

Neuropharmacologie

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

Cours : Les récepteurs du glutamate : récents développements (suite)

En 1994, nous avons entrepris de décrire et d'analyser les récents développements de la recherche florissante sur les récepteurs du glutamate, le principal médiateur excitateur du système nerveux central. Après un long rappel historique sur la période précédant la phase moléculaire actuelle, ce premier cours sur ce sujet avait été consacré aux récepteurs ionotropiques de type AMPA et kainate. Cette année, après avoir brièvement commenté des données récentes sur la structure tridimensionnelle des sous-unités des récepteurs AMPA et kainate, nous nous sommes particulièrement intéressés aux récepteurs ionotropiques de type N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et aux récepteurs glutamatergiques métabotropiques. Il s'agit d'un vaste domaine d'investigation car ces récepteurs sont impliqués dans la croissance cellulaire, le développement, l'activité rythmique de certaines populations neuronales, la plasticité neuronale (potentialisation ou dépression à long terme des réponses neuronales) et dans des processus neurotoxiques liés dans certains cas à des libérations massives de glutamate. Les récepteurs métabotropiques du glutamate représentent une nouvelle grande famille de récepteurs couplés à des protéines G et semblent intervenir dans une grande diversité des processus synaptiques. De fait, ainsi que nous l'avons souligné, ceux couplés négativement à l'adénylate cyclase (des autorécepteurs notamment) diminueraient certaines transmissions synaptiques.

Après une brève introduction générale, deux grands chapitres ont été consacrés à l'analyse des propriétés des récepteurs NMDA : les aspects moléculaires et les processus de régulation.

Les récepteurs NMDA sont constitués de deux types de sous-unités, les sous-unités NMDA R1 dont 8 isoformes ont déjà été identifiées et les 4 sous-unités NMDA R2 qui dérivent de gènes distincts. Les sous-unités NMDA R1 absolu-

ment requises pour les propriétés fonctionnelles des récepteurs NMDA et pour un grand nombre de leurs processus de régulation sont exprimées dans la grande majorité des cellules neuronales. A l'inverse, les sous-unités NMDA R2 (A, B, C, D) représentent des sous-unités régulatrices douées de propriétés amplificatrices et qui par leurs sensibilités à certains agents régulateurs et leurs distributions distinctes sont responsables de la très grande diversité et de l'hétérogénéité des récepteurs NMDA natifs.

Nous nous sommes donc successivement intéressés au clonage de ces sous-unités, à la formation par épissage alternatif des isoformes NMDA R1, aux caractéristiques structurales de ces sous-unités, aux propriétés fonctionnelles — perméabilité, électrophysiologiques — des récepteurs homomériques NMDA R1 et hétéromériques NMDA R1 et R2 reconstitués. Ensuite, après avoir commenté l'hétérogénéité des distributions cérébrales des sous-unités NMDA R2 et insisté sur les modifications de l'expression des différentes sous-unités intervenant au cours du développement chez la souris ou le rat, nous avons évoqué des données en faveur de l'existence d'autres types de récepteurs NMDA, les récepteurs RGbs et GR 33. Enfin, après avoir insisté sur les propriétés pharmacologiques distinctes de certains récepteurs NMDA natifs, les modifications comportementales observées chez des souris mutantes NR1 *-/-* ou des animaux ayant reçu des oligonucléotides anti-sens NMDA R1 ont été décrites.

Un très grand nombre de régulations des récepteurs NMDA impliquent des sites distincts (sous-unités R1, sous-unités R2, face externe, interne, intramembranaire, canal) et leurs amplitudes varient en fonction de la constitution des récepteurs NMDA considérés. Ces régulations modulent positivement ou négativement les effets évoqués par la stimulation des récepteurs NMDA. Parmi les modulations positives, le rôle déterminant du co-agoniste, la glycine, qui régule de façon allostérique l'affinité du glutamate pour son site de liaison a été analysé en détail, puis nous avons successivement évoqué les effets des polyamines, des neurostéroïdes, du pH (basicité), des agents réducteurs, d'une diminution de l'osmolarité du milieu extracellulaire (régulation « mécanique »), de l'acide arachidonique, et enfin des processus souvent indispensables de phosphorylation nécessitant notamment l'activation d'une protéine kinase C et de certaines tyrosine kinases. En ce qui concerne les modulations négatives, le blocage voltage-dépendant évoqué par une concentration physiologique d'ions magnésium a été décrit précisément, puis nous nous sommes intéressés aux effets des ions zinc (voltage-indépendant), du calcium (interne), de l'augmentation de concentration en protons, des agents oxydants, du monoxyde d'azote (NO), des solutions hyperosmotiques et, enfin de dérivés du tetrahydrocannabinol, ou encore de la dynorphine. Dans certains cas (rôle de la glycine, des polyamines), nous nous sommes également attachés à décrire les effets de différentes molécules agonistes ou antagonistes récemment développées et à envisager leurs applications pharmacologiques et thérapeutiques.

La dernière partie de ce cours a été consacrée aux récepteurs métabotropiques qui sont couplés positivement à une phospholipase C (mGLUR1 et mGLUR5) ou négativement à l'adénylate cyclase. Ces derniers se subdivisent en deux familles : 1) mGLUR2 et mGLUR3 ; 2) mGLUR4, mGLUR6 et mGLUR7 dont les agonistes respectifs les plus efficaces sont le L-CGI et le L-AP4. Après avoir rappelé les expériences classiques qui ont permis de mettre en évidence l'existence de ces récepteurs, nous nous sommes successivement intéressés à leur clonage, leur structure moléculaire, au mode de formation par épissage alternatif de leurs isoformes et de façon plus prédominante à leurs propriétés pharmacologiques. Ensuite, nous avons décrit des études récentes sur leurs localisations et sur leurs propriétés fonctionnelles (régulation de nombreux types de canaux ioniques et des autres récepteurs glutamatergiques).

J. G.

SÉMINAIRES :

L'avenir de la sante mentale :

Cette série de séminaires préparée avec le D^r S.D. Kipman et la Fédération Française de Psychiatrie a été organisée sous forme d'un symposium d'une journée qui a réuni une très large audience.

Philippe JEAMMET (Hopital International de l'Université de Paris) : La psychiatrie de l'enfant et de l'adolescent : les modèles psychiatriques questionnés par la perspective développementale.

Jean MAISONDIEU (Clinique de Psychothérapie, Poissy) : Psychopathologie de l'abjection et prévention du « naufrage sénile ».

Jean-Claude SCOTTO (CHU Ste Marguerite, Marseille) : Les perspectives de la psychiatrie générale.

Christiane DRESSEN (CFES, Vanves) : L'image de la santé mentale dans le grand public.

Jean-Michel THURIN (Paris) : Evolution de la clinique.

André GREEN (Paris) : Neuropharmacologie et psychanalyse devant la psychiatrie.

Jean-Pierre OLIE (CHU Ste Anne, Paris) : Evolution des thérapeutiques biologiques.

Pierre-François CHANOIT (Paris) : De la psychiatrie à la santé publique.

Simon-Daniel KIPMAN (Paris) : Conclusion.

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 neurones
cérébraux*

Nous avons montré que les astrocytes sécrètent du M-CSF, une glycoprotéine ayant des effets mitogènes sur la microglie et d'autres phagocytes tissulaires, et que des neurones en culture produisent des facteurs solubles qui potentialisent l'activité du M-CSF. Cultivés en présence de concentrations saturantes de M-CSF, les macrophages issus d'organes hématopoïétiques ou du SNC prolifèrent mais leur nombre est doublé en l'espace de 72 heures lorsqu'ils sont simultanément exposés à des neurones, selon des protocoles limitant les échanges entre les deux types cellulaires à des molécules diffusibles. Cette année, la caractérisation cellulaire et moléculaire de cette activité neuronale a été poursuivie. La capacité des neurones à favoriser la prolifération macrophagique, quel que soit leur origine intracérébrale (cortex cérébral, mésencéphale, cervelet) et leur stade de maturation *in vitro* a pu être confirmée. Cette activité neuronale est spécifique dans la mesure où elle n'est pas exercée par des astrocytes ou des cellules microgliales. Des études effectuées avec des cultures de macrophages synchronisés ont permis de montrer que les facteurs neuronaux entraînent un raccourcissement de la phase G1 du cycle cellulaire des phagocytes. Ces facteurs ne semblent pas correspondre à du GM-CSF ou aux interleukines 3, 4 et 7, connus pour potentialiser l'activité mitogène du M-CSF. Des caractérisations physico-chimiques effectuées à partir d'extraits de cerveaux de rat immatures (reproduisant l'effet des facteurs sécrétés par les neurones en culture) indiquent que l'activité biologique est conservée dans une fraction thermostable de composés solubles dont la masse moléculaire est comprise entre 1 et 3kD. Ces résultats suggèrent un rôle promoteur des neurones centraux dans la prolifération microgliale au cours du développement (A. Dobbertin).

1.1.2 *Production intracérébrale d'agents chémotactiques actifs
sur les macrophages : expression et rôle de la protéine MCP-1*

Utilisant un test *in vitro* de migration polarisée, nous avons montré que les cellules microgliales amiboïdes produisent des agents chémotactiques actifs sur

des précurseurs des macrophages tissulaires isolés à partir de moëlle osseuse. Par ailleurs, nous avons observé que la microglie isolée *in vitro* synthétise des transcrits correspondant à la protéine MCP-1, une chémokine active sur les phagocytes mononucléés. Cette année nous avons démontré que le MCP-1 est effectivement l'un des médiateurs de l'attraction *in vitro* exercée par la microglie sur ses précurseurs et recherché l'expression du gène de cette chémokine dans différents lignages d'origine neuroectodermique (s). Les astrocytes en culture peuvent synthétiser du MCP-1 lorsque les cellules sont stimulées par du lipopolysaccharide (LPS). L'induction d'une expression astrocytaire de MCP-1 a aussi été observée *in vivo* par immunocytochimie, à la suite d'une lésion tissulaire provoquée par l'injection d'acide kaïnique dans le striatum de rats adultes. Ces observations suggèrent que le MCP-1 favorise l'infiltration intracérébrale de macrophages lors de processus lésionnels (C. Calvo, M. Gelman).

1.2. CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE PROTÉINES NEURONALES ET ANALYSE MOLÉCULAIRE DE LA VULNÉRABILITÉ PARTICULIÈRE DES NEURONES DOPAMINERGIQUES (Responsable de l'équipe : Matthieu Lévi-Strauss)

1.2.1. *Etude d'un ARN très abondant du système nerveux embryonnaire*

L'ARN messager 3.1 très abondant dans les neurones embryonnaires ne persiste chez l'adulte que dans les cellules des grains du cervelet, du bulbe olfactif et de l'hippocampe. Sa caractérisation structurale a montré que la phase ouverte de lecture la plus probable coderait pour une petite protéine de 68 acides aminés. Jusqu'à présent, cette protéine n'a pas pu être mise en évidence ce qui soulève la question d'un éventuel rôle non codant pour cet ARN. En effet, la forte pression de sélection à laquelle il semble soumis (80 % d'homologies entre les séquences établies chez le poulet et chez l'homme sur l'ensemble des 2000 pb de cet ARN), incite à poursuivre la recherche de son rôle fonctionnel.

