

Neuropharmacologie

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

Le cours de cette année n'a pas eu lieu.

SÉMINAIRES

SIGNALISATION INTRACELLULAIRE

Cette série de séminaire a été organisée avec le Professeur P. Corvol sous forme d'un symposium de deux jours qui a réuni une très large audience.

J. GLOWINSKI et P. CORVOL : Introduction

Récepteurs et Protéines G

— J. BOCKAERT (Montpellier) : Les récepteurs couplés aux protéines G : le cas exemplaire du récepteur PACAP.

— R. FISCHMEISTER (Châtenay-Malabry) : Rôle des protéines G et de la compartimentalisation intracellulaire dans la régulation des canaux calciques cardiaques.

— A. TAVITIAN (Paris) : Protéines Ras et petites protéines G apparentes dans la signalisation intracellulaire.

— B. TOCQUE (Paris, Rhône-Poulenc Rorer) : Ras-GAP : un effecteur avéré ou présomptif pour les protéines oncogéniques Ras ?

Tyrosine kinases/Tyrosine Phosphatases

— E. VAN OBERGEN (Nice) : Signalisation par le récepteur de l'insuline et de l'IGF-1.

— S. PELLIGRINI (Paris) : Le rôle des protéines tyrosine kinases dans la signalisation des interférons α/β .

— C. SUSINI (Toulouse) : Tyrosine phosphatase et récepteur de la somatostatine.

— B. MALISSEN (Marseille) : Dissection génétique des unités de transduction du récepteur pour l'antigène des lymphocytes T.

Kinases et autres voies de signalisation

— C. COCHET (Grenoble) : Structure et fonction de la protéine kinase CK2.

— H. CHAP (Toulouse) : Plaquette et transduction (PLA2).

— J.V. BARNIER (Gif-sur-Yvette) : Les kinases de la famille Raf dans la transduction du signal ; expression et fonction de B-Raf dans le système nerveux central.

Cascades de phosphorylation et cibles

— B. GIROS (Paris) : Inactivation du gène de la β -adrenergic receptor kinase-1 (β ARK-1).

— J. POUYSSEGUR (Nice) : Les cascades de MAP kinases et le contrôle de l'entrée dans le cycle.

— P. SASSONE-CORSI (Strasbourg) : Réponse nucléaire à l'AMPc.

— M. DOREE (Montpellier) : Activation des complexes cyclines CDK.

— A. SOBEL (Paris) : La stahmine, sa famille et ses partenaires.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE (INSERM U 114)

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

1.1. ÉTUDE DU RECRUTEMENT DES MACROPHAGES CÉRÉBRAUX (Responsable de l'équipe : Michel Mallat)

1.1.1. Régulation de la prolifération des macrophages cérébraux

Le M-CSF est un facteur de croissance produit par les astrocytes qui stimule la prolifération des macrophages cérébraux (cellules microgliales amiboïdes). Précédemment, nous avons montré que des neurones embryonnaires en culture primaire produisent des facteurs solubles qui augmentent l'effet mitogène du M-

CSF sur des macrophages issus du SNC ou d'organes hématopoïétiques. Les facteurs neuronaux responsables de cette stimulation ont été identifiés : leur activité est totalement bloquée par des anticorps neutralisant les isoformes $\beta 1$ et $\beta 2$ du TGF- β . Les transcrits de ces cytokines ont été détectés dans les cultures neuronales. De plus, des analyses immunocytochimiques ont révélé que plus de 80 % des neurones corticaux d'embryons de rats expriment le TGF- $\beta 2$ et le TGF- $\beta 3$ après 4 jours de culture. Le TGF- $\beta 2$ et le TGF- $\beta 3$ sous forme recombinante reproduisent les effets des facteurs d'origine neuronale sur la prolifération des macrophages. L'existence d'une production neuronale de TGF- $\beta 2$ et de TGF- $\beta 3$ a été confirmée *in situ* par co-détection de marqueurs neuronaux et des cytokines dans des coupes de cerveaux de rats âgés d'une semaine, période du développement au cours de laquelle la population des macrophages cérébro-corticaux s'accroît considérablement.

L'ensemble de ces données indique que les neurones, par leur capacité de sécréter du TGF- $\beta 2$ et du TGF- $\beta 3$, favorisent la croissance microgliale au cours du développement (A. Dobbertin).

1.1.2. Production gliale d'agents chémoattractifs actifs sur les macrophages

L'utilisation d'un test *in vitro* de migration polarisée a permis de démontrer que le M-CSF produit par les astrocytes exerce des effets chémoattractifs sur les macrophages cérébraux. Ainsi, en plus de son effet stimulateur sur la prolifération microgliale, le M-CSF peut intervenir sur la localisation intracérébrale des macrophages.

L'étude de l'expression microgliale de la protéine MCP-1, un agent chémoattractif actif sur les monocytes, a également été poursuivie. Précédemment nous avons montré que les macrophages cérébraux en culture sécrètent du MCP-1. Des études complémentaires ont révélé que les taux microgliaux d'ARNm de cette protéine sont accrus après stimulation des cellules par les interleukines 1 et 6 ou le TNF- α . La protéine MCP-1 n'est pas exprimée dans le SNC adulte sain. Toutefois, l'existence d'une production de MCP-1 par les cellules microgliales amiboïdes a pu être confirmée *in situ* dans le striatum de rat adulte lésé par une injection d'acide kainique : l'expression du gène MCP-1 par les cellules microgliales réactives est intense pendant les premières 48 heures qui suivent cette injection, mais n'est plus détectable après 6 jours (C. Calvo, M. Gelman).

1.2. ÉTUDE DE L'ARN 3.1, CARACTÉRISATION BIOCHIMIQUE ET FONCTIONNELLE D'UNE NOUVELLE FAMILLE DE PROTÉINES NEURONALES ET ANALYSE MOLÉCULAIRE DE LA VULNÉRABILITÉ PARTICULIÈRE DES NEURONES DOPAMINERGQUES (Responsable de l'équipe : Matthieu Lévi-Strauss)

1.2.1. Étude de l'ARNm 3.1

L'ARN messager 3.1, remarquable par son abondance dans les neurones embryonnaires ne persiste chez l'adulte que dans les cellules des grains du cervelet,

du bulbe olfactif et de l'hippocampe. La régulation très précise de son expression au cours du développement ainsi que sa conservation phylogénétique témoignent d'une forte pression de sélection (80 % d'homologies entre les séquences établies chez le poulet et chez l'homme sur l'ensemble des 2 000 pb de cet ARN) et plaident en faveur d'un rôle fonctionnel patent.

En dépit de l'existence d'une petite phase ouverte de lecture potentielle (68 acides aminés), aucune protéine n'a pu être clairement mise en évidence au niveau tissulaire en Western blot, après immunoprécipitation, ou par immunohistochimie. La transfection transitoire de cellules COS n'a pas permis non plus de visualiser la protéine putative par ces mêmes techniques, en dépit d'une bonne incorporation du transgène vérifiée par Northern blot.

Les lignées de neuroblastome NS20 obtenues après transfection stable du cDNA 3.1 montraient une transcription très faible voire indétectable du transgène. Enfin, plusieurs tentatives pour obtenir des souris transgéniques (au total 200 œufs injectés viables, réimplantés) effectuées en collaboration avec M. Le Bert sont restées infructueuses. Un seul animal présentait une bonne incorporation du transgène (environ 100 copies) mais sans transcription décelable. Le caractère léthal de la surexpression de l'ARN 3.1, suggéré par ces expériences, resterait à démontrer.

Un rôle non codant de cet ARN peut être envisagé. En faveur de cette hypothèse, des expériences préliminaires révèlent l'existence d'une liaison de l'ARN 3.1 à des protéines spécifiques, présentes seulement dans les tissus où l'ARN 3.1 est exprimé (i.e. système nerveux embryonnaire et cervelet adulte).

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

Après avoir caractérisé la protéine p19, nous nous sommes consacrés cette année à l'analyse de la protéine p21 dont la similarité, d'environ 60 %, avec p19 permet de définir une nouvelle famille de protéines spécifiques du système nerveux. Cette protéine d'environ 21 kDa est, comme p19, exprimée dans les neurones et les cellules neuroendocrines et est particulièrement abondante dans l'épithélium olfactif. Des études de fractionnement sub-cellulaire ont indiqué que p21 est associée aux membranes par une liaison résistante à un tampon pH 11,5, suggérant une localisation trans-membranaire de cette protéine. En accord, avec les données obtenues sur p19, en collaborant avec Claude Tougard et Renée Picart (Groupe de Biologie de la Cellule Neuroendocrine, Collège de France), nous avons pu montrer, par immunohistochimie et microscopie électronique, que p21 est localisée dans l'appareil de Golgi de neurones en culture primaire (comme p19). Nous tentons actuellement d'élucider la fonction de ces deux protéines en étudiant la sécrétion de prolactine à partir de cellules hypophysaires GH3 transfectées avec des constructions permettant l'expression, inductible par la dexaméthasone, des brins sens ou anti-sens des ADNc correspondants (D. Sabéran-Djoneidi, M. Gelman, M. Lévi-Strauss).

1.2.3. Analyse moléculaire de la vulnérabilité particulière des neurones dopaminergiques

Nous avons cherché à mettre en évidence une anomalie du métabolisme énergétique de la souris weaver qui pourrait intervenir dans le déficit très précoce de la recapture de dopamine (précédemment mis en évidence) et la dégénérescence des neurones dopaminergiques qui 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 est diminuée de 40 % mais que l'oxydation du succinate est normale dans le foie de souriceaux weaver âgés de seize jours. Des études d'activités enzymatiques ont ensuite permis de révéler 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 mesuré individuellement. Ce déficit des complexes I plus III de la phosphorylation oxydative a été retrouvé dans d'autres tissus à priori non affectés par la mutation weaver tels que le rein et le cœur.

Afin de s'assurer que les altérations observées sont effectivement liées au phénotype weaver et ne résultent pas uniquement du mauvais état général des souriceaux utilisés, les données obtenues ont pu être reproduites en utilisant des souriceaux weaver nouveau-nés ne souffrant encore d'aucun trouble neurologique. La publication d'un article indiquant qu'une mutation du gène *Girk2*, codant pour un canal potassique rectificateur, serait à l'origine du phénotype weaver (Patil *et al.*; *Nature Genetics*, **11**: 126, 1995) a retardé la soumission du manuscrit résumant nos données. Cette mutation présente dans les souris weaver de notre élevage ne peut expliquer nos résultats puisque le gène *Girk2* n'est pas exprimé dans le foie et le rein, tissus dans lesquels un déficit de la phosphorylation oxydative a été mis en évidence. De plus, il est difficile de concevoir que l'altération d'un canal potassique puisse modifier des activités enzymatiques mesurées *in vitro* sur des fragments de membranes internes de mitochondries (I. Marey-Semper, M. Gelman, M. Lévi-Strauss).

