

## Neuropharmacologie

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

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

### SÉMINAIRES

#### *TOXICOMANIES : BASES NEUROBIOLOGIQUES DE LA PHARMACODÉPENDANCE*

(sous le haut patronage du Secrétariat d'État à la Recherche)

- Jean ROSSIER (ESCPI, Paris) : Introduction.
- Brigitte KIEFFER (UPR 9050 CNRS, Illkirch) : Récepteurs opiacés et pharmacodépendance : approches génétiques.
- Bruno GIROS (INSERM U.288, CHU Pitié, Paris) : Validation d'un modèle animal hyperdopaminergique pour l'étude des effets de la cocaïne et d'autres drogues addictives pour l'homme.
- Bernard ROQUES (INSERM U.266, Paris) : Exploration biochimique des mécanismes de la dépendance opioïde : utilisation des modèles de souris transgéniques et d'inhibiteurs des enzymes du métabolisme des enképhalines.
- Philippe SOUBRIE (SANOFI, Montpellier) : Propriétés d'un antagoniste d'un récepteur central du cannabis (CB1).
- Philippe JEAMMET (Hôpital International de l'Université de Paris) : Discussion du concept d'addiction : est-il possible d'individualiser des dimensions psychologiques communes aux conduites addictives ?
- Louis STINUS (UMR 5541 CNRS, Bordeaux) : Dépendance des opiacés : implication des neurones noradrénergiques et aspects thérapeutiques.

— Jean-Pol TASSIN (INSERM U.114, Paris) : Le rôle des interactions noradré-  
naline-dopamine dans les processus de pharmaco-dépendance.

— Jacques VIGNON (INSERM U.336, Montpellier) : Effets de la N-[1-(2-benzo  
(b)thiophenyl)cyclohexyl]piperidine (BTCP) et de la cocaïne sur la concentration  
extracellulaire de dopamine dans le striatum de rat. Une étude par microdialyse  
répétée au cours de traitements chroniques.

— Pier Vincenzo PIAZZA (INSERM U.259, Bordeaux) : Bases neurobiolo-  
giques de la pharmacodépendance.

— Marie Jo BESSON (Univ. Paris VI) : Comparaison des effets de la nicotine  
et de la cocaïne sur l'expression de proto-oncogènes et de peptides dans le  
cerveau du rat.

— Jacques GLOWINSKI (Collège de France, Paris) : Conclusion.

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. *Production de cytokines à effets mitogènes sur les macrophages  
dans le SNC du rat*

Précédemment, nous avons montré que des neurones du cortex cérébral de rats  
cultivés *in vitro* sécrètent du TGF $\beta$ 2, et que cette cytokine augmente la réponse  
mitogène de macrophages exposés à du M-CSF, un facteur de croissance lui-  
même produit par les astrocytes en culture. Cette année nous avons précisé  
certaines des modalités de la production *in vivo* ou *in vitro* de ces deux cytokines.

Suite à des analyses immunocytochimiques révélant *in situ* la présence de  
TGF $\beta$ 2 dans des corps cellulaires neuronaux, nous avons démontré la synthèse  
neuronale de TGF $\beta$ 2 par la détection des transcrits correspondants dans des  
coupes de cortex cérébral de rats âgés d'une semaine. Les analyses par hybri-  
dation *in situ* ont révélé une accumulation préférentielle des transcrits au niveau  
des couches II et IV du cortex cérébral. Parallèlement, une technique immuno-  
enzymatique (ELISA) nous a permis de mettre en évidence du M-CSF dans des  
extraits de cortex cérébraux prélevés sur des animaux à différents stades du  
développement. Dans cette structure, le M-CSF est détectable depuis le 17<sup>e</sup> jour  
de vie embryonnaire jusqu'à l'âge adulte. Au cours de l'ontogénèse, les concen-

trations de M-CSF estimées en fonction de la teneur protéique des tissus, ne varient que très faiblement (entre 2 et 5 pg de M-CSF par mg de protéines tissulaires).

Les cultures *in vitro* de neurones cérébrocorticaux nous ont permis d'aborder l'étude de la régulation de la production neuronale de TGF $\beta$ 2. Les taux de TGF $\beta$ 2 sécrétés par les neurones ont été évalués par dosage ELISA de la cytokine. Il est apparu que les neurones libèrent spontanément du TGF $\beta$ 2 dans leur milieu de culture. De plus, les quantités accumulées sur une période de 48 heures sont augmentées (50 % environ) lorsque les récepteurs glutamatergiques de type NMDA sont bloqués par l'incorporation dans les cultures d'inhibiteurs compétitifs ou non compétitifs (APV, MK801) indiquant notamment que le glutamate est libéré dans nos conditions expérimentales. Réciproquement, l'addition d'agonistes des récepteurs AMPA (AMPA et acide kainique) dans les cultures provoque une réduction significative des taux de TGF $\beta$ 2, selon un mécanisme indépendant de l'activité endogène responsable de l'activation des récepteurs NMDA. Une réduction similaire peut également être observée lors du traitement des neurones par un autre agent dépolarisant, le chlorure de potassium. Ces résultats suggèrent que la transmission glutamatergique exerce un rôle inhibiteur sur la sécrétion neuronale de cytokines (A. Dobbertin, M. Gelman).

#### 1.1.2. *Production intracérébrale d'agents chémoattractifs actifs sur les macrophages*

Nous avons montré précédemment que les cellules gliales peuvent produire des facteurs exerçant un effet chémoattractif sur des macrophages. Ainsi, par leur production de M-CSF, les astrocytes exercent un effet chémoattractif local sur les macrophages cérébraux. Par ailleurs, en utilisant un modèle de lésion à l'acide kainique chez le rat adulte nous avons également montré que l'expression de la protéine MCP-1 par les cellules gliales réactives constitue une des réponses cellulaires précoces et que la chémokine MCP-1 intervient dans le mécanisme de chémoattraction des monocytes sanguins vers le SNC.

Une des conséquences de la lésion est la fragilisation de la barrière hémocéphalique permettant alors le passage vers le SNC de composants sériques normalement exclus. Nous avons observé que l'albumine sérique peut induire l'expression de MCP-1 dans les cellules gliales favorisant ainsi une amplification de l'effet chémoattractif. Les mécanismes responsables des effets propres de l'albumine ou de lipides associés restent à déterminer.

Par ailleurs, l'analyse de milieux conditionnés de cellules de cortex cérébral embryonnaire de rat nous a permis de montrer la présence d'une activité chémoattractif active sur des macrophages. Cette activité, distincte du MCP-1 et du CSF-1, pourrait être à l'origine de l'infiltration des précurseurs macrophagiques dans le SNC, au cours du développement. (C-F. Calvo, M. Gelman).

## 2. RÉGULATION DES SYSTÈMES DE TRANSDUCTION ASSOCIÉS À 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

Nous avons récemment démontré que le glutamate réduisait la synthèse protéique (50 % environ) dans des neurones en culture issues du cortex cérébral de l'embryon de la souris. La phosphorylation d'un facteur d'élongation des protéines, eEF2, est impliquée dans cet effet inattendu du glutamate. Cette phosphorylation résulte de l'activation d'eEF2 kinase, une kinase activée par le complexe calcium-calmoduline et ayant pour seul substrat connu eEF2. Ainsi, en stimulant des récepteurs canaux (NMDA et AMPA), le glutamate augmente la concentration de calcium intracellulaire ce qui conduit à un accroissement du taux de la forme phosphorylée (inactive) d'eEF2. Cette inhibition de la synthèse protéique en réponse au glutamate pourrait protéger les neurones des effets neurotoxiques provoqués par une application prolongée de cet acide aminé. En effet, une inhibition quasi totale de la synthèse protéique, induite par la toxine diphérique qui modifie spécifiquement (et inactive) eEF2 (ADP-ribosylation) ou le cycloheximide, diminue sensiblement les effets neurotoxiques de concentrations sous-maximales de glutamate (P. Marin).

#### 2.1.2. Effets neuroprotecteurs du pyruvate et d'autres $\alpha$ cétoacides vis-à-vis de la toxicité induite par l'eau oxygénée

Les neurones du striatum (ou du cortex cérébral) sont très sensibles à l'eau oxygénée. Cette sensibilité particulière est renforcée par leur faible capacité à éliminer cet agent toxique essentiellement par l'action de la glutathion peroxydase et à réduire le glutathion. Nous avons démontré que les astrocytes exercent un effet neuroprotecteur très important vis-à-vis de la toxicité induite par une exposition transitoire des neurones à l'eau oxygénée. Cet effet neuroprotecteur résulte probablement de la capacité des astrocytes à détruire l'eau oxygénée grâce à leur forte concentration en catalase.

L'activité glycolytique importante des astrocytes et leur capacité à libérer du lactate mais aussi du pyruvate en réponse au glutamate nous ont incité à étudier l'action de ces deux substrats métaboliques sur les effets neurotoxiques de l'eau oxygénée. Nous avons constaté que le pyruvate, mais pas le lactate, protège les neurones d'une exposition transitoire à l'eau oxygénée. L'analyse du mécanisme mis en jeu démontre que cette neuroprotection provient d'une destruction non enzymatique de l'eau oxygénée par les  $\alpha$ -céto-acides comme le pyruvate selon la réaction suivante :  $R - CO COOH + H_2O_2 \rightarrow R - COOH + CO_2 + H_2O$ .

De fait, l' $\alpha$ -cétoglutarate, l'oxaloacétate ou l' $\alpha$ -cétobutyrate (qui n'est pas un substrat métabolique) exercent un effet neuroprotecteur d'autant plus important que chacun de ces  $\alpha$ -céto-acides est capable de réagir rapidement avec l'eau oxygénée.

Nous avons également démontré que le pyruvate exerce un effet protecteur vis-à-vis de la neurotoxicité induite par de l'eau oxygénée produite de façon endogène par les neurones. Pour ce faire, nous avons incubé les neurones en présence de ménadione qui en entrant dans le cycle des quinones provoque la formation d'une grande quantité de radicaux superoxydes qui dismutent rapidement en eau oxygénée au sein de la cellule. Cette quinone induit une forte neurotoxicité dont une partie est abolie par l'addition de catalase dans le milieu extracellulaire. Dans cette situation expérimentale, l'effet neuroprotecteur du pyruvate, varie avec la concentration de pyruvate. La concentration optimale est 1 mM et l'efficacité du pyruvate diminue pour des concentrations plus élevées. Cet effet biphasique résulte probablement de l'acidification du cytosol par le cotransport de proton qui est associé à l'entrée du pyruvate, l'acidification augmentant d'une part les effets toxiques de l'eau oxygénée et diminuant d'autre part la vitesse de réaction entre le pyruvate et l'agent oxydant.