Dans ce but, diverses constructions comportant l'ADN complémentaire 3.1 sens ou antisens ont été réalisées en vue de pratiquer des expériences de transfection stable et de transgénèse. Le choix des cellules à transférer s'est porté sur le neuroblastome NS20 (fourni par A. Koulakoff et Y. Netter) dans la mesure où l'abondance de l'ARN 3.1 apparaît modulée en fonction de la différenciation de ces cellules. Les premières transfusions ont entraîné des modifications morphologiques des cellules en dépit d'une transcription très faible du transgène. Ces transfusions seront donc répétées en utilisant un promoteur CMV qui devrait permettre une expression plus abondante et la vérification de l'effet morphologique observé. Ces mêmes constructions seront utilisées pour créer des souris transgéniques en collaboration avec Marc Le Bert (J.M. Studler)

1.2.2. *Caractérisation biochimique et fonctionnelle d'une nouvelle famille de protéines neuronales.*

L'ARN correspondant à l'ADN complémentaire 8.5 code pour un polypeptide de 171 acides aminés dont la similarité, d'environ 60 %, avec un autre polypeptide déjà partiellement caractérisé permet de définir une nouvelle famille de protéines spécifiques du système nerveux. Un anticorps dirigé contre la protéine recombinante, produite dans *E. Coli* a permis de montrer l'existence de la protéine naturelle, spécifiquement exprimée dans les cellules neuroendocrines et dans les neurones ; celle-ci a été nommée p19 à cause de sa masse moléculaire de 19 kDa. En collaboration avec Claude Tougard et Renée Picart (Groupe de Biologie de la Cellule Neuroendocrine, Collège de France) nous avons par ailleurs montré, par immunohistochimie et microscopie électronique, que cette protéine est localisée dans l'appareil de Golgi. Sa structure primaire contient toute l'information nécessaire à sa localisation ultrastructurale puisque elle est capable de s'accumuler dans l'appareil de Golgi de cellules COS transfectées avec le cDNA correspondant. En collaboration avec Nguyen Van Cong et Alain Bernheim (Institut Gustave Roussy, Villejuif), nous avons recherché la localisation chromosomique du gène humain codant pour cette protéine. Sa situation, en 5q35, ne correspond malheureusement pas à une maladie neurologique héréditaire connue. Par ailleurs la fonction de la protéine p19 est étudiée en analysant les modifications éventuelles de la sécrétion de prolactine de cellules hypophysaires GH3 transfectées avec des constructions permettant l'expression des brins sens ou anti-sens de l'ADNc correspondant. Nous nous consacrons aussi à la caractérisation structurale de l'autre membre de cette nouvelle famille (D. Sabéran-Djoneidi, M. Gelman, M. Lévi-Strauss)

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

Le but de cette étude est double. Il s'agit d'une part de vérifier notre hypothèse selon laquelle les neurones dopaminergiques nigro-striataux, qui sont sélectivement atteints au cours de la maladie de Parkinson, seraient particulièrement sensibles à des altérations de la phosphorylation oxydative. D'autre part, nous cherchons à comprendre la cause de la dégénérescence de ces neurones dopaminergiques nigro-striataux chez les souris portant la mutation récessive *weaver*.

Pour démontrer *in vitro* l'existence de cette vulnérabilité particulière, plusieurs types de neurones de souris en culture primaire ont été utilisés afin de comparer la toxicité de différents traitements destinés, soit à inhiber la phosphorylation oxydative, soit à augmenter les dépenses énergétiques en perturbant les gradients ioniques membranaires. La roténone, un inhibiteur de la phosphorylation oxydative, et le glutamate qui provoque une entrée massive de sodium dans les neurones dopaminergiques ont été choisis pour ces expériences. Ces deux drogues, appliquées séparément, affectent autant les neurones dopaminergiques que les

neurones GABAergiques. Par contre, un traitement d'une heure par le glutamate (ou par le NMDA en l'absence de magnésium) de neurones préincubés six heures avec de la roténone est trois fois plus toxique pour les neurones dopaminergiques que pour les neurones GABAergiques. Chez les souris weaver, l'existence d'un déficit très précoce de la recapture de dopamine, qui n'est pas dû à une diminution du nombre des neurones dopaminergiques, a été observée sur des neurones mésencéphaliques en culture primaire.

Nous avons cherché à mettre en évidence une anomalie du métabolisme énergétique de la souris weaver qui pourrait expliquer à la fois le déficit très précoce de la recapture de dopamine et la dégénérescence des neurones dopaminergiques puisque ceux-ci sont particulièrement vulnérables à des altérations de la phosphorylation oxydative. En collaboration avec Pierre Rustin et Arnold Munnich (INSERM U.393), nous avons tout d'abord montré par polarographie que l'oxydation du malate était diminuée de 40 % dans le foie de souriceaux weaver âgés de seize jours mais que l'oxydation du succinate était normale chez ces animaux. Des études d'activités enzymatiques ont ensuite révélé l'existence, dans le foie de souriceaux weaver, d'une diminution d'environ 60 % de l'activité des complexes I plus III de la phosphorylation oxydative qui, curieusement, ne s'accompagne d'aucune diminution de l'activité de chaque complexe mesurée individuellement. Ce déficit des complexes I plus III de la phosphorylation oxydative est déjà présent à la naissance et précède donc toute dégénérescence neuronale (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)

Nous avons démontré que les astrocytes contribuaient à la régulation de la transmission glutamatergique dans le striatum de la souris en modulant la recapture du glutamate. L'analyse des effets du glutamate sur les neurones de cette structure a été poursuivie en étudiant plusieurs mécanismes intervenant dans la neurotoxicité de cet acide aminé exciteur. L'étude du rôle des astrocytes dans la neurotoxicité du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a également été entreprise.

2.1.1. *Rôle protecteur des astrocytes vis-à-vis de la neurotoxicité du peroxyde d'hydrogène*

Selon certains auteurs, la neurotoxicité de la protéine b-amyloïde qui s'accumule durant l'évolution de la maladie d'Alzheimer résulte vraisemblablement d'une production neuronale de peroxyde d'hydrogène. Le but de notre étude a donc été de déterminer les capacités respectives des astrocytes et des neurones à

dégrader le peroxyde d'hydrogène afin de prévoir un éventuel rôle protecteur des astrocytes. Nous avons montré qu'une exposition de 30 minutes des neurones striataux au peroxyde d'hydrogène (10-300 mM) induit une forte neurotoxicité mesurée 24 heures plus tard. De plus, les neurones semblent avoir une capacité beaucoup plus faible (7 fois) que les astrocytes d'hydrolyser le peroxyde d'hydrogène. De fait, lorsque les neurones sont cultivés avec les astrocytes, la neurotoxicité du peroxyde d'hydrogène est fortement diminuée et ce d'autant plus que la densité d'astrocytes est élevée.

2.1.2. Recherche du mécanisme mis en jeu dans les effets neuroprotecteurs de la nicotine

Un des principaux enjeux de la découverte d'un effet neuroprotecteur de la nicotine est de trouver des molécules protégeant les neurones par le même mécanisme que la nicotine mais dépourvues de ses effets indésirables. Il est pour cela nécessaire d'identifier les processus mis en jeu dans les effets neuroprotecteurs de la nicotine.

Une action directe sur le récepteur NMDA de la nicotine et des autres ligands cholinergiques utilisés dans notre étude a pu être rapidement écartée. En effet, à l'aide d'une technique micro-fluorimétrique faisant appel à l'INDO-1 comme sonde fluorescente, nous avons démontré que la nicotine n'inhibe pas l'influx calcique provoqué par l'ouverture du canal NMDA dans les neurones de striatum. Une autre réponse biochimique provoquée par l'activation des récepteurs NMDA dans ces neurones striataux est la libération d'acide arachidonique. Nous avons également démontré que la nicotine inhibe (environ 50 %) la libération d'acide arachidonique induite par l'application de NMDA. Paradoxalement, des résultats préliminaires indiquent que l'effet de la nicotine résulte uniquement d'une inhibition de la libération d'acide arachidonique provoquée par l'activation conjointe des récepteurs AMPA et métabotropiques. En effet, le glutamate provoque la libération d'acide arachidonique dans les neurones de striatum par deux mécanismes distincts et additifs : l'un met en jeu l'activation des récepteurs NMDA, l'autre résulte d'une activation conjointe des récepteurs AMPA et métabotropiques. En conséquence, la stimulation des récepteurs NMDA provoquerait une libération de glutamate qui stimulerait les récepteurs AMPA et métabotropiques.

2.1.3. Recherche du mécanisme responsable de l'inhibition de synthèse protéique par le glutamate

Nous avons pu mettre en évidence qu'une stimulation très brève (30 secondes) des récepteurs NMDA des neurones striataux induit une forte inhibition de la synthèse protéique (70 %). Cet effet ne se manifeste qu'en présence de calcium externe. En collaboration avec Angus Nairn, un chercheur américain (New York) nous recherchons si cet effet résulte de la phosphorylation d'un facteur d'élongation EF2. De fait, la phosphorylation de cette protéine catalysée spéci-

fiquement par la protéine kinase dépendante de la calmoduline (type III) est responsable sur d'autres types cellulaires d'un arrêt de la synthèse protéique. Ces expériences sont réalisées à l'aide d'anticorps (fournis par A. Nairn) spécifiques des formes phosphorylée ou déphosphorylée de cette protéine.

2.1.4. *Rôle du métabolisme énergétique dans les effets neurotoxiques du glutamate*

Cette étude prolonge des travaux précédents concernant le rôle de l'apport en glucose dans la régulation de la libération d'acide arachidonique induite par le glutamate et la régulation d'une enzyme de la cascade de la glycolyse, la glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogénase.

Nous avons montré que les effets potentialisateurs de l'absence de glucose sur la libération d'acide arachidonique induite par le glutamate peuvent être annulés par un apport substitutif en lactate ou en pyruvate. Nous recherchons si la neurotoxicité du glutamate est diminuée en présence de lactate ou de pyruvate. Cette étude s'inscrit dans la recherche d'autres types d'interactions astrocyto-neurales et amplifie celle entreprise par le groupe de Pierre Magistretti à Lausanne. En effet, ces chercheurs ont démontré que la libération de lactate par les astrocytes était augmentée en réponse au glutamate.

