmentation atteint 90 % après l'application de la seconde série de trains et reste stable jusqu'à la fin de l'expérience. En présence d'APV (200 μ M) durant l'application de la stimulation tétanique, l'induction de la LTP est bloquée. Par contre, l'application d'APV n'affecte pas la LTP lorsque celle-ci a été préalablement établie. L'induction de la LTP évoquée dans le CPF par stimulation tétanique de l'hippocampe est donc NMDA-dépendante (T. Jay et F. Burette ; cette étude a été réalisée en collaboration avec S. Laroche, CNRS, Orsay).

PUBLICATIONS

J. MANTZ, A. CHERAMY, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, J. & J.M. DESMONTS, *Anesthetic properties of Riluzole (54274 RP), a new inhibitor of glutamate neurotransmission.* (Anesthesiology's, 76, 844-848, 1992).

J. MANTZ, J. CORDIER & C. GIAUME, *Effects of general anesthetics on intercellular communications mediated by gap junctions between astrocytes in primary culture.* (Anesthesiology, 78, 892-901, 1993).

D. HERVE, M. LEVI-STRAUSS, I. MAREY-SEMPER, C. VERNEY, J.P. TASSIN, J. GLOWINSKI & J.A. GIRAULT, *Golf and Gs in rat basal ganglia : possible involvement of Golf in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase.* (J. Neurosci., 13 (5) 2237-2248, 1993).

J.M. STUDLER, J. GLOWINSKI & M. LEVI-STRAUSS, *An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood.* (Europ. J. Neurosci., 5, 614-623, 1993).

F. PETITET, J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, Y. TORRENS, V. FARDIN & J. GLOWINSKI, *NK-1 tachykinin receptors in rat and guinea pig brains : pharmacological and autoradiographical evidence for a species difference*. (Peptides, 14, 551-559, 1993).

F. PETITET, J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, Y. TORRENS & J. GLOWINSKI, *The nonpeptide NK-2 antagonist SR 48968 is also a NK-3 antagonist in the guinea pig but not in the rat*. (Biochem. Biophys. Res. Comm., 191, 180-187, 1993).

S. GISPERT, R. TWELLS, G. OROZCO, A. BRICE, J. WEBER, L. HEREDERO, K. SCHEUFLER, B. RILEY, R. ALLOTEY, C. NOTHERS, R. HILLERMANN, A. LUNKES, C. KHATI, G. STEVANIN, A. HERNANDEZ, C. MAGARINO, T. KLOCKGETHER, A. DURR, H. CHNEIWEISS, J. ENCMANN, M. FARRALL, J. BECKMANN, M. MULLAN, P. WERNET, Y. AGID, H.J. FREUND, R. WILLIAMSON, G. AUBURGER & S. CHAMBERLAIN, *Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1*. (Nature Genetics, 4, 295-299, 1993).

I. MAREY-SEMPER, M. GELMAN & M. LEVI-STRAUSS, *The high sensitivity to rotenone of striatal dopamine uptake suggests the existence of a constitutive metabolic deficiency in dopaminergic neurons from the substantia nigra*. (Eur. J. Neurosci., 5, 1029-1034, 1993).

K. TSOU, J.A. GIRAULT & P. GREENGARD, *Dopamine D1 agonist SKF 38393 increases the state of phosphorylation of ARPP-21 in substantia nigra*. (J. Neurochem., 60, 1043-1046, 1993).

S. LAVIELLE, G. CHASSAING, A. BRUNISSEN, M. RODRIGUEZ, J. MARTINEZ, O. CONVERT, A. CARRUETTE, C. CARRET, F. PETITET, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN & J. GLOWINSKI, *Importance of the leucine side-chain to the spasmogenic activity and binding of substance P analogues*. (Int. J. Peptide Protein Res., 42, 270-277, 1993).

C. KHATI, G. STEVANIN, A. DURR, H. CHNEIWEISS, S. BELAL, A. SECK, H. CANN, A. BRICE & Y. AGID, *Genetic heterogeneity of autosomal dominant cerebellar ataxia type 1 : clinical and genetic analysis of 10 french families*. (Neurology, 43, 1131-1137, 1993).

G. STEVANIN, H. CHNEIWEISS, E. LE GUERN, N. RAVISE, A. DÜRR, C. PENET, Y. AGID & A. BRICE, *Genetic heterogeneity of autosomal dominant cerebellar ataxia type 1 : evidence for the existence of a third locus*. (Human Mol. Genetics, Vol. 2 n° 9, 1483-1485, 1993).