En conclusion, ces nouvelles données ouvrent des perspectives thérapeutiques prometteuses dans le traitement des ischémies cérébrales où la production d'eau oxygénée contribue de façon importante aux lésions cérébrales. En effet, nous avons observé que la perfusion intraveineuse de pyruvate permettait d'atteindre des concentrations cérébrales de pyruvate suffisantes (mesurées par microdialyse) pour exercer un effet neuroprotecteur important. On rappellera que nous avons également démontré que le pyruvate (mais aussi le lactate), par un mécanisme différent, protégeait aussi de la neurotoxicité du glutamate libéré en grande quantité durant l'ischémie (Solange Desagher et Marion Maus).

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

(Responsable de l'équipe : C. Giaume)

### 2.2.1. *Étude in vitro du rôle des communications jonctionnelles dans la réponse des astrocytes à des lésions*

Lors de différentes situations de lésion du système nerveux central, les cellules gliales, et en particulier les astrocytes, développent une gliose réactive. Cette réaction astrocytaire se traduit par une augmentation de l'expression de la GFAP (glial fibrillary acidic protein), une synthèse et une libération de cytokines, de neurotransmetteurs et de facteurs de croissance. D'autre part, les astrocytes sont caractérisés par la présence en grand nombre de jonctions communicantes (ou jonctions de type « gap ») qui permettent les échanges intercellulaires directs de molécules « signal ». Afin de déterminer le rôle des jonctions communicantes lors

de glioses astrocytaires, nous avons utilisé comme modèle des souris transgéniques dépourvues du gène codant pour la connexine 43, la principale protéine jonctionnelle exprimée par les astrocytes.

Lors d'une étude précédente, nous avons montré que les cultures d'astrocytes n'exprimant pas la connexine 43 n'étaient pas couplées (Naus et al., 1997). En utilisant un test de lésion *in vitro*, nous avons obtenu des données suggérant une perte de la communication jonctionnelle entre les astrocytes réactifs. D'autre part, les astrocytes issus de souris transgéniques (knock-out connexine 43) présentent une augmentation de l'expression de la GFAP plus faible que celle mesurée dans les astrocytes cultivés à partir de souris de type sauvage. Ces observations suggèrent que les jonctions communicantes pourraient intervenir lors de la réponse des astrocytes à des lésions (en collaboration avec C. Naus, University of Western Ontario, Canada).

### 2.2.2. *Étude de la perméabilité des jonctions communicantes entre cellules gliales enregistrées dans des tranches de striatum maintenues en survie*

La communication entre cellules gliales par jonctions communicantes a été étudiée dans des tranches frontales de cerveau de rat effectuées au cours des premières semaines postnatales (6-20 jours). Les cellules gliales ont été identifiées en utilisant un microscope équipé d'un contraste interférentiel, d'un éclairage et d'une caméra vidéo infrarouge. Les cellules ont été enregistrées en configuration « cellule-entière » à l'aide d'une pipette contenant un traceur fluorescent de faible poids moléculaire qui traverse les jonctions communicantes, le jaune Lucifer. Dans le striatum, ces enregistrements ont permis de distinguer deux populations de cellules gliales : l'une possède à la fois des conductances « voltage-dépendantes » (en particulier de type  $I_A$ ) et passives, tandis que l'autre exprime uniquement des courants passifs sans composante activée par le potentiel. L'expression de ces propriétés est liée au développement, puisque les courants sortants voltage-dépendants qui s'inactivent rapidement sont quasiment absents après 9 jours. A la suite d'un temps de dialyse de 10 minutes, l'analyse des cellules injectées avec le jaune Lucifer indique que dans 48 % des cas ( $n = 23$ ) le marquage de la cellule enregistrée est accompagné d'une diffusion du colorant dans des cellules adjacentes. Le nombre de ces cellules couplées varie de 1 à 9. L'existence d'un tel couplage a été confirmée en utilisant un second traceur intercellulaire, la neurobiotine. Des expériences préliminaires ont également montré qu'en présence d'halothane, un inhibiteur des jonctions communicantes, aucun couplage diffusionnel ne peut-être détecté ( $n = 3$ ). L'optimisation des conditions de couplage pour différents traceurs intercellulaires est en cours. Elle devrait permettre de comparer les situations de couplage diffusionnel dans différents noyaux des ganglions de la base, et d'autres régions du cerveau. Ce travail sera complété par une étude développementale, afin de déterminer s'il existe une relation entre la présence de conductances voltage-dépendantes et celle d'un couplage jonctionnel (B. Hamon).

### 2.2.3. Réduction des stocks calciques intracellulaires des astrocytes par la (R)-methanandamide

Dans le striatum, l'anandamide, un dérivé de l'acide arachidonique qui active les récepteurs cannabinoïdes des neurones centraux, inhibe les jonctions communicantes et bloque la propagation des vagues calciques des astrocytes (Venance et al., 1995). Des études de liaison de ligands radioactifs et des analyses biochimiques ont permis d'établir que l'action de l'anandamide dans les astrocytes est médiée par des récepteurs distincts des récepteurs cannabinoïdes centraux.

L'analyse des effets de l'anandamide sur la signalisation calcique dans les astrocytes a été poursuivie en utilisant un analogue non métabolisable, la (R)-methanandamide. Un prétraitement (2-10 minutes) des astrocytes avec ce composé provoque une inhibition des réponses calciques induites par l'endothéline 1, un puissant activateur de la phospholipase C. L'analyse des réponses calciques produites par la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique et des dosages biochimiques indiquent que cette inhibition est due à une réduction totale des réserves calciques intracellulaires. Cette « vidange » des stocks internes est réversible, concentration-dépendante (0.5-5  $\mu\text{M}$ ) et peut être supprimée lorsque les astrocytes sont incubés en présence de toxine de pertussis (PTX). Par contre, les effets de la (R)-méthanandamide ne sont pas reproduits par l'acide arachidonique utilisé à la même concentration (5  $\mu\text{M}$ ). Ces données indiquent que ce composé stable de l'anandamide contrôle la signalisation calcique par un mécanisme sensible à la PTX qui inhibe la libération de calcium à partir du réticulum endoplasmique. Cette observation complète des données obtenues précédemment sur les astrocytes et les neurones suggérant qu'un des rôles de l'anandamide pourrait être de provoquer une extinction de la signalisation calcique intra- et intercellulaire dans ces deux types cellulaires (L. Venance en collaboration avec S. Sagan, CNRS URA 493, Paris).

## 2.3. RÉCEPTEURS DES TACHYKININES ET SYSTÈMES DE SIGNALISATION

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

### 2.3.1. Étude des récepteurs $\text{NK}_3$ des tachykinines chez le rat et le cobaye

Précédemment, nous avons développé des essais spécifiques pour étudier les affinités et activités de molécules peptidiques ou non peptidiques vis-à-vis des récepteurs tachykinergiques de type  $\text{NK}_3$ . De fait, l'estimation d'une activité phospholipase C sur des coupes d'iléon de cobaye dans des conditions appropriées permet maintenant la recherche et l'étude de molécules agonistes ou antagonistes sélectives des récepteurs  $\text{NK}_3$ . De plus, nous avons observé qu'un antagoniste non peptidique des récepteurs  $\text{NK}_2$ , le SR 48968, développé initialement chez le rat interagissait avec les récepteurs  $\text{NK}_3$  des tachykinines chez le cobaye mais pas chez le rat. Cette observation a permis d'accélérer la découverte par le groupe Sanofi du premier antagoniste non peptidique sélectif des récepteurs tachykiner-

giques NK<sub>3</sub>, le SR 142801. Ces données en faveur de l'existence de différence de structure moléculaire de ces récepteurs entre espèces, nous ont incité à préciser les propriétés pharmacologiques des récepteurs de type NK<sub>3</sub> par des études de mesure d'affinité et d'activité chez le rat et le cobaye.

Deux radioligands sélectifs des sites NK<sub>3</sub>, la [<sup>125</sup>I][MePhe<sup>7</sup>]NKB et le [<sup>3</sup>H]Senktide ont été choisis pour les études de liaison. Chez le cobaye, les sites de liaison de type NK<sub>3</sub> sont uniquement présents sur les membranes du muscle longitudinal/plexus myentérique de l'iléon, les membranes de muscle circulaire en étant dépourvues. Dans ce tissu, la stimulation par le senktide de la formation d' [<sup>3</sup>H]inositol monophosphate est vraisemblablement liée à l'activation de récepteurs NK<sub>3</sub> neuronaux impliqués dans le contrôle de la libération de l'acétylcholine et des tachykinines. Chez le cobaye, comme chez le rat, les études de liaison indiquent que les caractéristiques biochimiques et pharmacologiques des sites NK<sub>3</sub> sont identiques aux niveaux central (cortex cérébral) et périphérique (muscle longitudinal de l'iléon). Par contre, l'antagoniste NK<sub>3</sub>, le SR 142801 présente une meilleure affinité pour les sites de liaison NK<sub>3</sub> du cobaye que pour ceux du rat et une très faible affinité pour les sites NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> chez ces deux espèces. Le SR 142801 antagonise avec une très grande efficacité la formation de l' [<sup>3</sup>H]inositol phosphate induite par le senktide (agoniste sélectif NK<sub>3</sub>) dans des coupes d'iléon de cobaye, cet antagonisme est de type non compétitif (K<sub>B</sub> apparent de 3,2 nM). L'effet du SR 142801 est stéréospécifique puisque le dérivé (R)-énantiomère, le SR 142806, est 100 fois moins affiné et actif.

L'étude de la sélectivité du SR 142801 a été effectuée en recherchant une action éventuelle sur des récepteurs de type NK<sub>1</sub>, « septide », et NK<sub>2</sub> présents sur la vessie de rat, tissu qui est complètement dépourvu de récepteurs NK<sub>3</sub>. Le SR 142801 ne modifie pas l'accumulation d' [<sup>3</sup>H]inositol monophosphate induite par la [Pro<sup>9</sup>]SP (agoniste sélectif NK<sub>1</sub>) et par le septide, mais utilisé à forte concentration, il réduit la réponse évoquée par l'agoniste sélectif NK<sub>2</sub>, la [Lys<sup>5</sup>,MeLeu<sup>9</sup>,Nle<sup>10</sup>]NKA(4-10) avec un K<sub>B</sub> de 340 nM.