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

2.1. ANALYSE DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA SURVIE NEURONALE (Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

2.1.1. Régulation de la synthèse protéique neuronale par le glutamate (Philippe Marin)

Dès 1967, des données indiquaient que le glutamate diminue la synthèse protéique dans des coupes de cerveaux de rat. Vingt cinq ans plus tard, une

observation similaire a été effectuée dans des régions cérébrales à la suite d'une ischémie. Nous nous sommes donc proposés d'élucider le mécanisme moléculaire responsable de la diminution de la synthèse protéique intervenant dans ces différentes conditions physiopathologiques. De fait, nous avons observé que le glutamate diminue très rapidement la synthèse protéique dans des cultures neuronales de cortex cérébral de souris. La vitesse de la traduction des protéines est un processus soumis à de nombreuses régulations faisant intervenir les facteurs d'initiation (eIF-2) et d'élongation (eEF-2 et EF-1). Les propriétés de ces complexes protéiques peuvent être modifiées lorsque certaines des sous-unités qui les composent sont phosphorylées par des protéines kinases spécifiques. eEF-2 est spécifiquement phosphorylé par une kinase (eEF-2 kinase) dépendante du complexe Ca^{2+} -calmoduline. La forme phosphorylée de ce facteur d'élongation est inactive.

Notre étude démontre l'existence d'une excellente corrélation entre les élévations de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire et le taux de phosphorylation de eEF-2. De plus, un parallélisme étroit semble exister entre le taux de phosphorylation de eEF-2 et l'inhibition de la synthèse protéique. En conclusion, en stimulant les récepteurs NMDA et par voie de conséquence en produisant une élévation importante et soutenue de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , le glutamate provoquerait une phosphorylation de eEF-2 qui serait responsable de la réduction de la synthèse protéique. Ce mécanisme pourrait intervenir dans l'inhibition de la synthèse protéique observée au cours de l'ischémie cérébrale, situation dans laquelle le glutamate s'accumule massivement dans l'espace extracellulaire. Nous nous proposons également de rechercher une éventuelle contribution de eIF-2 dans ce processus. En conclusion, la phosphorylation d'eEF-2 et l'inhibition de la synthèse protéique qui l'accompagne ouvrent des perspectives nouvelles sur le rôle de la neurotransmission glutamatergique normale ou prolongée.

2.1.2. Effets neuroprotecteurs du lactate et du pyruvate vis-à-vis de la toxicité induite par le glutamate ou l'eau oxygénée (Marion Maus et Solange Desagher)

Nous avons effectué plusieurs observations indiquant que le pyruvate exerce un effet protecteur sur la neurotoxicité induite par le glutamate et l'eau oxygénée, molécules respectivement libérée ou formée durant l'ischémie cérébrale.

Analyse des effets protecteurs du lactate ou du pyruvate vis-à-vis de la neurotoxicité induite par le glutamate

Plusieurs auteurs (groupes d'Hamprecht, de Magistretti ou de Tsacopoulos particulièrement) ont proposé l'existence d'un couplage métabolique entre les neurones et les cellules gliales. Ce couplage ferait intervenir une libération de lactate (ou de pyruvate) des astrocytes utilisable par les neurones environnants. Une production importante de lactate à partir de glycogène intervient dans les astrocytes lorsque ceux-ci sont exposés au glutamate. Le glutamate agirait par un

mécanisme dépendant de son transport en activant indirectement la glycolyse. Ainsi, le glutamate libéré au niveau des terminaisons synaptiques induirait une production et une libération de lactate d'origine astrocytaire susceptible d'être recapté par les neurones.

Poursuivant nos études sur les interactions astrocyto-neuronales, nous avons recherché si le lactate et le pyruvate sont capables de moduler l'efficacité de la neurotransmission glutamatergique et la neurotoxicité provoquée par le glutamate. L'exposition transitoire (30 minutes) des neurones striataux au glutamate provoque 24 heures plus tard une mort neuronale importante (70 %). Cet effet neurotoxique, qui résulte de la stimulation des récepteurs NMDA, est fortement amplifié lorsque les neurones sont préexposés pendant 30 minutes à un milieu dépourvu de glucose.

Dans ces conditions expérimentales, le lactate et le pyruvate (5-20 mM) exercent un effet neuroprotecteur puissant vis-à-vis de la toxicité induite par le NMDA (plus de 50 %). Cet effet peut être reproduit par l' α -cétooglutarate, un composé intermédiaire du cycle de Krebs. Par contre, le D-lactate et le β -cétooglutarate sont sans action. Le lactate et le pyruvate protègent également les neurones de la toxicité marginale induite par l'AMPA. En conclusion, les acides monocarboxyliques exercent un effet neuroprotecteur global vis-à-vis des deux composantes (NMDA et AMPA) toxiques du glutamate.

Recherche du mécanisme d'action du lactate et du pyruvate

Des inhibiteurs spécifiques du co-transporteur L-lactate/proton H^+ tels que la phlorétine, et l' α -cianocinnamate ont été utilisés pour rechercher les mécanismes d'action du lactate et du pyruvate. Les données obtenues suggèrent que les effets neuroprotecteurs du pyruvate dépendent en partie de l'intégrité de ce co-transport.

Les α -cetoacides (pyruvate, α -cétooglutarate, etc.) sont susceptibles de réagir avec l'eau oxygénée (H_2O_2) et ainsi d'éliminer cet oxydant cytotoxique puissant (réaction de décarboxylation des α -cetoacides). Par ailleurs, l'activation des récepteurs NMDA peut engendrer la production de radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), capables de dismuter en H_2O_2 conduisant à la formation de radicaux hydroxyyles (réactions de Fenton et Haber-Weiss). Le pyruvate pourrait ainsi protéger les neurones de la toxicité induite par le NMDA en détruisant l'eau oxygénée produite. Toutefois, cette hypothèse ne semble pas pouvoir être retenue car le propylgallate ou le diméthylsulfoxyde (DMSO), composés perméants piégeant respectivement l'eau oxygénée et les radicaux hydroxyyles, ne protègent pas les neurones de la toxicité induite par le glutamate.

Parallèlement à nos études sur la survie neuronale, la respiration des neurones a été déterminée dans différentes conditions expérimentales en mesurant l'activité des succinate-deshydrogénases mitochondriales (estimation de la conversion du sel de tétrazolium MTT en précipité bleu formazan). La privation de glucose diminue la respiration neuronale et cet effet inhibiteur peut être annulé par

l'addition de lactate ou de pyruvate (aux concentrations utilisées dans les expériences de neuroprotection). Ainsi, le lactate et le pyruvate pourraient exercer leur effet protecteur vis à vis de la toxicité du glutamate en restaurant un métabolisme énergétique normal.

2.2. ÉTUDE DES INTERACTIONS ASTROCYTAIRES PAR L'INTERMÉDIAIRE DES JONCTIONS COMMUNICANTES

(Responsable de l'équipe : C. Giaume)

2.2.1. *Propriétés fonctionnelles des astrocytes provenant de cerveaux de souris « knock-out » pour le gène codant pour la Cx43*

Afin de confirmer le rôle majeur de la connexine 43 (Cx43) dans les communications inter-astrocytaires, nous avons étudié les propriétés jonctionnelles d'astrocytes cultivés à partir de souris dépourvues du gène codant pour cette connexine (Reaume et al., 1994). L'utilisation d'anticorps anti-Cx43 a permis de confirmer que les astrocytes provenant de souris homozygotes n'expriment pas la Cx43 et que ceux des souris hétérozygotes en expriment une quantité beaucoup plus faible que celle observée dans les astrocytes des souris sauvages. Le couplage diffusiel entre astrocytes homozygotes est supprimé. Un niveau de couplage intermédiaire est observé entre les astrocytes des souris hétérozygotes. De plus, cette absence de communication intercellulaire entraîne une disparition des « vagues » calciques inter-cellulaires. Enfin, le taux de croissance des astrocytes des souris mutées est plus faible que celui des astrocytes du type sauvage. Ainsi, l'absence de communication jonctionnelle pourrait altérer la prolifération des cellules gliales.

L'absence de jonctions communicantes dans ce modèle de souris transgénique sera mis à profit pour étudier la contribution de ces jonctions dans la capture et le métabolisme du glucose ou le rôle neuroprotecteur des astrocytes, propriétés astrocytaires également étudiées dans le laboratoire (Laurent Venance, en collaboration avec C. Naus, University of Western Ontario, Canada).

2.2.2. *Étude comparative des réponses neuronales et astrocytaires induites par l'anandamide et d'autres agonistes des récepteurs cannabinoïdes*

Les effets de l'anandamide (composé endogène se liant aux récepteurs du cannabis) et de deux autres agonistes des récepteurs cannabinoïdes centraux CB1 (WIN55212-2, CP55940) sur la formation d'AMP cyclique ont été comparés sur des cultures primaires de neurones et d'astrocytes du striatum et du cortex cérébral de la souris. Ces trois agonistes inhibent la formation d'AMPc induite dans les neurones par l'isoprotérénol ou la forskoline en agissant sur des récepteurs CB1, ces réponses étant bloquées par l'antagoniste sélectif des récepteurs CB1, le SR141716A.

Les astrocytes ne possèdent pas de récepteurs CB1. Néanmoins nous avons pu montrer que le WIN 55212-2 et l'anandamide inhibent également la production évoquée d'AMPc dans ces cellules, ces réponses étant plus importantes dans les astrocytes striataux que corticaux et insensibles à l'action du SR141716A. Des récepteurs couplés à une G protéine distincts des récepteurs CB1 semblent être impliqués car ces réponses ne sont plus observées lorsque les cellules sont prétraitées avec la toxine de pertussis. Les effets de l'anandamide et du WIN 55212-2 sont partiellement additifs et seule l'anandamide stimule la libération d'acide arachidonique suggérant l'intervention de mécanismes distincts dans les réponses induites par ces deux agonistes. Ces données complètent un étude récente (Venance *et al.*, 1995) indiquant que seule l'anandamide inhibe les jonctions communicantes des astrocytes du striatum en agissant sur des récepteurs couplés à des protéines G distincts des récepteurs cannabinoïdes CB1 (L. Venance, en collaboration avec S. Sagan, CNRS URA 493, Paris).

2.2.3. Inhibition par la nicotine de courants potassiques activés par le potentiel dans les neurones striataux du rat

Nous savions déjà que l'acétylcholine présent dans les interneurons cholinergiques du striatum agit par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques sur des courants potassiques de type IA.

Nous avons montré sur des neurones striataux de rat en culture primaire enregistrés en configuration « cellule entière » qu'en présence d'atropine, l'acétylcholine inhibe des courants potassiques activés par des sauts de potentiel dépolarisants. Des protocoles de dépolarisation permettant, par soustraction ultérieure, de séparer les courants de type I_{K+} et I_A ont été utilisés. L'application locale de (-)-nicotine (10 μ M) diminue de façon réversible l'amplitude des courants I_{K+} . Cette action semble indépendante de la réponse ionotropique des récepteurs nicotiques, puisqu'elle est observée lorsque ceux-ci sont déjà désensibilisés. L'effet inhibiteur de la (-)-nicotine est reproduit par la cytosine et le DMPP, des agonistes nicotiques. Il est insensible à l'hexaméthonium, la D-tubocurarine, la mécamylamine, l' α -bungarotoxine, mais réduit par la DHbE. Par contre, la (-)-nicotine ne modifie pas l'amplitude des courants de type I_A mais ralentit très légèrement leur inactivation.

