

## Neuropharmacologie

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

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

Séminaires-Symposium (en relation avec la FRC) :

« MALADIES NEUROLOGIQUES : DES BASES MOLÉCULAIRES À LA THÉRAPEUTIQUE »

J. GLOWINSKI, M. CLANET : Présentation du Colloque.

H. WEKERLE : Processus inflammatoires dans les maladies neurologiques.

C. HENDERSON : Bases mécanistiques pour une stratégie thérapeutique dans les maladies du motoneurone.

G. KROEMER : Altérations des fonctions mitochondriales au cours de la mort neuronale.

G. BONVENTO : Couplages neuro-vasculaire et neuro-métabolique.

C. LUBETZKI : Interactions neuronogliales dans la myélinisation du système nerveux central.

J.-A. GIRAULT : Les nœuds de Ranvier.

Y. BEN ARI : Mort neuronale dans l'épilepsie et l'ischémie.

F. CHECLER : Présénilines et gamma-sécrétases dans la maladie d'Alzheimer.

L. BUÉE : Tauopathies : vers une définition moléculaire de certaines maladies neurodégénératives.

A. DEPAULIS : Les ganglions de la base : un circuit de contrôle des épilepsies généralisées ?

C. CHIRON : Maturation cérébrale et épilepsies de l'enfant.

P. CÉSARO : Greffes neuronales et maladies neurodégénératives.

P. POLLAK : Neurostimulation : maladie de Parkinson et autres troubles du mouvement.

M. LATHROP : Maladies génétiques multifactorielles.

A. BRICE : Aspects génétiques des maladies neurodégénératives : l'exemple de la maladie de Parkinson.

J. CHELLY : Gènes du retard mental.

P. AEBISCHER : Thérapies géniques, facteurs de croissance, stress oxydatif.

V. MEININGER : Essais thérapeutiques dans la sclérose latérale amyotrophique.

F. FORETTE : Avenir des thérapeutiques des démences.

J.-P. AMANN : Maladies neurologiques et bioéthique.

M. CLANET et J. GLOWINSKI : Conclusions.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE  
(INSERM U.114)

1. PROPRIÉTÉS DES CIRCUITS INTÉGRÉS SOUMIS AUX RÉGULATIONS  
DES SYSTÈMES ASCENDANTS DOPAMINERGIQUES

1.1. PROPRIÉTÉS DES NEURONES STRIATAUX ET ORGANISATION DES GANGLIONS  
DE LA BASE

(Responsable de l'équipe : Jean-Michel Deniau)

1.1.1. *Mémoire intrinsèque des neurones de sortie du striatum*

La grande majorité des neurones du striatum, la principale structure d'entrée des ganglions de la base, est constituée des neurones Gabaergiques efférents. Constituant un processus clé dans les fonctions motrices des ganglions de la base, la décharge de ces cellules — déclenchée pour l'essentiel par l'intégration d'événements synaptiques glutamatergiques excitateurs d'origine corticale — entraîne une forte activation des réseaux prémoteurs par un mécanisme de désinhibition. Les neurones striataux se caractérisent par leur faible fréquence de décharge spontanée de potentiels d'action. Cette hypoexcitabilité résulte de la présence de canaux potassiques non synaptiques dont l'activation dépend du potentiel membranaire. Les courants potassiques sortants, mis ainsi en jeu par la dépolarisation ont pour effet de « court-circuiter » les potentiels post-synaptiques excitateurs (PPSE) qui résultent de l'activité des afférences corticales.

Récemment, des enregistrements intracellulaires nous ont permis de montrer *in vivo* chez le rat que l'excitabilité des neurones striataux de sortie peut être accrue à la suite de l'injection d'un échelon de courant dépolarisant supralimi-

naire pour la décharge de potentiels d'action. Cette augmentation de l'excitabilité s'exprime par une augmentation de décharge en réponse à l'injection intracellulaire d'un courant dépolarisant et par un accroissement dans la probabilité d'induire des PPSE supraliminaire par stimulations des afférences corticales. Les mécanismes de cette plasticité ont été déterminés en montrant par modélisation sur ordinateur que les propriétés dynamiques du courant potassique striatal à inactivation lente ( $I_{As}$ ) sont nécessaires et suffisantes pour induire l'augmentation d'excitabilité cellulaire ainsi que la facilitation synaptique observées *in vivo*.