Le SR 142801 est donc un antagoniste non peptidique stéréospécifique et sélectif des récepteurs NK<sub>3</sub> présentant une grande efficacité chez le cobaye mais qui peut également être utilisé chez le rat (en dépit des différences confirmées par notre étude des propriétés pharmacologiques des récepteurs NK<sub>3</sub> du cobaye et du rat). (J.C. Beaujouan, M. Saffroy et Y. Torrens, certaines études ont été poursuivies en collaboration avec S. Lavielle, G. Chassaing et C. Sagan du laboratoire de Chimie Biologique (Jussieu, Paris VI).

### 2.3.2. Rôle de la phospholipase D dans le mécanisme d'action des tachykinines et d'autres neuromédiateurs

La plupart des récepteurs couplés à la phospholipase C sont également couplés à la phospholipase D (PLD), une enzyme qui hydrolyse la phosphatidylcholine en choline et acide phosphatidique. L'acide phosphatidique peut être déphospho-

rylé en diacylglycérol, l'activateur de la protéine kinase C, ou déacylé en acide lysophosphatidique (LPA).

L'activation de la PLD constitue une voie de signalisation impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires et en particulier dans le trafic vésiculaire et dans les régulations à long terme. Dans le SNC, la PLD jouerait notamment un rôle dans la synthèse de l'acétylcholine et de l'anandamide. Le LPA est un petit phospholipide récemment décrit comme un messenger transcellulaire, agissant de façon autocrine et/ou paracrine sur des récepteurs membranaires couplés à des protéines G. Les effets du LPA, et en particulier ses propriétés mitogènes, ont surtout été décrits dans les tissus périphériques. Dans le SNC, le LPA agirait sur la croissance neuritique et sur la régulation de la recapture du glutamate.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets de la substance P et de l'endothéline, deux neuropeptides possédant des récepteurs très efficacement couplés à l'activation de la phospholipase C dans leurs cellules cibles. Précédemment, nous avons montré que l'endothéline stimule l'activité de la PLD dans les astrocytes en culture primaire issus de différentes structures cérébrales. Cet effet, qui est médié par des récepteurs ETB, met en jeu une protéine G de type Gi/Go et dépend de la protéine kinase C. La substance P et la [Pro<sup>9</sup>]SP, l'agoniste sélectif des récepteurs NK<sub>1</sub>, stimulent également très fortement l'activité PLD dans des cellules CHO transfectées avec le cDNA du récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines. Cet effet met en jeu une protéine G insensible à la toxine pertussique, il dépend de la protéine kinase C mais est indépendant des taux d'AMP cyclique. De plus, plus récemment, l'activation de la PLD par la substance P a pu être mise en évidence dans une lignée de cellules gliales humaines (U 373 MG) dans lesquelles seul le récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines est exprimé (Yvette Torrens, Martine Tencé).

Des travaux de l'équipe de J.A. Girault indiquaient que le LPA activait la voie des MAP kinases dans des tranches d'hippocampe. Pendant cette année, nous avons montré que le LPA stimule de façon très marquée plusieurs voies de signalisation dans les astrocytes en culture primaire. Ainsi, il induit la phosphorylation sur des résidus tyrosine de la MAP kinase (collaboration avec M. Toutant et J.A. Girault). Il stimule l'hydrolyse des phosphoinositides (EC<sub>50</sub> : 0.6 mM) et provoque une augmentation importante et transitoire de la concentration intracellulaire de calcium (collaboration avec J. Prémont). Le LPA est aussi un puissant inhibiteur de la production d'AMP cyclique induite par la forskoline (60 % d'inhibition ; EC<sub>50</sub> : 0.4 mM). Ces différentes voies mettent toutes en jeu une protéine G de type Gi/Go. Ces effets du LPA ont été trouvés dans différentes structures cérébrales telles que le cortex et l'hippocampe (Martine Tencé, Yvette Torrens).

### 3. ÉTUDE DES PROTÉINES KINASES ET PHOSPHATASES NEURONALES ET DE LEURS SUBSTRATS

#### 3.1. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DE LA SIGNALISATION INTRANEURONALE

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

Les travaux de cette équipe portent sur les protéines G assurant le couplage des récepteurs D1 de la dopamine avec leurs effecteurs et sur les protéines tyrosines kinases non-récepteurs dans les neurones.

##### 3.1.1. *Analyse de la protéine G $\alpha$ olf dans le striatum* (F. Arnos, D. Hervé, J.M. Studler)

La sous-unité de protéine G hétérotrimérique «  $\alpha$ olf » est exprimée en forte densité dans les ganglions de la base, en particulier dans les neurones striatonigraux. Par contre, la sous-unité  $\alpha$ s qui assure généralement le couplage positif des récepteurs à sept segments transmembranaires avec l'adénylate-cyclase dans les autres tissus est très peu abondante dans les mêmes neurones. Il est donc vraisemblable que G $\alpha$ olf assure le couplage entre le récepteur D1 de la dopamine et l'adénylate-cyclase.

Afin de vérifier cette hypothèse et d'évaluer le rôle physiologique de G $\alpha$ olf dans les effets de la dopamine, nous avons entrepris d'invalider le gène de cette protéine chez la souris. L'ADN correspondant à l'extrémité 5' du gène a été isolé à partir d'une banque génomique de souris (lignée 129). Il correspond aux quatre premiers exons de G $\alpha$ olf, aux trois premiers introns ainsi qu'à une partie du quatrième intron. Des constructions permettant l'inactivation du gène par recombinaison homologue ont été préparées. Une d'entre elles possède une séquence Lox P introduite dans le deuxième intron de G $\alpha$ olf et une autre dans le quatrième intron. De plus, elle contient un gène de résistance à la néomycine dans l'intron 4 immédiatement en 5' de la deuxième séquence Lox P. Ce gène de résistance est sous la dépendance du promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK) ce qui assure son expression dans les cellules ES. La construction comprend également le gène de la toxine diphtérique favorisant la sélection négative en cas d'insertion aléatoire. La recombinaison homologue est effectuée en collaboration avec Mme. Bucchini (laboratoire du Pr. Jami). Les cellules recombinantes sélectionnées par leur résistance à la néomycine seront criblées par PCR. Une partie des clones positifs seront transfectés avec Cre qui devrait exciser les exons 3 et 4 flanqués par les séquences Lox P. L'élimination de ces deux exons doit entraîner un décalage dans la phase de lecture de l'ARNm et conduire à une protéine de G $\alpha$ olf tronquée et non fonctionnelle. Les clones positifs de cellules ES ainsi obtenus seront injectés dans des blastocystes. Ces expériences doivent conduire à la production d'animaux ayant une élimination totale du gène de G $\alpha$ olf affectant tous les tissus.

3.1.2. *Régulation des protéines tyrosines kinases FAK et PYK2/Cak $\beta$*   
(F. Burgaya, P. Derkinderen, M. Gelman, M. Le Bert, M. Toutant)

FAK et PYK2/Cak $\beta$  sont deux tyrosines kinases non-récepteurs dont la séquence présente de fortes homologues. Dans les cellules non-neuronales ces deux tyrosines kinases jouent un rôle dans la signalisation induite par les contacts entre les cellules et la matrice extracellulaire ou d'autres cellules. La phosphorylation de FAK sur tyrosine est stimulée dans les tranches d'hippocampe par plusieurs neurotransmetteurs et messagers intercellulaires. Ainsi, la stimulation des récepteurs du glutamate et l'acide lysophosphatidique (LPA) augmentent la phosphorylation de FAK par une voie sensible aux inhibiteurs de protéine kinase C (PKC). Par contre, la stimulation des récepteurs cannabinoïdes CB1 entraîne le même effet en inhibant l'adénylate-cyclase. Enfin, la phosphorylation de FAK induite par l'acétylcholine met en jeu les deux mécanismes. Par contre, la phosphorylation de PYK2/Cak $\beta$  est peu sensible à ces différents agents mais est très fortement stimulée par la dépolarisation neuronale ou les chocs hyperosmotiques. Les voies de régulation de ces deux kinases, souvent confondues dans les lignées cellulaires en culture, sont donc distinctes dans le système nerveux mature.

Plusieurs isoformes de FAK différant les unes des autres par épissage alternatif ont été mises en évidence. L'un des exons alternatifs code pour trois acides aminés dans la région carboxy-terminale de la protéine, et sa présence définit une forme appelée FAK+ qui est majoritaire dans les neurones. Plusieurs autres isoformes ont été caractérisées : elles diffèrent par la présence ou l'absence d'exons codant pour 6, 7 ou 28 acides aminés dans la région du site d'auto-phosphorylation. Tous ces exons sont préférentiellement exprimés dans le système nerveux. Leurs propriétés ont été étudiées par transfection dans les cellules Cos. La présence de deux d'entre eux se traduit par une très forte augmentation de l'activité d'auto-phosphorylation de FAK, ce qui pourrait avoir des conséquences fonctionnelles importantes.

FAK et PYK2/Cak $\beta$  interagissent fortement avec la tyrosine kinase Src. Des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement active de n-Src dans les neurones ont été produites et sont en cours d'analyse. Les premières expériences effectuées avec l'équipe d'André Chéramy révèlent une augmentation de la libération de GABA en réponse à la stimulation des récepteurs NMDA dans le striatum des souris transgéniques. S'il est confirmé, ce résultat indiquerait que les récepteurs NMDA mis en jeu dans cette réponse sont régulés par une phosphorylation impliquant Src, ainsi que cela a été observé dans des systèmes reconstitués.