En fonction de sa cinétique et de sa dépendance par rapport au voltage, le courant I_{K+} peut intervenir dans le contrôle de la fréquence de décharge des neurones. De fait, lors d'un courant dépolarisant prolongé provoquant des décharges de potentiels d'action, la (-)-nicotine n'affecte que très peu la latence du premier potentiel d'action, mais diminue fortement celle des potentiels d'action suivants, donnant lieu à une décharge de fréquence plus élevée. Ceci est en conformité avec l'effet de la (-)-nicotine, observé en voltage imposé, sur le courant I_{K+} .

Les données pharmacologiques obtenues suggèrent que la nicotine (ainsi que l'acétylcholine) agit sur des sites des neurones striataux distincts des récepteurs nicotiniques centraux décrits jusqu'à ce jour (Brigitte Hamon).

2.3. RÉCEPTEURS DES TACHYKININES ET DE L'ENDOTHÉLINE

(Responsables de l'équipe : J.-C. Beaujouan, Y. Torrens et M. Tencé)

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

2.3.1. *Présence de récepteurs NK₁ et NK₂ couplés à une phospholipase C sur la vessie de rat*

Des études de liaison effectuées avec des ligands spécifiques indiquent que la vessie de rat possède des récepteurs NK₁ et NK₂ des tachykinines mais pas de récepteurs NK₃. De plus, le septide, provoque une contraction importante de cet organe et l'étude pharmacologique de cette réponse semble suggérer l'implication de récepteurs de type « septide » dont nous avons précédemment décrit l'existence au niveau de l'iléon de cobaye. Ces données obtenues par d'autres auteurs nous ont incité à rechercher si ces différents récepteurs des tachykinines étaient couplés à une phospholipase C dans la vessie de rat.

Nous avons effectivement pu démontrer que des agonistes sélectifs des récepteurs NK₁ et NK₂ stimulent la formation des inositol phosphates alors que l'agoniste sélectif des récepteurs NK₃ est sans effet. Les réponses des agonistes NK₂ sont de plus grande amplitude que les réponses NK₁ et ces deux types de réponses sont bloquées par des antagonistes non peptidiques sélectifs NK₂ (SR48968) et NK₁ (RP67580), respectivement. La substance P agit principalement sur les récepteurs NK₁ alors que la Neurokinine A et le Neuropeptide K provoquent une forte stimulation de l'hydrolyse des phosphoinositides en agissant principalement sur des récepteurs NK₂. Paradoxalement, avec une plus faible affinité, la Neurokinine B, le ligand des récepteurs NK₃, stimule également et fortement l'activité de la phospholipase C. Cette réponse, qui n'est pas bloquée par l'antagoniste sélectif NK₃, le SR142801, résulte de la stimulation des récepteurs NK₂. Ceci révèle, une fois de plus, la faible sélectivité des tachykinines endogènes pour leurs récepteurs. A l'inverse de ce qui peut être observé avec un ligand sélectif des récepteurs NK₂, des réponses résistantes à l'antagoniste NK₂ (SR48968) sont décelables avec la Neurokinine A, le Neuropeptide K et la Neurokinine B (Y. Torrens, M. Saffroy et J.C. Beaujouan).

2.3.2. *Présence de récepteurs de type « septide » couplés à une phospholipase C sur la vessie de rat*

Nous avons pu montrer que le septide (un analogue court C-terminal de la substance P) qui est dépourvu d'affinité pour les sites de liaison NK₁ et NK₂

stimule la formation des inositol phosphates avec une amplitude plus importante que les agonistes sélectifs NK₁. Cette réponse, qui est bloquée par des antagonistes NK₁, présente néanmoins des caractéristiques cinétiques distinctes de celles observées avec des agonistes sélectifs NK₁ et est complètement insensible à l'effet de l'antagoniste NK₂ (SR48968, 10⁻⁶M). De plus, à forte concentration, le septide provoque une désensibilisation de ses récepteurs. Enfin, donnée originale, à faible concentration, la [Pro9] SP et d'autres agonistes des récepteurs NK₁ inhibent la réponse évoquée par le septide suggérant que ces agonistes désensibilisent les récepteurs de type « septide » ou agissent comme des agonistes partiels de ces récepteurs.

Plus récemment, en effectuant des expériences en présence de SR48968, 10⁻⁶M, pour éviter toute interaction avec les récepteurs NK₂, nous avons montré que la SP(6-11) agissait comme le septide. Ceci suggère que ce fragment C-terminal de la SP pourrait être le ligand endogène des récepteurs de type « septide » couplés à une phospholipase C dans la vessie de rat. Enfin, les réponses SR48968 (10⁻⁶M) – résistantes induites par la neurokinine B, la neurokine A et le neuropeptide K présentent toutes les caractéristiques des réponses évoquées par le septide ou la SP(6-11) et notamment d'être bloquées par de faibles concentrations d'agonistes sélectifs NK₁ ou par la substance P (Y. Torrens, M. Saffroy et J.C. Beaujouan).

2.3.3. Régulation de l'activité phospholipase D par l'endothéline

L'hydrolyse de la phosphatidylcholine, un constituant majoritaire des membranes, par la phospholipase D, constitue une voie de signalisation intracellulaire associée aux récepteurs de nombreux agonistes. L'activation de la phospholipase D génère la choline et l'acide phosphatidique. La déphosphorylation de l'acide phosphatidique conduit au diacylglycérol, l'activateur de la protéine kinase C, et sa déacylation génère l'acide lysophosphatidique, un messenger transcellulaire agissant sur ses propres récepteurs membranaires. Cette voie de signalisation semble être impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (en particulier le trafic vésiculaire et les mécanismes de régulation à long terme nécessitant une activation prolongée de la protéine kinase C). Dans le système nerveux central, l'activation de la phospholipase D interviendrait dans la croissance neuritique et les synthèses de l'acétylcholine et de l'anandamide.

L'endothéline (ET) induit une prolifération des astrocytes et selon des travaux du laboratoire, inhibe fortement la perméabilité de leurs jonctions communicantes. Les récepteurs de ce neuropeptide sont couplés à plusieurs voies de signalisation : activation des phospholipases C et A2 et des tyrosine kinases, augmentation du calcium intracellulaire, inhibition de l'activité adénylate cyclase.

Nous avons montré que l'ET induit dans les astrocytes de striatum de souris embryonnaires en culture primaire une production soutenue d'acide phosphatidique et de diacylglycerol. Cet effet résulte de l'activation d'une phospholipase

D et est médié par des récepteurs de type ET_B (EC_{50} identiques pour ET-1 et ET-3 : 2-5 nM) couplés partiellement à une protéine G de type G_i ou G_o . Des récepteurs ET_B couplés à des protéines G sensibles à la toxine pertussique sont également impliqués dans les activations des phospholipases C et A2. L'activation de la phospholipase D par l'ET qui nécessite la présence de calcium extracellulaire dépend également d'une activité protéine kinase C suggérant une régulation positive par la voie de la phospholipase C et/ou de la phospholipase A2. L'activité phospholipase D semble insensible aux variations des taux intracellulaires d'AMP cyclique. Le PMA, un activateur direct de la protéine kinase C, active également la phospholipase D mais son effet est additif avec celui de l'ET indiquant l'existence dans les astrocytes de plusieurs mécanismes de régulation de l'activité phospholipase D (S. Desagher, J. Cordier, M. Tencé).

2.3.4. Régulation de l'activité phospholipase D par les tachykinines

Précédemment nous avons montré que les astrocytes striataux en culture (souris) expriment des récepteurs des tachykinines de type NK_1 couplés à une phospholipase C et dont la stimulation évoque une augmentation du calcium intracellulaire.

Dans un premier temps, le couplage éventuel des récepteurs NK_1 à une phospholipase D a été étudié sur des cellules CHO transfectées avec le cDNA du récepteur $NK1$ de rat. Dans ces cellules, la substance P (SP) et la [Pro9]-SP, un agoniste sélectif des récepteurs $NK1$, stimulent de façon très importante l'hydrolyse des phosphatidylinositols, la libération d'acide arachidonique et la synthèse d'AMP cyclique. Ces agonistes induisent également une production très soutenue d'acide phosphatidique et de diacylglycérol résultant de l'hydrolyse de la phosphatidylcholine par une phospholipase D. Cet effet dépend de la durée d'application et de la concentration de l'agoniste et met probablement en jeu une protéine G hétérotrimérique puisque le fluorure d'aluminium reproduit l'effet de l'agoniste. Il ne s'agit pas d'une protéine G_i ou G_o car l'effet de la SP est insensible à un prétraitement des cellules par la toxine pertussique. La stimulation de la phospholipase D requiert du calcium extracellulaire et une activité protéine kinase C (Y. Torrens, J.C. Beaujouan, M. Tencé).

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

3.1. ÉTUDE DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA SIGNALISATION INTRANEURONALE

(Responsable de l'équipe : Jean-Antoine Girault)

Les thèmes abordés concernent plus particulièrement les protéines G et les cascades de phosphorylation de protéines impliquées dans l'action du récepteur D1 de la dopamine, ainsi que le rôle de la phosphorylation de protéines sur tyrosine dans l'action des neurotransmetteurs.

3.1.1. *Analyse de la protéine Golf du striatum* (Denis Hervé et Jeanne-Marie Studler)

Nous avons montré chez le rat que les neurones du striatum porteurs des récepteurs dopaminergiques D1 renferment des taux élevés d'une sous-unité α de protéine G particulière, appelée G α olf, très homologue à la protéine G α s, elle-même présente à des taux beaucoup plus faibles dans cette structure.

Afin de démontrer les rôles respectifs des protéines Golf et Gs dans l'accumulation d'AMPC induite par la stimulation des récepteurs D1, nous essayons d'obtenir des anticorps dirigés contre G α s et G α olf car leur fixation pourrait bloquer l'activité de l'une ou l'autre protéine et ainsi révéler leur participation respective dans la transduction de certains récepteurs. Les tentatives d'immunisation contre des peptides sélectifs de G α s et G α olf s'étant révélées décevantes, nous avons choisi de préparer ces protéines entières, sous forme recombinante, portant à leur extrémité amino-terminale un enchaînement de 6 histidines qui permet leur purification sur colonne de nickel. Les fragments correspondants aux régions codantes de G α s et G α olf ont été obtenus par PCR à partir d'ADNc de rat, clonés dans le vecteur bactérien d'expression PQE30, et vérifiés par séquençage. Trois protéines ont été ainsi purifiées (G α olf, et les deux formes de G α s résultant de l'épissage alternatif de son ARNm) et injectées à des lapins. L'analyse des sérums est en cours.

Une deuxième approche entreprise pour tenter de démontrer le rôle de G α olf comparativement à G α s vise à éliminer le gène G α olf par recombinaison homologue chez la souris. L'étalement de 4×10^6 clones d'une banque génomique de souris (souche 129) réalisée dans LambdaGEM-12 par J.M. Garnier (laboratoire de P. Chambon) a permis de sélectionner 30 clones hybridant avec une sonde correspondant à la partie codante de G α olf de rat. Trois d'entre eux ont été isolés en raison de leur hybridation avec différentes parties du cDNA G α olf de rat et de la mise en évidence de fragments PCR de même taille que ceux décrits chez le rat. Il reste à vérifier par Southern blot que les fragments de restriction issus de ces clones correspondent bien à ceux qui sont obtenus à partir d'ADN

génomique de souris de même souche. Pour plus de facilité, les fragments de restriction BAM HI de l'un de ces clones viennent d'être introduits dans le plasmide Bluescript II SK+ en vue de réaliser la construction nécessaire à la recombinaison homologe et d'effectuer les vérifications indispensables à sa validité. La transfection des cellules souches embryonnaires ES devrait se faire par la suite en collaboration avec M. Picciotto (Université Yale, New Haven).