F. PETITET, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI & J.C. BEAUJOUAN, *A new selective bioassay for tachykinin NK3 receptors based on inositol monophosphate accumulation in the guinea pig ileum*. (Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharm. Section, 47, 185-191, 1993).

M.O. KREBS, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, M. DESBAN & J. GLOWINSKI, *Local GABAergic regulation of the N-methyl-d-aspartate-evoked release of*

striatal dopamine is more prominent in striosomes than in matrix of the rat striatum. (Neuroscience, 57 n° 2, 249-260, 1993).

M. DESBAN, M.L. KEMEL, J. GLOWINSKI & C. GAUCHY, *Spatial organization of patch and matrix compartments in the rat striatum.* (Neuroscience, 57 n° 3, 661-671, 1993).

P. MARIN, N. STELLA, J. CORDIER, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Role of arachidonic acid and glutamate in the formation of inositol phosphates induced by noradrenaline in striatal astrocytes.* (Mol. Pharmacol., 44, 1176-1184, 1993).

P. NEYROZ, F. DESDOUITS, F. BENFENATI, J.R. KNUTSON, P. GREENGARD & J.A. GIRAULT, *Study of the conformation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, by fluorescence spectroscopy.* (J. Biol.Chem., 268 n° 32, 24022-24031, 1993).

A. DÜRR, H. CHNEIWEISS, C. KHATI, G. STEVANIN, G. CANCEL, J. FEINGOLD, Y. AGID & A. BRICE, *Phenotypic variability in autosomal dominant cerebellar ataxia type I is unrelated to genetic heterogeneity.* (Brain, 116, 1497-1508, 1993).

K.D. PEUSNER & C. GIAUME, *The first developing « mixed » synapses between vestibular sensory neurons mediate glutamate chemical transmission.* (Neuroscience, 58, 99-113, 1994).

M. SAFFROY, J.C. BEAUJOUAN, F. PETITET, Y. TORRENS & J. GLOWINSKI, *Differential localization of ³H-[Pro9]SP binding sites in the guinea pig and the rat brain.* (Brain Research, 633, 317-325, 1994).

M.O. KREBS, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, M. DESBAN & J. GLOWINSKI, *Does bicuculline antagonize NMDA receptors? Further evidence in the rat striatum.* (Brain Research, 634, 345-348, 1994).

C. GAUCHY, M. DESBAN, J. GLOWINSKI & M.L. KEMEL, *NMDA regulation of dopamine release from proximal and distal dendrites in the cat substantia nigra.* (Brain Research, 635, 249-256, 1994).

G. STEVANIN, E. LE GUERN, N. RAVISE, H. CHNEIWEISS, A. DURR, G. CANCEL, A. VIGNAL, A.L. BOCH, A.L. RUBERG, C. PENET, Y. POTHIN, I. LAGROUA, M. HAGUENAU, G. RANCUREL, J. WEISSENBACH, Y. AGID & A. BRICE, *A third locus for autosomal dominant cerebellar ataxia type I maps to chromosome 14q24.3qter: Evidence for the existence of a fourth locus.* (Am. J. Hum. Genet., 54, 11-20, 1994).

G. CANCEL, A. DURR, G. STEVANIN, H. CHNEIWEISS, C., DUYSKAERTS, M. SERDARU, B. DE TOFFOL, Y. AGID & A. BRICE, *Is DRPLA also linked to 14q?* (Nature Genetics, 6, 8, 1994).

P. VEZINA, D. HERVE, J. GLOWINSKI & J.P. TASSIN, *Injections of 6-hydroxydopamine into the ventral tegmental area destroy mesolimbic dopamine neurons but spare the locomotor activating effects of nicotine in the rat.* (Neurosci. Lett., 168, 111-114, 1994).

P. VEZINA, G. BLANC, J. GLOWINSKI & J.P. TASSIN, *Blockade of D-1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex produces delayed effects on pre- and postsynaptic indices of dopamine function in the nucleus accumbens.* (Synapse, 16, 104-112, 1994).

J. SICILIANO, M. GELMAN & J.A. GIRAULT, *Depolarization and neurotransmitters increase neuronal protein tyrosine phosphorylation.* (J. Neurochem., 62, 950-959, 1994).