3.1.3. *La paranodine une glycoprotéine neuronale enrichie dans la région paranodale des nœuds de Ranvier* (T. Galvez, M. Le Bert, M. Menegoz)

Une nouvelle glycoprotéine neuronale de 180 kDa, purifiée et clonée dans le laboratoire, a été nommée paranodine en raison de son enrichissement dans la

région paranodale des nœuds de Ranvier des fibres myélinisées centrales et périphériques. Cette localisation très particulière a été mise en évidence par immunofluorescence et microscopie confocale en collaboration avec Patricia Gaspar. Le grand domaine extracellulaire de la paranodine est proche de celui des neurexines et son court domaine intracellulaire possède une région homologue à la glycophorine C permettant la liaison de la protéine 4.1. La liaison entre la paranodine et les protéines possédant un domaine 4.1 a été caractérisée à l'aide de protéines de fusion. La paranodine pourrait donc permettre l'ancrage du cytosquelette neuronal à la membrane axonale dans la région paranodale où celle-ci est étroitement associée à la membrane de la cellule gliale myélinisante. De plus, la paranodine pourrait interagir avec des tyrosines kinases ou phosphatases possédant des domaines SH3 ou 4.1 et jouer un rôle dans la signalisation.

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

Les différents récepteurs pour les neurotransmetteurs, les facteurs de croissance et les cytokines, présents à la surface des astrocytes, agissent sur la cellule via des cascades de réactions intracellulaires. Une stratégie d'analyse par gels bidimensionnels (2D-SDS-PAGE) des protéines dont le degré de phosphorylation varie en réponse à divers traitements pharmacologiques, nous a conduit à caractériser des phosphoprotéines astrocytaires, en particulier PEA-15 (Protéine Enrichie dans les Astrocytes de 15 kDa, pI 5,2-5,4), qui est un substrat *in vitro* et *in vivo* de la protéine kinase C et de la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type 2 (CaMKII).

Plus récemment, nous avons commencé à caractériser les systèmes de déphosphorylation, sur homogénats astrocytaires et sur cellules intactes. Des peptides substrats spécifiques et des inhibiteurs ayant des spectres d'activité sélectifs pour les serine/thréonine protéines phosphatases (Calyculine, acide okadaïque, tautomycine) ont permis de mettre en évidence des phosphatases de type I (PP1), 2a (PP2A) et 2c (PP2C, Mg-dépendante), tandis que les phosphatases 2b calcineurine n'ont pas été détectées dans ces cellules. L'analyse de la déphosphorylation des protéines astrocytaires *in vitro* par des préparations de cerveaux adultes et d'astrocytes en culture, a permis de montrer l'existence d'une activité environ trois fois plus élevée au sein des astrocytes. A la suite d'une incorporation de phosphate  $^{32}\text{P}$  effectuée sur des cellules intactes, de nombreuses phosphoprotéines astrocytaires n'apparaissent que lorsque les phosphatases sont inhibées. L'analyse des cartes bidimensionnelles permet de montrer l'existence de substrats préférentiellement déphosphorylés par PP2A, dont PEA15, et celle de substrats de PP1, dont la vimentine et plusieurs substrats majeurs qui restent à identifier. Les phosphatases exercent donc une activité tonique limitante importante sur le niveau de phosphorylation des protéines astrocytaires (Malvyne Rolli, Jocelyne Cordier).

Précédemment, l'analyse de la séquence de PEA-15 avait révélé l'existence d'un domaine homologue avec deux protéines (FADD/MORT1 et FLICE/MACH/Pro-Caspase-8) impliquées dans la transduction intracellulaire des effets du ligand de Fas et du Tumor Necrosis Factor alpha (TNF alpha), en particulier l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose). Plusieurs stratégies sont développées pour rechercher un rôle de PEA-15 au cours de l'apoptose induite par le TNFalpha : interaction directe de la protéine recombinante avec FADD ou FLICE, recherche de partenaires spécifiquement astrocytaires par criblage en double-hybride, analyse des effets du TNF alpha sur des astrocytes dépourvus de PEA.15, la délétion du gène ayant été obtenue après recombinaison homologue chez la souris (Étienne Formstecher, Jocelyne Cordier).

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

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

###### 4.1.1. *Mise en évidence du rôle physiologique de l'acide arachidonique endogène dans la régulation présynaptique de la libération de dopamine à partir de microdisques de striatum de souris...*

Libéré à partir des fibres corticostriatales, le glutamate favorise la libération de dopamine (DA) en activant des récepteurs AMPA et NMDA localisés sur les terminaisons dopaminergiques. Il exerce aussi des effets indirects, médiés par des circuits locaux, impliquant notamment les interneurons cholinergiques et les neurones GABAergiques efférents. Enfin, le glutamate pourrait également augmenter la libération de DA par l'intermédiaire de messagers diffusibles tels que le monoxyde d'azote et l'acide arachidonique (AA).

L'AA est libéré des neurones striataux en culture lors de l'application de NMDA et cet effet est potentialisé par l'acétylcholine ou l'agoniste mixte muscarinique et nicotinique, le carbachol (Tencé et al., 1995). Précédemment, nous avons déjà mis en évidence que l'AA exogène stimule la libération de [<sup>3</sup>H]-DA nouvellement synthétisé ou préalablement capté dans les terminaisons dopaminergiques (L'Hirondel et al., 1995). D'autre part, en agissant sur les récepteurs nicotiques et muscariniques, l'acétylcholine réduit le blocage par le magnésium des récepteurs NMDA impliqués dans le contrôle présynaptique de la libération de [<sup>3</sup>H]-DA (Chéramy et al., 1996). Ces diverses données nous ont conduit à rechercher si l'AA endogène, libéré lors de l'application combinée de NMDA et de carbachol, participe au contrôle de la libération de DA.

Nos premières expériences sur la libération de [<sup>3</sup>H]-DA ayant été effectuées chez le rat, et celles de M. Tencé, sur la libération d'AA, ayant été réalisées chez la souris, une comparaison des données obtenues chez ces deux espèces s'imposait dans un premier temps. En présence de magnésium, aucune différence n'a été trouvée entre le rat et la souris : Appliqué seul, le NMDA, est quasiment inactif. Par contre, un effet stimulateur du NMDA sur la libération de [<sup>3</sup>H]-DA peut-être est observé en présence de carbachol. En absence de magnésium, l'amplitude de la réponse induite par la co-application de NMDA et de carbachol est très largement supérieure à la somme des réponses évoquées par le NMDA et le carbachol. Toutefois, cette potentialisation est beaucoup plus marquée chez la souris que chez le rat. Ces données sont en accord avec celles de M. Tencé obtenues en mesurant la libération d'AA. Les expériences ultérieures ont donc été effectuées chez la souris.

En présence comme en l'absence de magnésium, l'augmentation de libération de [<sup>3</sup>H]-DA induite à partir de microdisques de striatum de souris lors de la co-application de NMDA et de carbachol dépend des concentrations de NMDA et de celles de carbachol. La libération de [<sup>3</sup>H]-DA évoquée dans ces conditions, est fortement réduite (- 50 %) en présence d'un inhibiteur de phospholipase A2 (PLA2). Cette réduction est observée en présence de mépacrine (de 0,1 µM à 10 µM) mais aussi de 4-bromophenacylbromide (0,1 µM). Démontrant la spécificité des effets de la mépacrine (0,1 µM), la présence de cet inhibiteur de phospholipase A2 ne modifie pas la libération de [<sup>3</sup>H]-DA évoquée par le KCl 25 mM ou par la nicotine (1 mM), mais réduit celle induite par l'oxotrémorine (1 mM). L'AA peut être formé non seulement à partir de phospholipides sous l'action de la PLA2 mais également à partir du diacylglycérol sous l'action de la diglycérine lipase. Nous avons donc également étudié l'effet d'un inhibiteur de cette dernière enzyme, le RG80267 (1 µM et 10 µM). Le RG 80267 ne modifie pas la libération de [<sup>3</sup>H]-DA évoquée par la co-application de NMDA et de carbachol.

Ces diverses données suggèrent que la libération de DA évoquée à partir de coupes de striatum lors de la co-stimulation des récepteurs NMDA et cholinergiques résulte en partie d'effets indirects et notamment de l'action de l'AA endogène libéré sous les effets conjoints du NMDA et de l'agoniste cholinergique (F. Artaud, G. Godeheu, M. L'Hirondel).

#### 4.1.2. *Rôle des autorécepteurs dopaminergiques D2 et D3 des terminaisons dopaminergiques dans la régulation inhibitrice de la libération de dopamine*

Des souris dépourvues de récepteurs dopaminergiques D2 étant disponibles (Baik et al., 1995), le rôle des autorécepteurs D2 et D3 dans le contrôle inhibiteur de la DA sur son processus de libération a été examiné en utilisant des synaptosomes purifiés de striatum de souris témoins (C57Bl/6) ou dépourvues de récepteurs D2. Ces expériences ont été effectuées en étudiant la libération de [<sup>3</sup>H]-DA

nouvellement synthétisée à partir de [ $^3\text{H}$ ]-tyrosine ou le plus souvent préalablement captée dans les terminaisons dopaminergiques.

Chez les souris témoins, le quinpirole (agoniste D2 et D3, 10  $\mu\text{M}$ ), réduit la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA évoquée par le KCl (25 mM), la vératridine (1  $\mu\text{M}$ ) et la 4-aminopyridine (4-AP, 100  $\mu\text{M}$ ). Cet effet est plus marqué avec la 4-AP. Cet agent dépolarisant qui est un inhibiteur de certains canaux potassiques a donc été utilisé dans les autres expériences. Le quinpirole et la propyl-norapomorphine (NPA) (de 1 nM à 10  $\mu\text{M}$ ) inhibent de façon concentration-dépendante la libération évoquée de [ $^3\text{H}$ ]-DA (50 % d'inhibition maximale). Parmi les divers agonistes dopaminergiques testés (quinpirole, NPA, ( $\pm$ )-2-(N-phenylethyl-N-propyl)amino-5-hydroxytétralin (PPHT) et PD-128,907), la NPA est le plus efficace alors que l'agoniste D3, le PD-128,907 est dépourvu d'effet lorsqu'il est utilisé à 10 nM, une faible inhibition étant décelée à 100 nM. Les inhibitions induites par le quinpirole (100 nM) et la NPA (100 nM) sont complètement bloquées en présence de sulpiride (antagoniste D2 et D3, 1  $\mu\text{M}$ ).