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

La DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*) est une protéine capable d'inhiber puissamment la protéine phosphatase 1, lorsqu'elle est phosphorylée sur la thréonine 34. Cette phosphorylation est catalysée par les protéines kinases activées par l'AMPc et le GMPc, alors que la déphosphorylation du même résidu est effectuée par la calcineurine (phosphatase activée par le Ca²⁺). La DARPP-32 est très enrichie dans les neurones striatonigraux au niveau desquels la dopamine, agissant sur des récepteurs D1, augmente sa phosphorylation alors que le glutamate ou la dépolarisation la diminuent. Nos travaux précédents avaient permis d'identifier plusieurs autres sites de phosphorylation possédant un rôle modulateur. La sérine 137 est phosphorylée par la protéine kinase CK1 (anciennement appelée caséine kinase 1) et cette phosphorylation protège la thréonine 34 de la déphosphorylation par la calcineurine. Nous avons montré que la sérine 137 est elle-même déphosphorylée par la phosphatase 2C dans les neurones striatonigraux. Il existe donc une véritable cascade de phosphatases mettant en jeu la DARPP-32 et pouvant réactiver la phosphatase 1 après son inhibition par l'AMPc ou le GMPc : la phosphatase 2C déphosphoryle la sérine 137, rendant la thréonine 34 plus sensible à l'action de la calcineurine.

Plusieurs collaborations ont été entreprises afin de préciser le rôle physiologique de la DARPP-32. 1) La DARPP-32 phosphorylée ou non, a été fournie à Serge Schiffmann (Université Libre de Bruxelles) qui a montré que la DARPP-32 phosphorylée inhibe les courants sodiques voltage-dépendants des neurones striataux en culture, mimant ainsi une grande partie de l'effet de la stimulation des récepteurs dopaminergiques D1 sur ces courants. 2) Dans le laboratoire, l'équipe d'André Chéramy a montré que les effets de la dopamine et de l'amphétamine sur la libération de GABA sont réduits dans le striatum de souris *knock out* déficientes en DARPP-32 produites (souris fournies par Allan Fienberg, laboratoire de Paul Greengard ; Université Rockefeller, New York). Ces diverses données indiquent que l'inhibition de phosphatase par la DARPP-32 rend compte d'une partie significative de l'action de la dopamine sur les récepteurs D1.

3.1.3. *Régulation des tyrosines kinases FAK et PYK2/Cakb* (F. Burgaya, P. Derkinderen, M. Gelman, M. Le Bert, M. Toutant)

Précédemment, nous avons montré qu'une forte stimulation de la phosphorylation de protéines sur tyrosine intervenait lors de la dépolarisation ou de l'appli-

cation de certains neurotransmetteurs dans des tranches d'hippocampe de rat, ou des neurones en culture primaire. Les mécanismes de ces régulations ont été précisés en identifiant certaines de leurs cibles majeures. L'une de ces cibles est pp125-FAK (*focal adhesion kinase*). Plusieurs variants de cette tyrosine kinase, vraisemblablement générés par épissage alternatif, ont été identifiés. L'un d'entre eux, FAK+, est caractérisé par une insertion de 3 acides aminés dans la région carboxy-terminale de la protéine et représente la forme majeure de FAK dans les neurones. Nous avons montré que la phosphorylation de FAK+ est régulée par plusieurs messagers extracellulaires tels que l'anandamide, un ligand endogène des récepteurs cannabinoïdes CB1, l'acide lysophosphatidique, l'acide arachidonique et le carbachol. L'anandamide agit en inhibant l'adénylyl cyclase et en diminuant les taux intracellulaires d'AMPc, alors que les autres substances exercent leur effet en stimulant la protéine kinase C. Par contre, la phosphorylation de PYK2/Cakb (une tyrosine kinase très proche de pp125-FAK également enrichie dans les neurones) n'est pas stimulée par ces agents, alors qu'elle est fortement augmentée lors d'une dépolarisation. Ces résultats obtenus avec des tranches d'hippocampe contrastent avec ceux observés dans les cellules PC12 et révèlent la grande spécificité de la régulation de ces tyrosines kinases dans le tissu nerveux normal.

Lorsque pp125-FAK est autophosphorylée sur tyrosine, elle lie avec une forte affinité des tyrosines kinases de la famille de Src, en particulier c-Src et Fyn. Ces tyrosines kinases phosphorylent pp125-FAK et certaines protéines associées, activant de multiples cascades de signalisation. Pour tenter de préciser les interactions privilégiées que pourraient avoir certains des variants de pp125-FAK avec c-Src, n-Src ou Fyn, la phosphorylation des différentes formes de pp125-FAK par ces trois kinases est en cours d'étude par transfection dans les cellules Cos. D'autre part, des souris transgéniques exprimant dans les neurones une forme activée de n-Src ont été produites afin d'étudier *in vivo* le rôle de n-Src et ses interactions avec pp125-FAK.

3.1.4. *Caractérisation d'une protéine neuronale de 180 kDa susceptible de localiser des protéines de signalisation à la membrane* (F. Arnos, J.-A. Girault, M. Menegoz)

Lors de la caractérisation biochimique de glycoprotéines neuronales de 180 kDa, nous avons purifié, puis cloné, une nouvelle protéine neuronale dont les caractéristiques suggèrent qu'elle pourrait servir de point d'ancrage membranaire à des composants du cytosquelette ou des molécules de signalisation. L'analyse de la séquence de son ADNc a montré qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire proche des neurexines, dont le domaine extracellulaire, fortement glycosylé contient des motifs de type facteur VIII, laminine et EGF. Son court domaine intracellulaire présente une région de forte homologie avec une protéine du globule rouge, la glycophorine C. La protéine de 180 kDa peut par ce domaine

intracellulaire lier une protéine du cytosquelette, la bande 4.1. La localisation de cette protéine et ses interactions possibles avec des tyrosines phosphatases contenant un domaine 4.1 sont en cours d'étude.

3.2. RÔLES DES PHOSPHORYLATIONS ASTROCYTAIRES DANS LES INTERACTIONS NEURO-GLIALES (Responsable de l'équipe : H. Chneiweiss)
(J. Cordier, A. Estelles, M. Kubes, M. Rolli)

Les astrocytes possèdent de nombreux récepteurs de neuro-médiateurs et de neuromodulateurs ou de différents facteurs. La stimulation de ces récepteurs est à l'origine de cascades de réactions intracellulaires et notamment de phosphorylations de protéines. Cette année, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la caractérisation des phosphatases astrocytaires impliquées dans la déphosphorylation de sérines et de thréonines, et nous avons poursuivi l'analyse de PEA-15, une protéine majoritaire des astrocytes précédemment découverte par notre équipe.

Les activités serine/thréonine phosphatases ont été mesurées sur des homogénats de cellules astrocytaires en culture primaire originaires de structures cérébrales d'embryons de souris. La présence des activités de type 1 et 2A (PP1 et PP2A) a pu être mise en évidence mais pas celle des formes 2B (calcineurine) et 2C (dépendante du magnésium). Ces activités de type 1 et 2A sont très voisines de celles mesurées dans des homogénats de cerveau adulte. Plusieurs substrats spécifiques présents dans les astrocytes intacts ont pu être identifiés à l'aide d'inhibiteurs sélectifs. Ainsi, la serine 116 de PEA-15, phosphorylée par la CaMKII, est déphosphorylée par PP2A. Les mécanismes intervenant dans les modulations de l'activité de ces phosphatases dépendantes de signaux extracellulaires sont actuellement recherchés (Malvyne Rolli, Jocelyne Cordier, Hervé Chneiweiss).

PEA-15 est une petite phosphoprotéine acide enrichie dans les astrocytes de l'hippocampe, du cervelet et du cortex cérébral. Elle est un substrat de la protéine kinase C (PKC) et de la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type 2 (CaMKII), ces phosphorylations intervenant sur deux sites distincts. Des médiateurs tels que la noradrénaline (via des récepteurs α de type 1), l'endothéline, le glutamate ou le VIP, modulent le degré de phosphorylation de la protéine. Des approches complémentaires ont été utilisées pour compléter les données déjà obtenues sur les processus de régulation par phosphorylation de PEA 15 et tenter de déterminer sa fonction.

Le clonage de l'ADNc de PEA 15 et l'analyse de sa séquence chez la souris puis chez l'homme ont permis de montrer l'existence chez ces deux espèces de deux messagers (2.4 et 1.7 kbp) ayant 70 à 95 % d'identité. De plus, la partie 3' non traduite du messenger code pour la séquence d'un oncogène préalablement mis en évidence dans des tumeurs mammaires (MAT1). Dans certains cas, la

transfection de MAT1 dans des fibroblastes de la lignée 3T3 provoque leur transformation, alors que celle des messagers complets de PEA-15 est inefficace. Le fragment responsable de la transformation semble contenir plusieurs séquences régulatrices qui pourraient interférer avec des protéines impliquées dans la stabilisation de certains ARNm.

L'analyse de la séquence de PEA 15 a permis de révéler l'existence d'un motif commun avec deux autres protéines (FADD/MORT1 et FLICE/MACH) impliquées dans la transduction intracellulaire des effets du ligand de Fas et du Tumor Necrosis Factor α (TNF α), et en particulier dans l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose). Le multi-alignement entre FADD/MORT1, FLICE/MACH et PEA15, permet de définir un nouveau module protéique, DED, déterminant la dimérisation des molécules ou leurs interactions. De plus, un variant de MACH produit par épissage alternatif et ne contenant que le domaine DED agit comme un inhibiteur de la cascade conduisant à l'apoptose. Selon ces données récentes, PEA-15 pourrait être un effecteur intracellulaire mis en jeu lors de la stimulation des récepteurs de la famille du TNF α , orientant cette cascade vers la voie de l'activation de la protéine NF κ B (Angeles Estelles, Miroslav Kubes, Hervé Chneiweiss).

4. MÉCANISMES INTERVENANT DANS LA RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DES NEUROMÉDIATEURS DANS LES NOYAUX GRIS CENTRAUX

4.1. INTERACTION DE RÉCEPTEURS IMPLIQUÉS DANS LA RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE DOPAMINE ET DE GABA (Responsable de l'équipe : A. Chéramy)

4.1.1. *Analyse des effets de l'acide arachidonique (AA) sur les régulations présynaptiques des libérations de dopamine et de GABA à partir de synaptosomes de striatum de rat*

Plusieurs médiateurs, seuls ou en combinaison, tels que le glutamate, l'acétylcholine, l'ATP stimulent considérablement la formation et la libération d'AA à partir des neurones (essentiellement GABAergiques) ou des cellules gliales (Tencé et *al.*, 1995) du striatum. Ceci nous a conduit à envisager que ce messenger diffusible régule la libération de DA et de GABA car il augmente l'effet facilitateur de certains agonistes des récepteurs présynaptiques métabotropiques du glutamate sur la libération du médiateur des terminaisons glutamatergiques corticales (Herrero et *al.*, 1992).