G. BLANC, F. TROVERO, P. VEZINA, D. HERVE, A.M. GODEHEU, J. GLOWINSKI & J.P. TASSIN, *Blockade of prefronto-cortical $\alpha 1$ -adrenergic receptors prevents locomotor hyperactivity induced by subcortical D-amphetamine injection.* (Europ. J. Neurosci., 6, 293-298, 1994).

J.M. DESCE, G. GODEHEU, T. GALLI, J. GLOWINSKI & A. CHERAMY, *Opposite presynaptic regulations by glutamate through NMDA receptors of dopamine synthesis and release in rat striatal synaptosomes.* (Brain Res., 640, 205-214, 1994).

N. STELLA, M. TENCE, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes.* (J. Neurosci., 14, n° 2, 568-575, 1994).

N.P. MURPHY, J. CORDIER, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Is protein kinase C activity required for the N-methyl-D-aspartate-evoked rise in cytosolic Ca^{2+} in mouse striatal neurons ?* (Eur. J. Neurosci., 6, 854-860, 1994).

M.O. KREBS, C. GAUCHY, M. DESBAN, J. GLOWINSKI & M.L. KEMEL, *Role of dynorphin and GABA in the inhibitory regulation of NMDA-induced dopamine release in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum.* (J. Neurosci., 14, 4, 2435-2443, 1994).

*
**

Différents chercheurs du laboratoire ont présenté leurs travaux dans les congrès suivants :

J.P. TASSIN, *Neurobiologie et anticipation*, Congrès International de Psychiatrie, Rio de Janeiro, Brésil, 07-11/06/93.

P. MARIN, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, J. BOCKAERT, M. MAUS, *Le glutamate et le monoxyde d'azote modulent une activité ADP-ribosyltransferase endogène dans les neurones de striatum.* Minicolloque de la Société des Neurosciences, Montagnac, 23-25/06/93.

M. TENCE, N. STELLA, J. CORDIER, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, *Les agonistes muscariniques induisent une libération d'acide arachidonique par les neurones de striatum en culture primaire.* Minicolloque de la Société des Neurosciences, Montagnac, 23-25/06/93.

S. DESAGHER, J. GLOWINSKI, M. TENCE, *Le phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) stimule une phospholipase D dans les astrocytes de striatum en culture primaire*. Minicolloque de la Société des Neurosciences, Montagnac, 23-25/06/93.

P. MARIN, M. TENCE, J.C. DELUMEAU, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Adenosine or somatostatin potentiates the α 1-adrenergic activation of phospholipase C in striatal astrocytes through a mechanism involving arachidonic acid and glutamate*. Biochemical Society Meeting, Sheffield, UK, 20-23/07/93.

A. CHERAMY, J.M. DESCE, G. GODEHEU, J. GLOWINSKI, *Simultaneous measurement of dopamine synthesis and release from rat striatal synaptosomes*. Gordon Conference on Catecholamines, Andover, USA, 26-30/07/93.

J.A. GIRAULT, M. MENEGOZ, J. SICILIANO, *Regulation of protein tyrosine phosphorylation in CNS neurons*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

M. MENEGOZ, J. SICILIANO, J.A. GIRAULT, *Characterization and purification of a 180 kDa neuronal protein, phosphorylated on tyrosine and enriched in post-synaptic densities*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

I. MAREY-SEMPER, M. GELMAN, M. LEVI-STRAUSS, *The existence of a constitutive metabolic deficiency in nigrostriatal dopaminergic neurons is suggested by the high sensitivity to rotenone of the striatal dopamine uptake*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

D. SABERAN-DJONEIDI, I. MAREY-SEMPER, J.M. STUDLER, J. GLOWINSKI, M. LEVI-STRAUSS, *Molecular characterization of an abundant mRNA of the embryonic brain*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

A. CHERAMY, T. GALLI, F. ARTAUD, Y. TORRENS, J.M. DESCE, G. GODEHEU, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, *Cholinergic and glutamatergic modulation of 3 H-GABA release in matrix-enriched areas of the rat striatum*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

B. CHAMAK, M. MALLAT, *Regulation of neurite growth and regeneration by brain macrophages: involvement of thrombospondin*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

H. CHNEIWEISS, M. YOKOYAMA, N. DANZIGER, J. CORDIER, H. ARAUJO, J. GLOWINSKI, *PEA-15, a novel major astrocytic phosphoprotein. Identification and regulation of two phosphorylation sites*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

L. VENANCE, J. CORDIER, M. MONGE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Development of homotypic and heterotypic communications via gap junctions during oligodendrocyte differentiation*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

M. TENCE, N. STELLA, J. CORDIER, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, *Muscarnic agonists induce a release of arachidonic acid from neurons in primary culture*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

N. STELLA, M. TENCE, P. MAGISTRETTI, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Glutamate induced release of arachidonic acid from astrocytes in primary cultures*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

J.C. BEAUJOUAN, F. PETITET, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, *Species differences for NK-3 receptors*. 14th ISN Biennial Meeting, Montpellier, 22-27/08/93.