2.2. ÉTUDE IN VITRO DES INTERACTIONS GLIALES PAR L'INTERMÉDIAIRE DES JONCTIONS DE TYPE "GAP"

(Responsable de l'équipe : C. Giaume)

2.2.1. *Rôle de la phospholipase C dans la propagation des vagues calciques intercellulaires*

Les astrocytes en culture primaire constituent un modèle de choix pour l'étude des mécanismes intervenant dans la propagation des vagues calciques intercellulaires. Selon des travaux récents, le passage d'IP3 à travers les jonctions "gap" est indispensable pour que ces augmentations de $[Ca^{++}]_i$ soient transmises d'une cellule à ses voisines. Nous avons observé sur des astrocytes du striatum de la souris que la production d'inositol phosphates induite par l'endothéline 1 ou par l'ionomycine est réduite de 81 % et 51 % respectivement en présence de U-73122, un inhibiteur de la phospholipase C (PLC). Lorsqu'une stimulation mécanique est réalisée en présence de U-73122, l'augmentation de calcium reste limitée à l'astrocyte stimulé. Ce blocage ne peut être attribué à une inhibition des jonctions "gap" puisque la perméabilité jonctionnelle n'est pas affectée par cet inhibiteur. Ainsi, l'activation de la PLC semble être une étape indispensable pour que les vagues calciques se propagent de manière régénérative. Ceci suppose que la distance de propagation des vagues intercellulaires dépend du niveau d'activation de la PLC et par conséquent de la production d'IP3 qui en résulte. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que des applications locales

d'endothéline 1 ou de glutamate, qui induisent des augmentations importantes d'IP3 (660 % et 430 % du niveau basal), sont capables de générer des vagues calciques tandis que la méthoxamine et le carbachol qui stimulent faiblement la PLC (170 % et 131 %) ne le sont pas (L. Venance, N. Stella, C. Giaume)

2.2.2. Inhibition de la perméabilité jonctionnelle et de la propagation des vagues calciques par l'anandamide

Dans le striatum, l'anandamide, un dérivé endogène de l'acide arachidonique qui active les récepteurs cannabinoïdes, est synthétisé et libéré par les neurones mais pas par les astrocytes.

L'anandamide (1-5 μM) s'est révélée un puissant inhibiteur de la perméabilité des jonctions communicantes entre les astrocytes striataux (souris embryonnaires) en culture primaire. Cet effet inhibiteur est : (1) sélectif puisque des analogues structuraux ayant un nombre de doubles liaisons inférieur à 4 sont sans effet, (2) distinct de celui produit par l'acide arachidonique qui agit à des concentrations plus élevées (50 μM), (3) dépendant de la structure d'origine des astrocytes puisqu'il n'est pas observé sur des astrocytes corticaux, (4) diminué après prétraitement avec la toxine de pertussis ou des agent alkylants, et (5) ni reproduit par des agonistes (WIN55212 et CP55940) ni bloqué par un antagoniste (SR141716A) du récepteur cannabinoïde central CB1. Des études d'imagerie calcique (Indo-1 AM) effectuées sur des astrocytes striataux ont également indiqué que l'anandamide (0.5-5 μM) bloque la propagation de vagues calciques intercellulaires induites par la stimulation mécanique ou l'application locale de glutamate (100 μM). Ainsi, l'anandamide semble inhiber les jonctions communicantes des astrocytes striataux par l'intermédiaire d'un récepteur distinct du récepteur cannabinoïde central CB1, et agir comme messager « transcellulaire » en contrôlant la propagation de signaux calciques dans les cellules gliales. (L. Venance et C. Giaume, en collaboration avec D. Piomelli Neurosciences Institute, La Jolla, USA).

2.3 RÉCEPTEURS DES TACHYKININES

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

Ces études ont été poursuivies en étroite collaboration avec S. Lavielle, G. Chassaing, H. Josien et C. Sagan du laboratoire de Chimie Biologique (Jussieu, Paris VI).

2.3.1. Recherche de ligands radioactifs des récepteurs de type "septide", nouvelle classe de récepteurs des tachykinines.

Précédemment nous avons suggéré que le septide et certains analogues de la SP (fragments C-terminaux de la SP) contractent l'iléon de cobaye par l'intermédiaire d'un nouveau type de récepteur des tachykinines (récepteur "septide") différent des récepteurs NK-1, NK-2 et NK-3 déjà connus.

Des études structure-activité ont révélé que l'identité de l'acide aminé en position 10 de molécules agonistes ou antagonistes analogues de la SP est primordiale pour la reconnaissance du récepteur NK-1 ou du récepteur "septide". Ceci a permis de synthétiser des molécules plus spécifiques des deux types de récepteurs, et de sélectionner certaines d'entre elles afin de les radiomarquer et de rechercher des sites de liaison de type "septide" sur des préparations membranaires et cellulaires. Nous tentons donc actuellement de mettre en évidence des sites de liaison de type "septide" en utilisant le ^{125}I -BH [Apa $^{9-10}$] SP, le ^3H -GR 82334 et le ^3H -proprionic acide-SP (7-11) comme ligands (J.C. Beaujouan, M. Saffroy, Y. Torrens).

2.3.2. *Mise en évidence d'un couplage des récepteurs de type septide à la phospholipase C dans la vessie de rat*

Des données de la littérature indiquent que le septide est plus efficace que les agonistes NK-1 pour contracter la vessie de rat. Ceci nous a incité dans un premier temps à comparer les effets des agonistes spécifiques des récepteurs NK-1, NK-2, NK-3 et du septide sur la formation des inositol phosphates dans ce tissu.

L'agoniste NK-2, la [Lys 5 , Meleu 9 , Nle 10] NKA (4-10) stimule fortement la formation des inositol phosphates et cette réponse est bloquée par l'antagoniste NK-2, le SR48968. L'agoniste NK-1, la (Pro 9) SP stimule plus faiblement l'activité de la phospholipase C et cette réponse est bloquée par l'antagoniste NK-1, le RP67580. Par contre, l'agoniste NK-3, le senktide est sans effet, ce qui n'est pas en faveur de la présence de récepteurs NK-3. Paradoxalement, le septide qui n'a pas d'affinité pour les sites de liaison NK-1 [^3H (Pro 9) SP] mis en évidence dans le tissu stimule également la formation des inositol phosphates avec une amplitude et une cinétique distincte de celle de la réponse NK-1 et il en est de même de la [Apa $^{9-10}$] SP un autre agoniste des récepteurs de type "septide". La réponse du septide persiste en présence de SR 48968 (10^{-6}M), traitement qui réduit notablement la réponse de la (Pro 9) SP. Confirmant des données obtenues sur l'iléon de cobaye, plusieurs antagonistes NK-1, le RP 67580, le CP 96345, le GR 82334 et le [DPro 9 , Tr-Br 10 , Trp 11] SP se sont révélés plus efficaces pour bloquer la réponse du septide que celle de l'agoniste NK-1, la (Pro 9) SP. Le RP 67580 est le plus efficace, mais le GR 82334 est le plus discriminatif, son efficacité vis-à-vis de la réponse du septide étant nettement plus grande que celle observée vis-à-vis de la réponse (Pro 9) SP. Enfin, nous avons observé que la (Pro 9) SP mais également la [Sar 9 , Met (O $_2$) 11] SP, un autre agoniste NK-1, utilisées à faible concentration inhibent la formation des inositol phosphates induite par le septide. Ceci suggère que les agonistes NK-1 se comportent comme des agonistes partiels des récepteurs de type "septide". L'ensemble de ces données est en accord avec l'hypothèse de l'existence de récepteurs des tachykinines de type "septide" dans certains tissus périphériques et montre que ces récepteurs sont couplés à la phospholipase C (Y. Torrens, J.C. Beaujouan, M. Saffroy).

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. La DARPP-32, un inhibiteur de phosphatase intervenant dans l'action de la dopamine (Frédéric Desdouits, Jean-Antoine Girault)

La DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*) est une protéine enrichie dans les neurones striato-nigraux. Lorsque la DARPP-32 est phosphorylée sur la thréonine 34, elle devient un puissant inhibiteur de la protéine phosphatase 1. La thréonine 34 est phosphorylée par les kinases activées par l'AMPc et le GMPc. Divers signaux extracellulaires, y compris la dopamine dans les neurones striato-nigraux, activent ces kinases et augmentent la phosphorylation de la DARPP-32. La déphosphorylation de la thréonine 34 est catalysée par la calcineurine, une phosphatase activée par le Ca^{2+} et la calmoduline, et par la phosphatase 2A. Dans les neurones striato-nigraux, la calcineurine est mise en jeu par la dépolarisation ou par la stimulation des récepteurs NMDA du glutamate.

Nous avons montré que la DARPP-32 non phosphorylée est capable d'inhiber la protéine phosphatase 1 avec une $\text{IC}_{50} \cong 1 \mu\text{M}$. La phosphorylation de la thréonine 34 améliore considérablement la puissance de cette inhibition ($\text{IC}_{50} = 0,5 \mu\text{M}$), sans entraîner de changement conformationnel majeur de la DARPP-32. Ces résultats permettent de proposer un modèle d'interaction entre la DARPP-32 et la protéine phosphatase 1 comprenant deux sites à faible affinité, l'un d'eux étant la phosphothréonine 34 qui jouerait le rôle d'un pseudo-substrat. Etant données les concentrations élevées ($>10 \mu\text{M}$) de phosphatase 1 et de DARPP-32 dans les neurones striato-nigraux nos résultats suggèrent que ces deux protéines doivent exister sous forme d'un complexe bimoléculaire *in vivo*.

Nous avons également montré que la DARPP-32 est phosphorylée *in vitro* par la caséine kinase I sur la sérine 137 et que cet acide aminé est aussi phosphorylé dans les neurones striato-nigraux *in vivo*. La stoechiométrie de phosphorylation de la sérine 137 est d'ailleurs plus élevée dans les terminaisons nigrales que dans la région somato-dendritique des neurones située dans le striatum. La phosphorylation de la sérine 137 inhibe la déphosphorylation de la thréonine 34 par la calcineurine, par un mécanisme intramoléculaire. Cette inhibition caractérisée en utilisant les enzymes purifiées semble également intervenir dans les neurones puisque 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. Ces résultats montrent que la caséine kinase I, une enzyme très conservée chez les eukaryotes mais dont la régulation n'est pas connue, peut jouer un rôle régulateur dans les neurones du système nerveux central en modulant la sensibilité de la DARPP-32 à la déphosphorylation.

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

Nous avons poursuivi l'étude de protéines neuronales phosphorylées sur des tyrosines entrant dans la composition d'une « bande immunoréactive majeure de 180 kDa » (pp180). L'analyse biochimique a permis de constater que plusieurs protéines correspondent à cette bande. Nous avons purifié et séquencé l'une d'entre elles. Toutefois, l'utilisation d'anticorps spécifiques a révélé que cette protéine ne correspond qu'à une faible proportion de l'immunoréactivité phosphotyrosine de 180 kDa dans le striatum. Le composant majeur de cette immuno-réactivité a pu être identifié comme étant la sous-unité NR2B du récepteur de type NMDA du glutamate. La sous-unité NR2A, bien que moins abondante que NR2B dans le striatum, est aussi phosphorylée sur tyrosine. Enfin, la phosphorylation sur tyrosine de NR2B augmente dans le striatum après lésion des neurones dopaminergiques à la 6-hydroxy-dopamine. Nos résultats, ainsi que certaines observations de la littérature, suggèrent que le changement de phosphorylation sur tyrosine du récepteur NMDA pourrait jouer un rôle dans les phénomènes de plasticité synaptique dans des conditions physiologiques ou pathologiques.

