

## **Neuropharmacologie**

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

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

### Séminaires-Symposium :

« LES GANGLIONS DE LA BASE : DU NEURONE À LA FONCTION »

Jacques GLOWINSKI

Introduction

J.-Paul BOLAM (MRC, Oxford)

Neuronal microcircuits of the basal ganglia

Jérôme YELNIK (INSERM U.289, Pitié-Salpêtrière, Paris)

Anatomie fonctionnelle du système striato-pallido-thalamique chez le primate

Bertrand BLOCH (CNRS, Bordeaux)

Communications interneuronales et compartimentation des récepteurs à la dopamine dans le striatum

Claude FEUERSTEIN (INSERM U.318, Grenoble)

Le branchement axonal des neurones dopaminergiques centraux

Lydia KERKERIAN-LE GOFF (CNRS UPR 9013, Marseille)

Interactions cellulaires, neurodégénérescence et processus adaptatifs postlésionnels au niveau du striatum : implication des systèmes à acides aminés excitateurs

Étienne HIRSCH (INSERM U.289, Pitié-Salpêtrière, Paris)

Neurochimie fonctionnelle des ganglions de la base dans les syndromes parkinsoniens

Jean-Michel DENIAU (CNRS URA 1488, Paris)

Architecture fonctionnelle du système striato-nigral chez le rat

Jean FEGER (INSERM U.289, Paris)

Noyau subthalamique et globus pallidus, relations réciproques et contrôle par le noyau parafasciculaire

Anne-Marie THIERRY (INSERM U.114, Paris)

Relations anatomo-fonctionnelles entre le cortex préfrontal et les ganglions de la base

Pierre SOKOLOFF (INSERM 109, Paris)

Implications fonctionnelle et thérapeutique de l'interaction entre les récepteurs D1 et D3 de la dopamine

Emiliana BORRELLI (INSERM U.184, Illkirch)

Ganglions de la base et dopamine : le rôle du récepteur dopaminergique D2

Marie Jo BESSON (Univ. Paris VI)

Contrôle par le cortex cérébral de l'expression de gènes précoces dans le striatum chez le rat

Marie-Lou KEMEL (INSERM U.114, Paris)

Régulation glutamatergique de l'activité des interneurons cholinergiques au niveau des compartiments striataux : rôle de la dopamine

Régis STEINBERG (SANOFI Recherche, Montpellier)

Rôle des récepteurs NK2 dans la modulation de l'activité des neurones cholinergiques du striatum : approche biochimique et comportementale

Jean COSTENTIN (Neuropsychologie expérimentale, Univ. Rouen)

Interactions systèmes opioïdiques — système dopaminergique dans le SNC

Umberto SPAMPINATO (INSERM U.259, Bordeaux)

Rôle du système sérotoninergique dans la régulation de l'activité des voies dopaminergiques nigro-striatale et méso-limbique

Chris CARTER (Synthelabo Recherche SNC, Bagneux)

NMDA receptor subtype mediated control of different neuronal circuits in the basal ganglia

Michel HAMON (INSERM U.288, Paris)

Pluralité des récepteurs 5-HT dans les ganglions de la base — Caractérisation moléculaire et implications fonctionnelles.

Bernard BIOULAC (CNRS, Bordeaux)

Stimulation à haute fréquence : akinésie et rigidité. De l'expérimentation à la chirurgie stéréotaxique dans le syndrome parkinsonien

Alim Louis BENABID (CHU Michallon, Grenoble)

Neuroinhibition du noyau subthalamique comme traitement de la maladie de Parkinson

Sidney WIENER (LPPA, CNRS, Paris)

Réponses sélectives aux récompenses, comportements et position du corps dans le noyau accumbens

Driss BOUSSAOU (CNRS UPR 9075, Institut Neurosciences Cognitives Lyon)

Les ganglions de la base : entre l'attention et l'action

Léon TREMBLAY (Salpêtrière Paris)

Traitement de la récompense par les ganglions de la base

Sue IVERSEN (Dept exp. psychol. Oxford, UK)

Multiple dopamine receptors : behavioural correlates

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE  
(INSERM U.114)

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

1.1. MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA SURVIE NEURONALE

(Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

Libéré en grande quantité pendant l'ischémie, le glutamate est originaire des neurones glutamatergiques mais peut provenir également des astrocytes ou des cellules endothéliales. Dans l'hippocampe, les neurones cibles des neurones riches en glutamate et  $Zn^{2+}$  sont ceux qui dégénèrent principalement après une ischémie globale transitoire. Lors de la reperfusion faisant suite à l'ischémie, l'altération fonctionnelle des mitochondries conduit à une réduction incomplète de l'oxygène moléculaire et par conséquent à une production importante de radicaux superoxydes et de leur produit de dismutation,  $H_2O_2$ . Cette année nous avons poursuivi nos études dans ce domaine en analysant les mécanismes impliqués dans les effets toxiques de l'eau oxygénée et du zinc. De plus, Charles Calvo a identifié le facteur chémoattractant libéré par les neurones favorisant la migration des monocytes/macrophages.

1.1.1. *Analyse des effets neurotoxiques de l'eau oxygénée*

(Études effectuées par Frank Mailly)

Rôle du glutamate extracellulaire : En utilisant des cultures de neurones corticaux de souris, nous avons recherché si une accumulation extracellulaire de glutamate et une stimulation secondaire des récepteurs glutamatergiques de type NMDA n'intervenaient pas dans la neurotoxicité de l' $H_2O_2$ . Cet agent neurotoxique bloque en effet le transport neuronal du glutamate. L'exposition des neurones à l' $H_2O_2$  provoque une augmentation des taux extracellulaires du glutamate et cet effet est bloqué par le MK801 ou l'AP5, des inhibiteurs non compétitif et compétitif des récepteurs NMDA, respectivement. Cet effet neuro-

protecteur diminue en fonction du délai de l'application des antagonistes après le traitement :  $H_2O_2$ .

Rôle des PARP : En altérant l'ADN, les radicaux hydroxyyles provoquent une activation des Poly-ADP-Ribose-Polymérase. Ceci conduit à une réduction des taux de NAD et à une consommation importante d'ATP qui contribue à la resynthèse de NAD. Effectivement, l'exposition des neurones à l' $H_2O_2$  provoque une réduction des taux intracellulaires de NAD et d'ATP. Les taux d'ATP reviennent en partie à des valeurs normales en présence de nicotinamide ou de benzamide, des inhibiteurs de PARP. Toutefois, la chute des taux d'ATP ne résulterait pas uniquement d'une consommation accrue de l'ATP liée à l'activation des PARP mais également d'une inhibition de la synthèse d'ATP provoquée par une altération mitochondriale et, notamment, une disruption du gradient de protons. Les antagonistes des récepteurs NMDA ne diminuent pas la chute de NAD induite par l' $H_2O_2$  mais ils restaurent en partie les taux d'ATP. Les effets des inhibiteurs de PARP et des antagonistes NMDA sur les taux d'ATP sont presque additifs. L'application combinée de ces traitements est très bénéfique sur la survie neuronale.

1.1.2. *Protection de la neurotoxicité du glutamate dans le striatum par le lactate, le pyruvate. Étude des mécanismes mis en jeu*  
(Étude effectuée par Marion Maus)

Nous avons montré que l'application transitoire (30 minutes) de glutamate ou de NMDA sur des cultures de neurones striataux de la souris provoque une mort neuronale importante (estimée 24 heures après le traitement). Ces effets sont fortement amplifiés en absence de glucose.

En absence de glucose, le lactate ou le pyruvate (5-20 mM) protègent en grande partie (>50 %) les neurones de la toxicité induite par le NMDA. Ces substrats énergétiques sont également efficaces en présence de glucose et protègent les neurones de la toxicité induite par des concentrations sous-maximales de NMDA (30-70  $\mu$ M). Le D-lactate est dépourvu d'effet. Le lactate et le pyruvate protègent également les neurones d'une toxicité induite par l'AMPA (mise en évidence en présence de cyclothiazide, substance qui inhibe la désensibilisation rapide des récepteurs AMPA).

L'application de NMDA (30  $\mu$ M) pendant 30 minutes sur des neurones striataux provoque une réduction prononcée des taux intracellulaires d'ATP, effet qui est très aggravé en absence de glucose. Le lactate ou le pyruvate restaurent des taux d'ATP élevés, voisins de ceux observés en présence de glucose. Ils peuvent également se substituer au glucose et servir de substrats métaboliques. Nous avons pu le mettre en évidence en mesurant la respiration mitochondriale des neurones en absence de glucose (mesurant de l'activité des deshydrogénases mitochondriales = réduction du sel de tétrazolium MTT en un précipité bleu formazan). Le lactate et le pyruvate protègent donc les neurones striataux de la toxicité évoquée par le NMDA.

Selon certains auteurs, la neurotoxicité du NMDA serait principalement liée à une activation retardée des récepteurs NMDA (après retrait du NMDA) par le glutamate (ou un autre agoniste des récepteurs NMDA) libéré de façon prolongée par les neurones. Nous avons montré que le pyruvate prolonge la durée d'activation des récepteurs NMDA des neurones striataux (après le retrait du NMDA) et réduit sa toxicité en diminuant l'intensité de ses effets délétères (expériences réalisées en appliquant un antagoniste des récepteurs NMDA, le MK 801, à des temps croissants après le retrait du NMDA). De plus, le pyruvate réduit de façon importante l'augmentation de la concentration extracellulaire de glutamate évoquée par le NMDA.

Le pyruvate et le lactate peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et sont tolérés par l'organisme à des concentrations plasmatiques de l'ordre du millimolaire. L'utilisation thérapeutique du pyruvate dans des situations pathologiques telle que l'ischémie cérébrale (situation dans laquelle une libération prolongée de glutamate et une production accrue d' $H_2O_2$  semblent responsables de la mort neuronale) pourrait donc être envisagée après vérification de son effet neuroprotecteur *in vivo*.

### 1.1.3. Effets neurotoxiques du zinc

(Étude effectuée par Philippe Marin)

Présent en concentrations millimolaires dans les vésicules de certaines terminaisons nerveuses glutamatergiques du cortex cérébral et de l'hippocampe (notamment les fibres moussues), le  $Zn^{2+}$  vésiculaire peut-être co-libéré avec le glutamate lors d'une stimulation nerveuse. Il module les effets du glutamate en : a) potentialisant les réponses provoquées par l'activation des récepteurs AMPA, b) bloquant l'activation des récepteurs NMDA par une inhibition de ces récepteurs indépendante du potentiel (concentrations 0.1-1  $\mu M$ ) ou en bloquant directement le canal selon un mécanisme voltage-dépendant (concentrations 10-100  $\mu M$ ) et enfin c) en inhibant la recapture astrocytaire du glutamate. Le  $Zn^{2+}$  agirait également directement dans la neurotoxicité observée au niveau des régions hippocampiques innervées par les fibres moussues à la suite d'une ischémie globale transitoire.

Nous avons étudié les mécanismes impliqués dans l'influx de  $Zn^{2+}$  au niveau de neurones corticaux de la souris en utilisant deux sondes fluorescentes : le TSQ, une quinone qui interagit préférentiellement avec le  $Zn^{2+}$  associé aux membranes et le BTC-5N, une sonde reconnaissant le  $Zn^{2+}$  libre cytosolique et qui est insensible aux ions  $Ca^{2+}$  et  $Mg^{2+}$ .