Dans les autres expériences, les données obtenues sur des synaptosomes d'une souris sans récepteurs D2 (homozygote) ont toujours été comparées avec celles obtenues à partir d'une préparation synaptosomale de souris sauvages. La NPA (100 nM) ou le PD-128,907 (100 nM) réduisent la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA chez les souris sauvages (- 60 et - 20 % respectivement), mais n'ont aucun effet chez les souris dépourvues de récepteurs D2. Ces résultats confirment non seulement le rôle des autorécepteurs D2 dans la régulation de la libération évoquée de [ $^3\text{H}$ ]-DA mais indiquent également que les terminaisons dopaminergiques ne possèdent pas de récepteurs D3 impliqués dans ce processus. Ajoutons que les augmentations des taux extracellulaires de [ $^3\text{H}$ ]-DA observées en présence d'amphétamine (0,4  $\mu\text{M}$ ) ou de cocaïne (100  $\mu\text{M}$ ) sont respectivement identiques chez les souris sauvages et dépourvues de récepteurs D2 (F. Artaud, G. Godeheu, M. L'Hirondel).

#### 4.2. INTERVENTION DES TACHYKININES DANS LA RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE L'ACÉTYLCHOLINE ÉVOQUÉE PAR LE NMDA DANS LES COMPARTIMENTS STRIATAUX (Responsables de l'équipe : Marie-Lou Kemel et Christian Gauchy)

Les corps cellulaires des interneurons cholinergiques du striatum sont localisés presque exclusivement dans les régions matricielles et possèdent un réseau dendritique distribué dans les deux compartiments. De ce fait, ces interneurons cholinergiques pourraient contribuer au transfert des informations entre les striosomes et la matrice. Dans le striatum, ces interneurons cholinergiques contiennent la grande majorité du mARN codant pour le récepteur NK<sub>1</sub> des tachykinines. De plus, ils sont contactés par des terminaisons riches en immunoréactivité Substance P (SP). Par ailleurs, les deux principales populations de neurones GABAergiques efférents qui reçoivent une innervation dense glutamatergique d'origine corticale, possèdent des cotransmetteurs tels que la SP, la neurokinine A (NKA) et la dynorphine pour ceux qui se projettent dans la

substance noire et le noyau entopédonculaire et la neurokinine B (NKB) et la Met-enképhaline pour ceux qui innervent le globus pallidus externe.

Dans un premier temps ces données nous ont incité à déterminer à l'aide d'antagonistes spécifiques des récepteurs  $NK_1$  et  $NK_2$  si la SP et la NKA libérées intervenaient dans la régulation *in vitro* de la libération de l' $[^3H]$ -acétylcholine ( $[^3H]$ -ACh) (préalablement synthétisée à partir de  $[^3H]$ -choline) évoquée par le NMDA dans des zones du striatum de rat enrichies en striosomes ou en matrice. Ces expériences ont été effectuées en l'absence de magnésium et en utilisant le NMDA à forte concentration (1 mM) en présence du co-agoniste la D-serine (10  $\mu$ M). Dans ces conditions ainsi que nous l'avons précédemment montré, la dopamine exerce un effet inhibiteur sur la libération évoquée de l'ACh alors que le GABA induit un effet inverse résultant de son action inhibitrice présynaptique sur la libération de dopamine (DA).

#### 4.2.1. Contribution de la substance P dans la régulation de la libération évoquée de l'acétylcholine

En l'absence de magnésium, le NMDA (1 mM+D-ser 10  $\mu$ M) stimule la libération de l' $[^3H]$ -ACh dans les striosomes (+ 89 %) et la matrice (+ 83 %). Cette réponse est fortement amplifiée dans les striosomes (mais pas dans la matrice) en présence de l'antagoniste  $NK_1$ , le SR 140333, appliqué dans une gamme de concentrations s'échelonnant de  $10^{-7}$  à  $10^{-14}$  M, les effets maximaux intervenant jusqu'à  $10^{-12}$  M (+ 218 %). Le dérivé énantiomère du SR 140333, le SR 140603, dont l'activité est très inférieure à celle du SR 140333 dans des études de liaison, ne modifie pas la libération évoquée de l' $[^3H]$ -ACh lorsqu'il est utilisé à la concentration de  $10^{-12}$  M. Toutefois, une légère desinhibition peut-être observée dans les striosomes à la concentration de  $10^{-7}$  M. La réponse observée en présence de SR 140333 semble spécifique puisqu'un autre antagoniste  $NK_1$ , le RP 67580 ( $10^{-7}$  M), qui possède une structure moléculaire distincte de celle du SR 140333, potentialise fortement la réponse évoquée par le NMDA (1 mM+D-ser, 10  $\mu$ M) dans les striosomes et, comme le SR 140333, n'induit aucun effet dans la matrice. Ces données suggèrent que la SP ou un de ses métabolites la SP(6-11), qui peut agir sur un site spécifique des récepteurs de type  $NK_1$ , exercent un effet inhibiteur sur la libération évoquée de l' $[^3H]$ -ACh dans les striosomes.

#### 4.2.2. Rôle de la Neurokinine A dans la régulation évoquée de l'acétylcholine

Le SR 48968, un antagoniste sélectif du récepteur  $NK_2$ , augmente fortement la libération évoquée de l' $[^3H]$ -ACh dans les deux compartiments lorsqu'il est appliqué dans une gamme de concentrations s'échelonnant de  $10^{-7}$  à  $10^{-12}$  M. La réponse est toujours plus prononcée dans les striosomes que dans la matrice. La réponse maximale est observée à la concentration de  $10^{-8}$  M (S : + 300 % ; M : +201 %). Le SR 48965 ( $10^{-9}$  M), le dérivé énantiomère du SR 48968, ne modifie pas la libération de l' $[^3H]$ -ACh induite par le NMDA (1 mM+D-ser

10  $\mu\text{M}$ ) dans les striosomes ou la matrice. Ces données indiquent que la neurokinine A libérée sous l'action du NMDA (1 mM+D-ser 10  $\mu\text{M}$ ) exerce un effet inhibiteur sur la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh.

#### 4.2.3. Rôle de la dopamine dans les effets inhibiteurs de la substance P et de la neurokinine A sur la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh

Le GABA facilite indirectement la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh. en réduisant la libération de dopamine et par conséquent le contrôle inhibiteur de la dopamine sur la libération de l' $^3\text{H}$ -ACh évoquée par le NMDA (1 mM+D-ser 10  $\mu\text{M}$ ). A l'inverse, nous avons envisagé que les effets inhibiteurs de la SP et de la neurokinine A sur la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh pourraient résulter de l'action facilitatrice présynaptique de ces tachykinines sur la libération de dopamine et par conséquent d'un renforcement du contrôle inhibiteur de la dopamine sur la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh. Cette hypothèse a été vérifiée en analysant les effets des antagonistes  $\text{NK}_1$  et  $\text{NK}_2$  en présence d'un antagoniste des récepteurs D2, le (-)sulpiride (1  $\mu\text{M}$ ) puis d' $\alpha$ -méthyl-p-tyrosine (10<sup>-4</sup>M, AMPT) qui interrompt complètement la transmission dopaminergique en inhibant la synthèse du médiateur.

Rappelons que le blocage des récepteurs D2 par le sulpiride augmente fortement la libération de l' $^3\text{H}$ -ACh évoquée par le NMDA (1 mM+D-ser, 10  $\mu\text{M}$ ) dans les deux compartiments striaux (S : x3 ; M : x2,2). Ceci est en accord avec la présence de récepteurs D2 sur les interneurons cholinergiques et de leur intervention privilégiée dans le contrôle inhibiteur de la dopamine sur la libération de l'ACh. En présence de sulpiride, les desinhibitions de la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh induites par les antagonistes tachykinergiques  $\text{NK}_1$  et  $\text{NK}_2$  sont complètement abolies dans les striosomes (ant.  $\text{NK}_1$ ) ou dans les deux compartiments (ant.  $\text{NK}_2$ ). La suppression des effets des antagonistes tachykinergiques en présence de sulpiride résulte bien de l'interruption de la transmission dopaminergique de type D2 et non d'une réponse maximale évoquée par le NMDA (en présence de son co-agoniste, la D-serine) lors du blocage des récepteurs D2. En effet, en présence de sulpiride, la naloxone (1  $\mu\text{M}$ ), un antagoniste des récepteurs opiacés, amplifie considérablement la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh.

Appliqué seul l'AMPT amplifie également la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh avec une amplitude identique à celle observée lors de l'application de sulpiride dans les striosomes mais plus faible dans la matrice. En accord avec les données obtenues avec le sulpiride, en présence d'AMPT, les effets désinhibiteurs des antagonistes tachykinergiques  $\text{NK}_1$  et  $\text{NK}_2$  sur la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh sont complètement abolis dans les deux compartiments. Toutefois, paradoxalement, dans ces conditions (présence d'AMPT), l'antagoniste  $\text{NK}_2$ , mais également l'antagoniste  $\text{NK}_1$  induisent une réduction de la libération évoquée de l' $^3\text{H}$ -ACh. Ces réponses n'interviennent que dans la matrice et en présence de concentrations relativement élevées des antagonistes (10<sup>-7</sup> M). Ceci suggère que la substance P et la neurokinine A exercent également un effet facilitateur sur la libération

évoquée de l' [<sup>3</sup>H]-ACh indépendant de la transmission dopaminergique. L'effet facilitateur de la substance P est vraisemblablement médié par les récepteurs NK<sub>1</sub> présents en forte densité sur les interneurons cholinergiques. Le ou les mécanismes impliqués dans l'effet excitateur de la neurokinine A doivent encore être précisés.

Précédemment, nous avons montré que la présence du co-agoniste des récepteurs NMDA, la glycine (ou celle de son analogue, la D-serine), était nécessaire pour observer l'action inhibitrice de la dopamine sur les neurones cholinergiques. Ceci indique que la libération de dopamine doit atteindre un certain niveau pour observer son effet inhibiteur. Vraisemblablement, dans la matrice, l'effet facilitateur des tachykinines indépendant de la transmission dopaminergique, doit pouvoir être mis en évidence dans des conditions de stimulation des récepteurs NMDA insuffisantes pour déclencher l'action inhibitrice de la dopamine sur l'activité des interneurons cholinergiques. De fait, lorsque le NMDA est utilisé seul à la concentration de 1 mM, le sulpiride ou l'AMPT ne modifient pas la libération évoquée de l' [<sup>3</sup>H]-ACh et les antagonistes NK<sub>1</sub> et NK<sub>2</sub> provoquent une réduction de la libération évoquée de l' [<sup>3</sup>H]-ACh. Ceci confirme l'existence d'une action excitatrice de la substance P et de la neurokinine A indépendante de la transmission dopaminergique.