Une deuxième partie de notre travail porte sur les mécanismes de régulation des tyrosines kinases non-récepteurs dans les neurones. 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 110-120 kDa sur des tyrosines. Nous étudions actuellement le rôle possible de l'acide lysophosphatidique et de l'acide arachidonique et de ses dérivés dans cet effet qui nécessite une augmentation du Ca^{++} intracellulaire et une activation de la protéine kinase C. Parmi les protéines tyrosines kinases susceptibles d'être la cible de ce type de régulation nous nous sommes particulièrement intéressés à pp125-FAK (*focal adhesion kinase*, FAK). Il s'agit d'une tyrosine kinase enrichie au niveau des plaques d'adhésion où elle interagit directement avec les récepteurs de la matrice extracellulaire (intégrines) et indirectement avec les microfilaments d'actine. Nous avons montré que FAK est abondant dans les neurones au cours du développement et chez l'adulte. Le clonage de l'ADNc de FAK chez le rat a révélé l'existence de plusieurs variants, vraisemblablement codés par un seul gène et résultant de l'utilisation de plusieurs promoteurs et d'épissage alternatif. L'un de ces variants (FAK+) contient une insertion de 9 nucléotides codant pour trois acides aminés supplémentaires (Pro-Trp-Arg) dans la région carboxy-terminale de la protéine. Cette région joue un rôle important dans l'adressage intracellulaire de FAK et dans sa capacité d'activer plusieurs cascades de transduction de signal. FAK+, est exprimé préférentiellement dans les neurones, alors qu'il est à peine détectable dans les autres tissus. Ceci suggère que FAK+ pourrait avoir des cibles et un rôle spécifiques dans les neurones.

FAK est capable de recruter et d'activer p60-src, une autre tyrosine kinase non-récepteur. Pour tenter d'évaluer les conséquences de l'activation de p60-src nous avons produit des souris transgéniques exprimant un mutant constitutivement actif de la forme neuronale de p60-src (n-src). Le transgène est placé sous contrôle du promoteur de l'énolase spécifiquement neuronale (NSE). Plusieurs animaux transgéniques ont été obtenus et sont en cours d'analyse.

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

Neurotransmetteurs, facteurs de croissance et cytokines sont les médiateurs des interactions entre neurones et astrocytes. Ces signaux extracellulaires modulent en particulier la morphologie de l'astrocyte. Les récepteurs présents à la surface des astrocytes, agissent sur la cellule via des cascades de réactions intracellulaires. Afin de reconnaître les molécules intracellulaires responsables de la plasticité du cytosquelette astrocytaire, des protéines sélectivement enrichies dans les astrocytes et dont le degré de phosphorylation varie en réponse à divers traitements pharmacologiques ont été recherchées. Ceci nous a conduit à caractériser une protéine de faible poids moléculaire enrichie dans les astrocytes : 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 (PKC) dont le site de phosphorylation a pu être déterminé. Plusieurs approches complémentaires ont été développées afin d'analyser la fonction de PEA-15.

PEA-15 semble être un substrat *in vitro* et *in vivo* de plusieurs enzymes dépendantes du calcium. En effet un second site de phosphorylation, spécifique de la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type 2 (CaMKII) a été démontré. De plus, la phosphorylation du site CaMKII facilite celle du site PKC. Enfin, la déphosphorylation du site PKC est sous la dépendance d'une phosphatase de type calcineurine.

Une banque d'ADNc d'astrocytes de souris a été construite, permettant le clonage de la protéine. Sa structure ne présente pas d'homologie avec une protéine déjà connue. Par contre, la comparaison des séquences de l'homme et de la souris (125 identités en acides aminés et 5 changements conservatifs) suggère un rôle structural important.

Au sein des astrocytes en culture primaire, l'immuno-réactivité anti-PEA-15 est associée aux microtubules, cette liaison est modulée par l'état de phosphorylation de la protéine, et plus particulièrement par la PKC. Deux sites potentiels d'interaction avec les microtubules existent dans la partie C-terminale de la protéine, l'un d'entre eux étant associé au site de phosphorylation par la PKC. 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.

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

4.1. RÔLE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE DANS LA RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE DOPAMINE ET DE GABA (Responsable de l'équipe : André Chéramy)

4.1.1. *Contrôle présynaptique de la libération et de la recapture de dopamine par l'acide arachidonique à partir de synaptosomes de striatum de rat*

Par son action sur les neurones striataux, le glutamate peut entre autre induire la formation d'acide arachidonique (AA). Cet acide gras et certains de ses métabolites sont impliqués dans de nombreuses fonctions. La récente découverte de son rôle de second messenger, voire de neuromédiateur diffusible, nous a conduit à rechercher s'il pourrait intervenir dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine (DA) dans le striatum de rat. Les expériences ont été effectuées sur des synaptosomes striataux, purifiés sur gradient de Percoll.

L'AA (10^{-5} à 10^{-4} M) stimule de façon importante et dose-dépendante la libération spontanée de ^3H -DA continuellement formée à partir de ^3H -tyrosine. Toutefois, la réponse évoquée par l'AA est également associée à une diminution de ^3H - H_2O formée au cours de la conversion de la ^3H -tyrosine en ^3H -DOPA. Contrairement à l'AA, d'autres acides gras tels que l'acide arachidique, l'acide oléique, l'ester méthylique de l'AA (tous utilisés à 10^{-4} M) ne modifient pas la libération de ^3H -DA. L'acide 5,8,11,14-eicosatétraénoïque (ETYA, 10^{-4} M) et le métyrapone (10^{-5} M), deux inhibiteurs du métabolisme de l'AA, n'affectent pas la libération de ^3H -DA évoquée par l'AA (3×10^{-5} M), suggérant que l'AA agit par lui-même et non par l'intermédiaire de ses métabolites. L'AA (10^{-5} à 10^{-4} M) inhibe également de façon dose-dépendante la capture de ^3H -DA dans les synaptosomes, cette capture étant totalement bloquée à 10^{-4} M. A cette concentration, l'AA stimule toujours la libération de ^3H -DA lorsqu'il est appliqué en présence d'un inhibiteur de la recapture de DA tel que la nomifensine, la benztropine, la mazindole ou le GBR12909. L'AA augmente donc l'efflux de ^3H -DA en inhibant la recapture et en facilitant la libération de DA. De plus, la libération de ^3H -DA évoquée par l'AA (10^{-4} M) n'est pas modifiée par des inhibiteurs de protéine kinase A (H-89, Rp-8-Br-cAMPS, 10^{-6} M), mais elle est considérablement diminuée en présence d'inhibiteurs de protéine kinase C (Ro 31-7549, chélérythrine, 10^{-6} M). Ceci indique que l'effet stimulateur de l'AA sur la libération de ^3H -DA résulte d'une activation de la protéine kinase C (L'Hirondel, M., Godeheu, G., Chéramy, A.).

4.1.2. *Contrôle de la libération de la recapture de GABA par l'acide arachidonique dans le striatum chez le rat*

Nous avons également recherché si l'AA régulait la libération de GABA à partir des neurones épineux du striatum (présents en majorité dans cette struc-

ture) en utilisant des microdisques de tissus, sélectivement prélevés sur des coupes de striatum dans des zones enrichies en matrice, préincubés en présence de $^3\text{H-GABA}$.

La libération de $^3\text{H-GABA}$ est augmentée par l'AA de manière dose-dépendante (10^{-5}M à 10^{-4}M). Cet effet est bloqué par l'albumine sérique bovine délipidée (1mg/ml). L'action de l'AA est spécifique puisqu'elle n'est pas reproduite par d'autres acides gras tels que les acides arachidique et oléique ou par les esters de méthyle de l'acide oléique ou de l'AA et qu'elle persiste en présence d'inhibiteurs de son catabolisme tels que l'acide 5,8,11,14-eicosatétraïnoïque (ETYA, 10^{-4}M) et le métyrapone (10^{-5}M). Comme dans le cas de la DA, l'augmentation de $^3\text{H-GABA}$ induite par l'AA résulte de l'activation d'une protéine kinase C. En effet, celle-ci est fortement réduite par des inhibiteurs de protéine kinase C tels que la chélérythrine, le Ro 3175449 ou la rhodamine 6G (10^{-6}M). Enfin, la libération de $^3\text{H-GABA}$ évoquée par l'AA (10^{-4}M) n'est pas modifiée par des inhibiteurs de protéine kinase A (H-89, Rp-8-Br-cAMPS, 10^{-6}M). Outre son action sur la libération, l'AA inhibe aussi la recapture de $^3\text{H-GABA}$ de façon dose-dépendante. Cette effet est maximal à 10^{-4}M et n'est pas reproduit par l'acide arachidique (10^{-4}M). L'AA stimule toujours la libération de $^3\text{H-GABA}$ en présence d'inhibiteurs de la recapture de GABA tels que l'acide nipocotique ($5 \times 10^{-4}\text{M}$), le SKF100330A (10^{-5}M) ou le NO-328 ($3 \times 10^{-6}\text{M}$), indiquant que cet effet résulte non seulement d'une inhibition du transporteur, mais également d'une stimulation du processus de libération.

L'effet de l'AA sur la libération de $^3\text{H-GABA}$ persiste en présence d'un antagoniste DA D1, le SCH23390 (10^{-5}M), traitement qui bloque l'effet stimuleur de l'amphétamine sur la libération de $^3\text{H-GABA}$. Il persiste également en présence de l'addition combinée de MK-801 (10^{-5}M) et de 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX, 10^{-5}M), des antagonistes des récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA. Ceci indique que l'effet de l'AA sur la libération de $^3\text{H-GABA}$ n'est pas lié à son action facilitatrice sur la libération de DA ou à sa capacité d'augmenter les concentrations extracellulaires de glutamate. Des expériences complémentaires ont montré que l'AA augmente la libération de $^3\text{H-GABA}$ à partir de synaptosomes prémarqués avec du $^3\text{H-GABA}$. L'ensemble de ces résultats indique que l'AA stimule directement la libération de GABA à partir des terminaisons nerveuses du striatum de rat (F. Artaud et A. Chéramy).

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

4.2.1. *Distribution des interneurones cholinergiques et des interneurones riches en somatostatine dans le striatum (M. Desban, M.L. Kemel, C. Gauchy)*

Les interneurones ont été visualisés par révélation histochimique de l'acétylcholinestérase sur des coupes de striatum de rats traités avec le di-isopropyl-

phosphofluoridate (DFP) 6 heures avant leur sacrifice. La révélation de l'activité de la NADPH diaphorase a permis d'identifier les interneurons riches en somatostatine.