La majorité du  $Zn^{2+}$  qui pénètre dans les neurones s'associe rapidement aux membranes. En effet, la fluorescence du TSQ est augmentée et celle du BTC-5N reste inchangée lorsque les neurones sont en présence de  $Zn^{2+}$ . De plus, une perméabilisation de la membrane plasmique effectuée à l'aide de digitonine ne

provoque pas une disparition de la fluorescence du TSQ liée au  $Zn^{2+}$ . Ces données ont été confirmées par fractionnement subcellulaire : effectivement, le  $Zn^{2+}$  s'accumule essentiellement dans les membranes et une partie importante du  $Zn^{2+}$  cytosolique est associée aux protéines. La dissociation du  $Zn^{2+}$  des membranes neuronales est un phénomène très lent car l'application de TSQ une heure après l'exposition des neurones au  $Zn^{2+}$  produit une fluorescence identique à celle obtenue lorsque la sonde est appliquée immédiatement après le traitement. L'influx de  $Zn^{2+}$  ne résulte pas d'une diffusion au travers des récepteurs AMPA ou des canaux calciques voltage-dépendants. Toutefois, l'influx de  $Zn^{2+}$  peut être facilité par l'activation des récepteurs AMPA ou une dépolarisation membranaire. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de l'influx neuronal de  $Zn^{2+}$  dans des conditions expérimentales permettant le fonctionnement réverse de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ . Selon nos données, l'essentiel de l'influx spontané de  $Zn^{2+}$  résulterait de la capacité du  $Zn^{2+}$  de diffuser librement à travers la bicouche lipidique. L'existence d'un transporteur spécifique du  $Zn^{2+}$  peut être également envisagée.

Un mécanisme semblable d'influx du  $Zn^{2+}$  semble intervenir également dans ses effets neurotoxiques. En effet, la mort neuronale retardée (estimée 24 heures après le traitement) induite par une exposition transitoire de 30 min des neurones au  $Zn^{2+}$  n'implique pas l'ouverture de récepteurs AMPA ou NMDA ou des canaux calciques voltage-dépendants. Elle semble résulter d'une stimulation secondaire des récepteurs NMDA liée à une libération retardée du glutamate par les neurones préalablement exposés au  $Zn^{2+}$ . En effet, le  $Zn^{2+}$  induit une augmentation retardée des concentrations extracellulaires de glutamate. De plus, les effets neurotoxiques du  $Zn^{2+}$  ne sont pas diminués par une application simultanée des antagonistes des récepteurs NMDA (MK-801 ou AP5). Par contre, ils sont considérablement réduits lorsque ces antagonistes sont appliqués après l'exposition des neurones au  $Zn^{2+}$ . L'augmentation des taux extracellulaires de glutamate évoquée par le  $Zn^{2+}$  pourrait résulter de l'inhibition de la respiration mitochondriale et par conséquent d'une diminution des taux intracellulaires d'ATP. Ce phénomène serait en effet responsable d'une dépolarisation membranaire et de l'augmentation de la libération de glutamate. Le  $Zn^{2+}$  pourrait également inhiber des transporteurs neuronaux du glutamate tel que cela a été mis en évidence dans les astrocytes. Cette inhibition serait alors à l'origine de l'accumulation de concentrations neurotoxiques de glutamate dans le milieu extracellulaire.

Ainsi, le  $Zn^{2+}$  co-libéré avec le glutamate au cours d'une ischémie cérébrale, pourrait amplifier le processus de neurotoxicité lié à l'activation par le glutamate des récepteurs NMDA. La liaison prolongée du  $Zn^{2+}$  aux membranes des neurones cibles provoquerait des modifications à long terme de certaines de leurs propriétés et notamment une capacité accrue de libérer du glutamate.

#### 1.1.4. *Effet inhibiteur du zinc sur la synthèse protéique*

(Étude effectuée par Merhdad Alirezai et Philippe Marin)

Les périodes d'ischémie cérébrale s'accompagnent d'une inhibition de la synthèse protéique neuronale, phénomène qui peut en partie résulter de la phosphorylation du facteur eEF-2 par le glutamate. En accord avec des données obtenues par d'autres auteurs sur un lysat de réticulocytes, nous avons montré que le  $Zn^{2+}$  inhibe également la synthèse des protéines des neurones corticaux de la souris. Cette inhibition (plus de 80 %) induite par 100  $\mu$ M de  $Zn^{2+}$  résulte bien d'un influx de  $Zn^{2+}$  car l'efficacité de concentrations sous-maximales de  $Zn^{2+}$  est fortement accrue en présence d'un ionophore spécifique du  $Zn^{2+}$ , la  $Na^+$ -pyrithione. Cet effet inhibiteur du zinc ne nécessite pas l'activation des récepteurs NMDA et AMPA ou l'influx du  $Zn^{2+}$  par des canaux calciques potentiel dépendants.

L'effet inhibiteur du  $Zn^{2+}$  sur la synthèse protéique n'implique que de façon marginale la phosphorylation du facteur d'élongation eEF-2. La phosphorylation d'eEF-2 est moins importante que celle induite par le glutamate alors que l'effet inhibiteur du  $Zn^{2+}$  sur la synthèse protéique est plus prononcé que celui du glutamate. De plus, cette phosphorylation est transitoire alors que l'inhibition de synthèse protéique est prolongée. Par contre, les amplitudes de la phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 et de l'inhibition de la synthèse protéique induites par le zinc sont voisines de celles induites par la thapsigargine, un inhibiteur de l'ATPase / $Ca^{2+}$  du RE qui provoque une déplétion des stocks calciques intracellulaires.

En conclusion, le  $Zn^{2+}$ , libéré avec le glutamate lors d'une ischémie cérébrale, pourrait contribuer à l'inhibition de la synthèse protéique neuronale observée dans cette pathologie. Cette inhibition de synthèse protéique est essentiellement liée à la phosphorylation du facteur d'initiation eIF-2 de la synthèse des protéines.

#### 1.1.5. *Neurotoxicité et recrutement des monocytes/macrophages dans le SNC*

(Étude réalisée par Charles Calvo)

Au cours du développement, le processus physiologique de mort neuronale est associé à une accumulation de monocytes/macrophages dans le tissu nerveux. Cette infiltration monocyttaire serait ainsi à l'origine d'une partie au moins de la population microgliale observée dans le SNC adulte.

Nous nous sommes intéressés au mécanisme associé à cette migration. Nous avons proposé que cette réponse monocyttaire soit due à un gradient de facteurs chimioattractants produits par les cellules corticales embryonnaires. En utilisant des milieux conditionnés de cellules nerveuses embryonnaires, et un test de migration des macrophages cérébraux *in vitro*, nous avons déjà montré l'existence d'une telle activité. La caractérisation biochimique avait permis de démontrer l'implication d'une molécule de type peptidique dans cette activité chimioattractante. En recherchant des agents ayant la capacité de bloquer la migration des

macrophages, nous avons remarqué que la naloxone était particulièrement efficace, l'inhibition de la migration pouvant atteindre 70 % à  $10^{-6}$ M. Nous avons donc envisagé que l'un (des) membre(s) de la famille des peptides opiacés était responsable de l'activité chimioattractante décelée dans nos expériences. Par une analyse d'amplification de gène après une transcription inverse de l'ARN total isolé, nous avons montré que les macrophages cérébraux utilisés dans le test de chimioattraction expriment les trois principaux récepteurs des opiacés ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ). L'étude du blocage de la migration avec des antagonistes sélectifs pour chacun des récepteurs a révélé l'intervention du récepteur  $\mu$  et/ou  $\delta$ . L'expérience inverse consistant à tester l'effet d'agonistes sélectifs a permis de mettre en évidence que seul un peptide agoniste du récepteur  $\delta$  à la capacité d'attirer les macrophages cérébraux dans des proportions équivalentes à celles obtenues avec le milieu conditionné des cellules mixtes embryonnaires.

En conclusion, un peptide opiacé de type  $\delta$  serait produit par les cellules nerveuses embryonnaires et participerait au mécanisme d'infiltration du SNC par des cellules macrophagiques (C.-F. Calvo et M. Gelman).

## 1.2. ÉTUDE DES INTERACTIONS NEURONES-GLIES PAR L'INTERMÉDIAIRE DES JONCTIONS COMMUNICANTES (Responsable de l'équipe : Christian Giaume)

### 1.2.1. *Contrôle neuronal de la communication jonctionnelle des astrocytes*

L'influence des neurones sur la communication jonctionnelle astrocytaire a été étudiée à l'aide de plusieurs modèles de cultures d'astrocytes purs et de co-cultures neurones-astrocytes issues de striata de rats embryonnaires. Dans les différents types de cultures, la présence de neurones augmente de 50 % le couplage diffusionnel dans les astrocytes pour un traceur intercellulaire fluorescent (le jaune Lucifer). Le couplage diffusionnel entre les astrocytes a été étudié par des enregistrements en patch-clamp et la technique de « scrape-loading ». L'augmentation du couplage est observée à partir du 7<sup>e</sup> jour de culture des neurones lorsque ceux-ci présentent une activité synaptique spontanée importante et des courants entrants sodiques de grande amplitude. Cet effet dépend de la densité des neurones, et atteint une valeur maximale pour un rapport de 1 neurone pour 2 astrocytes. Par contre, la co-culture d'astrocytes et de cellules microgliales réalisée dans des proportions identiques diminue de 35 % le couplage diffusionnel astrocytaire. Ces observations ont été complétées en réalisant des western blots avec un anticorps reconnaissant la connexine 43 (Cx43), la protéine majoritaire des jonctions communicantes astrocytaires. L'expression de la Cx43 est augmentée en présence de neurones cultivés pendant plus d'une semaine et diminuée en présence de cellules microgliales ce qui est en accord avec les données fonctionnelles.

La stimulation des récepteurs neuronaux NMDA (libération d'un messenger transcellulaire, l'acide arachidonique), ou l'induction d'une mort neuronale après



une période de 24 h inhibent l'effet stimulant neuronal sur le couplage diffusiel observé au niveau des astrocytes. L'effet des neurones dépend de leur activité électrique : il est supprimé par une application prolongée (1-3 jours) de tetrodoxine, d'antagonistes des récepteurs AMPA (CNQX), ou GABA A (picrotoxine ou bicuculline). L'augmentation de la communication astrocytaire induite par les neurones accroît (30 %) l'étendue de la propagation des vagues calciques intercellulaires induites dans les astrocytes par stimulation mécanique unitaire.

Ces différentes observations confirment que les neurones et les astrocytes interagissent de manière étroite et réciproque en facilitant leur mode de communication : la transmission synaptique pour les neurones et la communication jonctionnelle pour les astrocytes (Nathalie Rouach, Jocelyne Cordier).

### 1.2.2. *Étude comparative des courants chlore dans les astrocytes isolés ou confluents*

Plusieurs sous-populations d'astrocytes peuvent être distinguées en fonction de différences dans leur relation entre le courant et le voltage (I/V). Cette diversité pourrait résulter de l'existence d'un couplage « électrique » entre ces cellules. Les caractéristiques de la relation I/V ont donc été étudiées sur des astrocytes isolés ou confluents, enregistrés en patch-clamp en configuration « cellule entière » dans des cultures primaires de striatum de rat embryonnaire.

A confluence, la majorité des astrocytes présente une relation I/V proche de la linéarité et un potentiel d'inversion moins négatif que ceux des astrocytes isolés ( $-46 \pm 5$  mV et  $-73 \pm 4$  mV, respectivement) dont la relation I/V présente une rectification (entrante et/ou sortante). Si l'application d'acide glycérophthalique, un inhibiteur des canaux jonctionnels, réduit le courant total ( $84 \pm 6$  %), elle ne modifie pas la linéarité de la relation I/V ni son potentiel d'inversion. Par contre, l'application de NPPB, un bloquant des canaux chlore, qui réduit l'amplitude du courant total ( $19 \pm 7$  %), fait apparaître une rectification et déplace le potentiel d'inversion ( $-65 \pm 6$  mV). Ces effets sont reproduits partiellement par un autre bloquant des canaux chlore, le DIDS. Ces deux agents ont des effets moins marqués sur des astrocytes isolés. Une importante composante chlore pourrait donc contribuer au courant total des astrocytes confluents. Ceci a été confirmé en substituant le potassium externe et interne par du césium, puisque le potentiel d'inversion ( $-27 \pm 5$  mV) est alors proche de celui des ions chlore ( $-30$  mV). En présence de césium, une augmentation du calcium intracellulaire, provoquée par une application d'ionomycine en présence de calcium externe, induit une augmentation du courant chlore sensible au NPPB. Des applications identiques réalisées après le blocage des courants potassium et chlore activent également une conductance cationique non-sélective.