En conclusion, lors de la stimulation des récepteurs NMDA (1 mM) en présence ou en absence de D-serine, la substance P et la neurokinine A peuvent être co-libérées avec le GABA à partir des collatérales des neurones GABAergiques efférents. De plus, en présence de D-serine dans les striosomes, ces deux tachykinines exercent un effet inhibiteur sur la libération évoquée de l'ACh résultant de leurs effets facilitateurs sur la libération de dopamine. Dans la matrice, la neurokinine A (mais pas la substance P) exerce également un effet inhibiteur indirect médié par la dopamine. Toutefois, dans ce compartiment striatal, sous l'action du NMDA (en présence de D-ser), les deux tachykinines induisent aussi une régulation facilitatrice sur la libération évoquée de l'ACh qui est indépendante de la transmission dopaminergique.

## 5. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MÉSOCORTICAUX ET MÉSOLIMBIQUES

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

#### 5.1.1 *Étude de l'interaction Noradrénaline/Dopamine et de ses conséquences sur le rôle fonctionnel de la libération de dopamine sous-corticale*

En augmentant la libération de dopamine, la D-amphétamine provoque une hyperactivité locomotrice chez le rat. Cet effet résulte essentiellement d'un ac-

croissement de la libération de dopamine dans le noyau accumbens puisque cette hyperactivité peut être obtenue par des injections bilatérales de D-amphétamine dans cette structure. En 1994, nous avons montré que le blocage des récepteurs alpha-adrénergiques du cortex préfrontal par du prazosin inhibait l'hyperactivité locomotrice induite par une injection de D-amphétamine dans le noyau accumbens (Blanc et al., 1994). Compte tenu des propriétés de l'amphétamine, qui bloque la recapture et augmente aussi la libération des catécholamines, il était peu probable que l'injection distale de prazosin puisse intervenir directement sur les effets induits par l'application locale de l'amphétamine dans le noyau accumbens. Par des expériences de microdialyse effectuées sur des animaux éveillés et libres de leurs mouvements, nous avons donc cherché à préciser la nature de l'interaction entre le contrôle noradrénergique cortical et la transmission dopaminergique sous-corticale.

Nous avons tout d'abord montré qu'une injection systémique de prazosin (0,5 mg/kg, i.p.) ne modifie pas l'augmentation importante des taux extracellulaires de dopamine (augmentation par un facteur 5) induite dans le noyau accumbens par une superfusion locale de 3  $\mu$ M de D-amphétamine effectuée à l'aide de la sonde de microdialyse. Cette expérience confirme que le prazosin n'agit pas directement sur la libération de dopamine évoquée localement par l'amphétamine. Nous avons cependant constaté qu'en dépit de l'augmentation importante des taux extracellulaires de dopamine, les animaux ne présentent pas d'hyperactivité locomotrice, même lorsque la superfusion locale de D-amphétamine est effectuée de façon bilatérale.

Dans une seconde série d'expériences, curieusement, nous avons observé que l'hyperactivité locomotrice n'apparaît pas lorsque la D-amphétamine est superfusée à une concentration de 500  $\mu$ M. Nous avons vérifié que l'amphétamine diffusait convenablement en implantant deux canules de microdialyse distantes de 1 mm dans le noyau accumbens. La superfusion de 500  $\mu$ M de D-amphétamine dans le centre de la structure provoque une augmentation significative des taux extracellulaires de dopamine à la périphérie de celle-ci (augmentation par un facteur de 15 à 30) et néanmoins, paradoxalement, cette augmentation est insuffisante pour induire une augmentation de l'activité locomotrice. L'augmentation de l'activité locomotrice ne devient visible que lorsqu'une concentration plus élevée de D-amphétamine (1 000  $\mu$ M) est utilisée, la superfusion étant réalisée bilatéralement. Dans ce dernier cas, les taux extracellulaires de dopamine sont considérablement augmentés (augmentation des taux par un facteur 225)

Ces derniers résultats nous ont conduit à analyser les modifications des taux extracellulaires de dopamine dans le noyau accumbens dans des situations qui induisent de l'hyperactivité locomotrice, c'est-à-dire à la suite d'une injection systémique de D-amphétamine (0,5 mg/kg, i.p.) ou lorsque cette injection systémique est précédée d'une superfusion locale de 3  $\mu$ M de D-amphétamine. Dans le premier cas, nous avons observé deux périodes d'augmentation brutale et de courte durée (de 1 à 5 minutes) des taux extracellulaires de dopamine, environ

10 et 40 minutes après l'injection d'amphétamine, l'augmentation moyenne pendant les 40 minutes qui suivent l'injection de la drogue n'étant toutefois pas significative. Dans le second cas, une augmentation significative correspondant à trois fois les taux de base a pu être mise en évidence. Celle-ci est bien inférieure à celle nécessaire pour évoquer une hyperactivité locomotrice lors d'une injection locale de la drogue. Les augmentations des taux de dopamine (d'un facteur 3) et de l'hyperactivité locomotrice peuvent être totalement bloquées par une injection systémique de prazosin (0,5 mg/kg, i.p.) ou par une injection bilatérale de 500 pmoles de prazosin dans le cortex préfrontal précédant l'injection systémique d'amphétamine.

Ces données suscitent trois types de remarques :

1) L'hyperactivité locomotrice ne serait pas uniquement liée aux niveaux des taux extracellulaires absolus de dopamine mais dépendrait aussi des modalités de la libération du médiateur. Les augmentations brutales et brèves des taux extracellulaires de dopamine observées lors d'une injection périphérique d'amphétamine (absence de superfusion locale d'amphétamine) pourraient être attribuées à des libérations simultanées de dopamine à partir des terminaisons dopaminergiques de neurones dont les activités seraient synchronisées. L'existence d'une telle synchronisation a déjà été décrite par Grace et Bunney (1983) sur la base de données électrophysiologiques et morphologiques obtenues au niveau des cellules dopaminergiques de la substance noire suggérant l'intervention de jonctions de type gap entre ces cellules.

2) La superfusion préalable d'amphétamine dans le noyau accumbens masque partiellement la réponse locale évoquée par l'injection systémique d'amphétamine (diminution du rapport signal/bruit). Toutefois, en inhibant la recapture locale de dopamine, celle-ci favorise néanmoins la visualisation des effets distaux provoqués par l'injection systémique de la drogue, c'est-à-dire par les variations de l'activité des neurones dopaminergiques qu'elle induit. La perfusion locale d'amphétamine facilite ainsi la détection dans le noyau accumbens des effets distaux de l'injection systémique d'amphétamine aux dépens de ses effets locaux. Elle permet donc de mieux apprécier les modifications de l'activité électrique des neurones dopaminergiques à partir des variations des taux extracellulaires de dopamine et de discerner les effets de la synchronisation des cellules dopaminergiques sur les taux extracellulaires de dopamine.

3) Des taux extracellulaires de dopamine très élevés sont nécessaires pour déclencher l'hyperactivité locomotrice lors de la superfusion locale d'amphétamine dans le noyau accumbens. Ceci pourrait indiquer que des libérations simultanées et homogènes de dopamine dans l'ensemble de la structure sont nécessaires pour obtenir des réponses fonctionnelles.

4) Enfin, un lien fonctionnel existerait entre les neurones noradrénergiques et dopaminergiques. En effet, lorsqu'elle est injectée à la périphérie, la D-amphétamine favorise également la libération de noradrénaline au niveau cortical. Ainsi,

en retentissant sur le niveau ou les modalités d'activation de la voie glutamatergique du cortex préfrontal-aire tegmentale ventrale, la stimulation par la noradrénaline des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques corticaux pourrait favoriser le couplage (par des jonctions de type gap) et donc la synchronisation des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (Laurent Darracq, Gérard Blanc).

#### 5.1.2. Sites d'action des phénomènes de sensibilisation comportementale

Des injections répétées de la même dose d'amphétamine provoquent une augmentation de la réponse comportementale (hyperactivité locomotrice) induite par l'amphétamine. Récemment, nous avons montré que l'injection périphérique de l'antagoniste  $\alpha$ 1 adrénergique, le prazosin (0,5 mg/kg, i.p.) bloque le développement de ce phénomène de sensibilisation comportementale.

De nombreuses données suggèrent que la sensibilisation comportementale résulte d'une cascade d'événements intervenant au niveau de l'aire tegmentale ventrale. Parmi ceux-ci, le blocage des récepteurs D1 ou l'activation de l'adénylcyclase couplée à ces récepteurs inhiberait ou faciliterait, respectivement, cette sensibilisation.

Lorsque les animaux reçoivent cinq injections répétées d'amphétamine conduisant au processus de sensibilisation, l'activité locomotrice mesurée après la dernière injection est plus élevée que celle observée lors de la première injection. Curieusement, l'injection bilatérale de prazosin (500 pmoles/côté) dans l'aire tegmentale ventrale augmente l'hyperactivité locomotrice induite par la première injection d'une faible dose de D-amphétamine (+150 %). Par contre, lorsque les injections répétées d'amphétamine sont associées à des injections locales de prazosin, le phénomène de sensibilisation ne peut plus être mis en évidence.

Dans une autre série d'expériences, le prazosin est injecté bilatéralement dans le cortex préfrontal (500 pmoles/côté). Lors de la première injection systémique d'amphétamine, le prazosin bloque l'hyperactivité locomotrice mais après cinq injections d'amphétamine le niveau de l'activité locomotrice des animaux traités avec le prazosin est identique à celui des animaux du groupe contrôle qui se sont sensibilisés.

Ainsi, l'injection de prazosin dans l'aire tegmentale ventrale augmente l'effet aigu de l'amphétamine mais bloque la sensibilisation. Inversement, l'injection de prazosin dans le cortex préfrontal antagonise l'effet aigu de l'amphétamine mais pas la sensibilisation (Candice Drouin, Gérard Blanc.).