En utilisant des synaptosomes striataux purifiés de rat nous avons montré précédemment que l'AA (10^{-5} à 10^{-4} M) stimule, de façon concentration-dépendante, la libération spontanée de [3 H]-DA continuellement formée à partir de

[³H]-tyrosine et que cet effet résulte pour une large part d'une activation de la protéine kinase C. Des résultats similaires ont été obtenus sur la libération de GABA à partir de synaptosomes purifiés ou de microdisques de tissu (prélevés dans des zones enrichies en matrice sur des coupes de striatum) préincubés en présence de [³H]-GABA ou de [³H]-glutamine, le précurseur du [³H]-GABA. Toutefois, à faible concentration, l'AA augmente de façon plus prononcée et plus rapide la libération de [³H]-GABA que celle de [³H]-DA. Une activation d'une protéine kinase C est également impliquée dans la libération de [³H]-GABA évoquée par l'AA mais cette réponse n'est réduite que de 50 % par des inhibiteurs de protéine kinase C.

Plusieurs autres observations ont été effectuées : 1) l'AA stimule de façon calcium-dépendante l'efflux de [³H]-DA et de [³H]-GABA (synaptosomes et microdisques de tissu respectivement) 2) l'AA libéré de façon endogène reproduit les effets de l'application d'AA exogène ; en effet, les libérations de [³H]-DA et de [³H]-GABA évoquées par l'action conjointe du NMDA et du carbachol (agoniste mixte muscarinique et nicotinique), traitement qui stimule fortement la libération de l'AA à partir des neurones striataux en culture primaire, sont réduites par la mépacrine (un inhibiteur de la phospholipase A2). 3) Un effet dépolarisant de l'AA sur les synaptosomes a été mis en évidence à l'aide d'un indicateur de variation du potentiel de membrane, un cation lipophile marqué au tritium, le [³H]-TPP+. 4) Le t-ACPD et le quisqualate potentialisent l'effet de l'AA sur la libération de [³H]-DA suggérant la présence de récepteurs métabotropiques glutamatergiques de classe 1 sur les terminaisons dopaminergiques (F. Artaud, A. Chéramy, Godeheu G., M. L'Hirondel).

4.1.2. Hétérorégulations des récepteurs dopaminergiques D2 et D3 des terminaisons dopaminergiques (auto-récepteurs) impliqués dans une régulation inhibitrice de la libération de DA

Certains peptides (cholécystokinine, peptides opiacés, tachykinines, somatostatine ou NPY) présents dans les fibres afférentes glutamatergiques, les terminaisons des neurones efférents GABA-ergiques, ou dans certains interneurons du striatum pourraient moduler selon des voies de signalisation distinctes les récepteurs présynaptiques dopaminergiques localisés sur les terminaisons dopaminergiques ou GABAergiques.

Pour étudier ces phénomènes, les effets d'un agoniste dopaminergique D2, le quinpirole, sur les libérations de [³H]-DA évoquées par le potassium, la 4-aminopyridine et la vératridine ont tout d'abord été comparés afin de choisir le modèle expérimental le plus approprié pour l'étude de la modulation de la sensibilité des autorécepteurs dopaminergiques. Ces expériences ont été effectuées sur des synaptosomes purifiés de striatum de souris car cette préparation s'est révélée particulièrement sensible à différents traitements pharmacologiques. La dépolarisation évoquée par la 4-amino-pyridine s'est révélée la plus efficace pour mettre en évidence une régulation présynaptique inhibitrice de grande amplitude induite

par le quinpirole. Cette réponse est antagonisée par le sulpiride, un antagoniste dopaminergique de type D2. Les actions inhibitrices de divers agonistes D2 ont également été comparées. Des études préliminaires effectuées chez des souris mutantes dépourvues de récepteurs D2 (généreusement fournies par le Docteur E. Borrelli) semblent indiquer que seuls les autorécepteurs D2 (mais pas les autorécepteurs D3) interviennent dans le contrôle inhibiteur présynaptique de la libération de DA (F. Artaud, A. Chéramy, G. Godeheu, M. L'Hirondel).

4.1.3. *Hétérorégulations des récepteurs dopaminergiques D1 des terminaisons GABAergiques (hétérorécepteurs) impliqués dans une régulation facilitatrice de la libération de GABA*

Selon des données récentes, l'anandamide, une molécule ayant une structure voisine de l'AA, est libérée à partir des neurones GABAergiques striataux (Piomelli et al., 1995) et les neurones GABAergiques striato-nigraux possèdent des récepteurs cannabinoïdes de type CB1 couplés négativement à l'adénylate cyclase sensibles à l'anandamide (Herkenham et al., 1991 ; Vogel et al., 1993). Ceci nous a incité à comparer les effets de l'anandamide et de l'AA et à étudier les effets éventuels de l'anandamide sur les réponses présynaptiques médiées par la DA ou certains de ses agonistes.

Selon des données préliminaires, l'anandamide (comme l'AA) stimule la libération de [³H]-DA à partir des synaptosomes du striatum bien que les terminaisons dopaminergiques ne possèdent pas de récepteurs CB 1.

Les terminaisons GABAergiques du striatum possèdent des récepteurs D1 couplés positivement à l'adénylate cyclase ce qui nous a conduit à envisager que la DA et des agonistes des récepteurs cannabinoïdes de type CB1 pouvaient exercer des effets opposés sur la libération de GABA. En utilisant des microdisques de striatum, nous avons d'abord confirmé que la DA, en agissant sur des récepteurs D1, stimule de façon concentration-dépendante la libération de [³H]-GABA et que cet effet est antagonisé par le SCH 23390, un antagoniste D1. Nous avons montré ensuite que la stimulation des récepteurs CB1 par des agonistes spécifiques tels que le WIN 55212-2 et le CP 55,940 inhibe la libération de [³H]-GABA évoquée par la stimulation des récepteurs D1 et que les réponses induites par les agonistes CB1 sont bloquées par le SR141716 A, un antagoniste des récepteurs CB1 (F. Artaud, A. Chéramy, G. Godeheu, M. L'Hirondel).

4.2. ÉTUDE ANATOMIQUE ET FONCTIONNELLE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ DU STRIATUM CHEZ LE RAT

(Responsables de l'équipe : Marie-Lou Kemel et Christian Gauchy)

4.2.1. *Vascularisation et compartiments striataux* (M. Desban, M.L. Kemel, C. Gauchy, F. Blanchet, S. Perez)

Précédemment, nous avons remarqué que la distribution topographique des différents vaisseaux du noyau caudé (chat) ou du striatum (rat) était hétérogène.

En effet, le compartiment matriciel semble être vascularisé par le réseau capillaire alors que le compartiment striosomal est principalement irrigué par les vaisseaux de large diamètre (artérioles) et partiellement par le réseau capillaire. La reconstruction tridimensionnelle de la distribution topographique des larges vaisseaux a révélé une organisation labyrinthique orientée dans les axes rostrocaudal et médiolatéral chez le chat et principalement médiolatéral chez le rat semblables à ce que nous avons pu mettre en évidence pour les réseaux striosomaux chez ces deux espèces. Les échanges classiques régulés par la barrière hémato-encéphalique pourraient donc s'effectuer au niveau du réseau capillaire de la matrice alors que le tissu striosomal riche en artérioles pourrait être soumis à des échanges particuliers avec le milieu sanguin. En effet, selon certaines données de la littérature, un transport vésiculaire de grosses protéines pourrait intervenir au niveau des artérioles cérébrales. Ceci nous a incité à rechercher dans le striatum du rat, la distribution d'une protéine de haut poids moléculaire, la peroxydase de raifort (HRP), injectée par voie intraveineuse.

Vérifiant notre hypothèse, la HRP pénètre uniquement dans les striosomes à la périphérie des vaisseaux de large diamètre et n'est visible qu'à l'intérieur des capillaires dans la matrice. Ces données suggèrent que certains agents pharmacologiques pourraient pénétrer avec plus de facilité dans le tissu striosomal que dans le tissu matriciel.

4.2.2. *Rôle des afférences glutamatergiques dans le contrôle de la libération d'acétylcholine dans les compartiments striataux* (F. Blanchet, M.L. Kemel, C. Gauchy, S. Perez, M. Desban)

En utilisant une stratégie identique à celle développée pour étudier les circuits locaux impliqués dans les régulations directes et indirectes de la libération de dopamine dans les compartiments striataux, précédemment, nous avons entrepris l'étude des effets du NMDA sur la libération de [³H]-ACh préalablement synthétisée à partir de [³H]-choline dans des zones du striatum du rat enrichies en striosomes et en matrice. Ces études avaient été effectuées en présence de sérum albumine afin de faciliter l'analyse des effets des tachykinines sur ces régulations. Nous nous sommes rendus compte que la présence de sérum albumine qui, vraisemblablement, peut éliminer certains messagers diffusibles tels que l'acide arachidonique et le NO, modifie considérablement les réponses induites par le NMDA. Certaines des expériences effectuées précédemment ont donc été reproduites en absence de sérum albumine. Les données comparatives obtenues dans ces deux situations et les mécanismes mis en jeu pour expliquer les différences observées seront décrites ultérieurement.

Effets stimulateurs du NMDA sur la libération de l'ACh dans les compartiments striataux

En l'absence de magnésium, à faible concentration (50µM), le NMDA stimule fortement la libération d'ACh avec une amplitude similaire dans les striosomes

et dans la matrice en agissant sur des récepteurs de type NMDA. Ces réponses sont en effet bloquées par le magnésium, le MK801 (un antagoniste compétitif du récepteur NMDA) ou le 7 chloro-kynurénate (un antagoniste du site glycine). Inversement, un agoniste du site glycine, la D-serine accroît les réponses induites par une faible concentration de NMDA (10 μ M) dans les deux compartiments. Les réponses évoquée par le NMDA qui disparaissent en présence de tétradotoxine résultent d'une activation des interneurons cholinergiques.

Les effets du NMDA sont concentration-dépendants. Toutefois, à la concentration de 1 mM la réponse évoquée par le NMDA est plus importante dans les striosomes (+280 %) que dans la matrice (+150 %). De plus, la co-application de D-serine avec le NMDA (1mM) réduit l'amplitude des réponses, cette réduction étant beaucoup plus prononcée dans les striosomes. Des circuits locaux inhibiteurs pourraient être mis en jeu lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA car ces récepteurs sont présents sur la majorité des populations neuronales du striatum et sur certaines afférences telles que les fibres dopaminergiques. Nous avons donc rechercher les rôles respectifs du GABA et de la dopamine dans ces régulations inhibitrices en utilisant des antagonistes de ces récepteurs. Le NMDA a été utilisé à faible (50 μ M) ou forte (1mM) concentration et dans ce dernier cas, en présence de D-serine.

Rôle facilitateur indirect du GABA sur la libération évoquée de l'ACh

Paradoxalement, la bicuculline, un antagoniste des récepteurs GABA A, réduit la libération d'ACh induite par 50 μ M NMDA dans les deux compartiments striataux et une réduction similaire est observée dans la matrice lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA. Ainsi, le GABA semble exercer un rôle facilitateur sur la libération d'ACh qui résulte de l'effet inhibiteur du GABA sur la libération de dopamine. En effet, les réductions de la libération d'ACh évoquées par le NMDA disparaissent lorsque la transmission dopaminergique est également bloquée sous l'action combinée du SCH23390 et du (-)sulpiride, des antagonistes des récepteurs D1 et D2, respectivement.