En conclusion, les canaux chlore semblent jouer un rôle important dans l'apparition des nouvelles propriétés des astrocytes organisés en réseaux. Dans cette

situation, ces canaux pourraient contribuer à des fonctions astrocytaires telles que la propagation de vagues calciques et la régulation du volume cellulaire (Rostislav Byshkov).

### 1.2.3. *Étude du rôle des jonctions communicantes (synapses électriques) entre les neurones des ganglions de la base*

Les neurones gabaergiques épineux de taille moyenne (NETM) présents en majorité dans le striatum sont massivement innervés par des afférences en provenance du cortex cérébral, du thalamus et du mésencéphale. Ces neurones projettent directement sur des aires de sorties majeures des ganglions de la base telles que le globus pallidus et la substance noire. D'autre part, par l'intermédiaire de leurs collatérales, les NETM constituent une des principales populations neuronales impliquées dans les interactions internes du striatum. Une caractéristique de ces neurones est qu'ils sont connectés entre eux par des jonctions communicantes. Ces jonctions présentent un certain degré de spécificité et de plasticité : chez l'adulte le couplage entre les NETM respecte les divisions anatomo-fonctionnelles (striosomes et matrice) du striatum et la perméabilité jonctionnelle entre NETM est régulée au cours du développement post-natal, et est sensible aux lésions de structures afférentes au striatum et à des traitements pharmacologiques (neuroleptiques) à court ou à long termes.

La technique de patch-clamp utilisée sur tranches de cerveaux nous a permis de confirmer et d'étudier le couplage diffusionnel, à l'aide d'un traceur intercellulaire — la biocytine —, au niveau des NETM du striatum et des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta. Le couplage diffusionnel est important au début du développement et puis diminue. En effet, l'incidence du couplage entre les NETM est de 70 % à P5, 56 % à P10, 64 % à P15 et 23 % à P25. Ce couplage diffusionnel disparaît lorsque les tranches de cerveau ont été traitées par des agents inhibant la communication intercellulaire par l'intermédiaire des jonctions communicantes, tels que l'halothane ou la carbonexolone. L'incidence de couplage entre les neurones dopaminergiques de la substance noire est de 24 % entre P5 et P25. L'existence de ces couplages (NETM et neurones dopaminergiques) suggère que des groupes de neurones pourraient fonctionner de manière synchrone (Laurent Venance, Anne-Marie Godeheu).

## 1.3. RÉCEPTEURS DES TACHYKININES ET SYSTÈMES DE SIGNALISATION

(Responsables de l'équipe : Jean-Claude Beaujouan, Yvette Torrens et Martine Tencé)

### 1.3.1. *Caractérisation pharmacologique du site des tachykinines NK1 (septide-sensible) dans les glandes sous-maxillaires de rat*

Cette étude a été effectuée en collaboration avec les Drs S. Lavielle et G. Chassaing (laboratoire de chimie organique, Jussieu).

Précédemment, nous avons mis en évidence un sous-type de récepteur NK1 des tachykinines ('septide-sensible') dans certains tissus périphériques. La synthèse de [3H]propionyl-[Met(O<sub>2</sub>)<sup>11</sup>]SP(7-11) ([3H]ALIE-124) a permis d'obtenir un radioligand se liant spécifiquement sur les sites NK1 'septide-sensible' de cellules CHO transfectées avec le cDNA du récepteur NK1 humain et murin des tachykinines. Des sites de liaison [3H]ALIE-124 à haute affinité ont également été mis en évidence sur des membranes de glandes sous-maxillaires de rat. Les caractéristiques biochimiques et pharmacologiques de ce sous type de récepteurs NK1 'septide-sensible' des tachykinines ont donc été précisément analysées sur cette préparation en utilisant non seulement l'[3H]ALIE-124 mais aussi la [125I]-Neurokinine A ([125I]-NKA) comme radioligands. La [125I]-NKA a été choisie pour son activité spécifique élevée, mais aussi parce que la NKA possède une faible affinité pour les sites de liaison NK1 classiques et une très bonne affinité pour les sites de liaison 'septide-sensible'.

La liaison à haute affinité de [125I]-NKA est saturable, réversible et température-dépendante, (équilibre de liaison : 60 minutes, constante de dissociation (Kd) : 3,2 nM ; nombre de sites : 307 fmoles par mg de protéines). La [125I]-NKA se lie à une population homogène de sites n'interagissant pas entre eux. Les expériences de compétition indiquent que la [125I]-NKA et le [3H]ALIE-124 se lient exclusivement sur des sites identiques : les sites 'septide-sensible'. Les affinités des tachykinines et de molécules apparentées vis-à-vis des sites marqués par la 125I-NKA ou l'[3H]ALIE-124 sont identiques.

Les agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs NK2 et NK3 ne présentent que peu ou pas d'affinité pour les sites de liaison [125I]-NKA. Par contre, la SP ainsi que les agonistes et antagonistes sélectifs des récepteurs NK1 classiques reconnaissent avec de hautes affinités les sites de liaison NK1 'septide-sensible' selon des modalités identiques à ce que nous avons précédemment observé au niveau des sites NK1 classiques marqués avec le ligand [125I]Bolton-Hunter substance P sur des synaptosomes de cerveau de rat. Toutefois, plusieurs caractéristiques des sites NK1 'septide-sensible' se distinguent de celles des sites NK1 classiques. Seuls les sites NK1 'septide-sensible' sont reconnus avec une très bonne affinité par la NKA, le neuropeptide K (NPK), le neuropeptide gamma (NPgamma) et la neurokinine B (NKB), des fragments C-terminaux tels que la SP(6-11) et la NKA(4-10) ainsi que par des analogues modifiés de la substance P (SP) et de la NKA de la famille des agonistes de type 'septide'. L'ALIE-124 et la SP(6-11) sont les molécules les plus appropriées pour discriminer les sites NK1 'septide-sensible' des sites NK1 classiques.

La forte augmentation de sécrétion salivaire induite par le NPK et le NPgamma, et les effets potentialisateurs puissants de ces peptides vis-à-vis des réponses évoquées par la SP résultent vraisemblablement de leur action sur les sites NK1 'septide-sensible' car les glandes sous-maxillaires de rat ne possèdent pas de récepteurs NK2.

### *1.3.2. Mise en évidence de deux sous-types de récepteurs NK1 distincts des récepteurs NK1 classiques dans le cerveau de rat*

Des études effectuées avec la [125I]-NKA au niveau de membranes de cerveau de rat en présence d'un antagoniste NK2 (SR48968) et d'un agoniste NK3 (senktide), afin d'éviter une fixation du ligand sur des récepteurs NK2 ou NK3, ont permis de mettre en évidence une liaison spécifique réversible température-dépendante et bloquée par divers antagonistes NK1.

Des études de compétition effectuées avec des concentrations croissantes de SP(6-11) ont permis de mettre en évidence l'existence de deux sous populations de sites NK1 (distincts des sites NK1 classiques) marqués par ce ligand dans certaines structures cérébrales. La caractérisation de ces sites a permis de montrer que l'un d'eux présente toutes les caractéristiques pharmacologiques des sites 'septide-sensible' de la glande sous-maxillaire de rat et que l'autre se distingue des sites NK1 'septide-sensible' par sa faible affinité pour la SP(6-11) et l'ALIE-124 et par une plus faible affinité pour certains antagonistes de récepteurs NK1. Les quantités absolues et les proportions relatives de ces deux sites diffèrent d'une structure cérébrale à une autre. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives dans les recherches sur les antagonistes NK1 (Jean-Claude Beaujouan, Monique Saffroy, Yvette Torrens).

### *1.3.3. Effets multiples de l'acide lysophosphatidique et de la sphingosine-1-phosphate dans les astrocytes de striatum*

Lors d'une hémorragie, les plaquettes activées libèrent de nombreuses molécules et en particulier, l'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine-1-phosphate (S-1-P). Ces deux lysophospholipides (dont les concentrations peuvent atteindre jusqu'à 50 mM dans le système nerveux central lors d'un traumatisme et d'une rupture de la barrière-hémoencéphalique) sont des messagers transcellulaires qui agissent localement de façon autocrine/paracrine sur des récepteurs membranaires. Récemment clonés, ces récepteurs couplés à des protéines G ont été nommés EDG-1 et EDG-3 pour les récepteurs de la S-1-P et EDG-2 et EDG-4 pour ceux du LPA. Selon des données récentes, le LPA exercerait des effets délétères sur les neurones. Toutefois, nous ne possédons pas encore d'informations sur les modalités des effets de ces deux lipides au niveau central.

Nos expériences indiquent que le LPA et la S-1-P activent plusieurs cascades de signalisation dans les astrocytes du striatum de la souris embryonnaire (cultures) : 1) stimulation de l'hydrolyse des phosphoinositides, cet effet s'accompagnant d'une libération de calcium à partir des stocks intracellulaires ; 2) inhibition de la production d'AMP cyclique induite par les agonistes beta-adrénergiques ou VIP-ergiques ; 3) stimulation de la libération d'acide arachidonique, cet effet résultant probablement de l'activation d'une phospholipase A2 ;

4) stimulation d'une activité phospholipase D et enfin ; 5) activation importante des MAP kinases, ERK1 et ERK2. La plupart de ces effets font intervenir des protéines G de type Gi/Go.

L'analyse des effets du LPA et de la S-1-P sur la plasticité morphologique, la prolifération et l'activité métabolique des astrocytes a également été entreprise. Bien qu'activant les mêmes cascades de signalisation, le LPA et la S-1-P ont pourtant des effets différents. Ainsi, la S-1-P stimule la synthèse d'ADN alors que le LPA est totalement inefficace. Par contre, le LPA provoque de profondes modifications morphologiques et semble perturber les processus d'exocytose. Ces deux phospholipides doivent agir sur les astrocytes en activant des récepteurs différents. De fait, des expériences de RT-PCR, ont permis de mettre en évidence l'existence des ARN messagers des deux récepteurs EDG-1 et EDG-2 dans ces cellules.

Ces études ont été effectuées par Alice Pébay, Jocelyne Cordier et Martine Tencé en collaboration avec Madeleine Toutant, Joël Prémont, Marc Le Bert et Charles-Felix Calvo.

## 2. ÉTUDE DES PROTÉINES KINASES ET PHOSPHATASES NEURONALES

### 2.1. MÉCANISMES DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE DANS LES NEURONES (Responsable de l'équipe : Jean-Antoine Girault)

#### 2.1.1. Mécanismes de signalisation en aval du récepteur D1 de la dopamine (D. Hervé, J.-A. Girault)

Nous étudions la protéine G hétérotrimérique qui couple le récepteur D1 de la dopamine à l'adénylyle cyclase dans le striatum. Les neurones striatonigraux contiennent des quantités importantes de la protéine G $\alpha$ olf, mais pas de G $\alpha$ s à un niveau détectable. La concentration de G $\alpha$ olf semble jouer un rôle limitant dans l'activation de la cyclase par les récepteurs D1 et être régulée par leur degré d'utilisation. En effet, elle est augmentée après lésion des neurones dopaminergiques et chez les souris dépourvues de récepteurs D1. Une augmentation moins marquée de G $\alpha$ olf est observée dans le striatum de souris dépourvues de récepteurs A2a de l'adénosine, couplés à l'adénylyle cyclase dans les neurones striatopallidaux. Dans tous les cas, l'augmentation du taux de protéine G $\alpha$ olf ne s'accompagne pas de modification de son ARN messenger indiquant que la régulation a lieu au niveau post-transcriptionnel. Notre hypothèse de travail est que l'activation de G $\alpha$ olf entraîne une instabilité de la sous-unité  $\alpha$  et que celle-ci est plus facilement dégradée.