C. GIAUME, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *Endothelins inhibit gap junction permeability between cultured astrocytes*. International Meeting on Gap Junctions, Hiroshima, Japon, 24-29/08/93.

A. CHERAMY, J.M. DESCE, G. GODEHEU, T. GALLI, J. GLOWINSKI, *Presynaptic control of dopamine synthesis and release by excitatory amino acids in rat striatal synaptosomes*. Excitatory amino acid neurotransmission, Marseille, 29/08-02/09/93.

C. GAUCHY, M.O. KREBS, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Presynaptic control of dopamine release by NMDA in rat striatal compartments : involvement of GABA and dynorphin-containing neurons*. Excitatory amino acid neurotransmission, Marseille, 29/08-02/09/93.

G. BLANC, F. TROVERO, D. HERVE, P. VEZINA, A.M. GODEHEU, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Permissive role of cortical $\alpha 1$ -adrenergic transmission in the amphetamine induced locomotor hyperactivity*. 16th Annual ENA Meeting, Madrid, Espagne, 18-21/09/93.

S. PIROT, T. JAY, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *The neurotransmitter of the projection of the medio-dorsal nucleus of the thalamus to the prefrontal cortex of the rat is an excitatory amino acid*. 16th Annual ENA Meeting, Madrid, Espagne, 18-21/09/93.

P. MARIN, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, J. BOCKAERT, M. MAUS, *Modulation of an endogenous ADP-ribosyltransferase activity by glutamate and nitric oxide in neurons*. 16th Annual ENA Meeting, Madrid, Espagne, 18-21/09/93.

M. DIETL, G. GODEHEU, J.C. BEAUJOUAN, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, *Dopamine release from rat striatum and substantia nigra : modulation by selective NK1, NK2 and NK3 tachykinin receptor agonists*. 16th Annual ENA Meeting, Madrid, Espagne, 18-21/09/93.

L. VENANCE, J. CORDIER, M. MONGE, B. ZALC, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Développement des communications homotypique et hétérotypique par les jonctions de type « gap » au cours de la différenciation in vitro des cellules gliales*. 4^e Colloque « Canaux ioniques », Carry-le-Rouet, 30/09-02/10/93.

J. GLOWINSKI, *Control of glutamatergic transmission by astrocyto-neuronal interactions and modalities of action of glutamate on astrocytes in the striatum*. International Titisee Conference, Titisee, Suisse, 27-31/10/93.

M. YOKOYAMA, N. DANZINGER, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *A novel protein kinase C substrate enriched in astrocytes, PEA-15, may be associated with microtubules*. Society for Neuroscience, Washington, 7-12/11/93.

F. BURETTE, T. JAY, S. LAROCHE, *The hippocampal-prefrontal cortex pathway in the rat : long-term potentiation and implication in associative learning*. Society for Neuroscience, Washington, 7-12/11/93.

C. GIAUME, *Gap junctions in cultured astrocytes : characterization of the major junctional protein and regulation by endothelins*. 1^{er} EWWL Meeting, Montpellier, 25-26/11/93.

M. MALLAT, C. THERY, B. CHAMAK, *Macrophages in CNS and free radicals*. 4th International Symposium on ALS/MND, Chantilly, 25-27/11/93.

F. DESDOUITS, P. GREENGARD, J.A. GIRAULT, *Casein kinase I inhibits dephosphorylation of DARPP-32 by calcineurin*. American Society for cell biology, 33rd Meeting, New Orleans, USA, 11-15/12/93.

M. MALLAT, B. CHAMAK, C. THERY, *Neurotoxic and neurite promoting effects of brain macrophages*. 1st European meeting on glial cell Function in health and disease, Heidelberg, Allemagne, 24-27/03/94.

H. CHNEIWEISS, *Multiple phosphorylation cascades in astrocytes triggered by neurotransmitters and growth factors : studies using PEA-15 as a probe*. 1st European meeting on glial cell Function in health and disease, Heidelberg, Allemagne, 24-27/03/94.