## 5.2. ÉTUDES ÉLECTROPHYSIOLOGIQUES 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*

Le cortex cérébral et les ganglions de la base sont reliés par des circuits multisynaptiques striato-pallido- et striato-nigro-thalamiques organisés en boucles parallèles. Précédemment, nous avons montré que les règles d'organisation décrites pour les circuits issus du cortex sensorimoteur s'appliquaient également à ceux originaires du cortex préfrontal (CPF). En effet, nos données anatomiques et électrophysiologiques indiquent que les aires prélimbique et orbitaire médiane (PL/MO) du CPF envoient une projection excitatrice sur une région délimitée du striatum ventral, le « core » du noyau accumbens (NAcc). Cette région du NAcc innerve par une voie directe la zone dorsomédiane de la substance noire pars reticulata (SNR). Les neurones de cette région de la SNR, dont l'activité spontanée est inhibée par la stimulation du NAcc, innervent le noyau médiadorsal du thalamus et la région médiane du noyau ventromédian du thalamus, deux régions thalamiques en relation avec le CPF (Deniau et al., 1994 ; Montaron et al., 1996). Le « core » du NAcc est également relié à la zone dorsomédiane de la SNR par une voie indirecte qui implique successivement la région dénommée VPI du pallidum ventral et la région la plus médiane du noyau subthalamique (STN) (Maurice et al., 1997). L'activation de la voie indirecte exerce vraisemblablement un effet opposé (excitateur) à celui de la voie directe (inhibiteur) sur l'activité des neurones de la SNR. En effet, en inhibant l'activité des neurones du VPI qui eux-mêmes inhibent de tonique sur les neurones du STN, l'activation du NAcc induit une désinhibition des neurones du STN qui projettent à la SNR. Les neurones du STN étant glutamatergiques, la mise en jeu de la voie indirecte évoque une augmentation de l'activité des neurones de la SNR.

Enfin, dans le circuit PL/MO, le STN peut également être considéré comme une structure d'entrée des ganglions de la base. En effet, les neurones du STN reçoivent une afférence excitatrice directe du CPF. Cette année nous avons étudié plus précisément les réponses excitatrices évoquées par la stimulation des aires PL/MO ainsi que les caractéristiques morphologiques des neurones du STN qui présentent ces réponses.

#### *— Réponses excitatrices évoquées dans le noyau subthalamique par la stimulation des aires PL/MO*

Les réponses excitatrices évoquées par la stimulation des aires PL/MO sont observées sur les neurones localisés dans la région la plus médiane du STN qui projettent à la zone dorsomédiane de la SNR. Ces réponses excitatrices sont composées de plusieurs potentiels d'actions successifs interrompus dans certains cas par une inhibition de courte durée. Elles présentent des caractéristiques similaires à celles observées dans le STN latéral à la suite d'une stimulation du

cortex sensorimoteur. Dans ce cas, selon les auteurs qui ont effectué ces études, l'inhibition qui interrompt les réponses excitatrices serait due à un effet « feed-forward » via le globus pallidus externe. Similairement, nos données suggèrent que l'inhibition responsable de l'interruption des réponses excitatrices évoquées dans le STN par la stimulation des aires PL/MO résulte d'une activation du pallidum ventral. En effet, la plupart des cellules du STN qui présentent une réponse excitatrice lors de la stimulation du CPF présentent également une réponse inhibitrice lors de la stimulation du pallidum ventral. D'autre part, les réponses inhibitrices évoquées par la stimulation du pallidum ventral sont observées non seulement sur des neurones du STN qui projettent à la SNR mais également, dans certains cas, sur des neurones du STN qui, en retour, innervent le pallidum ventral. L'identification des cibles de projection des neurones du STN a été réalisée par la méthode d'activation antidromique. Enfin, après l'injection d'un marqueur antérograde, la biocytine, dans un site où les neurones du STN présentent une réponse inhibitrice à la stimulation du pallidum ventral, des fibres marquées antérogradement sont visibles dans la région du pallidum ventral (VPI) qui projette vers le STN (N. Maurice).

— *Étude morphofonctionnelle des neurones du noyau subthalamique*

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer la durée des réponses excitatrices, composées de plusieurs potentiels d'action, observées dans le STN à la suite d'une stimulation corticale : l'intervention de récepteurs NMDA, les propriétés membranaires particulières des neurones du STN ou encore la mise en jeu de collatérales récurrentes de ces neurones. L'existence ou non de collatérales récurrentes au sein du STN est actuellement controversée. Afin de répondre à cette question, la technique d'injection juxtacellulaire de neurobiotine décrite récemment (Pinault, 1996) a été développée dans le laboratoire en collaboration avec J.M. Deniau. Cette technique permet de marquer un neurone identifié par sa réponse électrophysiologique ainsi que l'ensemble de ses dendrites et axones. Elle permet également, à l'aide du logiciel « Neurolucida », de réaliser la reconstruction tridimensionnelle du réseau dendritique et axonal de la cellule ainsi marquée. Les données obtenues par cette approche confirment que les neurones du STN qui présentent une réponse excitatrice lors de la stimulation des aires PL/MO sont localisés dans la région la plus médiane du STN, que leurs axones innervent la zone dorsomédiane de la SNR et qu'ils envoient des collatérales axonales vers le pallidum ainsi que vers le noyau entopédonculaire. Par contre, dans tous les cas étudiés (9 cellules), ces neurones n'émettent pas des collatérales d'axone au sein du STN. Ceci suggère que la mise en jeu de collatérales récurrentes locales n'est pas à l'origine des réponses excitatrices de longue durée observées lors de la stimulation du CPF (N. Maurice)

5.2.2. *Effet facilitateur des récepteurs nicotiques sur les réponses excitatrices induites par la stimulation du noyau médiodorsal du thalamus au niveau du cortex préfrontal*

Le cortex cérébral reçoit une importante innervation cholinergique. L'application d'acétylcholine au niveau cortical induit une excitation directe des cellules pyramidales ou au contraire une inhibition via l'activation des interneurons GABAergiques qui les contactent. Dans ces deux cas, les effets de l'acétylcholine sont médiés par des récepteurs de type muscarinique (Mc Cormick, 1993). Plus récemment, la présence de récepteurs de type nicotinique a été mise en évidence au niveau du cortex cérébral. Les récepteurs muscariniques sont distribués dans les différentes couches corticales. Par contre, les récepteurs nicotiques présents en plus grande densité dans les couches III et IV seraient principalement localisés sur les afférences thalamiques. Selon une étude électrophysiologique effectuée sur des coupes de CPF, la stimulation des récepteurs nicotiques facilite la transmission glutamatergique et cet effet est vraisemblablement présynaptique (Vidal et Changeux, 1993).

En fonction des données précédentes, nous nous sommes proposés d'étudier l'effet de l'activation des récepteurs nicotiques sur les réponses excitatrices évoquées dans le CPF par la stimulation du noyau médiodorsal du thalamus. Nous avons déjà mis en évidence que deux types de réponses excitatrices sont induites par la stimulation électrique du noyau médiodorsal du thalamus : les réponses à courte latence résultant de l'activation de la voie thalamo-corticale et celles à plus longue latence provoquées par l'activation des collatérales intracorticales issues des axones des neurones du CPF qui innervent le noyau médiodorsal du thalamus. L'application iontophorétique d'agonistes nicotiques (nicotine, 1,1-diméthyl-4-phényl-piperazinium (DMPP)) au niveau des cellules du CPF facilite les deux types de réponses. Ces effets facilitateurs sont observés dans la majorité des cas (75 %) pour les réponses à courte latence et dans 54 % des cas pour celles à longue latence. Ils peuvent être bloqués par des antagonistes nicotiques. Ainsi, l'application iontophorétique préalable de mécamylamine, ou l'application par micropression de dihydrobetaerythroidine (DHBE) ou de méthyllycaconitine citrate (MLA) bloque la facilitation des réponses à courte ou longue latences dans 90 % et 67 % des cas respectivement. L'ensemble de ces données indique que la stimulation des récepteurs nicotiques du CPF provoque : 1 - une facilitation de la transmission excitatrice thalamo-corticale, 2 - une augmentation des effets excitateurs provoqués par l'activation des collatérales récurrentes des cellules pyramidales (Y. Gioanni, C. Lepoué, en collaboration avec C. Vidal).

#### PUBLICATIONS

C. GAUCHY, M. DESBAN, J. GLOWINSKI & M.L. KEMEL, *Distinct regulations by peptide and the neurokinin-1 tachykinin receptor agonist (Pro9) Substance P of*

*the N-Methyl-D-aspartate-evoked release of dopamine in striosome — and matrix-enriched areas of the rat striatum.* (Neuroscience, 73 (4), 929-939, 1996).

R.J. WILLIAMS, M. MAUS, N. STELLA, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Reduced glucose metabolism enhances the glutamate-evoked release of arachidonic acid from striatal neurones.* (Neuroscience, 74 (2), 461-468, 1996).

C. CALVO, T. YOSHIMURA, M. GELMAN & M. MALLAT, *Production of monocyte chemotactic protein-1 by rat brain macrophages.* (EJN, 8 (8), 1725-1734, 1996).

P. DERKINDEREN, M. TOUTANT, J.C. SICILIANO, F. BURGAYA, V. DE FRANCISCIS, M. GELMAN & J.A. GIRAULT, *Regulation of a neuronal form of a focal adhesion kinase by anandamide.* (Science, 273 (5282), 1719-1722, 1996).

R. WILLIAMS & J. GLOWINSKI, *Cyclothiazide unmasks an AMPA-evoked release of arachidonic acid from cultured striatal neurones.* (J. Neurochem., 67 n° 4, 1551-1558, 1996).

A. ESTELLES, M. YOKOYAMA, F. NOTHIAS, J.D. VINCENT, J. GLOWINSKI, P. VERNIER & H. CHNEIWEISS, *The major astrocytic phosphoprotein PEA-15 is encoded by two mRNAs conserved on their full length in mouse and human.* (J. Biol. Chem., 271, 25, 14800-14806, 1996).

S. LUKOWSKI, M.C. LECOMTE, J.P. MIRA, P. MARIN, H. GAUTERO, F. RUSSO-MARIE & B. GENY, B., *Inhibition of phospholipase D activity by Fodrin.* (J. Biol. Chem., 271, 39, 24161-24171, 1996).

S. PIROT, J. GLOWINSKI & A.M. THIERRY, *Mediodorsal thalamic evoked responses in the rat prefrontal cortex : influence of the mesocortical DA system.* (Neuroreport, 7 n° 8, 1437-1441, 1996).