### 2.1.2. *Protéines tyrosines kinases activées par les neurotransmetteurs dans le système nerveux*

(Alicia Costa, Pascal Derkinderen, Michèle Gelman, Marc Le Bert, Jeanne-Marie Studler, Madeleine Toutant)

Nous nous intéressons aux voies de signalisation intracellulaires activées par les neurotransmetteurs et faisant intervenir deux tyrosines kinases non récepteurs étroitement apparentées, la kinase des plaques d'adhérence (FAK, focal adhesion kinase), et PYK2/CAK $\beta$ . Dans les tranches d'hippocampe, la phosphorylation sur tyrosine de FAK et son autophosphorylation sont augmentées en réponse à différents neurotransmetteurs et à des messagers lipidiques tels que l'acide lysophosphatidique, l'acide arachidonique, et l'anandamide, un ligand endogène des récepteurs cannabinoïdes CB1. Par contre, PYK2/CAK $\beta$  est sélectivement activée par la dépolarisation. Les travaux récents ont permis de préciser la régulation de FAK par les endocannabinoïdes et de mettre en évidence l'activation parallèle de la voie des MAP-kinases ERK dans les mêmes conditions.

Une autre partie du travail porte sur la caractérisation biochimique de FAK. Nous avons montré avec I. Callebaut et J.P. Mornon (LMCP, Jussieu) que l'extrémité N-terminale de FAK est apparentée au domaine bande 4.1/ERM (ezrine, radixine, moesine), un domaine présent dans de nombreuses protéines qui permet leur ancrage de protéines cytoplasmiques à certaines protéines membranaires. Nous avons aussi montré que ce domaine est présent dans les JAKs (Janus kinases), qui médient l'action des cytokines, permettant de définir la super-famille de domaines JEF (JAK-ERM-FAK). Les recherches en cours ont pour but de caractériser la structure et les partenaires du domaine JEF de FAK. Nous étudions également les propriétés des isoformes neuronales de FAK et leur mécanisme d'activation.

### 2.1.3. *La paranodine, une glycoprotéine neuronale enrichie dans la région paranodale des nœuds de Ranvier*

(Pascal Ezan, Marc Le Bert, Wilma Martinez)

Cette protéine est très enrichie dans la région paranodale des nœuds de Ranvier du système nerveux central et périphérique. Sa grande région extracellulaire présente des similitudes avec les neurexines et son court domaine intracellulaire comporte une région d'interaction avec les protéines à domaine bande 4.1/ERM ainsi qu'une extrémité riche en proline. La localisation particulière de la paranodine, son abondance et ses caractéristiques structurales suggèrent qu'il s'agit d'un composant important des paranodes, pouvant jouer un rôle dans leur structure et les phénomènes de signalisation qui prennent place à leur niveau. Les travaux récents ont montré que la paranodine interagit *in vitro* et dans des cellules transfectées avec différentes protéines à domaine bande 4.1/ERM. Les recherches en cours ont pour but d'identifier les partenaires physiologiques de la paranodine parmi ces protéines. Nous étudions aussi le rôle de la paranodine dans la formation

et la fonction des régions paranodales dans des co-cultures neurones-oligodendrocytes en collaboration avec le laboratoire de B. Zalc (INSERM, Pitié Salpêtrière). Enfin, nous examinons la maturation intracellulaire de la paranodine et ses interactions avec F3/contactine en collaboration avec Catherine Faivre Sarraillh et Geneviève Rougon (CNRS Luminy).

## 2.2. RÔLES DES PHOSPHORYLATIONS ASTROCYTAIRES DANS LES RÉPONSES DU TISSUS NERVEUX À UNE AGRESSION

(Responsable de l'équipe Hervé Chneiweiss (Brigitte Canton, Hervé Chneiweiss, Jocelyne Cordier, Mireille Fauquet, Étienne Formstecher, Darina Zvalova)

Les astrocytes constituent la première ligne de défense du tissu nerveux en cas d'agression, que celle-ci soit infectieuse, virale ou bactérienne, traumatique ou liée à des désordres vasculaires, ischémiques ou hémorragiques. Les cellules astrocytaires ont une grande capacité de survie ce qui contraste avec la mort neuronale ou oligodendrocytaire par apoptose fréquemment observée dans ces conditions d'agression. De plus, les astrocytes développent des réponses spécifiques à ces agressions se traduisant en particulier par des changements de leur forme et de leurs fonctions. Ainsi, les astrocytes participent à la réponse immune en exprimant de nombreuses molécules de surface permettant l'initiation et le développement de la réponse inflammatoire centrale, et en sécrétant de nombreuses cytokines et notamment, le facteur de nécrose tumorale TNF alpha, qui interviennent dans l'organisation de cette réponse. Nous avons donc poursuivi l'analyse des mécanismes d'activation des kinases de stress astrocytaires et étudié leurs conséquences. L'étude du rôle de la phosphoprotéine PEA-15 a également été poursuivie : nous avons montré que l'expression de cette protéine favorise la protection de l'astrocyte contre la mort cellulaire induite par le TNF alpha.

### 2.2.1. *Analyse de l'activation des kinases de stress JNK et p38 astrocytaires*

Nous avons observé que le choc osmotique, situation rencontrée notamment lors des hémorragies cérébrales, induit une activation puissante et prolongée de la p38/SAPK2 dans les astrocytes, sans provoquer de mort cellulaire secondaire. Certains des mécanismes moléculaires intervenant en amont et en aval de la stimulation de la kinase lors de l'application sur les cellules de sorbitol ont été caractérisés. Plusieurs toxines bloquant les protéines G, par exemple la toxine pertussis dirigée contre Gi et Go, sont sans effet sur l'activation de la kinase par le sorbitol, suggérant que l'osmorécepteur n'est pas couplé à ce système de transduction. Par contre, le choc osmotique induit immédiatement une stimulation de la tyrosine kinase Pyk2, déjà décrite dans d'autres systèmes cellulaires. Nous avons également observé que le choc osmotique induit une stimulation de la PKC. Cette activation de la PKC est secondaire à celle de p38/SAPK2 et ces PKCs n'appartiennent pas à la famille des PKC atypiques car elles sont désensi-

bilisées après traitement aux esters de phorbol. Des constructions peptidiques permettant le transfert dans la cellule de fragments inhibiteurs de la partie N-terminale des PKCs seront réalisées afin d'identifier plus précisément l'enzyme sélectivement activée par p38/SAPK2 (Darina Zvalova, Jocelyne Cordier).

### 2.2.2. *Fonctions(s) de PEA-15*

PEA-15 est un substrat majeur de la protéine kinase C et de la kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de type 2 (CaMKII). Sa partie N-terminale (acides aminés 1 à 80), constitue un Death Effector Domain (DED), homologue avec celui de plusieurs protéines impliquées dans la transduction intracellulaire des effets du ligand de Fas et du TNF alpha, en particulier, l'induction de la mort cellulaire programmée (apoptose). Ces molécules peuvent être proapoptotiques (FADD, caspase-8 et caspase-10) ou inhibent l'apoptose (cFLIP). Des études d'interactions *in vitro* entre PEA-15, FADD et/ou caspase-8, seules ou en fusion avec la GST, ont permis de démontrer l'existence d'une liaison possible de PEA-15 et FADD, et de PEA-15 et caspase-8, en plus des interactions connues FADD/FADD, et FADD/caspase-8 (Brigitte Canton, Étienne Formstecher).

Des transfections transitoires de cellules Cos7 ou NIH 3T3 indiquent que l'expression de PEA-15 protège ces cellules de la mort cellulaire induite par la co-transfection avec FADD ou par le TNF, respectivement. Nous avons aussi obtenu des clones exprimant de façon stable PEA-15 ou une construction GFP-PEA-15, mettant ici encore en évidence le rôle protecteur de PEA-15 vis-à-vis de la mort cellulaire induite par le TNF $\alpha$  (Mireille Fauquet, Brigitte Canton, Hervé Chneiweiss).

Le rôle de PEA-15 dans l'astrocyte a été aussi analysé à l'aide d'une souris mutante dont le gène codant pour PEA-15 a été invalidé par recombinaison homologue (recombinaison réalisée dans le laboratoire du Pr Philip Leder, Harvard Medical School). L'exposition au TNF $\alpha$  de cultures d'astrocytes des souris mutantes provoque chez 60 % environ des cellules étudiées des signes d'apoptose après 24 heures de ce traitement. Par contre, le TNF $\alpha$  est sans effet sur les astrocytes des souris sauvages parentes des mutantes. Inversement, la re-expression après transfection de PEA-15 dans les astrocytes de la souris mutante, protège ces cellules des effets délétères du TNF $\alpha$ . Dans les astrocytes, PEA-15 est donc un inhibiteur de l'apoptose induite par le TNF $\alpha$  (Jocelyne Cordier, Étienne Formstecher, Hervé Chneiweiss).

Les astrocytes expriment de façon très faible FADD et caspase-8, ce qui nous a conduit à nous interroger sur l'identité du partenaire physiologique de PEA-15. En collaboration avec le Dr Jacques Camonis (Institut Curie, Paris) nous avons développé une stratégie de recherche des interactions protéines-protéines par double hybride dans la levure. Une banque astrocytaire de cDNA a donc été insérée dans le vecteur pGADGE. La caractérisation des partenaires identifiés indique que PEA-15 doit être considérée comme une protéine adaptatrice inter-



venant à l'interface du contrôle de la mort cellulaire et de l'activation de facteurs de transcription impliqués dans le cycle cellulaire. Une collaboration a donc été établie avec les Drs Joe Ramos et Mark Ginsberg (Scripps Institute, San Diego, USA) qui ont pu observer que l'expression de PEA-15 dans des cellules CHO permettait de compenser l'effet inhibiteur de l'oncogène H-Ras sur la signalisation des intégrines (Étienne Formstecher, Hervé Chneiweiss).

Enfin, le recours de plus en plus fréquent aux transfections cellulaires, et la difficulté de ces transfections sur des cellules en culture primaire, nous ont conduit à développer une collaboration avec les chimistes du groupe de J.P. Vigneron (Chaire de chimie du Collège de France) afin d'apprécier les capacités d'interaction avec l'ADN de molécules intercalantes et les capacités d'emballage de l'ADN et de transfert via des dérivés du cholestérol récemment synthétisés par ces chercheurs (Mireille Fauquet en collaboration avec Marie-Paule Fichou-Teulade et Jean-Pierre Vigneron).

### 3. CIRCUITS LOCAUX IMPLIQUÉS DANS LES RÉGULATIONS DES LIBÉRATIONS DE GABA, DOPAMINE ET ACÉTYLCHOLINE DANS LE STRIATUM

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

##### 3.1.1. *Stimulation directe par les cannabinoïdes de la libération de dopamine à partir de synaptosomes de striatum de souris*

Connus depuis plus de 25 ans, les effets des cannabinoïdes sur les neurones dopaminergiques centraux ont souvent été comparés à ceux des antipsychotiques. En effet, ils inhibent l'activité motrice et induisent de la catalepsie, de l'hypothermie et de l'hypoalgésie. Dans les ganglions de la base, les récepteurs CB1 des cannabinoïdes sont localisés sur les neurones striato-nigraux GABAergiques. De ce fait, de nombreux auteurs considèrent que les effets des substances cannabinoïdes sur les neurones dopaminergiques nigrostriataux sont indirects. Ceci nous a conduit à vérifier cette hypothèse et rechercher si les agonistes cannabinoïdes endogènes et de synthèse n'agissent pas directement sur la libération de dopamine à partir de synaptosomes purifiés de rat et, dans certains cas, à comparer ces effets à ceux de l'acide arachidonique mis en évidence dans nos précédentes études.

L'anandamide, la methanandamide (un analogue stable de l'anandamide) et les agonistes cannabinoïdes de synthèse, le WIN 55,212-2 et le CP-55,940 stimulent de façon concentration-dépendante la libération de [<sup>3</sup>H]-dopamine ([<sup>3</sup>H]-DA) préalablement captée, un effet significatif étant déjà observé à la concentration

de 2  $\mu\text{M}$ . Des effets analogues sont observés lorsque les expériences sont effectuées en mesurant la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA continuellement formée à partir de [ $^3\text{H}$ ]-tyrosine. A la concentration de 3  $\mu\text{M}$ , les amplitudes des réponses maximales évoquées par ces substances et des produits apparentés sont respectivement (par ordre croissant) : acide lysophosphatidique (inactif) < 2-arachidonoylglycerol (+ 19 %) < palmitoylethanolamide (+ 27 %) < acide arachidonique (+ 43 %) < anandamide (+ 67 %) = CP-55,940 (+ 72 %) = methanandamide (+ 76 %) < WIN 55,212-2 (+ 95 %) < HU-210 (+ 99 %) (libération moyenne pendant les 5 min de traitement en % de la libération basale), profil pharmacologique déjà distinct de celui observé au niveau de récepteurs CB1.