Rôle inhibiteur de la dopamine. Intervention préférentielle des récepteurs D2

Le blocage des récepteurs D1 ou/et D2 par le SCH23390 (1 μ M) ou le (-)sulpiride (1 μ M), appliqués seuls ou en combinaison, ne modifie pas la libération d'ACh évoquée par le NMDA (50 μ M). Par contre, en présence de bicuculline (pour éliminer l'action inhibitrice du GABA sur la libération de DA), les antagonistes des récepteurs D1 et D2 potentialisent les réponses induites par le NMDA dans les striosomes et la matrice. Dans la matrice (mais pas dans les striosomes), les effets des antagonistes sont additifs suggérant des mécanismes ou une localisation cellulaire distincts des récepteurs D1 et D2.

Le (-)sulpiride amplifie considérablement la libération d'ACh évoquée par une forte stimulation des récepteurs NMDA (1mM+ D-sérine) dans les striosomes et la matrice alors que le SCH23390 ne provoque pas d'effet significatif. La désin-

hibition induite par le (-)-sulpiride dans la matrice est plus importante que celle observée lors du blocage combiné des récepteurs D2 et D1 suggérant que lors du blocage sélectif des récepteurs D2, la stimulation des récepteurs D1 exerce un effet facilitateur sur la libération d'ACh. Enfin, le (-)-sulpiride ou le SCH 23390 augmentent de façon plus prononcée les réponses induites par le NMDA (1mM+D-serine) dans les striosomes en présence de bicuculline et dans ces conditions une amplification de la réponse est également observée dans la matrice. Dans ce compartiment, la co-application des deux antagonistes induit une désinhibition plus faible de la réponse NMDA que celle observée avec le (-)-sulpiride. Ceci confirme que l'action stimulatrice de la DA sur le récepteur D1 ne peut être détectée que lors du blocage des récepteurs D2. En conclusion, si la stimulation des récepteurs D2 évoquée par la dopamine endogène inhibe toujours la libération d'ACh induite par le NMDA, selon les conditions expérimentales, la stimulation des récepteurs D1 induit un effet inhibiteur ou facilitateur. D'autre part, le contrôle inhibiteur de la DA observé particulièrement lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA est beaucoup plus prononcé dans les striosomes que dans la matrice.

5. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MÉSOCORTICAUX ET MÉSOLIMBIQUES

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

5.1.1. Étude comportementale de l'interaction Noradrénaline/Dopamine et de ses conséquences sur le rôle de l'innervation noradrénergique dans les phénomènes de pharmacodépendance :

L'hyperactivité locomotrice induite par l'amphétamine résulte essentiellement de l'augmentation de la libération de dopamine dans les structures sous-corticales, le noyau accumbens en particulier. Néanmoins, précédemment, nous avons montré que l'injection *in situ* dans le cortex préfrontal d'un antagoniste $\alpha 1$ -adrénergique, le prazosin, bloque l'hyperactivité locomotrice induite par une injection d'amphétamine dans le noyau accumbens (Blanc et al., 1994). Ainsi, la transmission noradrénergique corticale de type $\alpha 1$ -adrénergique semble exercer un rôle permissif sur les effets comportementaux provoqués par une facilitation de la transmission dopaminergique dans le noyau accumbens.

L'amphétamine peut également déclencher des processus de pharmacodépendance. Chez l'homme, ceci se caractérise par un besoin irrésistible de reprendre du produit. Chez le rat, l'injection répétée de doses identiques d'amphétamine provoque une augmentation régulière de l'hyperactivité locomotrice initiale. Cette « sensibilisation comportementale » est également observée avec la plupart des

produits susceptibles de déclencher des pharmaco-dépendances chez l'homme, tels que la cocaïne ou l'héroïne. Cette sensibilisation comportementale semble résulter d'une augmentation de la réactivité des neurones dopaminergiques mésencéphaliques innervant le noyau accumbens, l'augmentation progressive de la libération de dopamine induite par l'amphétamine étant associée au développement de la sensibilisation comportementale. Les récepteurs dopaminergiques D1 semblent jouer un rôle critique dans ces processus et notamment ceux localisés dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) puisque leur blocage par l'antagoniste D1 le SCH23390 empêche le développement de cette sensibilisation (Vézina, 1996). La stimulation de ces récepteurs par la dopamine favoriserait la libération du glutamate impliqué dans l'activation des neurones dopaminergiques méso-limbiques.

Ces différentes observations nous ont incité à rechercher chez le rat si l'innervation noradrénergique corticale pouvait jouer un rôle régulateur sur le processus de sensibilisation comportementale induit par des injections répétées d'amphétamine (4 injections i.p. de 0,5 mg/kg, une tous les trois ou quatre jours). De fait, le blocage des récepteurs $\alpha 1$ adrénergiques abolit l'induction de la sensibilisation comportementale provoquée par l'amphétamine car l'augmentation régulière de l'activité locomotrice induite par l'amphétamine (de 360 % à 770 % des contrôles en quatre sessions) est complètement bloquée chez les animaux ayant reçu une injection de prazosin (i.p. 0,5mg/kg) 30 minutes avant chaque injection d'amphétamine. L'effet du prazosin est réversible car une sensibilisation comportementale peut être induite par l'amphétamine chez ces animaux immédiatement après l'interruption complète des injections de prazosin (Blanc et al., 1996). Des expériences sont en cours pour vérifier que le blocage des récepteurs $\alpha 1$ noradrénergiques localisés dans le cortex préfrontal est effectivement responsable des effets observés.

5.1.2. Rôle des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques dans la cinétique de libération de la dopamine induite par l'amphétamine

Des études de libération effectuées chez le rat chronique avec la technique de microdialyse indiquent que l'amphétamine provoque des libérations phasiques de dopamine et de noradrénaline dans le noyau accumbens et que le blocage des récepteurs $\alpha 1$ noradrénergiques modifie plus les composantes cinétiques de la libération de dopamine que l'amplitude de cette libération.

Chaque animal présente une réactivité différente à l'amphétamine (Piazza et al., 1989). Nous avons pu le vérifier récemment (Blanc et al., 1996) et remarquer que les phénomènes phasiques de libération de dopamine n'étaient pas décelables systématiquement chez tous les animaux. De fait, les libérations phasiques pourraient n'être observées que si les neurones sont activés de façon synchrone car la sensibilité de notre méthode de détection ne permet pas de mesurer l'activation d'une faible population de neurones. Pour tenter de résoudre cette difficulté, nous avons amplifié le signal obtenu dans le noyau accumbens en introduisant en

continu, par contre-dialyse, une faible quantité d'amphétamine ($3 \mu\text{M}$ dans le liquide de perfusion, soit $0,3 \mu\text{M}$ dans la structure). Cette approche a permis de constater que : 1) le niveau de dopamine extracellulaire augmente d'environ 5 fois sous contre-dialyse d'amphétamine sans que le comportement de l'animal soit modifié (son sommeil reste identique sous perfusion). 2) que l'injection systémique d'amphétamine ($0,5 \text{ mg/kg}$, i.p.) ne modifie que peu le niveau moyen de quantité de dopamine extracellulaire, mais qu'elle double les variations (erreur standard) de ces taux mesurés chaque minute et, 3) que l'injection préalable de prazosin fait disparaître les variations des taux extracellulaires de dopamine induites par l'injection systémique d'amphétamine. Ainsi, l'effet inhibiteur du prazosin sur l'hyperactivité locomotrice induite par l'amphétamine ne résulterait pas d'une diminution de la libération moyenne de dopamine dans le noyau accumbens mais d'une désynchronisation des variations rapides et importantes induites par l'amphétamine (libération phasique). La transmission noradrénergique corticale pourrait jouer un rôle permissif sur les processus de cette synchronisation (libération phasique) (L. Darracq, G. Blanc, J.P. Tassin).

5.1.3. Étude de l'action d'un antidépresseur inhibiteur spécifique de la recapture de sérotonine (ISRS) sur les taux extracellulaires de noradrénaline, dopamine et sérotonine dans le cortex préfrontal chez le rat

Depuis quelques années une nouvelle classe d'antidépresseurs présentant moins d'effets secondaires que les tricycliques est apparue. Il s'agit d'inhibiteurs spécifiques de la recapture de sérotonine (ISRS) susceptibles d'augmenter essentiellement la transmission sérotoninergique. En utilisant la technique de microdialyse, nous avons constaté que la fluoxétine (de 5 à 20 mg/kg , i.p.), un inhibiteur de la recapture de la sérotonine, augmente paradoxalement la quantité extracellulaire de noradrénaline sans affecter celle de sérotonine. Cet effet pouvant provenir d'une action de la sérotonine sur les autorécepteurs 5-HT_{1A} des corps cellulaires sérotoninergiques du raphé, la fluoxétine a été introduite par contre-dialyse dans le cortex frontal afin d'éviter les effets résultant de la libération des monoamines au voisinage des corps cellulaires. En faisant varier la concentration de fluoxétine (3 à $50 \mu\text{M}$), nous avons constaté que cette substance évoquait des augmentations beaucoup plus importantes des taux de noradrénaline extracellulaire (de 400 à $2\,000\%$) que de ceux de la sérotonine (170 à 300%). Cet effet suggère que la fluoxétine peut paradoxalement bloquer faiblement la recapture de noradrénaline et que dans ces conditions les fortes variations des taux extracellulaires résultent du niveau élevé de l'activité des neurones noradrénergiques chez l'animal vigile (L. Darracq, G. Blanc, J.P. Tassin).

5.2. ÉTUDES ELECTROPHYSIOLOGIQUES ET ANATOMIQUES

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

5.2.1. *Étude anatomo-fonctionnelle des relations entre le cortex préfrontal et les ganglions de la base*

Circuit reliant les aires prélimbique et orbitaire médiane et le noyau accumbens

Le cortex cérébral et les ganglions de la base sont reliés par des circuits multi-synaptiques striato-pallido – et striato-nigro-thalamiques organisés en boucles. L'architecture de ces circuits est essentiellement parallèle, les afférences issues de régions corticales fonctionnellement distinctes innervant des territoires différents du striatum. Cette ségrégation fonctionnelle est préservée au niveau des circuits efférents du striatum vers le segment interne du pallidum, la substance noire pars reticulata (SNR) et secondairement le thalamus. Le striatum est relié à la SNR par une voie directe et une voie indirecte faisant intervenir le segment externe du pallidum et le noyau subthalamique. Si les règles d'organisation des circuits issus du cortex sensori-moteur sont bien établies, il n'en était pas de même en ce qui concerne les circuits issus du cortex préfrontal. Les relations entre le CPF et les ganglions de la base ont donc été caractérisées chez le rat.