Les corps cellulaires des interneurons cholinergiques sont préférentiellement localisés dans les régions matricielles proches des striosomes où leur densité est trois fois plus importante que dans la matrice plus latérale dépourvue de striosomes. Les interneurons riches en somatostatine, également localisés dans le compartiment matriciel, semblent avoir une distribution plus homogène avec toutefois une densité légèrement plus importante ($\times 1,5$) dans la région matricielle la plus latérale. Ces résultats suggèrent (comme nous l'avons déjà montré chez le chat) que le compartiment matriciel du striatum de rat est hétérogène.

4.2.2. Rôle des systèmes glutamatergiques cortico-striataux dans le contrôle présynaptique de la libération d'acétylcholine au niveau des striosomes et de la matrice chez le rat

Les neurones cortico-striataux innervent de manière distincte les compartiments striataux ; ceux originaires des couches profondes du cortex frontal se projetant dans les striosomes et ceux des couches superficielles des cortex moteur et sensori-moteur dans la matrice. Par ailleurs, les interneurons cholinergiques dont les corps cellulaires sont exclusivement localisés dans la matrice et qui possèdent un réseau dendritique distribué dans les deux compartiments striataux pourraient contribuer au transfert des informations entre la matrice et les striosomes. Ces données anatomiques nous ont incité à étudier les effets du NMDA sur la libération d'acétylcholine (ACh) synthétisée à partir de ^3H -choline sur des coupes sagittales de striatum de rat dans des régions enrichies en striosomes ou en matrice.

A la concentration de 50 μM , le NMDA stimule la libération d'ACh dans les striosomes (+ 55 %) et la matrice (+ 66 %). Ces réponses sont bloquées par le Mg^{2+} (0.83 mM), le MK801 (1 μM antagoniste non compétitif) et le 7 chloro-kynuremate (150 μM , antagoniste du site glycine). De fait, l'action du NMDA sur la libération d'ACh est dose-dépendante, la réponse maximale étant observée à 100mM dans les striosomes (+ 140 %) et la matrice (+ 121 %). Si la D-serine (10 μM), un agoniste du site glycine des récepteurs NMDA, potentialise les effets du NMDA à faible concentration (50 μM) dans les striosomes ($\times 3$) et la matrice ($\times 2$) ceux provoqués par des concentrations de NMDA plus élevées (100 ou 1000 μM) sont peu modifiés ou même inhibés suggérant l'intervention d'effets indirects inhibiteurs accompagnant l'action directe facilitatrice du NMDA sur les interneurons cholinergiques. Enfin, l'effet stimulateur du NMDA sur la libération d'ACh est totalement bloqué par la tétrodontoxine (1 μM). Il résulte donc vraisemblablement d'une activation des interneurons cholinergiques, les récepteurs NMDA devant se trouver localisés sur le réseau dendritique et/ou le corps cellulaire.

4.2.3. *Circuits locaux impliqués dans l'interaction glutamate-acétylcholine : rôle du GABA et de la dopamine*

Ainsi que nous l'avons vu précédemment, les données obtenues avec des concentrations élevées de NMDA et du co-agoniste le D-sérine suggèrent la mise en jeu de neuro-transmetteurs inhibiteurs également libérés lors d'une stimulation massive des récepteurs NMDA. Ceux-ci pourraient réduire la libération évoquée d'ACh. Vérifiant cette hypothèse, nous avons pu montrer que si l'effet stimulateur de 50 μ M NMDA sur la libération d'ACh n'est pas modifié en présence de bicuculine (1 μ M), celui induit par 1mM NMDA + 10 μ M D-sérine est considérablement potentialisé dans les striosomes ($\times 2,6$) et à un degré moindre dans la matrice ($\times 1,8$) par cet antagoniste des récepteurs GABA A. Ainsi, le GABA libéré sous l'effet du NMDA (forte concentration) réduit la libération évoquée d'ACh. De même, le (-) sulpiride (1mM), un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D₂, potentialise l'effet stimulateur de 1mM NMDA + 10 μ M D-sérine sur la libération d'ACh dans les striosomes ($\times 2,4$) et la matrice ($\times 2,8$). Toutefois, ces effets desinhibiteurs du sulpiride s'observent également ($\times 1,5$) avec un concentration de NMDA plus faible (50 μ M). La dopamine libérée par le NMDA exerce donc un effet inhibiteur sur la libération évoquée d'ACh. De plus, les récepteurs présynaptiques de type NMDA localisés sur les terminaisons dopaminergiques semblent avoir une plus grande affinité pour le NMDA que les récepteurs postsynaptiques NMDA localisés sur les neurones GABAergiques.

4.2.4. *Nouvelle évidence pour la présence de récepteurs des tachykinines de type « septide » dans le striatum*

Plusieurs données obtenues sur des tissus périphériques (iléon de cobaye, vessie de rat) suggèrent que le septide, un analogue court de la substance P agit sur une nouvelle classe de récepteurs (ou un sous-type) des tachykinines puisqu'il exerce des effets biologiques puissants bien qu'il n'ait qu'une très faible ou pas d'affinité pour les récepteurs NK-1, NK-2 ou NK-3 identifiés (voir travaux de l'équipe JC Beaujouan). Précédemment, nous avons montré que l'agoniste NK-1, la (Pro⁹) SP et le septide exercent des effets opposés sur la libération de dopamine évoquée par le NMDA dans le striatum de rat ce qui est en faveur de l'existence de récepteurs de type septide dans cette structure.

Des données obtenues en comparant les effets de la (Pro⁹) SP et du septide sur la libération d'ACh évoquée par le NMDA confortent cette hypothèse. En effet, la (Pro⁹) SP (0,1 μ M) augmente la libération d'ACh évoquée par le NMDA (50 μ M) dans les striosomes ($\times 2,3$) et la matrice ($\times 1,8$) mais le septide (0,1 μ M) provoque un effet inverse, la réduction de la réponse évoquée atteignant 50 % dans les deux compartiments. L'antagoniste NK-1, le GR82334 (0,1 μ M ou 1 μ M) qui a une plus grande affinité pour le site septide que le site NK-1 dans la vessie de rat ne modifie pas la libération d'ACh évoquée par le NMDA (50 μ M) dans la matrice. Néanmoins il facilite la réponse NMDA dans les striosomes ce qui

suggère l'intervention d'une tachykinine endogène qui inhiberait la libération évoquée d'ACh. De plus, le GR82334 (1 μ M ou 0,1 μ M) bloque les effets facilitateurs de la (Pro⁹) SP dans les deux compartiments mais ne s'oppose pas aux effets inhibiteurs du septide qu'à forte concentration (1 μ M) et uniquement dans la matrice. Ces résultats paradoxaux sont en accord avec la présence de récepteurs de type « septide » dans les deux compartiments striataux. Toutefois, ils semblent indiquer que les récepteurs centraux de type « septide » sont distincts des récepteurs périphériques puisque leur affinité pour le GR82334 est plus faible que celle des récepteurs NK-1.

5. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MÉSOCORTICAUX ET MÉSO-LIMBIQUES

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

5.1.1. *Etudes des interactions noradrénaline/dopamine dans le cortex préfrontal et de leurs conséquences sur la transmission dopaminergique sous-corticale*

Précédemment nous avons montré qu'une transmission noradrénergique corticale de type $\alpha 1$ était nécessaire à l'obtention d'une transmission dopaminergique sous-corticale fonctionnelle. Ces résultats avaient été obtenus en observant que le blocage des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques corticaux par un antagoniste spécifique, le prazosin, bloquait l'hyperactivité locomotrice induite par une injection d'amphétamine sous-corticale.

Cette année, nous avons donc cherché à préciser les mécanismes de cette interaction en étudiant les effets du prazosin sur la libération de dopamine et de noradrénaline induite par une injection systémique d'amphétamine. Cette étude a été réalisée grâce à l'implantation simultanée de deux canules de microdialyse dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens chez des rats éveillés et libres de leurs mouvements et au développement récent d'une technique très sensible de détection électrochimique permettant d'obtenir des quantités significatives de monoamines sur des prélèvements pouvant descendre jusqu'à une minute.

Les résultats préliminaires montrent : 1) Que l'amphétamine (de 0,5 à 1,5 mg/kg i.p.) entraîne une libération phasique (et non pas tonique) de dopamine dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens. Ces libérations apparaissent 8 minutes et environ 25 minutes après l'injection d'amphétamine, aussi bien dans le cortex préfrontal mais aussi dans le noyau accumbens. Les niveaux de dopamine atteignent en une minute de 4 à 10 fois le niveau de base. 2) Que l'injection de prazosin (0,5 mg/kg i.p.) 30 minutes avant l'injection d'amphétamine diminue de façon importante (80 %) la libération spontanée de dopamine dans le cortex préfrontal. Après prazosin, l'injection d'amphétamine n'augmente la

libération de dopamine que jusqu'au niveau correspondant à la libération spontanée. Dans le noyau accumbens, le prazosin semble modifier l'allure de la libération de dopamine, cette dernière étant libérée de façon intense et non régulée entre 4 et 14 minutes après l'injection d'amphétamine. 3) Que l'amphétamine entraîne une libération importante (5 fois le niveau de base) de noradrénaline 3 à 4 minutes après l'injection. Cet effet s'observe surtout dans le cortex préfrontal. L'injection de prazosin entraîne, par elle-même, une augmentation phasique de libération de noradrénaline, l'injection d'amphétamine augmentant encore cette libération.

Ces premiers résultats montrent d'une part que l'action de l'amphétamine passe par des libérations phasiques de dopamine et de noradrénaline et d'autre part que le prazosin modifie non seulement l'amplitude des libérations mais aussi leur cinétique (L. Darracq, G. Blanc, J.P. Tassin).

5.1.2 Etude de l'action du prazosin sur la sensibilisation comportementale à l'amphétamine.

Il est bien connu que des injections identiques et répétées d'amphétamine entraînent une augmentation régulière de l'hyperactivité locomotrice. Ce phénomène, dénommé sensibilisation comportementale, pourrait s'apparenter au développement de la dépendance psychique observée chez les toxicomanes. Les résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent indiquent que le prazosin (0.5 mg/kg, i.p.) qui, comme nous l'avons vu, est capable de bloquer l'hyperactivité locomotrice induite par l'amphétamine (0.75 mg/kg, i.p.), est aussi capable d'empêcher le développement du phénomène de sensibilisation à l'amphétamine (G. Blanc, J.P. Tassin).