Les réponses des agents cannabinoïdes les plus actifs présentent certaines caractéristiques : indépendance vis-à-vis du calcium externe, persistance en présence de nomifensine (1  $\mu\text{M}$ ), un inhibiteur du transporteur de la DA, insensibilité vis-à-vis du U 73,122 (0,1  $\mu\text{M}$ ), un inhibiteur de PLC, et du Ro 31-8220 (0,3  $\mu\text{M}$ ), un inhibiteur de protéine kinase C qui inhibe la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA évoquée par l'acide arachidonique. De plus, de façon surprenante, ces réponses ne sont pas bloquées par les antagonistes cannabinoïdes de type CB1 (SR 141716A ; 0,5  $\mu\text{M}$ ) et CB2 (SR 144528 ; 0,3  $\mu\text{M}$ ) et ne sont pas observées lorsque les synaptosomes striataux ont été préparés à partir de souris dépourvues de récepteurs CB1.

Néanmoins, plusieurs observations complémentaires suggèrent que ces effets facilitateurs des agents cannabinoïdes sur la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA sont spécifiques et font intervenir un récepteur présynaptique encore non identifié :

1) les substances cannabinoïdes efficaces appartiennent à des familles chimiques distinctes.

2) Parmi les substances apparentées, l'acide lysophosphatidique est sans effet, et la réponse induite par l'acide arachidonique fait intervenir un mécanisme distinct puisque cette réponse est calcium-dépendante et bloquée par les inhibiteurs de protéine kinase C.

3) Le WIN 55,212-3 (stéréo-isomère du WIN 55,212-2) est totalement inactif.

4) Si la methanandamide (3 $\mu\text{M}$ ) ou le WIN 55,212-2 stimulent la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA (+90 %), ces substances sont sans effet sur la libération de [ $^3\text{H}$ ]-GABA ou d' [ $^3\text{H}$ ]-acétylcholine (synthétisée à partir de [ $^3\text{H}$ ]-choline) à partir d'une préparation identique (synaptosomes de striatum de souris).

5) Paradoxalement, l'AM-404, un inhibiteur de la recapture neuronale et astrocytaire de l'anandamide et du 2-arachidonoylglycerol, qui généralement potentialise les réponses évoquées par ces agonistes cannabinoïdes endogènes, stimule lui même la libération de [ $^3\text{H}$ ]-DA et augmente de façon très marquée les réponses évoquées par l'anandamide et le 2-arachidonoylglycerol, mais pas celle induite par le WIN 55,212-2, un agoniste non transporté. Ainsi, les agonistes endogènes sont très efficacement éliminés du milieu extracellulaire par capture dans les

synaptosomes et les effets induits par ces agonistes résultent d'une action extra-cellulaire, au niveau de la membrane plasmique. Cette interaction pourrait s'effectuer avec une protéine possédant des groupements thiols car les stimulations de libération de [<sup>3</sup>H]-DA induites par la methanandamide ou le WIN 55,212-2 (3 μM) sont réduites par le N-ethylmaleimide (1 à 10 μM), un agent alkylant des thiols.

6) Un prétraitement des synaptosomes par le WIN 55,212-2 (1 μM) réduit fortement la stimulation de libération de [<sup>3</sup>H]-DA induite par une application ultérieure de WIN 55,212-2 (3 μM) ou de CP-55,940 (3 μM), sans affecter celle induite par le potassium (10 mM). Ce processus de désensibilisation, qui suggère fortement l'intervention de récepteurs, n'est pas reproduit par le WIN 55,212-3 (stéréoisomère inactif du WIN 55,212-2).

Toutefois, l'implication d'une protéine Gi/o ou Gs dans les réponses évoquées par les agonistes des cannabinoïdes n'a pas pu être mise en évidence. Des prétraitements des synaptosomes avec la toxine de pertussis ou la toxine du choléra, (10 μg/ml, 1 heure à 30 °C) ne modifient pas les réponses induites par la methanandamide ou le WIN 55,212-2 (3 μM). Dans les mêmes conditions (toxine de pertussis), l'inhibition de libération de [<sup>3</sup>H]-DA évoquée par la R(-)-propylnorapomorphine (0,1 μM) — un activateur puissant des auto-récepteurs D2 dopaminergiques — est réduite de 56 %.

En conclusion, ces résultats suggèrent l'existence d'un nouveau type de récepteur des cannabinoïdes au niveau central localisé sur les terminaisons dopaminergiques et impliqué dans un contrôle facilitateur de la libération de DA. Ces données peuvent conduire à la synthèse de nouveaux antagonistes des cannabinoïdes (F. Artaud, A. Chéramy, G. Godeheu).

### 3.2. CIRCUITS LOCAUX : RÉGULATION DE LA LIBÉRATION ÉVOQUÉE DE L'ACÉTYLCHOLINE

(Responsable de l'équipe : Marie-Lou Kemel)

Les interneurones cholinergiques innervent, par leurs longs neurites les deux compartiments (striosomes et matrice) du striatum et pourraient ainsi contribuer au transfert des informations entre les striosomes et la matrice. En contactant les parties distales et proximales de l'arborisation dendritique des neurones Gabaergiques efférents du striatum, ils peuvent moduler les influx générés dans les régions dendritiques distales contactées par les afférences corticales ou thalamiques glutamatergiques. Ces interneurones, qui sont toniquement actifs semblent synchroniser l'activité des neurones efférents de la matrice et intervenir ainsi dans les processus d'anticipation du mouvement en réponse à certains stimuli liés à la motivation. Cette année nous avons poursuivi nos études in vitro sur les modalités de régulation de la libération de l'[<sup>3</sup>H]acétylcholine préalablement marquée à

partir de [3H]choline dans les compartiments striataux du rat en nous intéressant particulièrement au rôle des tachykinines endogènes en absence de la régulation principale inhibitrice liée à l'action de la dopamine.

### 3.2.1. *Rôle des tachykinines endogènes dans la régulation de la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA en absence de régulation dopaminergique inhibitrice des neurones cholinergiques*

Précédemment, nous avons montré que dans certaines conditions de stimulation des récepteurs NMDA (1 mM NMDA, 10  $\mu$ M D-serine), les tachykinines endogènes libérées exercent un effet inhibiteur dopamine-dépendant sur la libération évoquée de l'acétylcholine et un effet facilitateur dopamine-indépendant, celui-ci étant uniquement observé dans la matrice. Ces données nous ont conduit à analyser plus précisément les réponses facilitatrices dopamine-indépendantes. A l'aide d'antagonistes sélectifs des tachykinines de type NK1 (SR140333), NK2 (SR48968) ou NK3 (SR142801), nous avons étudié l'influence respective des tachykinines endogènes, substance P(SP), neurokinine A(NKA) et neurokinine B (NKB) sur la libération évoquée d'acétylcholine dans deux conditions évitant l'intervention de la dopamine : 1) lors d'une stimulation importante des récepteurs NMDA (NMDA 1 mM + 10  $\mu$ M D-sérine) après inhibition de la synthèse de DA par application locale d' $\alpha$ -méthyl-para-tyrosine (100  $\mu$ M) et 2) lors de l'application de NMDA 1 mM seul, car la réponse évoquée est insensible à l'action du sulpiride (antagoniste D2) et de l' $\alpha$ -méthyl-para-tyrosine.

Dans ces deux situations, les effets facilitateurs du NMDA sur la libération de l'acétylcholine sont réduits en présence de SR140333, de SR48968 ou de SR142801. Uniquement observées dans la matrice, ces réponses nécessitent une concentration de 0.1  $\mu$ M des antagonistes, qui est plus élevée que celles nécessaires (de 10 nM à 1 pM) pour bloquer les effets inhibiteurs dopamine-dépendants des tachykinines endogènes. A la concentration de 0.1  $\mu$ M, les énantiomères des antagonistes NK1, NK2 et NK3, le SR143603, le SR48965 et le SR142806, respectivement, n'ont aucun effet. Les effets inhibiteurs des antagonistes peuvent être supprimés par le septide, la [Lys<sup>5</sup> Meleu<sup>9</sup> Norleu<sup>10</sup>]NKA4-10 ou le senktide, lorsque ces agonistes sélectifs des récepteurs NK1 (sensibles au septide), NK2 et NK3, respectivement, sont appliqués, à la concentration de 0.1  $\mu$ M avec le NMDA (1 mM + 10  $\mu$ M D-sérine) en présence d' $\alpha$ -méthyl-para-tyrosine. En absence des antagonistes, à cette concentration, les agonistes sont sans effet.

Ainsi, en absence du contrôle inhibiteur dopaminergique, dans la matrice uniquement, les tachykinines endogènes libérées lors de la stimulation des récepteurs NMDA, facilitent la libération évoquée de l'acétylcholine, ces effets étant médiés par les trois types de récepteurs NK1, NK2 et NK3. Dans le striatum, seuls les interneurons cholinergiques ainsi que ceux riches en somatostatine possèdent des récepteurs NK1. L'effet facilitateur de la substance P ou d'un fragment C-terminal de la substance P (SP (6-11)) sur la libération évoquée de l'acétylcholine pourrait donc être direct. Par contre, les effets de la neurokinine A

et de la neurokinine B également libérées dans ces conditions sont nécessairement indirects. Selon ces données, les antagonistes des récepteurs NK1, NK2 ou NK3 pourraient indirectement être utilisés comme des anticholinergiques dans des situations où la transmission dopaminergique est déficiente et de ce fait avoir des effets bénéfiques dans la maladie de Parkinson.

### 3.2.2. *Analyse des effets des tachykinines exogènes et caractérisation de leurs réponses*

Les effets de la [Pro<sup>9</sup>]SP, du septide (agonistes des récepteurs NK1 classiques et des récepteurs NK1 sensibles au septide, respectivement) et de la neurokinine A sur la libération évoquée de l'acétylcholine ont été étudiés dans la matrice dans des conditions évitant l'intervention d'une régulation dopaminergique (présence d' $\alpha$ -méthyl-para-tyrosine). D'autre part, ces expériences ont été réalisées en stimulant faiblement les récepteurs NMDA (50 $\mu$ M), modalité de stimulation qui ne permet pas une libération des tachykinines endogènes afin d'éviter toute interférence avec les effets des agonistes exogènes.

1) La [Pro<sup>9</sup>]SP stimule la libération de l'ACh évoquée par le NMDA. Paradoxalement, l'une des réponses est observée à une concentration élevée (0.1  $\mu$ M) et l'autre très faible (1 pM). La première est antagonisée par l'antagoniste NK1, le RP67580 (0.1  $\mu$ M) mais pas par l'antagoniste NK1, le SR140333 (0.1  $\mu$ M), par contre, la seconde est antagonisée par le SR140333 (1 nM) mais pas par le RP67580 (1 nM). Dans les deux cas, l'antagoniste NK2 est sans effet.

2) Le septide (0.1  $\mu$ M à 0.1 nM) stimule la libération de l'ACh évoquée par le NMDA et ces réponses sont bloquées par l'antagoniste NK1, le SR140333 (0.1  $\mu$ M et 1 nM, respectivement) mais paradoxalement, quelles que soient les concentrations utilisées (0.1  $\mu$ M et 1 nM), le RP67580 est sans effet. De façon attendue, l'antagoniste NK2 est également sans effet sur la réponse évoquée par le septide.