Nous avons aussi démontré que la décharge de la cellule striatale induit des processus dynamiques intrinsèques conduisant à un accroissement d'excitabilité qui favorisent l'intégration des événements synaptiques ultérieurs. Ce phénomène de plasticité intrinsèque, décrit pour la première fois dans la striatum, démontre l'existence d'une forme de « mémoire intrinsèque » de la cellule striatale en fonction de son activité préalable. En effet, nous avons observé que le nombre de potentiels d'action évoqués par une injection intracellulaire d'un échelon de courant dépolarisant est accru si la stimulation directe est précédée par une décharge spontanée. De plus, lorsque les stimulations corticales sont appliquées après un potentiel d'action spontané, un accroissement de la probabilité d'obtenir un PPSE supraliminaire peut être systématiquement observé (S. Mahon, S. Charpier).

### 1.1.2. *Organisation spatiale tridimensionnelle des neurones de la pars reticulata de la substance noire*

Les modèles actuels de l'organisation des ganglions de la base reposent sur une architecture parallèle, les informations issues d'aires fonctionnellement distinctes du cortex cérébral restant ségréguées de l'entrée à la sortie du système. Il est bien démontré que l'organisation topographique des projections cortico-striatales subdivise le striatum en une mosaïque de secteurs fonctionnellement distincts, mais peu de données indiquent comment les informations issues des différents secteurs striataux sont ensuite transmises.

Nous avons déjà montré chez le rat que la mosaïque fonctionnelle striatale est représentée de manière ordonnée dans la pars réticulata de la substance noire (une des deux structures de sortie des ganglions de la base) sous forme de lames concentriques entourant un cœur central localisé dans la partie dorsolatérale de cette structure. Afin de déterminer si l'organisation spatiale des neurones éfférents de la substance noire se conformait ou non à cette organisation en pelure d'oignon des projections striatales, les neurones de la pars reticulata de la substance noire (identifiés par leur réponse électrophysiologique à la stimulation de différentes aires du cortex sensorimoteur) ont été marqués par injection juxtacellulaire de neurobiotine et leur arborisation dendritique a été reconstruite en trois dimensions. Comme dans le cas de l'organisation des projections striatales, les dendrites des neurones de la pars reticulata forment une série de lames concentriques

entourant un cœur dorsolatéral. Les champs dendritiques des neurones localisés dans les lames ont une forme de disques ou d'ellipses plates et ceux des neurones du cœur dorsolatéral sont sphériques ou cylindriques, respectant ainsi l'organisation spatiale des projections striatales. Ce remarquable alignement des arborisations dendritiques individuelles des neurones de la substance noire et des projections issues des différents secteurs fonctionnels du striatum est en faveur d'une architecture parallèle des circuits striato-nigraux. Toutefois, les paramètres morphométriques des neurones injectés indiquent que l'extension des champs dendritiques des neurones ne se limite pas au territoire de projection d'un seul secteur striatal, chaque neurone s'étendant au sein d'une région innervée par deux ou trois secteurs striataux adjacents assurant par là-même une continuité entre les différents circuits parallèles.

Cette comparaison de l'extension des champs dendritiques des neurones de la substance noire réticulée et de celle des projections striatales suggère que l'organisation des circuits des ganglions de la base est régie par des règles fonctionnelles permettant aux neurones de sortie du système d'avoir accès à l'ensemble des informations corticales utiles à la régulation des comportements moteurs spécifiques qu'ils contrôlent (J.-M. Deniau, A. Menetrey en collaboration avec P. Mailly).

### 1.1.3. Mécanismes physiopathologiques des épilepsies de type « absence »

L'épilepsie-absence, syndrome neurologique qui survient chez des enfants ou des adolescents, résulte probablement d'une prédisposition génétique multifactorielle et est caractérisée par de brefs épisodes d'altération de la conscience. Durant les crises d'absence, les tracés EEG révèlent des décharges pointe-onde (P-O) qui apparaissent bilatéralement et de manière synchrone dans le thalamus et le néocortex. Selon certains travaux, une anomalie du circuit thalamo-cortical serait à l'origine des P-O. Afin de déterminer les activités cellulaires au sein de ce réseau lors des crises d'absence, nous avons utilisé une souche de rats Wistar sélectionnée dans le laboratoire du Pr C. Marescaux qui présentent spontanément des crises d'absence très similaires à celles survenant chez l'enfant (*Genetic Absence-Epilepsy rats of Strasbourg ; GAERS*). Des enregistrements intracellulaires ont donc été effectués *in vivo* chez les rats GAERS pour analyser les événements synaptiques et intrinsèques dans les différents éléments de la boucle thalamo-corticale lors des décharges P-O.