Les données anatomiques et électrophysiologiques obtenues ont permis d'établir que les aires prélimbique et orbitaire médiane (PL/MO) du CPF projettent sur une région délimitée du striatum ventral, le « core » du noyau accumbens (NAcc). Cette région du NAcc innerve par une voie directe et l'autre indirecte (via le pallidum ventral et le subthalamus) la zone dorso-médiane de la SNR. La région dorsomédiane de la SNR impliquée dans ce circuit PL/MO qui finalement relie le noyau médiodorsal du thalamus (MD) au CPF a été également déterminée. Comme le circuit sensorimoteur, ce circuit PL/MO fonctionne selon un processus de désinhibition. L'activation par le CPF des neurones GABAergiques du NAcc qui projettent à la SNR induit une inhibition de l'activité des neurones nigro-thalamiques GABAergiques provoquant ainsi une désinhibition au niveau thalamique. Celle-ci aurait pour conséquence d'augmenter l'excitabilité des neurones cibles corticaux.

Caractéristiques du circuit PL/MO : un circuit en partie fermé

Nous nous sommes également proposés d'étudier si le circuit PL/MO était ouvert ou fermé au niveau du CPF. Une injection de biocytine, un marqueur antérograde, a tout d'abord été réalisée dans un site où les neurones du CPF répondent par une excitation lors de l'activation de la voie MD-CPF afin de déterminer les cibles corticales et sous-corticales de ces neurones. Ensuite les neurones du CPF présentant une réponse excitatrice lors de la stimulation du MD ont été identifiés par la méthode d'activation antidromique. Ces données indiquent que la majorité des neurones du CPF qui reçoivent une afférence excitatrice du MD innervent les aires PL/MO ipsi- et contralatérales et le cortex agrulaire

insulaire (région du CPF latéral en relation avec les aires PL/MO), et qu'une proportion relativement importante de ces neurones projette sur la région « core » du NAcc. En conclusion, le circuit striato-nigro-thalamique issu des aires PL/MO est en partie fermé au niveau cortical, en effet les neurones du CPF qui reçoivent une influence excitatrice de la région du MD impliquée dans ce circuit innervent en retour le « core » du NAcc ainsi que les aires corticales (PL/MO ipsi- et controlatérales et agrulaire insulaire) qui projettent sur le core du NAcc (S. Van der Linden).

Le noyau subthalamique : une structure d'entrée des ganglions de la base

Comme indiqué ci-dessus, le noyau subthalamique est impliqué dans les circuits indirects qui relient le striatum à la SNR. De plus, ce noyau qui reçoit également des afférences corticales directes peut être aussi considéré comme une structure d'entrée des ganglions de la base au même titre que le striatum. L'existence d'une projection directe du CPF sur la région médiane du noyau subthalamique venant d'être décrite, la caractérisation de cette voie a été poursuivie et nous avons recherché l'existence d'un lien fonctionnel entre le CPF et la SNR via la projection directe du CPF sur le subthalamus. Après injection de la WGA-HRP dans la région médiane du subthalamus, les neurones marqués rétrogradement dans les aires PL/MO sont principalement localisés dans la couche V. En accord avec ces données anatomiques, les neurones du CPF activés antidromiquement par la stimulation du noyau subthalamique sont principalement localisés dans la couche V du CPF. Le temps de conduction de la voie qui relie le CPF au subthalamus est faible (la latence moyenne des réponses antidromiques : 5 ms).

D'autre part, après injection de biocytine, un marqueur antérograde dans la région médiane du subthalamus, les fibres marquées antérogradement sont localisées dans la région dorsomédiane de la SNR. La stimulation du CPF induit une réponse excitatrice à courte latence sur les neurones du subthalamus identifiés par la méthode d'activation antidromique comme projetant à la région médiane de la SNR. Ces données confirment l'existence d'un lien fonctionnel entre le CPF et la SNR via la voie directe cortico-subthalamique. Les neurones du subthalamus qui innervent la SNR étant glutamatergiques, l'effet exciteur exercé par le CPF sur ces neurones a vraisemblablement pour conséquence une augmentation de l'activité des cellules de la SNR. Le CPF en activant les neurones subthalamo- et striato-nigraux exerce des effets opposés, respectivement exciteur et inhibiteur sur les neurones de la SNR (N. Maurice).

L'ensemble de cette étude a été réalisée en collaboration avec J.M. Deniau (Université Paris VI).

5.1.2. Analyse électrophysiologique de l'interaction entre les récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques et D1 dopaminergiques corticaux

La stimulation électrique de l'ATV provoque une inhibition de l'activité des cellules pyramidales du cortex préfrontal chez le rat. Cette inhibition n'est plus

visible lorsque les cellules dopaminergiques de l'ATV ont été sélectivement détruites ou lorsque la transmission dopaminergique corticale est bloquée par certains neuroleptiques, tel que le sulpiride, un antagoniste spécifique des récepteurs D2 mais par les antagonistes D1 (Thierry *et al.*, 1986). Cependant, d'autres antagonistes des récepteurs D2, comme l'halopéridol, la levomépromazine ou le palmitate de pipotiazine n'ont pas d'effet sur cette inhibition (Godbout *et al.*, 1990). Les neuroleptiques inactifs sur cette inhibition présentent la caractéristique d'être également des antagonistes puissants des récepteurs α 1-adrénergiques suggérant que cette propriété pourrait être responsable de l'inactivité de ces neuroleptiques.

Des études biochimiques et comportementales effectuées par le groupe de J.P. Tassin ont montré l'existence d'une interaction fonctionnelle entre l'effet de la stimulation des récepteurs dopaminergiques de type D1 et celle des récepteurs α 1-adrénergiques au niveau cortical. En effet, l'hyperactivité locomotrice induite par une injection d'amphétamine dans le noyau accumbens (structure cible du CPF) est bloquée par l'administration locale d'amphétamine au niveau du CPF ainsi que par l'injection locale (CPF) ou périphérique de prazosin un antagoniste des récepteurs α 1-adrénergiques. Au contraire, cette hyperactivité locomotrice est augmentée après injection locale de SCH 23390 un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1 alors qu'elle n'est pas affectée après injection de sulpiride un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2.

Ces diverses données ne permettent pas de préciser si l'interaction entre les systèmes dopaminergique et noradrénergique intervient au niveau cortical ou sous-cortical. Nous avons donc recherché chez le rat anesthésié, l'existence éventuelle d'une interaction entre les récepteurs α 1-adrénergiques et la transmission dopaminergique au niveau du CPF. Administré par voie intraveineuse ou appliqué par iontophorèse au niveau des cellules du CPF, le prazosin bloque dans la majorité des cas la réponse corticale inhibitrice induite par la stimulation de l'aire tegmentale ventrale.

Les effets de l'application iontophorétique d'un antagoniste D1 (SCH 23390) ainsi que celle d'un antagoniste D2 (sulpiride ou raclopride) sur les neurones du CPF ont également été étudiés après l'administration systémique de prazosin. Dans tous les cas, l'application de ces antagonistes dopaminergiques des récepteurs D1 ou D2 restaure l'effet inhibiteur induit par la stimulation de l'aire tegmentale ventrale. Rappelons que, chez des animaux non traités avec le prazosin, l'application iontophorétique de sulpiride ou de raclopride bloque l'effet inhibiteur induit par la stimulation de l'aire tegmentale ventrale alors que l'application de SCH 23390 est sans effet ou prolonge légèrement la durée de l'inhibition. Nos données montrent donc que le blocage des récepteurs α 1-adrénergiques fait disparaître l'inhibition médiée par les récepteurs D2 et que cette inhibition est rétablie si l'on bloque les récepteurs D1 ou les récepteurs D2. En conclusion, au niveau du CPF, une interaction complexe existe entre les récepteurs α 1-adrénergiques et la transmission dopaminergique mettant en jeu les récepteurs D1

et D2. De fait dans des conditions normales, la stimulation des récepteurs D1 pourrait exercer un rôle permissif sur l'inhibition provoquée par la stimulation des récepteurs D2 et la noradrenaline en agissant sur des récepteurs $\alpha 1$ faciliterait la transmission D1. En conséquence, le blocage des récepteurs $\alpha 1$ adrénérgiques en diminuant les effets de la transmission D1 s'opposerait aux effets inhibiteurs provoqués par la stimulation des récepteurs D2 (Y. Gioanni, A.M. Thierry et J.P. Tassin).

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).

H.C. HEMMINGS, F. DESDOITS & 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).

I. MAREY-SEMPER, M. GELMAN & M. LEVI-STRAUSS, *A selective toxicity toward cultured mesencephalic dopaminergic neurons is induced by the synergistic effects of energetic metabolism impairment and NMDA receptor activation*. (J. Neurosci. 15, n° 9, 5912-5918, 1995).

Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY & J. GLOWINSKI, *Involvement of septide-sensitive tachykinin receptors in inositol phospholipid hydrolysis in the rat urinary bladder*. (Peptides, 16, n° 4, 587-594, 1995).

R. WILLIAMS, N. MURPHY, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Glucose regulates glutamate-evoked arachidonic acid release from cultured striatal neurons*. (J. Neurochem., 65, n° 1, 363-372, 1995).

D. HERVE, M. ROGARD & M. LEVI-STRAUSS, *Molecular analysis of the multiple Golf α subunit mRNAs in the rat brain*. (Mol. Brain Research, 32, 125-134, 1995).

F. BURGAYA, A. MENEGON, M. MENEGOZ, F. VALTORTA & J.A. GIRAULT, *Focal adhesion kinase in rat central nervous system*. (Eur. J. Neurosci., 7, 1810-1821, 1995).

L. VENANCE, D. PIOMELLI, J. GLOWINSKI & C. GIAUME, C., *Inhibition by anandamide of gap junctions and intercellular calcium signalling in striatal astrocytes*. (Nature, 376, 590-594, 1995).

O. VALDENNAIRE, P. VERNIER, M. MAUS, E. DUMAS MILNE & J. MALLET, *Transcription of the rat dopamine-D2-receptor gene from two promoters*. (Eur. J. Biochem., 220, 577-584, 1995).

B. CHAMAK, A. DOBBERTIN & M. MALLAT, *Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain.* (Neuroscience, 69, 177-187, 1995).

T. JAY, J. GLOWINSKI & A.M. THIERRY, *Inhibition of hippocampoprefrontal cortex excitatory responses by the mesocortical DA system.* (NeuroReport, 6, 1845-1848, 1995).

S. PIROT, J. GLOWINSKI & A.M. THIERRY, *Excitatory responses evoked in prefrontal cortex by mediodorsal thalamic nucleus stimulation: influence of anaesthesia.* (EJP, 285, 45-54, 1995).

L. THEODORE, D. DEROSI, G. CHASSAING, B. LLIRBAT, M. KUBES, P. JORDAN, H. CHNEIWEISS, P. GODEMENT & A. PROCHIANTZ, *Intraneuronal delivery of protein kinase C pseudosubstrate leads to growth cone collapse.* (J. Neurosci., 15 (11), 7158-7167, 1995).

G. CANCEL, G. STEVANIN, A. DÜRR, H. CHNEIWEISS, C. PENET, Y. POTHIN, Y. AGID & A. BRICE, *SCA2 is not a major locus for ADCA Type I in french families.* (Am. J. Medical Genetics, 60, 382-385, 1995).

G. CANCEL, N. ABBAS, G. STEVANIN, A. DÜRR, H. CHNEIWEISS, C. NERI, C. DUYCKAERTS, C. PENET, H.M. CANN, Y. AGID & A. BRICE, *Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus.* (Am. J. Hum. Genetics, 57, 809-816, 1995).