3) La NKA (0.1 nM, 10 pM) stimule la libération de l'ACh évoquée par le NMDA. La réponse évoquée à la concentration de 0.1 nM est supprimée en présence de l'antagoniste NK2, le SR48968 (1 nM), mais aussi des antagonistes NK1, le SR140333 (1 nM) ou le RP67580 (1 nM). Par contre, la stimulation de la libération de l'ACh évoquée par l'agoniste sélectif des récepteurs de type NK2, la [Lys<sup>5</sup> Meleu<sup>9</sup> Norleu<sup>10</sup>]NKA4-10 (1 nM) est uniquement supprimée par le SR48968 (1 nM) mais pas par le SR140333 (1 nM) ou le RP67580 (1 nM).

Ces données suggèrent l'existence de récepteurs NK1 de type septide dans le striatum qui sont impliqués dans la régulation de la libération de l'acétylcholine et qui pourraient également être situés sur les interneurons cholinergiques. Ces récepteurs NK1 présentent une sensibilité particulière par rapport à certains antagonistes NK1. Ces résultats confirment également la présence de récepteurs NK2 impliqués dans une régulation de la libération évoquée de l'ACh et indiquent que l'agoniste non sélectif, la NKA, peut aussi agir sur un sous-type de récepteurs

NK1 vraisemblablement distinct du récepteur NK1 sensible au septide. En effet, les deux antagonistes NK1 utilisés bloquent cette réponse. Ces données fonctionnelles complètent les études de liaison récentes effectuées avec le ligand 125I-NKA par l'équipe de Jean-Claude Beaujouan, équipe qui a pu mettre en évidence deux sous-types de récepteurs NK1 non classiques sensibles à la NKA et dont l'un d'entre eux seulement est sensible au septide.

#### 4. SYSTÈMES DOPAMINERGIQUES MÉSOCORTICAUX ET MÉSO-LIMBIQUES

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

###### 4.1.1. *Rôle des efférences glutamatergiques corticales dans la libération fonctionnelle de dopamine au niveau du noyau accumbens*

Nous avons montré qu'une faible partie (de 10 à 15 %) de la dopamine (DA) libérée dans le noyau accumbens à la suite d'une injection périphérique de D-amphétamine contribue à l'hyperactivité locomotrice induite par cette drogue. Cette libération fonctionnelle de DA sous-corticale est bloquée par l'application locale dans le cortex préfrontal d'un antagoniste des récepteurs  $\alpha$ 1-adrénergiques (prazosin). Ceci nous a incité à rechercher une contribution éventuelle des efférences corticales glutamatergiques dans la régulation de cette libération de DA fonctionnelle.

Des antagonistes spécifiques des récepteurs glutamatergiques de type NMDA, AMPA et métabotropiques (APV, CNQX et MCPG, respectivement) ont donc été appliqués dans le noyau accumbens à l'aide de sondes de microdialyse. Dans les conditions expérimentales utilisées, seul le MCPG s'est avéré capable de bloquer simultanément la libération fonctionnelle de DA (dans le noyau accumbens) et l'hyperactivité locomotrice induites par une injection systémique de D-amphétamine, le CNQX ne réduisant que la libération de DA non fonctionnelle et l'APV étant sans effet. La libération fonctionnelle de DA dans les structures sous-corticales devant être essentiellement dépendante de l'activité des cellules DA de l'aire tegmentale ventrale (ATV), la stimulation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques du noyau accumbens semble donc être nécessaire pour la stimulation par l'amphétamine de l'activité des cellules dopaminergiques de l'ATV.

Pour confirmer cette hypothèse, la morphine a été injectée de façon bilatérale dans l'ATV afin de désinhiber les neurones DA et évoquer une hyperactivité locomotrice. Confirmant des données d'autres auteurs, ces injections locales de morphine induisent effectivement une hyperactivité locomotrice et celle-ci est associée à une faible augmentation de la libération de DA dans le noyau accumbens.

bens. Cette augmentation de DA extracellulaire ne représente que 6 % de celle évoquée par l'injection systémique de D-amphétamine qui induit néanmoins une hyperactivité locomotrice voisine de celle évoquée par la morphine. Ceci confirme la présence d'une libération non fonctionnelle de DA lors d'une injection systémique de D-amphétamine.

En accord avec notre hypothèse, l'application bilatérale de MCPG dans le noyau accumbens (à la frontière du core et du shell), à l'aide de sondes de microdialyse, effectuée vingt minutes après les injections de morphine dans l'AVT, provoque dans les dix minutes qui suivent une réduction de la libération de DA (retour au niveau de base) et un blocage de l'hyperactivité locomotrice induite par la morphine (hyperactivité qui est visible pendant plus d'une heure en absence de MCPG). La stimulation tonique de récepteurs métabotropiques glutamatergiques du noyau accumbens semble donc être indispensable pour observer une augmentation de libération fonctionnelle de DA associée à une hyperactivité locomotrice, deux processus dépendant de l'activation des neurones dopaminergiques. Les neurones sur lesquels sont localisés ces récepteurs métabotropiques du glutamate sensibles au MCPG (dans le noyau accumbens) et qui, directement ou indirectement, régulent l'activité des neurones DA de l'ATV doivent être maintenant identifiés.

Des expériences identiques ont été réalisées dans le striatum dorsal. De l'amphétamine a été introduite à faible concentration dans la sonde de microdialyse afin d'augmenter légèrement et de façon stable la libération de DA. Dans ces conditions, l'injection systémique de D-amphétamine augmente la libération de DA, mais cette réponse est environ deux fois plus faible que celle observée dans le noyau accumbens. En accord avec des données précédentes obtenues dans le noyau accumbens, la libération de DA évoquée par l'injection systémique de D-amphétamine est bloquée par une injection préalable de prazosin et selon des données préliminaires, le MCPG appliqué dans le striatum dorsal (par la sonde de microdialyse) réduit considérablement l'augmentation de DA extracellulaire induite par l'injection systémique de D-amphétamine. Un parallélisme étroit semble donc exister dans les processus qui régulent à partir du noyau accumbens et du striatum dorsal, l'activité des neurones dopaminergiques de l'AVT et de la substance noire, respectivement (Laurent Darracq, Gérard Blanc, Jean-Pol Tassin).

#### *4.1.2. Rôle des neurones noradrénergiques dans la variabilité des sensibilités à la pharmacodépendance chez le rat*

L'injection systémique de cocaïne, comme celle d'amphétamine, provoque chez le rat une hyperactivité locomotrice et cette réponse est généralement attribuée au blocage par la cocaïne de la recapture de DA. La cocaïne ayant aussi une bonne affinité pour le transporteur de la noradrénaline, nous avons recherché une intervention éventuelle de la noradrénaline (comme dans le cas de l'amphétamine) dans l'hyperactivité locomotrice évoquée par la cocaïne.

Deux protocoles ont été utilisés. Dans le premier (I), les animaux sont introduits vers 10 heures du matin dans un corridor circulaire possédant des cellules photoélectriques destiné à mesurer l'activité locomotrice. Celle-ci est mesurée toutes les 10 minutes pendant une heure avant une première injection de sérum physiologique. Les rats reçoivent une seconde injection de sérum physiologique trente minutes plus tard, et l'activité locomotrice est encore mesurée pendant une heure comme précédemment. Cette expérience est renouvelée trois jours consécutifs. Dans le second protocole (II), les animaux sont introduits dans l'appareil à 17 heures le soir, et sortis de l'appareil pendant quelques secondes le lendemain, vers 10 heures du matin. Ils reçoivent ensuite deux injections de sérum physiologique selon des modalités identiques au premier protocole, mais ces injections ne sont effectuées que pendant un jour seulement.

Les rats ayant subi le premier protocole (I) réagissent beaucoup plus que ceux du second (II) à une nouvelle injection de sérum physiologique. Selon des données préliminaires, cette différence de réactivité (appréciée par la mesure de l'activité locomotrice) s'observe également lorsque les animaux sont traités avec de la cocaïne (et ce pour des doses variant de 6,6 à 12 mg/kg i.p.). Les animaux du premier protocole (I) présentent pendant l'heure qui suit l'injection de cocaïne une activité locomotrice deux fois plus grande que celle observée chez les animaux du second protocole (II). Une plus grande habitude à l'appareil de mesure des animaux du second protocole (plus faible réactivité) et/ou une sensibilisation aux injections successives (augmentation de la réactivité) des animaux du premier protocole pourraient expliquer ces différences décelées aussi bien chez les animaux ne recevant que des injections de sérum physiologique que chez ceux qui sont traités avec la cocaïne. Les neurones noradrénergiques pourraient être impliqués dans ces différences de réactivité. En effet, celles-ci disparaissent après l'injection périphérique de faibles doses de prazosin (0,5 mg/kg, i.p.) ou de clonidine (0,05 mg/kg, i.p.) ainsi que chez des animaux dont les fibres noradrénergiques ascendantes ont été détruites bilatéralement par des injections de 6-OHDA effectuées dans le pédoncule cérébelleux supérieur.

Le rôle des afférences noradrénergiques ascendantes a été également évalué dans le processus de sensibilisation comportementale. Celui-ci correspond à l'augmentation progressive de l'hyperactivité locomotrice induite chez le rat par des injections répétées de doses identiques d'amphétamine, de cocaïne ou de morphine. L'injection de prazosin (0,5 mg/kg, i.p.) bloque la sensibilisation comportementale importante induite par des injections répétées de doses faibles de cocaïne (5 mg/kg, i.p.). Ainsi la cocaïne agit non seulement en bloquant la recapture de DA mais aussi en augmentant la transmission de type  $\alpha$ 1-adrénérique, vraisemblablement par son effet inhibiteur sur la recapture de noradrénaline (Candice Drouin, Gérard Blanc, Anne-Sophie Villegier).



#### 4.1.3. *Rôle des interactions entre les systèmes ascendants noradrénergiques et dopaminergiques dans les modalités d'action des antidépresseurs*

Nous nous sommes également intéressés à l'étude de l'action des antidépresseurs de différentes classes sur l'auto-injection de produits toxicomanogènes chez le rat.

Dans une enceinte leur permettant de s'injecter eux-mêmes autant de fois qu'ils mettent leur museau dans le trou actif, les rats apprennent rapidement, au cours de sessions quotidiennes, à s'auto-administrer la même dose de morphine ou d'amphétamine. Le nombre de doses peut être important dès le premier jour d'exposition à la drogue, mais huit jours environ sont nécessaires pour obtenir une courbe d'acquisition correcte et un niveau d'administration stable. Nous avons étudié l'influence d'un traitement chronique par un antidépresseur sur le nombre d'auto-administrations des rats ré-exposés à deux reprises à la morphine ou à l'amphétamine alors qu'ils sont toujours sous traitement 'antidépresseur'. La chlorimipramine (un antidépresseur tricyclique, principe actif de l'Anafranil) ou la fluoxétine (un ISRS à profil stimulant, principe actif du Prozac) ont été utilisés dans ces expériences.

Les conditions expérimentales sont les suivantes : 1) les rats s'auto-administrent de la morphine (20 µg/injection de 20 µl) ou de la D-amphétamine (10 µg/injection de 20 µl) jusqu'à atteindre un niveau stable d'auto-injections. Le nombre de sessions nécessaires pour que chaque rat réponde à ce critère varie d'un animal à l'autre (de 6 à 10 jours). 2) les rats reçoivent jusqu'à la fin de l'expérience, à l'animalerie, l'antidépresseur ou le véhicule. Afin d'effectuer un test au milieu de la période de traitement, les animaux sont soumis à nouveau au protocole d'auto-administration les 8<sup>e</sup> et 9<sup>e</sup> jours qui suivent le début du traitement par l'antidépresseur. 3) Enfin les rats sont ré-exposés à la morphine ou à l'amphétamine selon le même protocole d'auto-administration que précédemment, pendant au moins 4 jours à partir du 15<sup>e</sup> jour qui suit la première injection de l'antidépresseur.

Les résultats des expériences sur les effets de la chlorimipramine (20 mg/kg, p.o. 2 fois/jour) sur l'auto-administration de morphine et d'amphétamine indiquent pour ces deux drogues que les courbes de ré-acquisition du critère d'auto-injection ont une pente deux fois plus faible chez les animaux traités à la chlorimipramine que chez les animaux contrôles, la pente étant légèrement toutefois plus faible dans le cas de la morphine que dans celui de l'amphétamine. Par contre, aucune différence significative n'a été observée lorsque les animaux (auto-administration de morphine) ont reçu un traitement chronique de fluoxétine (7,5 mg/kg, p.o. 2 fois/jour).