5.1.3 Analyse des effets d'antidépresseurs sur les taux extracellulaires de monoamines dans le cortex préfrontal.

L'action clinique d'un certain nombre d'antidépresseurs faisant partie de la classe des ISRS (inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine) semble mettre en jeu une augmentation de la transmission sérotoninergique. Après avoir implanté une sonde de microdialyse dans le cortex préfrontal nous avons analysé l'effet de la fluoxétine à différentes concentrations (de 5 à 20 mg/kg, i.p.) sur les taux extra-cellulaires de monoamines. Paradoxalement, des injections aiguës de fluoxétine ne modifient pas ou diminuent les taux extracellulaires de sérotonine alors qu'elles augmentent les taux de noradrénaline (G. Blanc, J.P. Tassin).

5.1.4 Etude des taux de monoamines dans des cerveaux de souris mutées sur la Monoamine Oxydase A.

Des souris déficientes en Monoamine Oxydase A, obtenues par le laboratoire de génétique des cytokines (URA 1343, CNRS) (O. Cases et I. Seif) ont été étudiées. Ces souris mutées présentent à la naissance des taux de sérotonine dix fois

supérieurs à ceux des souris contrôles. Les taux de noradrénaline ne sont que deux fois supérieurs et ceux de dopamine sont identiques à ceux des souris contrôles. Ces souris présentent un comportement très agressif au cours des trois premières semaines de leur existence et retrouvent un comportement quasi-normal à l'âge adulte. De façon très intéressante, les taux de monoamines des souris mutantes ne diffèrent plus des souris contrôles lorsqu'elles ont atteint l'âge adulte. Ce retour à la normale pourrait être dû à l'apparition de la Monoamine Oxydase B dans les semaines qui suivent la naissance (D. Hervé, J.P. Tassin).

5.1.5 Etude de la protéine Golf du striatum

La protéine Golf est la protéine G stimulatrice de l'adényl cyclase qui est la plus abondamment exprimée dans le striatum du rat. Il est probable que les récepteurs dopaminergiques D1 stimulent l'activité de l'adényl cyclase en agissant sur cette protéine et non sur la protéine Gs classique. Des expériences de lésion et d'hybridation *in situ* permettent de penser que les neurones striataux qui expriment les récepteurs D1 contiennent de grandes quantités de Golf et peu ou pas de Gs.

Cette année, nous avons développé plusieurs approches pour évaluer plus directement l'interaction entre les récepteurs D1 et les protéines G transductrices du signal. Tout d'abord nous essayons d'inhiber l'expression des sous-unités α de Golf (G α olf) et de Gs (G α s) par des oligonucléotides antisens afin de déterminer le rôle respectif des deux protéines dans l'activité cyclasique sensible à la dopamine du striatum. Nous développons également des anticorps anti-peptides qui reconnaissent sélectivement G α olf ou G α s afin de déterminer si ces anticorps sont capables de bloquer l'activité de ces protéines G et la production d'AMPc liée à la stimulation des récepteurs D1. La stimulation du récepteur par l'agoniste induit plusieurs changements dans la protéine G qui lui est associée. En particulier, la protéine G échange la molécule de GDP fixée à l'état de repos par une molécule de GTP. De plus, la plupart des sous-unités des protéines G dont G α s et G α olf, sont palmitoylées sur la cystéine en position 3 près de la région N-terminale et l'interaction de la protéine G avec le récepteur activé stimule une réaction de dépalmitoylation par un mécanisme non encore élucidé. Nous évaluons donc l'effet d'une stimulation des récepteurs D1 sur l'incorporation de (³²P)-GTP et de (³H)-palmitate dans les protéines G α olf et G α s du striatum. Ces études devraient permettre d'évaluer directement le couplage des récepteurs D1 avec les protéines Gs et Golf (D. Hervé, M. Lévi-Strauss et J.A. Girault).

Précédemment, nous avons observé que la lésion des neurones dopaminergiques nigro-striataux chez le rat adulte entraînait une augmentation des taux de Golf et de Gs dans le striatum. Cette augmentation est le facteur déclenchant de l'augmentation d'activité cyclasique sensible à la dopamine dans le striatum dénervé et suggère plus généralement que le taux cellulaire de protéine G peut constituer le facteur principal de régulation de la sensibilité des récepteurs D1.

Certaines études électrophysiologiques montraient que des animaux sensibilisés à l'amphétamine présentaient une hypersensibilité des récepteurs D1 dans leur noyau accumbens. Nous avons donc évalué le rôle des protéines Golf et Gs dans ce phénomène. Un groupe de rats a été traité quotidiennement par 1 mg/kg d'amphétamine pendant cinq jours. Dix jours après l'arrêt du traitement, ces animaux sont sensibilisés à l'amphétamine puisqu'une injection-test d'amphétamine (1mg/kg) a un effet stimulateur sur l'activité locomotrice plus important que celui observé chez les animaux naïfs. Cependant, chez ces animaux, les taux de Golf ou de Gs ne sont pas modifiés dans le noyau accumbens et le striatum. Ceci suggère que l'hyperréactivité des cellules du noyau accumbens à l'application d'agonistes D1 observée chez les animaux sensibilisés n'est pas liée à des variations des taux de Golf et de Gs dans cette structure (D. Hervé et M. Lévi-Strauss).

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

5.2.1. *Influence inhibitrice du système dopaminergique mésocortical sur les réponses évoquées par la stimulation de l'hippocampe*

Le cortex préfrontal (CPF) reçoit une innervation dopaminergique originaire de l'aire tegmentale ventrale (AVT). D'autre part, nous avons précédemment mis en évidence l'existence d'une projection directe de l'hippocampe, issue de la région CA1/prosubiculum, sur les aires prélimbique et orbitaire médiane du CPF et montré que la stimulation de la voie hippocampe-CPF évoque des réponses excitatrices au niveau des cellules du CPF. L'influence du système dopaminergique sur ces réponses excitatrices a été étudiée chez le rat anesthésié avec de la kétamine. La stimulation de l'AVT induit une inhibition des réponses excitatrices évoquées par la stimulation de l'hippocampe dans 73 % des neurones du CPF testés. Cet effet est observé lorsque la stimulation de l'AVT est appliquée entre 5 et 25 ms avant celle de l'hippocampe. L'activité spontanée de ces cellules corticales est également inhibée par la stimulation de l'AVT (durée de l'inhibition : 122 ± 44 ms).

Par ailleurs, en identifiant les neurones du CPF se projetant dans l'AVT ou le noyau accumbens (cible striatale des aires prélimbique et orbitaire médiane du CPF) par la méthode d'activation antidromique, nous avons pu montrer que 30 % de ces neurones corticaux présentent une réponse excitatrice lors de la stimulation de l'hippocampe.

En conséquence le système dopaminergique mésocortical exerce un contrôle inhibiteur sur les réponses excitatrices évoquées au niveau du CPF par l'activation de la voie hippocampe-CPF et l'hippocampe, par son influence excitatrice sur les cellules pyramidales du CPF qui innervent le noyau accumbens ou l'AVT, peut indirectement contrôler l'activité de ces deux structures sous-corticales (T. Jay).

5.2.2. Effets de la dopamine sur les réponses évoquées dans le cortex préfrontal par l'application iontophorétique d'AMPA et de NMDA

Certains systèmes afférents du CPF, en particulier ceux issus de l'hippocampe et du thalamus contiennent un acide aminé excitateur comme neuromédiateur et il en est de même pour les collatérales récurrentes intracorticales des cellules pyramidales. Les réponses excitatrices des neurones du CPF induites par l'activation de ces systèmes résultent de la stimulation des récepteurs AMPA et/ou NMDA. Ceci nous a incité à étudier l'influence de la dopamine sur les réponses excitatrices évoquées par l'application iontophorétique d'AMPA ou de NMDA chez des rats anesthésiés avec de l'halothane. L'application iontophorétique de dopamine modifie la majorité des réponses excitatrices de type AMPA (94 %) ou NMDA (76 %). Ainsi, les excitations évoquées par l'AMPA sont inhibées dans 79 % des cas et facilitées dans 19 % des cas par la dopamine et celles évoquées par le NMDA sont également inhibées (42 % des cas) ou augmentées (34 % des cas) par la dopamine.

Afin de caractériser le type de récepteur impliqué dans les effets de la dopamine sur les réponses évoquées par l'application d'AMPA ou de NMDA, nous avons ensuite étudié les effets de l'application iontophorétique de SKF 38393 (agoniste de type D1) et de quinpirole (agoniste de type D2). Le SKF 38393 réduit les réponses excitatrices évoquées par l'AMPA dans 40 % des cas et, à l'inverse, facilite ces réponses dans 21 % des cas. De même, les réponses évoquées par le NMDA sont inhibées ou facilitées dans respectivement 53 % et 20 % des cas. Le quinpirole provoque principalement une inhibition (42 % des cas) des réponses évoquées par l'AMPA (une facilitation n'étant observée que dans 8 % des cas), mais celles évoquées par le NMDA sont soit inhibées (38 % des cas) ou facilitées (27 % des cas). En conclusion, l'application iontophorétique de dopamine dans le CPF exerce principalement un effet inhibiteur sur les réponses excitatrices de type AMPA et un effet inhibiteur ou facilitateur sur celles évoquées par le NMDA. Selon les cas, ces effets inhibiteurs ou facilitateurs impliquent des récepteurs de type D1 et/ou D2 (S. Pirot).

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

Le striatum, principale structure d'entrée des ganglions de la base, reçoit des projections des différentes aires corticales et en retour influence indirectement le cortex cérébral via les circuits striato-pallido- et striato-nigro-thalamiques. L'architecture de ces circuits est essentiellement parallèle, les afférences issues d'aires corticales fonctionnellement distinctes innervant des territoires différents du striatum, cette ségrégation étant préservée dans les circuits efférents du striatum qui transitent par le pallidum ou la substance noire et secondairement par le thalamus. L'organisation de ces circuits a été bien établie en ce qui concerne le striatum dorsal mais reste en grande partie à définir pour le striatum ventral.

Pendant ces dernières années, par une approche anatomo-fonctionnelle, nous avons caractérisé chez le rat le circuit préfrontal impliquant le noyau accumbens, principale structure du striatum ventral. En effet, l'existence d'une boucle issue des aires prélimbique, médiale orbitaire et agrulaire insulaire du CPF faisant relais successivement dans la région du core du noyau accumbens adjacente à la commissure antérieure, la zone dorso-médiane de la pars reticulata de la substance noire et les noyaux thalamiques médio-dorsal et ventro-médian qui innervent le CPF a pu être mise en évidence.

Outre sa projection sur une région restreinte de la substance noire, le noyau accumbens envoie une importante projection vers le pallidum ventral. Cette année, nous avons défini le territoire du pallidum ventral innervé par la région du core du noyau accumbens reliée au CPF et caractérisé les efférences de ce territoire pallidal. Ainsi ces fibres marquées sont observées dans une région restreinte du pallidum ventral, après l'injection microiontophorétique de biocytine (un marqueur antérograde) dans un site du core du noyau accumbens dans lequel les neurones présentent une réponse excitatrice à la stimulation du CPF. Cette région, localisée dans la partie centrale du pallidum ventral, immédiatement adjacente à la commissure antérieure, correspond à la région dénommée VPL par Zahm et Brog. Par cette méthode de marquage (biocytine), nous avons également montré que les neurones de cette région pallidale se projettent massivement dans la zone médiane du noyau subthalamique, et enfin, que la zone médiane de ce noyau innerve la région dorso-médiane de la substance noire pars reticulata, région recevant également une afférence directe du noyau accumbens.