P. MARIN, M. MAUS, J. BOCKAERT, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Oxygen free radicals enhance the nitric oxide-induced covalent NAD⁺-linkage to neuronal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.* (Biochem. J., 891-898, 1995).

S. HALPAIN & J.A. GIRAULT, *The use of brain slices to study protein phosphatase regulation and function.* (Neuroprotocols, 6, 46-55, 1995).

F. DESDOUITS, D. COHEN, A.C. NAIRN, P. GREENGARD & J.A. GIRAULT, *Phosphorylation of DARPP-32, a dopamine — and cAMP-regulated by phosphoprotein by casein kinase I in vitro and in vivo.* (J. Biol. Chem., 270, 8772-8778, 1995).

F. DESDOUITS, J.J. CHEETHAM, H.C. HUANG, Y.G. KWON, E.F. DA CRUZ e SILVA, P. DENEFLÉ, M.E. EHRLICH, A.C. NAIRN, P. GREENGARD & J.A. GIRAULT, *Mechanism of inhibition of protein phosphatase 1 by DARPP-32: studies with recombinant DARPP-32 and synthetic peptides.* (Biochem. & Biophys. Res. Communic., 206 n° 2, 652-658 (1995).

M. MENEGOZ, L.F. LAU, D. HERVE, L. HUGANIR & J.A. GIRAULT, *Tyrosine phosphorylation of NMDA receptor in rat striatum: effects of 6-OH-dopamine lesions.* (Neuroreport, 7 n° 1, 125-128, 1995).

J.P. TASSIN, F. TROVERO, P. VEZINA, G. BLANC, J. GLOWINSKI, & D. HERVE, *L'hétéro-régulation des récepteurs ou la présence d'une relation fonctionnelle entre deux ensembles neuronaux.* (Medecine/Science, n° 11, pp. 829-836, 1995).

D. HERVE, *Role of GTP-binding proteins, Gs and Golf in the regulation of dopamine D1 receptor responsiveness.* (In : Molecular and Cellular Mechanisms of the Neostriatal Function, Éd. M.A. Ariano & J. Surmeier, Landes Co, chap. 9, pp. 111-127, 1995).

J. GLOWINSKI, *The « septide-sensitive » tachykinin receptor : still an enigmatic story.* (TIPS, 16, 365-367, 1995).

J.P. TASSIN, *Schizophrénie et neurotransmission* (In : « La schizophrénie, recherches culturelles et perspectives », éd. J. Dalevy et T. D'Amato, Masson, Paris, chap. 6, pp. 153-174, 1995).

M.F. MONTARON, J.M. DENIAU, A. MENETREY, J. GLOWINSKI & A.M. THIERRY, *Prefrontal cortex inputs of the nucleus accumbens-nigro-thalamic circuit.* (Neuroscience, 71 n° 2, 371-382, 1996).

A. TABERNO, C. GIAUME & J.M. MEDINA, *Endothelin-1 regulates glucose utilisation in cultured astrocytes by controlling intercellular communication through gap junctions.* (Glia, 16 n° 3, 187-195, 1996).

A. CHERAMY, G. GODEHEU, M. L'HIRONDEL & J. GLOWINSKI, *Cooperative contributions of cholinergic and NMDA receptors in the presynaptic control of dopamine release from synaptosomes of the rat striatum.* (JPET, 276 n° 2, 616-625, 1996).

S. DESAGHER, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity.* (J. Neurosci., 16, n° 8, 2553-2562, 1996).

F. BURGAYA & J.A. GIRAULT, *Cloning of focal adhesion kinase, pp125FAK, from rat brain reveals multiple transcripts with different patterns of expression.* (Mol. Brain Res., 37 (1,2), 63-73, 1996).

F. GRAY & M. MALLAT, *Lésions du système nerveux central liées au virus de l'immunodéficience humaine.* (Médecine Thérapeutique, 2 (HS) pp. 49-60, 1996).

J.P. TASSIN & N. WITKOWSKI, *Cannabis : un stupéfiant à démystifier.* (La Recherche, n° 287, pp. 28-29, 1996).

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

J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, C. GIAUME, J. PREMONT, *Modulations by neurotransmitters and/or arachidonic acid of astrocyto-astrocytic or astrocyto-neuronal interactions in the striatum.* Fourth IBRO World Congress of Neuroscience, Kyoto, Japon 09-14/07/95.

C. CALVO, M. MALLAT, *Production of macrophage chemotactic protein-1 by rat glial cells* 1995 Conf. Biologie cérébro-vasculaire, Le Carré des Sciences, Paris, 10-12/07/95.

J. GLOWINSKI, *Hopes and difficulties in the field of psychopharmacology XV* World congress of social Psychiatry, Rome, 01-05/09/95.

J. GLOWINSKI, *Pharmacological characterization of central and peripheral tachykinin receptors*. 8th Cambridge Symposium, 12-13/09/95, Cambridge, UK.

J.A. GIRAULT, *Protein tyrosine phosphorylation in CNS neurons : relationships with classical neurotransmission*. 8th Cambridge Symposium, 12-13/09/95, Cambridge, UK.

J. GLOWINSKI, *Relations astrocyto-neurales dans le striatum. Intervention dans la transmission glutamatergique*. Colloque B. Droz, Fondation Mérieux, Annecy, 05-07/10/95.

B. HAMON, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Effets inhibiteurs de la nicotine sur des courants voltage-dépendants dans des neurones striataux de rat in vitro.. 6:ze Colloque Canaux Ioniques, La Londe les Maures, 28-30/09/95.*

C. GAUCHY, M.L. KEMEL, M. DESBAN, S. PEREZ, J. GLOWINSKI, *Evidence for the existence of « septide-sensitive » tachykinin receptors involved in a presynaptic regulation of dopamine release in the rat striatum*. Tachykinins'95, Florence, 16-18/10/95.

M. TENCE, S. DESAGHER, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *Endothelin stimulates the hydrolysis of phosphatidylcholine by phospholipase D in mouse striatal astrocytes*. Society for Neuroscience, San Diego, 11-16/11/95.

L. VENANCE, N. STELLA, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Activation of phospholipase C is a necessary step for propagation of intercellular calcium signaling in cultured astrocytes*. Society for Neuroscience, San Diego, 11-16/11/95.

J.F. BECHBERGER, C.G.G. NAUS, C. GIAUME, L. VENANCE, S.C. JUNEJA, G.M. KIDDER, *Functional characterization of astrocytes deficient in connexin 43*. Society for Neuroscience, San Diego, 11-16/11/95.

A. ESTELLES, M. YOKOYAMA, F. NOTHIAS, M. KUBES, J. GLOWINSKI, P. VERNIER, H. CHNEIWEISS, *Cloning of the cDNAs encoding the major astrocytic phosphoprotein PEA-15 : sequence analysis and tissue distribution*. Society for Neuroscience, San Diego, 11-16/11/95.

A. ESTELLES, M. KUBES, M. YOKOYAMA, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *Phosphorylation of PEA-15 regulates its interaction with microtubules in astrocytes*. 9th International Conf. Second Messengers & Phosphoproteins, Nashville, nov. 95.

J. GLOWINSKI, « De la Neurobiologie à la Psychiatrie » Les Nouveaux Champs de la Dépression, Paris, 24/11/95.

F. BURGAYA, A. MENEGON, M. MENEGOZ, F. VALTORTA, J.A. GIRAULT, *Focal adhesion kinase in the central nervous system*. Thirty-fifth Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington, 09-12/12/95.

J. GLOWINSKI, *Astrocytes : privileged targets of endothelins*. Second European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Arcachon, 21-25/04/96.

M. TENCE, S. DESAGHER, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *Endohelin stimulates phospholipase D in mouse striatal astrocytes*. Second European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Arcachon, 21-25/04/96.

S. DESAGHER, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Astrocytes protect neurones from hydrogen peroxide toxicity*. Second European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Arcachon, 21-25/04/96.

A. DOBBERTIN, M. MALLAT, *Influence of neurons on macrophage proliferation*. Second European Meeting on Glial Cell Function in Health and Disease, Arcachon, 21-25/04/96.

C. GIAUME, L. VENANCE, *Mechanism and regulation of intercellular calcium signaling in cultured astrocytes*. Int. Symp. Gap Junction in the Nervous System, Allemagne, 03-07/05/96.

L. DARRACQ, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Minute by minute sampling in microdialysis : differential effets on dopamine levels and behaviour of amphetamine adminisered locally or systemically*. « Neurochemistry and pharmacology of drug addiction and alcoholism » Saint-Petersburg, 08-10/06/96.

J.A. GIRAULT, Les protéines phosphatases : structure et régulation. « Phosphorylation des protéines » Sté Franç. Bioch. Biol. Molec., Dourdan, 9-11/06/96.

F. BURGAYA, M. TOUTANT, J.A. GIRAULT, *Une forme de pp125FAK exprimée préférentiellement dans le système nerveux central du rat*. « Phosphorylation des protéines » Sté Franç. Bioch. Biol. Molec., Dourdan, 9-11/06/96.

M. TOUTANT, F. BURGAYA, P. DERKINDEREN, J.A. GIRAULT, *L'anandamine stimule la phosphorylation de pp125FAK dans le système nerveux central du rat* « Phosphorylation des protéines » Sté Franç. Bioch. Biol. Molec., Dourdan, 9-11/06/96.

M. LE BERT, M. TOUTANT, J. A. GIRAULT, *Expression d'une forme activée de la tyrosine kinase n-Src dans les neurones de souris transgéniques*. « Phosphorylation des protéines » Sté Franç. Bioch. Biol. Molec., Dourdan, 9-11/06/96.

LISTE DES DIPLÔMÉS — 1995-1996

MAREY-SEMPER Isabel :

Analyse moléculaire et cellulaire de la mutation weaver de la souris.
Thèse de Doctorat d'État de l'Université Paris 6 soutenue le 12 décembre 1995.

VENANCE Laurent :

Régulation de la perméabilité des jonctions communicantes et signaux calciques intercellulaires entre les cellules gliales du système nerveux central.
Thèse de Doctorat d'État de l'Université Paris 6 soutenue le 30 avril 1996.

BLANCHET Fabienne (sous la direction de M.L. Kemel et C. Gauchy) :

Régulation de la libération de l'acétylcholine impliquant les récepteurs guta-

matériques de type NMDA dans les deux compartiments du striatum : rôle des peptides de la famille des tachykinines.

DEA en Pharmacochimie moléculaire, pharmacologie expérimentale et métabolisme, Université René Descartes, Sept. 1995.

DARRACQ Laurent (sous la direction de J.P. Tassin) :

Analyse en microdialyse des libérations de catécholamines évoquées par l'amphétamine dans le cortex préfrontal et le noyau accumbens.

DEA de Neurosciences, Université P. et M. Curie, Paris VI, sept. 1995.

MAURICE Nicolas (sous la direction de A.M. Thierry) :

Rôle du pallidum ventral dans les relations entre le cortex préfrontal et les ganglions de la base.

DEA de Neurosciences, Université P. et M. Curie, Paris VI, sept. 1995.

DERKINDEREN Pascal (sous la direction de J.A. Girault) :

Effets de l'anandamide sur la phosphorylation de protéines sur tyrosine dans les neurones du rat.

DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Option Neurobiologie, Univ. P.M. Curie, Paris VI, sept. 1995.