Ainsi en accord avec nos hypothèses, certains antidépresseurs semblent capables de diminuer le besoin compulsif de produits toxicomanogènes. Selon nos données, ces différences ne s'observent qu'avec un antidépresseur tricyclique dont une des principales caractéristiques est de bloquer les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques, des récepteurs dont la stimulation est nécessaire à l'obtention d'une

activité dopaminergique fonctionnelle. La fluoxétine, qui est inactive dans cette expérience, bloque également la recapture des monoamines dans les fibres sérotoninergiques et noradrénergiques mais n'a pas d'action sur les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques. Ces observations nous ont conduit à évaluer l'action du prazosin sur le comportement d'auto-injection de morphine. Les données préliminaires suggèrent que le blocage des récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques diminue effectivement l'auto-injection de morphine. (Étude effectuée en collaboration avec Denis Brochet et Fabrice Trovero, Laboratoires Psy-Pharm dans le cadre d'un contrat MILDT et INSERM, appel d'offre sur la toxicomanie).

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

##### 4.2.1. *Cortex préfrontal et ganglions de la base : Architecture tridimensionnelle des neurones de la substance noire pars reticulata*

Le cortex cérébral et les ganglions de la base sont reliés par des circuits multisynaptiques striato-pallido et striato-nigro-thalamiques organisés en boucle. L'architecture de ces circuits est essentiellement parallèle, les afférences de régions fonctionnellement distinctes du cortex innervant des territoires différents du striatum. Selon des données récentes, les différents territoires du striatum, définis par leurs afférences corticales, projettent sur la substance noire pars reticulata (SNR) sous forme de lames incurvées organisées en « pelure d'oignon » (Deniau et Thierry, 1997). Les différentes lames de la SNR innervant des secteurs distincts du thalamus, l'organisation lamellaire de la SNR devrait permettre de maintenir en sortie du système des ganglions de la base la ségrégation fonctionnelle des informations corticales observée en entrée dans le striatum.

Après avoir caractérisé les relations anatomo-fonctionnelles entre le cortex préfrontal et les ganglions de la base (Maurice *et al.*, 1999), cette année, nous nous sommes proposés de déterminer si l'organisation des champs dendritiques des neurones de la SNR se conformait à l'organisation lamellaire des afférences striatales impliquées dans le canal préfrontal issu des aires prélimbique et orbitaire médiane du cortex préfrontal (PL/MO). Dans ce but, la technique d'injection juxtacellulaire de neurobiotine a été développée dans le laboratoire en collaboration avec J.M. Deniau (Institut des neurosciences, Université Paris VI). Les neurones de la SNR présentant une réponse caractéristique à la stimulation des aires PL/MO ont été marqués à l'aide d'une injection juxtacellulaire de neurobiotine et la reconstruction tridimensionnelle de leur champ dendritique a été réalisée à l'aide du logiciel NeuroLucida à partir de coupes sériées. Nos données indiquent que le champ dendritique de ces neurones est restreint aux lames dorsomédianes de la SNR définies par les zones de projection des territoires du striatum innervés par les aires PL/MO et ne pénètre pas dans les secteurs somatosensoriels adjacents ventralement et latéralement dans la SNR. La ségrégation fonctionnelle existant

au niveau du striatum, structure d'entrée des ganglions de la base, est donc conservée au niveau de la SNR, structure de sortie des ganglions de la base. Par contre, une partie du champ dendritique de ces neurones est localisée dans la substance noire pars compacta. Les neurones de la SNR impliqués dans le canal PL/MO pourraient donc intégrer non seulement les informations issues du territoire striatal correspondant à ce canal mais également celles issues de structures projetant à la pars compacta telles que le noyau central de l'amygdale, l'hypothalamus latéral ou le noyau pédonculopontin (J. Blanchard, U. Niemi-Junkola).

#### 4.2.2. *Influence synaptique de l'hippocampe sur le cortex préfrontal*

Précédemment, nous avons mis en évidence l'existence d'une projection directe de l'hippocampe sur les aires PL/MO du cortex préfrontal chez le rat. La voie hippocampo-cortex préfrontal est glutamatergique et issue de la région CA1/prosubiculum. La stimulation de l'hippocampe évoque une réponse excitatrice suivie d'une inhibition prolongée de l'activité des cellules corticales. Cette année, la technique d'enregistrement intracellulaire *in vivo*, couplée à l'injection intracellulaire de neurobiotine a été développée par Y. Gioanni afin de déterminer les événements synaptiques ainsi que les caractéristiques électrophysiologiques et morphologiques des neurones du cortex préfrontal qui répondent à la stimulation de l'hippocampe.

La stimulation de l'hippocampe évoque des réponses complexes dans la majorité des neurones (93 %, n = 88) enregistrés dans les couches II à VI des aires PL/MO. Ces réponses sont composées d'un EPSP monosynaptique (dont la latence est compatible avec le temps de conduction de la voie hippocampo-cortex préfrontale) qui est suivi dans la plupart des cas par un IPSP de longue durée (150 à 300 ms). Les EPSPs et IPSPs présentent deux composantes dans respectivement 38 % et 50 % des cas. L'effet de la stimulation en double choc testé dans 29 cellules corticales indique que l'amplitude de l'EPSP précoce est augmentée dans 11 cellules, diminuée dans 8 cellules ou n'est pas affectée dans 10 cellules.

Notre étude a également révélé que les trois principaux types cellulaires décrits dans d'autres aires corticales sur la base de leur mode de décharge en réponse à l'application d'un courant intracellulaire dépolarisant sont également présents dans le cortex préfrontal : 1) Les cellules à décharge régulière ou « regular spiking », 2) les cellules présentant des bouffées de potentiel d'action ou « bursting » et enfin 3) les cellules à décharge rapide ou « fast spiking ». La caractérisation électrophysiologique des cellules du cortex préfrontal répondant à la stimulation hippocampique réalisée dans 49 cellules indique que 39 de ces cellules sont de type « regular spiking », 6 de type « bursting » et enfin 2 de type « fast spiking ». Leur caractérisation morphologique, après injection intracellulaire de neurobiotine, indique que toutes ces cellules sont des neurones pyramidaux à l'exception des deux cellules de type « fast spiking » qui sont des interneurons (Y. Gioanni, E. Dégénétais).

## PUBLICATIONS ORIGINALES

N. MAURICE, J.M. DENIAU, A. MENETREY, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *Prefrontal cortex-basal ganglia circuits in the rat : involvement of ventral pallidum and subthalamic nucleus.* (Synapse, 29 (4), 363-370, 1998).

C. GIAUME, L. VENANCE, *Intercellular calcium signalling and gap junctional communication in astrocytes.* (Glia, 24 (1), 50-64, 1998).

C. CALVO, A. DOBBERTIN, M. GELMAN, J. GLOWINSKI, M. MALLAT, *Identification of CSF-1 as a brain macrophage migratory activity produced by astrocytes.* (Glia, 24 (2), 180-186, 1998).

L. VENANCE, J. PREMONT, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Gap junctional communication and pharmacological heterogeneity in astrocytes cultures from the rat striatum.* (J. Physiol., 510 (2), 429-440, 1998).

A.A. FIENBERG, N. HIROI, P.G. MERMELSTEIN, W.J. SONG, G.L. SNYDER, A. NISHI, A. CHERAMY, J.P. O'CALLAGHAN, D.B. MILLER, D.G. COLE, R. CORBETT, C.N. HAILE, D.C. COOPER, S. ONN, A.A. GRACE, C.C. OUIMET, F.J. WHITE, S.E. HYMAN, J. SURMEIER, J.A. GIRAULT, E.J. NESTLER, P. GREENGARD, *DARPP-32 : Regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission.* (Science, 281 (5378), 838-842, 1998).

O. VALDENNAIRE, M. MAUS-MOATTI, J.D. VINCENT, J. MALLET, P. VERNIER, *Retinoic acid regulates the developmental expression of dopamine D2 receptor in rat striatal primary cultures.* (J. Neurochem., 71 (3), 929-936, 1998).

M. KUBES, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, J.A. GIRAULT, J.A., H. CHNEIWEISS, *Endothelin induces a calcium-dependent phosphorylation of PEA-15 in intact astrocytes : identification of Ser104 and Ser116 phosphorylated, respectively, by protein kinase C and calcium/calmodulin kinase II in vitro.* (J. Neurochem., 71 (3) 1307-1314, 1998).

N. MAURICE, J.M. DENIAU, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat : physiology of the cortico-subthalamic circuits.* (J. Neuroscience, 18 (22) 9539-9546, 1998).

Y. GIOANNI, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Alpha1-Adrenergic D1 and D2 receptors interactions in the prefrontal cortex : implications for the modalities of action of different types of neuroleptics.* (Synapse, 30 (4) 362-370, 1998).

C. TOFFANO-NIOCHE, D. BEROULE, J.P. TASSIN, *A functional model of some parkinson's disease symptoms using guided propagation network.* (Artificial intelligence in Medicine, 14, 237-258, 1998).

F. BLANCHET, C. GAUCHY, S. PEREZ, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Role of arachidonic acid in the regulation of the NMDA-evoked release of acetylcholine in striatal compartments.* (Synapse, 31 (2), 140-150, 1999).

Y. GIOANNI, C. ROUGEOT, P.B.S. CLARKE, C. LEPOUSE, A.M. THIERRY, C. VIDAL, *Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex : increase in glutamate*

*release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission.* (EJN, 11 (1), 18-30 (1999).

S. SAGAN, L. VENANCE, Y. TORRENS, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Anandamide and WIN 55212-2 inhibit cyclic AMP formation through G-protein-coupled receptors distinct from CB1 cannabinoid receptors in cultured astrocytes.* (EJN, 11 (2), 691-699, 1999).

F. TROVERO, D. BROCHET, J.P. TASSIN, K. DRIEU, *Ginko biloba extract Egb761 reduces the development of amphetamine-induced behavioral sensitization : effects of hippocampal type II corticosteroid receptors.* (Brain Research, 818 (1) 135-139, 1999).

J.A. GIRAULT, G. LABESSE, J.P. MORNON, I. CALLEBAUT, *The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains.* (TIBS, 24 (2), 54-57, 1999).

M. L'HIRONDEL, A. CHERAMY, F. ARTAUD, G. GODEHEU, J. GLOWINSKI, *Contribution of endogenously formed arachidonic acid in the presynaptic facilitatory effects of NMDA and carbachol on dopamine release in the mouse striatum.* (EJN, 11 (4), 1229-1300, 1999).

N. MAURICE, J.M. DENIAU, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *Relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat : physiology of the corticostriatal circuits.* (J. Neurosci., 19 (11), 4674-4681, 1999).

#### REVUES GÉNÉRALES

J.P. TASSIN, *Norepinephrine/dopamine interactions in the prefrontal cortex and the VTA : relevance to mental disease* (In : Advances in Pharmacology - Catecholamines : bridging basic science with clinical medicine, eds. D. Goldstein, G. Eisenhofer, R. McCarty, Vol. 42, Adv. Pharmacol., pp. 712-716, 1998).

A.M. THIERRY, S. PIROT, Y. GIOANNI & J. GLOWINSKI, *Dopamine function in the prefrontal cortex.* (In : Advances in Pharmacology - Catecholamines : bridging basic science with clinical medicine, eds. D. Goldstein, G. Eisenhofer, R. McCarty, Vol. 42, Adv. Pharmacol., pp. 717-720, 1998).

J.P. TASSIN, L. DARRACQ, G. BLANC & F. TROVERO, *Integrating the monoamine systems.* (In : Antidepressant therapy at the dawn of the 3rd millennium, ed. M. Briley & S. Montgomery, Martin Dunitz, pp. 1-18, 1998).