La stimulation du noyau accumbens induit une inhibition de l'activité spontanée de 48 % des cellules pallidales innervant le noyau subthalamique identifiées par la méthode d'activation antidromique. D'autre part, la stimulation du VPL induit également une inhibition de courte durée de l'activité de 55 % des neurones du noyau subthalamique qui se projettent dans la substance noire.

Ces données montrent l'existence d'un circuit indirect reliant le noyau accumbens et la substance noire pars reticulata via le pallidum ventral et le subthalamus. Ce circuit présente des caractéristiques fonctionnelles identiques à celui reliant le striatum dorsal, le globus pallidus externe, le subthalamus et la substance noire pars reticulata. Ainsi, deux circuits striato-nigraux, l'un direct et l'autre indirect (via le pallidum ventral et le subthalamus) interviennent dans le traitement des informations du CPF par les ganglions de la base (N. Maurice ; cette étude a été réalisée en collaboration avec J.M. Deniau, Université de Paris VI).

PUBLICATIONS

N. STELLA, M. TENCE, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Glutamate induces the release of arachidonic acid by interacting with an atypical metabotropic receptor present on mouse brain astrocytes.* (Renal Physiol. Biochem., 17, 153-156, 1994).

T. GALLI, F. ARTAUD, Y. TORRENS, G. GODEHEU, M. DESBAN, J. GLOWINSKI & A. CHERAMY, *NMDA and carbachol but not AMPA affect differently the release of 3H-GABA in striosome — and matrix-enriched areas of the rat striatum.* (Brain Research, 659, 243-252, 1994).

S. PIROT, T. JAY, J. GLOWINSKI & A.M. THIERRY, *Anatomical and electrophysiological evidence for an excitatory amino acid pathway from the thalamic mediodorsal nucleus to the prefrontal cortex in the rat.* (Europ. J. Neuroscience, 6, 122-1234, 1994).

B. CHAMAK, V. MORANDI & M. MALLAT, *Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin.* (J. Neurosci. Res., 38, 221-233, 1994).

J.M. DENIAU, A. MENETREY & A.M. THIERRY, *Indirect nucleus accumbens input to the prefrontal cortex via the substantia nigra pars reticulata: a combined anatomical and electrophysiological study in the rat.* (Neuroscience, 61 n°3, 533-545, 1994).

C. THERY, A. DOBBERTIN & M. MALLAT, *Down-regulation of in vitro neurotoxicity of brain macrophages by prostaglandin E2 and a b-adrenergic agonist.* (Glia, 11, 383-386, 1994).

M. TENCE J. CORDIER, J. PREMONT & J. GLOWINSKI, *Muscarinic cholinergic agonists stimulate arachidonic acid release from mouse striatal neurons in primary culture.* (J. Pharmac. exp. Ther., 269, 647-653, 1994).

J.P. HUBERT, J.C. DELUMEAU, J. GLOWINSKI, J. PREMONT & A. DOBLE, *Antagonism by riluzole of entry of calcium evoked by NMDA and veratridine in rat cultured granule cells: evidence for a dual mechanism of action.* (Br. J. Pharmacol., 113, 261-267, 1994).

A. CHERAMY, J.M. DESCE, G. GODEHEU & J. GLOWINSKI, *Presynaptic control of dopamine synthesis and release by excitatory amino acid in rat striatal synaptosomes.* (Neurochem. Int., 25, 145-154, 1994).

H. JOSIEN, J. LAVIELLE, A. BRUNISSEN, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN, J. GLOWINSKI & G. CHASSAING, *Design and synthesis of side-chain conformationally restricted phenylalanines and their use for structure-activity studies on tachyinin NK-1 receptor.* (J. Med. Chem., 37, 1586-1601, 1994).

P. MARIN, M. MAUS, S. DESAGHER, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Nicotine protects cultured striatal neurones against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity.* (Neuroreport, 5, 1977-1990, 1994).

R.M. MEGE, D. GOUDOU, C. GIAUME, M. NICOLET & F. RIEGER, *Is intercellular communication via gap junctions required for myoblast fusion?* (Cell Adhesion and Communication, 2, 329-343, 1994).

F. TROVERO, P. MARIN, J.P. TASSIN, J. PREMONT & J. GLOWINSKI, *Accelerated resensitization of the D1-dopamine receptor-mediated response in cultured corti-*

cal and striatal neurons from the rat : respective role of $\alpha 1$ -adrenergic and N-methyl-D-aspartate receptors. (J. Neurosci., 14, 6280-6288, 1994).

S. RETAUX, F. TROVERO & M.J. BESSON, *Role of dopamine in the plasticity of glutamic acid decarboxylase messenger RNA in the rat frontal cortex and the nucleus accumbens.* (Eur. J. Neurosci., 6, 1782-1791, 1994).

J. GLOWINSKI, P. MARIN, M. TENCE & J. PREMONT, *Glial receptors and their intervention in astrocyte-neurone interactions* (Glia, Special issue "Receptors and signal transduction" ed. G. Lévi & S. Murphy, vol.11, n°2, 201-208, 1994).

A.M. THIERRY, T. JAY, S. PIROT, J., MANTZ, R. GODBOUT & J. GLOWINSKI, *Influence of afferent systems on the activity of the rat prefrontal cortex : electrophysiological and pharmacological characterization.* (Motor and Cognitive Functions of the prefrontal Cortex., Springer Verlag Berlin-Heidelberg, eds A.M. Thierry et al., pp. 35-50, 1994).

J. GLOWINSKI C. GAUCHY, M.L. KREBS, L. TREMBLAY, M. DESBAN & M.L. KEMEL, *Presynaptic regulation of dopamine release in striatal compartments and functional heterogeneity of the matrix.* (The Basal Ganglia IV : New Ideas and Data on Structure and Function, Plenum Pub. Corp., Percheron et al. eds., pp. 411-427, 1994).

C. GIAUME, *Noradrenergic control of gap junction permeability in cultured striatal astrocytes* (Noradrenergic Mechanisms in Parkinson's Disease, ed. M. Briley, M. Marien, CRC Press, pp. 205-223, 1994).

M. LEVI-STRAUSS, *Les effets inattendus des expériences de recombinaison homologue.* (Hypothèse, M/S n°5, vol.10, pp. 565-567, 1994).

P. MARIN, *Le monoxyde d'azote : du gaz toxique au nouveau concept de la neurotransmission.* (Neuro-Psy, 9 n°6, 213-219, 1994).

M. LEVI-STRAUSS, *Génétique moléculaire des formes familiales des maladies neurodégénératives.* (Neuro-Psy, 9 n°6, 222-226, 1994).

F. TROVERO, *Le clonage des gènes codant pour les récepteurs opiacés permet-il une meilleure compréhension de la toxicomanie ?* (Neuro-Psy, 9 n°6, 227-233, 1994).

C. GIAUME & L. VENANCE, *Les canaux ioniques des cellules gliales du système nerveux central.* (Neuro-Psy, 9 n°6, 235-241, 1994).

M. MALLAT & B. CHAMAK, *Brain macrophages : neurotoxic or neurotropic effector cells ?* (J. Leukocyte Biology, Vol.56, pp. 416-422, 1994).

M. MALLAT, B. CHAMAK & C. THERY, *Influences of brain macrophages on the survival, growth and regeneration of neurons.* ("Neurodegenerative diseases", Proceedings of the 8th Rhône Poulenc Rorer Round Table Conference, Acad.Press, eds G. Jolles, J.M. Stutzmann, Chap.4, pp. 91-104, 1994).

M. LE MOAL, J.P. TASSIN & J.C. BARON, *Neuroanatomie fonctionnelle et le problème des relations structures fonctions*. (Traité de Neurophysiologie humaine, Ed. Mardaga, Chap.3, pp. 57-68, 1994).

D. SABERAN-DJONEIDI, I. MAREY-SEMPER, R. PICART, J.M. STUDLER, C. TOUGARD, J. GLOWINSKI & M. LEVI-STRAUSS, *A 19-kDA protein elonging to a new family is expressed in the Golgi apparatus of neural cells*. (J. Biol. Chem., 270 n°4, 1888-1893, 1995).

T. JAY, F. BURETTE & S. LAROCHE, *NMDA receptor-dependent long-term potentiation in the hippocampal afferent fibre system to the prefrontal cortex in the rat*. (Eur.J.Neurosci., 7, 247-250, 1995).

N. DANZIGER, M. YOKOYAMA, T. JAY, J. CORDIER, J. GLOWINSKI & H. CHNEIWEISS, *Cellular expression, development regulation and phylogenic protein kinase C substrate*. (J. Neurochem., 64 n°3, 1016-1025, 1995).

M. L'HIRONDEL, A. CHERAMY, G. GODEHEU & J. GLOWINSKI, *Effects of arachidonic acid on dopamine synthesis, spontaneous release and uptake in striatal synaptosomes from the rat* (J. Neurochem., 64 n°3, 1406-1409, 1995).

M. DESBAN, C. GAUCHY, J. GLOWINSKI & M.L. KEMEL, *Heterogeneous topographical distribution of the striatonigral and striatopallidal neurons in the matrix compartment of the cat caudate nucleus*. (J. Comp. Neurol., 352, 117-133, 1995).

L. VENANCE, J. CORDIER, M. MONGE, B. ZALC, J. GLOWINSKI & C. GIAUME, *Homotypic and heterotypic coupling mediated by gap junctions during glial cell differentiation in vitro*. (Eur. J. Neurosci., 7, 451-469, 1995).

M. TENCE, N. MURPHY, J. CORDIER, J. PREMONT & J. GLOWINSKI, *Synergistic effects of acetylcholine and glutamate of the release of arachidonic acid from cultured striatal neurons*. (J. Neurochem., 64, 1605-1613, 1995).

F. DESDOUITS, J. SICILIANO, P., GREENGARD & J.A. GIRAULT, *Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein DARPP-32: phosphorylation of Ser-137 by casein kinase I inhibits dephosphorylation of Thr-34 by calcineurin* (Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 2682-2685, 1995)

L. VENANCE, J. SICILIANO, M. YOKOYAMA, J. CORDIER, J. GLOWINSKI & C. GIAUME, *Inhibition of astrocyte gap junctions by endothelins*. (Progress in Cell Research, 4, 245-249, 1995).

H.C. HEMMINGS, F. DESDOUITS & J.A. GIRAULT, *DARP-32 (dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein, Mr 32,000), a neuronal protein phosphatase-1 inhibitor: preparation and biochemical analysis*. (Neuroprotocols, 6, 35-45, 1995).