A. CHERAMY, F. ARTAUD, G. GODEHEU, M. L'HIRONDEL & J. GLOWINSKI, *Stimulatory effect of arachidonic acid on the release of GABA in matrix-enriched areas from the rat striatum.* (Brain Research, 742, 185-194, 1996).

J.C. SICILIANO, M. TOUTANT, P. DERKINDEREN, T. SASAKI, T. & J.A. GIRAULT, *Differential regulation of proline-rich tyrosine kinase 2/cell adhesion kinase 3 (PYK2/CAK3) and pp125FAK by glutamate and depolarization in rat hippocampus.* (J. Biol. Chem., 271, 46, 28942-28946, 1996).

S. DESAGHER, J. CORDIER, J. GLOWINSKI & M. TENCE, *Endothelin stimulates phospholipase D in striatal astrocytes.* (J. Neurochem., 68 n° 1, 78-87, 1997).

P. DE DEURWAERDER, M. L'HIRONDEL, N. BONHOMME, G. LUCAS, A. CHERAMY & U. SPAMPINATO, *Serotonin stimulation of 5-HT4 receptors indirectly enhances in vivo dopamine release in the rat striatum.* (J. Neurochem., 68 n° 1, 195-203, 1997).

J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, Y. TORRENS & J. GLOWINSKI, *Potency and selectivity of the tachykinin NK3 receptor antagonist SR 142801* (EJP, 319, 307-316, 1997).

P. MARIN, B. HAMON, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Nicotine-induced inhibition of neuronal phospholipase A2.* (JPET, 280 n° 3, 1277-1283, 1997).

L. VENANCE, N. STELLA, J. GLOWINSKI & C. GIAUME, *Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signalling in cultured rat astrocytes.* (J. Neurosci., 17 n° 6, 1981-1992, 1997).

N. STELLA, A. ESTELLES, J. SICILIANO, M. TENCE, S. DESAGHER, D. PIOMELLI, J. GLOWINSKI & J. PREMONT, *Interleukin-1 enhances the ATP-evoked release of arachidonic acid from mouse astrocytes.* (J. Neurosci., 17 n° 9, 2939-2945, 1997).

P. MARIN, K.L. NASTIUK, N. DANIEL, J.A. GIRAULT, A.J. CZERNIK, J. GLOWINSKI, A.C. NAIRN & J. PREMONT, *Glutamate-dependent phosphorylation of elongation factor-2 and inhibition of protein synthesis in neurons.* (J. Neurosci., 17 n° 10, 3445-3454, 1997).

J. PENIT-SORIA, C. DURAND, M.J. BESSON & D. HERVE, *Levels of stimulatory G protein are increased in the rat striatum after neonatal lesion of dopamine neurones.* (NeuroReport, 8 n° 3, 829-833, 1997).

Y.G. KWON, H.B. HUANG, F. DESDOITS, J.A. GIRAULT, P. GREENGARD & A.C. NAIRN, *Characterization of the interaction between DARPP-32 and protein phosphatase 1 (PP-1): DARPP 32 peptides antagonize the interaction of PP-1 with binding proteins.* (PNAS, 94 n° 8, 3536-3541, 1997).

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).

C. GIAUME & K.D. MCCARTHY, *Control of gap-junctional communication in astrocytic networks.* (TINS, 19 (8) 319-325, 1996).

M. MALLAT, C.F. CALVO, A. DOBBERTIN, *Recruitment of brain macrophages : roles of cytokines and extracellular matrix proteins produced by glial or neuronal cells.* (Braz. J. Med. Biol. Res., 29 (9) 1173-1177, 1996).

J.P. TASSIN, *Schizophrénie et neurotransmission : un excès de traitement analogique ?* (L'Encéphale, sp. III, 91-98, 1996).

C. GIAUME, *Les jonctions communicantes des cellules gliales du système nerveux central.* (Annales d'Endocrinologie, Masson, 57, 487-491, 1996).

C. CALVO & M. MALLAT, M., *Expression of macrophage chemotactic protein-1 in rat glial cells.* (Biol. & Physiol. of the Blood-brain barrier, pp 271-277, 1996).

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

M. LE BERT, M. TOUTANT & J.A. GIRAULT, *Transgenic mice expressing an activated tyrosine kinase in neurones.* 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

L. DARRACQ, G. BLANC, J. GLOWINSKI & J.P. TASSIN, *Minute by minute sampling in microdialysis : differential effects on dopamine levels of amphetamine administered locally or systemically.* 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

M. MAUS, M., WILLIAMS, R., GLOWINSKI, J. & PREMONT, J., *Lactate and pyruvate protect striatal neurons from N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity*. 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

N. MAURICE, A.M. THIERRY, J.M. DENIAU, A. MENETREY & J. GLOWINSKI, *Position of the ventral pallidum in the rat prefrontal cortex-basal ganglia circuit*. 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

M. L'HIRONDEL, A. CHERAMY, F. ARTAUD, G. GODEHEU & J. GLOWINSKI, *Control by arachidonic acid of the release of dopamine and GABA in the rat striatum*. 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

B. HAMON, J. GLOWINSKI & C. GIAUME, *Nicotine inhibits voltage-dependent outward K<sup>+</sup> currents in rat cultured striatal neurons*. 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

F. BLANCHET, M.L. KEMEL, C. GAUCHY, S. PEREZ & J. GLOWINSKI, *Regulation of the NMDA-evoked release of acetylcholine in striosome — and matrix-enriched compartments of the rat striatum*. 2nd ENA, Strasbourg, 24-28/09/96.

A.M. THIERRY, *Dopamine function in the prefrontal cortex*. 8th International CA symposium, Asilomar, Calif.(USA) 13-18/10/96.

M.L. KEMEL, F. BLANCHET, S. PEREZ, M. DESBAN, J. GLOWINSKI & C. GAUCHY, *Regulations of NMDA-evoked release of acetylcholine in striosome — and matrix-enriched areas of the rat striatum*. 26th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, 16-21/11/96.

A.M. THIERRY, N. MAURICE, J.M. DENIAU, A. MENETREY & J. GLOWINSKI, *Anatomical and functional relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat*. 26th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, 16-21/11/96.

M. TENCE, Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN & J. GLOWINSKI, *Substance P (SP) stimulates phospholipase D in chinese hamster ovary cells (CHO) expressing the NK1 tachykinin receptors*. 26th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, 16-21/11/96.

H. CHNEIWEISS, M. KUBES, A. ESTELLES, M. ROLLI, J. CORDIER & J. GLOWINSKI, *Endothelin induces phosphorylation of PEA-15 in astrocytes through the activation of calcium-calmodulin kinase II*. 26th Annual Meeting Society for Neuroscience, Washington, 16-21/11/96.

M. MENEGOZ, F. BURGAYA, M. LE BERT, F. ARNOS, C. PALFREY, & J.A. GIRAULT, *Neurophorine A neuronal transmembrane glycoprotein binding protein 4.1*. 6th Int. Cong. Cell Biology & 36th American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, 07-11/12/96.

A.M. THIERRY — *Workshop on: Resolving the nature of dopamine-GABA interactions in prefrontal cortex*. 1997 30th Winter Conference on Brain Research, Breckenridge, Colorado, USA, 25/01-01/02/97.

J. GLOWINSKI, *Circuits locaux intervenant dans le contrôle de la transmission cholinergique dans les compartiments striataux*. De la Neurophysiologie moléculaire aux systèmes intégrés. Hommage à Paul Feltz, Strasbourg, 17/03/97.

C.F. CALVO & M. MALLAT, *Production of macrophage chemotactic activities by rat brain cells*. Keystone Symposia, Copper Mountain, 31/03-05/04/97 Colorado, USA.

P. DERKINDEREN, M. TOUTANT, J. SICILIANO, F. BURGAYA, M. LE BERT, M. GELMAN, J.A. GIRAULT, *Régulation de la phosphorylation sur tyrosine de FAK et PYK2/Cakb dans l'hippocampe : effets de l'anandamide, des neurotransmetteurs et de la dépolarisation*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

A. DOBBERTIN, P. SCHMID, M. GELMAN, J. GLOWINSKI, M. MALLAT, *Cytokines et prolifération de macrophages cérébraux*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

M. L'HIRONDEL, F. ARTAUD, G. GODEHEU, A. CHERAMY, J. GLOWINSKI, A. SAIARDI, E. BORRELLI, *Étude de la libération de 3H-DA à partir de synaptosomes de striatum chez des souris sans récepteurs dopaminergiques D2*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

Y. GIOANNI, J.P. TASSIN, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, *Interaction fonctionnelle entre les récepteurs  $\alpha 1$ -noradrénergiques-et les récepteurs D1- et D2-dopaminergiques dans le cortex préfrontal chez le rat*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

N. MAURICE, J.M. DENIAU, A. MENETREY, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *Implication du noyau subthalamique dans les circuits reliant le cortex préfrontal et les ganglions de la base*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

F. BLANCHET, C. GAUCHY, S. PEREZ, M. DESBAN, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Régulation de la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA dans les striosomes et la matrice du striatum chez le rat : rôle de la dopamine et du GABA*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

L. VENANCE, S. SAGAN, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Rôle des réponses astrocytaires à l'anandamide dans les interactions neurone-glie*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

Y. TORRENS, J.C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, J. GLOWINSKI, M. TENCE, *Stimulation de la phospholipase D par la substance P (SP) dans les cellules CHO exprimant le récepteur NK1 de rat*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

H. CHNEIWEISS, J. CORDIER, M. ROLLI, *Les phosphatases de type 1 et 2A exercent un contrôle tonique sur les phosphoprotéines astrocytaires*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

S. DESAGHER, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Effet neuroprotecteur du pyruvate vis-à-vis de H2O2*. 3<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Bordeaux, 25-28/05/97.

## LISTE DES DIPLÔMÉS — 1996-1997

ROLLI Malvyne (sous la direction de H. Chneiweiss) :

Caractérisation des phosphatases astrocytaires responsables de la déphosphorylation de PEA15.

DEA de Neurosciences, Université P.M. Curie Paris VI, sept. 1996.

MENEGOZ Mathias :

Interactions entre protéines membranaires et cytosquelette. La paranodine une nouvelle glycoprotéine concentrée dans la région paranodale des nœuds de Ranvier.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris 5, soutenue le 5 mai 1997.

SABERAN-DJONEIDI Delara :

Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines du système nerveux central.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris 7, soutenue le 19 juin 1997.