J.P. TASSIN, *Drogues, dépendance et dopamine.* (La Recherche, n° 306, pp. 48-53 1998).

A. CHERAMY, M. L'HIRONDEL, G. GODEHEU, F. ARTAUD & J. GLOWINSKI, *Direct and indirect presynaptic control of dopamine release by excitatory amino acids.* (Amino Acids, 14, 63-68, 1998).

H. CHNEIWEISS, *Protéines phosphatases : l'autre plateau de la balance.* (Médecine/sciences, 14, n° 3, pp. 259-261, 1998).

P. GREENGARD, A.C. NAIRN, J.A. GIRAULT, C.C. OUMET, G.L. SNYDER, G. FISONE, P.B. ALLEN, A. FEINBERG & A. NISHI, *The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade : a model for signal integration*. (Brain Research Rev., 26 (2/3), 968-970, 1998).

M. FAUQUET & H. CHNEIWEISS, *Un mécanisme inédit d'épissage aberrant d'un ARN messenger à l'origine de formes sporadiques de sclérose latérale amyotrophique*. (Médecine/sciences, 14 (8/9), 968-970, 1998).

K.D. PEUSNER, G. GAMKRELIDZE & C. GIAUME, *Potassium currents and excitability in second-order auditory and vestibular neurons*. (J. Neurosci. Res. 53, pp. 511-520, 1998).

J. GLOWINSKI, *Initial investigations on the central metabolism of radioactive catecholamines* (« The rise of Psychopharmacology in the 1960s and the Story of CINP » eds by T.A. Ban, D. Healy, E. Section 2, pp. 120-123, 1998).

J.P. TASSIN, *Qu'est-ce que l'intelligence ?* (Pour la Science, 254, p. 30-33, 1998).

J.A. GIRAULT, G. LABESSE, J.P. MORNON & L. CALLEBAUT, *Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band : a superfamily of band 4.1. domains important for cell structures and signal transduction*. (Molecular Medicine, 4, pp. 751-769, 1998).

J.A. GIRAULT & P. GREENGARD, *Principles of signal transduction*. (In « Neurobiology of mental illness », chapter 4, D.S. Chaney, E.J. Nestler & B.S. Bunney eds., Oxford Univ. Press, New York, 1998).

J.A. GIRAULT, A. COSTA, P. DERKINDEREN, J.M. STUDLER & M. TOUTANT, *FAK and PYK2/CAKbeta in the nervous system : a link between neuronal activity, plasticity and survival*. (TINS, vol. 22 n° 6, pp. 257-262, 1999).

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

P. DERKINDEREN, M. TOUTANT, J. SICILIANO, J.A. GIRAULT, *Differential regulation of FAK+ and PYK2/CAKbeta, two related tyrosine kinases, in rat hippocampal slices : effects of LPA, carbachol, depolarization and hyperosmolarity*. ENA 1998, Berlin, 27/06-01/07/98.

L. DARRACQ, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Importance of the noradrenaline/dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine*. ENA 1998, Berlin, 27/06-01/07/98.

F. BLANCHET, C. GAUCHY, S. PEREZ, P. SOUBRIE, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Regulation by endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine in both compartments of the rat striatum : role of dopamine transmission*. ENA 1998, Berlin, 27/06-01/07/98.

C. GIAUME, *Gap junctions and astroglial communication in neurotransmission* 12th ESN'98, St Petersburg, 19-24/07/98

A. CHERAMY, M. L'HIRONDEL, G. GODEHEU, F. ARTAUD, J. GLOWINSKI, *Contribution of endogenously formed arachidonic acid in the presynaptic control of dopamine release in mouse striatal slices*. DA Symposium, Strasbourg, 22-25/07/98.

Y. GIOANNI, A.M. THIERRY, J.P. TASSIN, J. GLOWINSKI, *Alpha-1 adrenergic, D1 and D2 receptors interactions in the prefrontal cortex : implications on the modality of action of different types of neuroleptics*. DA Symposium, Strasbourg, 22-25/07/98.

C. GAUCHY, F. BLANCHET, S. PEREZ, J. GLOWINSKI, M.L. KEMEL, *Involvement of arachidonic acid in the regulation of the NMDA-evoked release of acetylcholine in striatal compartments*. XIIIth Int. Congress of Pharmacology, IUPHAR, Munich, 26-31/07/98.

C. DROUIN, G. BLANC, L. DARRACQ, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Local injection of prazosin in the VTA does not prevent the hyper-locomotor effect of systemic D-amphetamine*. EBPS'98, Brno, 2-6/09/98.

J.P. TASSIN, *Applications of system theory to drug-dependance involving DA systems*. EBPS'98, Brno, 2-6/09/98.

J. GLOWINSKI, *Espoirs et difficultés dans le domaine de la neuropharmacologie* Neuroscience et Société, Collège de France, Paris, 5-6/10/98.

A.M. THIERRY, N. MAURICE, J.M. DENIAU, J. GLOWINSKI, *Functional relationships between the prefrontal cortex and the basal ganglia in the rat*. 6th Int. Basal Ganglia Sy, Brewster, Mass, USA, 15-18/10/98.

M.L. KEMEL, F. BLANCHET, C. GAUCHY, S., PEREZ, P. SOUBRIE, J. GLOWINSKI, *Distinct regulations by endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine in striatal compartments of the rat : role of dopaminergic transmission*. 6th Int. Basal Ganglia Sy, Brewster, Mass, USA, 15-18/10/98.

P. DERKINDEREN, M. TOUTANT, A. COTA, P. EZAN, J.M. STUDLER, J.A. GIRAULT, *Signaling pathways activated by anandamide, an endogenous ligand of Cb1 cannabinoid receptors in hippocampal slices*. Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, 07-12/11/98.

H. CHNEIWEISS, D. ZVAOVA, J. CORDIER, M. KUBES, J. GLOWINSKI, *Osmotic stress activation of p38-SAPK in astrocytes induces the phosphorylation of PEA-15 through a PKC-dependent pathway*. Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, 07-12/11/98.

M. TENCE, A. PEBAY, Y. TORRENS, J. PREMONT, M. TOUTANT, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, *Lysophosphatidic acid (LPA) regulates multiple signalling pathways in mouse striatal astrocytes*. Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, 07-12/11/98.

L. VENANCE, C. GIAUME, H. MONYER, *Molecular identification of connexins expressed by hippocampal interneurons by single cell RT-PCR*. Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, 07-12/11/98.

G. GAMKRELIDZE, C. GIAUME, K. PEUSNER, *Excitability and K<sup>+</sup> currents in newborn chick central vestibular neurons*. Society for Neuroscience, Los Angeles, USA, 07-12/11/98.

C. GIAUME, *Intercellular calcium signalling in glial cells*. Modeling in molecular cell biology, Berlin, 13-15/11/98.

P. MARIN, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Mécanismes impliqués dans l'influx de zinc dans les neurones corticaux de souris : rôle dans ses effets neurotoxiques*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

M. ALIREZAIE, P. MARIN, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Le zinc inhibe la synthèse protéique dans les neurones du cortex cérébral de la souris*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

C. DROUIN, L. DARRACQ, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Participation de la transmission noradrénergique dans les effets comportementaux aigus et chroniques de différentes substances addictives*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

D. HERVE, A.A. FIENBERG, C. LEDENT, J.A. GIRAULT, *Augmentation de la protéine Golf dans le striatum de souris mutantes dépourvues de récepteur D1a de la dopamine ou de récepteurs A2a de l'adénosine*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

A. COSTA, J.M. STUDLER, M. TOUTANT, P. EZAN, J.A. GIRAULT, *Mécanismes moléculaires de l'autophosphorylation de FAK (focal adhesion kinase)*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

M. TOUTANT, J.M. STUDLER, F. BURGAYA, A. COSTA, P. EZAN, M. GELMAN, J.A. GIRAULT, *Des isoformes neuronales de la tyrosine kinase FAK ont une autophosphorylation augmentée*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

R. BYCHKOV, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Étude comparative des courants chlore dans les astrocytes isolés ou confluents*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

C. GIAUME, J. GLOWINSKI, R. BYCHKOV, *L'endotheline-1 régule deux courants sortants potassium dans les astrocytes en culture primaire*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

N. ROUACH, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Contrôle neuronal de la communication jonctionnelle des astrocytes*. 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

M.L. KEMEL, F. BLANCHET, S. PEREZ, C. GAUCHY, J. GLOWINSKI, *Rôle de l'acide arachidonique dans la régulation GABAergique de la libération de l'acétylcholine évoquée par stimulation des récepteurs NMDA dans les striosomes et la matrice*



*du striatum chez le rat.* 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

A. PEBAY, M. TOUTANT, Y. TORRENS, J. PREMONT, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, M. TENCE, *Effets multiples de l'acide lysophosphatidique (LPA) sur les astrocytes de striatum de souris.* 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

H. CHNEIWEISS, B. CANTON, N. CHOUDAY, J. CORDIER, M. FAUQUET, E. FORMSTECHE, J. GLOWINSKI, D. KITSBERG, D. ZVALOVA, *L'expression de la phosphoprotéine possédant un domaine effecteur de mort cellulaire PEA-15 protège les astrocytes de l'apoptose induite par le NTE alpha.* 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

D. ZVALOVA, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *La stimulation dans les astrocytes de la kinase de stress p38-SAPK par un choc osmotique induit la phosphorylation de PEA-15 par un processus dépendant de la protéine kinase C.* 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

E. FORMSTECHE, B. CANTON, N. CHOUDAY, M. FAUQUET, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *PEA-15 phosphoprotéine possédant un domaine effecteur de mort cellulaire et enrichie dans les astrocytes participe à plusieurs cascades de signalisations intracellulaires.* 4<sup>e</sup> Colloque de la société des neurosciences, Marseille, 25-28/05/99.

B. CANTON, M. FAUQUET, J. GLOWINSKI & H. CHNEIWEISS, *The death effector domain-containing phosphoprotein enriched in astrocytes PEA-15, is involved in apoptosis regulation.* 26th FEBS, Nice, 19-24/06/99.

#### LISTE DES DIPLÔMÉS - 1998-1999

MAURICE Nicolas

Relations anatomo-fonctionnelles entre le cortex préfrontal et les ganglions de la base chez le rat.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI, soutenue le 25 novembre 1998.

L'HIRONDEL Marie

Rôle de l'acide arachidonique endogène dans le contrôle de la libération de dopamine au niveau des terminaisons dopaminergiques du système nigrostriatal chez le rat et la souris.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris V, soutenue le 15 décembre 1998.

THIBAUT Raphaèle (sous la direction de J. Prémont).

Régulation de la libération d'acide arachidonique par l'interleukine 1b dans les astrocytes.

DEA de Pharmacochimie moléculaire, pharmacologie expérimentale et métabolisme, Université René Descartes, sept. 1998.

CHOUDEY Nathalie (sous la direction de H. Chneiweiss).

Étude des interactions entre PEA-15 et les protéines FADD et caspase-8 au cours de l'apoptose.

DEA de Pharmacochimie moléculaire, pharmacologie expérimentale et métabolisme, Université René Descartes, sept. 1998.

BLANCHARD Julien (sous la direction de A.M. Thierry).

Cortex préfrontal et ganglions de la base : architecture tridimensionnelle et cibles des neurones de la substance noire pars reticulata.

DEA de Neurosciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, sept. 1998.

PEBAY Alice (sous la direction de M. Tencé).

Différences d'effets de l'acide lysophosphatidique (LPA) et de la sphingosine-1-phosphate (SPP) dans les astrocytes de striatum en culture.

DEA de Neurosciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, sept. 1998.

ROUACH Nathalie (sous la direction de C. Giaume).

Contrôle neuronal de la communication jonctionnelle des astrocytes.

DEA de Pharmacologie moléculaire et cellulaire, option neurobiologie, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, sept. 1998.

BLANCHET Fabienne

Régulation glutamatergique de la libération de l'acétylcholine dans les striosomes et la matrice du striatum de rat : circuits locaux impliquant la dopamine, le GABA et les tachykinines.

Thèse de Doctorat de l'Université Paris V, soutenue le 2 février 1999.