J. GLOWINSKI, Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, F. PETITET, G. CHASSAING, S. LAVIELLE, *Further evidence for the existence of peripheral tachykinin septide-sensitive receptors*. 4th Annual meeting of the European Neuropeptide club, Strasbourg, 13-15/04/94.

Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, F. PETITET, J. GLOWINSKI, *NKB stimulates phospholipase C activity in the rat urinary bladder by acting on both NK2 and septide-sensitive receptors*. 4th Annual meeting of the European Neuropeptide club, Strasbourg, 13-15/04/94.

M. KUBES, M. YOKOYAMA, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *Multiple phosphorylation sites of PEA-15, a major astrocyte phosphoprotein interacting with microtubules*. Alzheimer's Disease : lessons from cell biology, Fondation Ipsen, Paris, 25/04/94.

J.A. GIRAULT, M. MENEGOZ, F. BURGAYA, M., LE BERT, J. SICILIANO, *Regulation of protein tyrosine phosphorylation in central neurons*. 14th Blanke-nese Conference, Hamburg, Allemagne, 08-12/05/94.

S. SAGAN, G. CHASSAING, L. PRADIER, Y. TOORRENS, J.C. BEAUJOUAN, S. LAVIELLE, *Tachykinin peptides affect differently the second messenger pathways after binding to CHO-expressed human-NKA receptors*. Summer Neuropeptide Conference, Martha's Vineyard, Mass. USA, 05-09/06/94.

M. TENCE, N. MURPHY, J. CORDIER, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, *Synergistic effects of acetylcholine and glutamate on the release of arachidonic acid from striatal neurons in culture*. PGs'94, Florence, Italie, 06-10/06/94.

A.M. THIERRY, S. PIROT, T. JAY, J. GLOWINSKI, *Differential influence of the dopaminergic system on thalamic and intracortical evoked responses in the rat prefrontal cortex*. CINF Congress, Washington, USA, Juin 1994.

A. TABERNEO, C. GIAUME, J.M. MEDINA, *Endothelin regulates uptake and intercellular distribution of glucose in cultured rat astrocytes*. Physiological Society, Cambridge, UK, Juillet 1994.

A. CHERAMY, G. GODEHEU, M. L'HIRONDEL, J. GLOWINSKI, *Cooperative contribution of cholinergic and NMDA receptors in the presynaptic control of dopamine release in rat striatal synaptosomes*. Dopamine 94, Quebec, Canada, 20-23/07/94.

M.L. KEMEL, M.O. KREBS, C. GAUCHY, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, *Blockade of D2 DA receptors facilitates the NMDA-evoked release of dopamine by reducing the local inhibitory control of GABAergic neurons in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum*. Dopamine 94, Quebec, Canada, 20-23/07/94.

D. HERVE, M. LEVI-STRAUSS, J.P. TASSIN, J. GLOWINSKI, J.A. GIRAULT, *Expression and regulation of the guanine nucleotide-regulated protein Golf in the rat basal ganglia*. Dopamine 94, Quebec, Canada, 20-23/07/94.

P. MARIN, M. MAUS, J. BOCKAERT, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Oxygen free radicals enhance the nitric oxide-induced NAD-dependent covalent modification of neuronal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*. Nitric oxide in the nervous system, Neuropharmacology II, IUPHAR, Montreal, Canada, 22-24/07/94.

A. CHERAMY, E. GHEORVASSAKI, F. ARTAUD, G. GODEHEU, J. GLOWINSKI, *Dopaminergic modulation of (3H)-GABA release in matrix-enriched areas of the rat striatum*. XII^e Intern. Congress of Pharmacology, Montreal, Canada, 24-29/07/94.

M.L. KEMEL, M.O. KREBS, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, M. DESBAN, *Involvement of dynorphin and GABA in the regulation of the NMDA-evoked release of dopamine in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum*. XII^e Intern. Congress of Pharmacology, Montreal, Canada, 24-29/07/94.

LISTE DES DIPLÔMÉS - 1993-1994

DESAGHER Solange (sous la direction de M. Tencé) :

Mise en évidence d'une activité phospholipase D régulée par la protéine kinase C et l'endothéline dans les astrocytes de striatum en culture primaire.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P.M. Curie, Paris VI, septembre 1993.

PIROT Sylvain :

Transfert des informations dans le cortex préfrontal du rat : influence du système dopaminergique mésocortical.

Thèse de Doctorat de l'Université de Paris 6, soutenue le 28 juin 1994.