Nous avons montré que l'une des caractéristiques électrophysiologiques majeures des neurones thalamo-corticaux lors des crises d'absence est la présence de PPSI rythmiques de type  $GABA_A$ . Ces potentiels inhibiteurs sont composés par une sommation de PPSI unitaires à haute fréquence. Les neurones du noyau réticulaire du thalamus constituant une des principales afférences  $GABA$ ergiques du thalamus, ces cellules ont été également étudiées lors des crises d'absence. L'enregistrement intracellulaire de ces cellules réticulaires du thalamus, combiné

à un EEG de la région corticale associée, a révélé l'émission de bouffées de potentiels d'action à haute fréquence déclenchées sur de larges dépolarisations résultant d'un courant calcique à bas seuil. Cette décharge paroxystique est temporellement associée au complexe P-O de l'EEG. Selon l'analyse des propriétés temporelles de décharge des neurones réticulaires du thalamus durant les crises, ces cellules sont très probablement à l'origine des bouffées de PPSI enregistrées dans les neurones thalamo-corticaux. Nous avons aussi montré qu'une « accélération » des événements synaptiques dépolarisants spontanés dans les neurones réticulaires était responsable, par un effet de sommation temporelle, du déclenchement du potentiel calcique à bas seuil dans ces neurones et, par conséquent, de leur décharge en bouffées. Ce phénomène constitue très probablement un processus clé dans les mécanismes de synchronisation pathologique dans la boucle cortico-thalamique lors du déclenchement et du maintien des crises d'absence (S. Slaght, S. Charpier, S. Mahon en collaboration avec V. Crunelli).

## 1.2. RELATIONS ANATOMO-FONCTIONNELLES ENTRE LE CORTEX CÉRÉBRAL ET LES GANGLIONS DE LA BASE (Responsable de l'équipe : Anne-Marie Thierry)

### 1.2.1. *Organisation fonctionnelle des relations entre le cortex cérébral et les ganglions de la base*

Le cortex cérébral et les ganglions de la base sont reliés par des circuits multisynaptiques organisés en boucles parallèles. Ainsi, des régions fonctionnellement distinctes du cortex cérébral innervent des territoires distincts du striatum. Cette ségrégation est préservée dans les projections du striatum sur la substance noire pars reticulata (SNR), structure de sortie des ganglions de la base qui en retour innerve le cortex cérébral via les noyaux thalamiques. Le striatum innerve la SNR par une voie directe et une voie indirecte qui implique le pallidum externe et le noyau subthalamique (STN). Le STN reçoit également des afférences directes des cortex moteur, prémoteur et préfrontal tandis que l'ensemble du cortex cérébral innerve le striatum.

La ségrégation des messages issus de régions corticales fonctionnellement distinctes est préservée dans la voie directe reliant le striatum à la SNR. Par contre, l'organisation des voies trans-subthalamiques fait l'objet de controverses. Nous avons donc effectué des enregistrements unitaires extracellulaires chez le rat anesthésié et analysé les réponses des neurones de la SNR évoquées par la stimulation des cortex préfrontal médian (CPF), moteur et auditif, représentant trois régions corticales fonctionnellement distinctes. Les stimulations des cortex préfrontal et moteur induisent une réponse complexe dans les neurones nigraux : une excitation à courte latence, qui résulte de l'activation des neurones subthalamo-nigraux par les projections directes cortico-STN, une inhibition qui résulte de la mise en jeu de la voie directe striato-nigrale et enfin, et une excitation

tardive transmise par la voie indirecte cortico-striato-pallido-subthalamique conduisant à une activation des neurones subthalamo-nigraux par un processus de désinhibition. Le cortex auditif se distingue par son absence de projections directes sur le STN. Sa stimulation n'induit qu'une inhibition des neurones de la SNR suivie d'une excitation tardive. Les neurones qui répondent à la stimulation du CPF et des cortex moteur et auditif sont respectivement localisés dans les parties médiane, latéro-centrale et latérale de la substance noire reticulée. Certaines convergences peuvent être observées, une faible population de neurones répondant aux cortex préfrontal et moteur (15 % et 6 %, respectivement) et une population plus importante aux stimulations des cortex auditif et moteur (56 % et 23 %, respectivement). Ces neurones « convergents » présentent des réponses excitatrices à longue latence lors de la stimulation des deux sites corticaux. Seule une faible proportion (28 %) d'entre eux présente une inhibition aux deux sites.