C. GIAUME & L. VENANCE, *Gap junctions in brain glial cells an development*. ("Perspectives on Development Neurobiology", Vol.2, n°4, pp. 335-345, 1995).

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

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, Québec, 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, Montréal, 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, Montréal, 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, Montréal, Canada, 24-29/07/94.

P. MARIN, N. STELLA, M. TENCE, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Putative role of astrocytes in glutamatergic neurotransmission*. 10th ESN Meeting, Jérusalem, Israël, 14-19/08/94.

L. VENANCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Pharmacological heterogeneity and gap junction permeability in cultured striatal astrocytes*. Workshop in intracellular communications ; Pushcino, Russie, août 94.

M. KUBES, M. YOKOYAMA, A. ESTELLES, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *The major astrocytic phosphoprotein PEA-15 is a substrate for multiple calcium-dependent phosphorylations* Neuron-Glia Interaction, satellite sympos. 17 ENA meeting, Prague, 31/08-03/09/94.

A.M. THIERRY, JM. DENIAU, M.F. MONTARON, M. MENETREY, J. GLOWINSKI, *Anatomical and functional organization of the nucleus accumbens-nigro-thalamic-prefrontal circuit*. 17th Annual Meeting ENA, Vienne, Autriche, 4-8/09/94.

C. GAUCHY, M.L. KEMEL, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, *Respective presynaptic inhibitory control of the NMDA-evoked release of 3H-dopamine by released GABA, dynorphin and tachykinins in striosome- and matrix-enriched areas of the rat striatum*. 17th Annual Meeting ENA, Vienne, Autriche, 4-8/09/94.

M. DESBAN, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, J. GLOWINSKI, *Relationships between striosome and matrix compartments and vascularization in the rat and the cat striatum* 17th Annual Meeting ENA, Vienne, Autriche, 4-8/09/94.

M. DIETL, G. GODEHEU, M. SAFFROY, M. DESBAN, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, J. GLOWINSKI, *Dopamine release from rat and guinea pig striatum : modulation by selective excitatory amino acid receptor agonists* 17th Annual Meeting ENA, Vienne, Autriche, 4-8/09/94.

F. PETITET, A. DOBLE, M. TENCE, J.C. BLANCHARD, *Modulation by cyclothiazide and GYKI 52466 of the release of (3H) arachidonic acid evoked by AMPA and carbachol on striatal neurons* 17th Annual Meeting ENA, Vienne, Autriche, 4-8/09/94.

J. GLOWINSKI, P. MARIN, N. STELLA, M. TENCE, J. PRÉMONT, *Role of astrocyto-neuronal interactions in the control of striatal glutamatergic transmission*. "The role of glia in synapse development..." satellite symposium to the 17th ENA meeting, Castle Ringberg, Germany, 11-14/09/94.

J.P. TASSIN, F. TROVERO, G. BLANC, J., GLOWINSKI, *Functional implications of noradrenergic-dopaminergic interactions in the prefrontal cortex*. 5th Intern. Meeting European Behavioural pharmacology Society, Berlin, Germany, 11-15/09/94.

J. GLOWINSKI, *Investigations on the properties of striato-nigral dopaminergic neurons and some of their target cells with the push-pull cannula methods*. International Conference on in vivo methods, Seignosse, 17-20/09/94.

J.P. TASSIN, *De la pharmacologie à la clinique*, "Schizophrénie déficitaires", Copenhagen, Danemark, 18-20/09/94.

J.A. GIRAULT, *Regulation of protein phosphatase I in striato-nigral neurons*. Conferences Jacques Monod, Ausois, 19-23/09/94.

J. GLOWINSKI, *Astrocytic and neuronal processes contributing to the regulation of glutamatergic transmission in the striatum*. The Cambridge Symposia : Molecular Neuroscience, Robinson College, Cambridge, 28-29/09/94.

P. MARIN, M. MAUS, S. DESAGHER, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Nicotine protects cultured striatal neurones against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity*. The Cambridge Symposia : Molecular Neuroscience, Robinson College, Cambridge, 28-29/09/94.

M. MENEGOZ, F. BURGAYA, M. LE BERT, J. SICILIANO, J.A. GIRAULT, *PP180 : A novel 180kDa neuronal glycoprotein phosphorylated on tyrosine*. The Cambridge Symposia : Molecular Neuroscience, Robinson College, Cambridge, 28-29/09/94.

L. VENANCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Hétérogénéité pharmacologique et perméabilité des jonctions "gap" dans les astrocytes striataux in vitro*. V^e Colloque "Canaux Ioniques", Carry le Rouet, 29/09-01/10/94.

H. CHNEIWEISS, M. KUBES, M. YOKOYAMA, J. CORDIER, A. ESTELLES, J. GLOWINSKI, *Multiple calcium-dependent kinases may regulate the interaction of PEA-15 with microtubules in astrocytes*. Society for Neuroscience, Miami Beach, Floride, 13-18/11/94.

M. MENEGOZ, F., BURGAYA, M., LE BERT, MJ SICILIANO, J., GIRAULT, J.A. *PP180 : A novel 180 kDA neuronal glycoprotein, phosphorylated on tyrosine* Society for Neuroscience, Miami Beach, Floride, 13-18/11/94.

N. STELLA, J. SICILIANO, D., PIOMELLI, M. EL ETR, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Interleukin 1 enhances receptor-dependent and independent induced release of*

arachidonic acid from mouse striatal astrocytes. Society for Neuroscience, Miami Beach, Floride, 13-18/11/94.

J.P. TASSIN, *Essai de compréhension neurobiologique* Paranoïa sensitive, Annecy, 27-29/01.95.

L. VENANCE, D. PIOMELLI, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Anandamide inhibits propagation of intercellular calcium waves in striatal astrocytes through a receptor distinct from the central cannabinoid receptor*. 1995 Gap Junction conf. The role of connexin diversity, L'Ile des Embiez, France, 05-10/03/95.

L. VENANCE, C. GIAUME, *18a-Glycyrrhetic acid inhibits junctional permeability in cultured astrocytes*. 1995 Gap Junction conf. The role of connexin diversity, L'Ile des Embiez, France, 05-10/03/95.

C. GIAUME, L. VENANCE, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *Endothelins inhibit intercellular communication in brain glial cell* IVth Intern. Conf. Endoghelin, Londres, 23-26/04/95.

J. GLOWINSKI, *Influence of cortico-striatal glutamatergic neurons on striatal target cells and involvement of astrocyto-neuronal interactions in striatal glutamatergic transmission*. Montagscolloquium, Göttingen, RFA, 24/04/95.

C. CALVO, T. YOSHIMURA, M. MALLAT, M., *Production de MCP-1 par des cellules microgliales en culture*. SFI, Bordeaux, 27-28/04/95.

A. CHERAMY, G. GODEHEU, M. L'HIRONDEL, J. GLOWINSKI, *Coopération des récepteurs cholinergiques et NMDA dans le contrôle présynaptique de la libération de dopamine à partir de synaptosomes de striatum de rat*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

M. L'HIRONDEL, G. GODEHEU, A. CHERAMY, J. GLOWINSKI, *Contrôle présynaptique de la synthèse, de la libération et de la recapture de dopamine par l'acide arachidonique à partir de synaptosomes de striatum de rat*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

M. DESBAN, C. GAUCHY, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Distribution hétérogène des neurones striato-nigraux et striato-pallidaux dans le compartiment matriciel du noyau caudé du chat*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

M. MAUS, R. WILLIAMS, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *L'acide lactique inhibe la neurotoxicité et la production d'acide arachidonique induite par le N-Methyl-D-Aspartate dans des neurones striataux en culture primaire*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

M. TENCE, S. DESAGHER, N. MURPHY, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *L'endothéline stimule l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par une phospholipase D dans les astrocytes de striatum en culture*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

H. CHNEIWEISS, A. ESTELLES, M. KUBES, M. YOKOYAMA, P. VERNIER, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *PEA-15 est une phosphoprotéine majeure des astrocytes, sub-*

strat de la CaMKII et de la PKC, associée aux microtubules et parfaitement conservée entre la souris et l'homme. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

L. VENANCE, D. PIOMELLI, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *L'anandamide inhibe la propagation des vagues calciques intercellulaires dans les astrocytes de striatum*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

A. DOBBERTIN, M. MALLAT, *Influence des neurones centraux sur la prolifération de précurseurs macrophagiques*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

M.F. MONTARON, J.M. DENIAU, A. MENETREY, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *Intervention d'une voie nigro-thalamique dans les relations entre les ganglions de la base et le cortex préfrontal*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

M. LEVI-STRAUSS, M. GELMAN, I. MAREY-SEMPER, *Bases moléculaires de la vulnérabilité particulière de certains types cellulaires : l'exemple des neurones dopaminergiques de la substance noire*. 2^e Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, 14-18/05/95.

I. MAREY-SEMPER, M. GELMAN, M. LEVI-STRAUSS, *A selective toxicity towards cultured mesencephalic dopaminergic neurons is induced by the synergistic effects of energetic metabolism impairment and NMDA receptor activation*. Neurodegenerative Diseases '95 : Molecular and Cellular Mechanisms, and Therapeutic advances, Washington, 15-17/05/95.

P. MARIN, M. MAUS, S. DESAGHER, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Nicotine protects cultured striatal neurons against NMDA receptor-mediated neurotoxicity*. Neurodegenerative Diseases '95 : Molecular and Cellular Mechanisms, and Therapeutic advances, Washington, 15-17/05/95.

S. DESAGHER, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Astrocytes protect neurons from the hydrogen peroxide-induced neurotoxicity*. Neurodegenerative Diseases '95 : Molecular and Cellular Mechanisms, and Therapeutic advances, Washington, 15-17/05/95.

A.M. THIERRY, S. PIROT, J.M. DENIAU, J. GLOWINSKI, *Excitatory synaptic transmission in the prefrontal cortex : influence of the mesocortical dopamine system*. Excitatory Amino Acids & Cerebral Cortex, Portonovo Bay, Italie, 21-24/05/95.

LISTE DES DIPLÔMÉS - 1994-1995

DESDOITS Frédéric :

La DARPP-32 (Dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, MR = 32,000) : un inhibiteur de la protéine phosphatase 1 régulé par la phosphorylation de multiples résidus.

Thèse de Doctorat d'Etat de l'Université de Paris 6, soutenue le 21 juin 1995.

GILLIBERT Cécile (sous la direction de J.P. Tassin) :

Libération des monoamines dans le cortex préfrontal du rat au cours du cycle veille-sommeil : analyse en microdialyse.

DEA de Neurosciences, Université P. et M. Curie, Paris VI, septembre 1994.

L'HIRONDEL Marie (sous la direction de A. Chéramy) :

Effets de l'acide arachidonique sur la libération de dopamine à partir de synaptosomes de striatum de rat.

DEA en Pharmacochimie moléculaire, pharmacologie expérimentale et métabolisme, Université René Descartes, septembre 1994.