La ségrégation des informations issues des cortex préfrontal, moteur ou auditif est donc largement préservée dans la SNR. Cela confirme que les circuits qui relient des aires corticales fonctionnellement distinctes à la SNR (via la voie striato-nigrale directe) sont organisés en parallèle. Les convergences des signaux issus de ces différentes aires corticales dans la SNR et le STN (étude précédente de Kolomiets *et al.*, *In Press*) révèlent l'existence, via les voies trans-subthalamiques, d'un niveau supplémentaire d'organisation permettant des interactions spécifiques entre les circuits parallèles des ganglions de la base (B. Kolomiets, en collaboration avec J.-M. Deniau).

### 1.2.2. *Systèmes dopaminergiques ascendants : compartimentation anatomo-fonctionnelle et rôle d'interface entre les circuits limbiques et moteurs*

Les neurones dopaminergiques ascendants qui innervent le striatum sont localisés dans le complexe aire tegmentale ventrale/substance noire pars compacta (AVT/SNC). Si l'innervation dopaminergique du striatum dorsal a pour origine la SNC et la région adjacente de l'AVT, celle du striatum ventral (ou noyau accumbens) provient de l'AVT et de la région médiane de la SNC. Le noyau accumbens est constitué de deux zones distinctes : le « core » qui reçoit des projections du cortex préfrontal et innerve la SNR, et le « shell » qui reçoit une importante projection de l'hippocampe et innerve l'AVT et la SNC médiane. Selon les travaux de l'équipe de J.-M. Deniau, chaque secteur fonctionnel du striatum dorsal reçoit une double innervation dopaminergique, l'une issue d'une région spécifique de la SNC et l'autre de la région médiane de la SNC et de l'AVT qui est commune à tous les secteurs striataux (Maurin *et al.*, 1999).

Selon une étude anatomique et électrophysiologique, une des deux sous-populations de neurones dopaminergiques joue le rôle d'interface entre les circuits limbiques motivationnels (shell) et les circuits moteurs du système extrapyramidal (core) et peut ainsi participer au transfert « motivation-action ». En effet, si

l'injection de WGA-HRP dans différentes régions du « shell » marque de façon rétrograde un grand nombre de cellules dans le champ CA1 de l'hippocampe et la région adjacente du subiculum, peu ou pas de cellules sont marquées dans le cortex préfrontal. Des neurones sont également marqués rétrogradement dans l'AVT et la région adjacente de la SNC et des fibres sont marquées de façon antérograde dans l'AVT mais aussi dans une large extension médio-latérale de la SNC. Complétant ces données anatomiques, les données électrophysiologiques suggèrent l'existence, via le « shell », d'un lien fonctionnel entre l'hippocampe et les neurones dopaminergiques du complexe AVT/SNC. En effet, la stimulation de l'hippocampe induit une réponse excitatrice dans des neurones du « shell » qui, comme l'indique la méthode d'activation antidromique, se projettent dans le complexe AVT/SNC. De plus, nous avons montré qu'une sous-population de neurones dopaminergiques qui innerve le striatum dorsal présente une réponse inhibitrice à la stimulation du « shell ». (B. Kolomiets, en collaboration avec J.-M. Deniau).

### 1.2.3. *Influence synaptique de l'hippocampe sur les cellules pyramidales du cortex préfrontal*

Nous avons mis en évidence l'existence d'une projection excitatrice directe issue des régions CA1/subiculum de l'hippocampe sur les aires prélimbique et orbitaire médiane du cortex préfrontal. De fait, la stimulation de l'hippocampe induit dans la majorité des cellules pyramidales du cortex préfrontal des réponses synaptiques complexes composées d'un EPSP monosynaptique suivi d'une hyperpolarisation de longue durée comprenant deux composantes. Une étude *in vivo* effectuée à l'aide d'enregistrements intracellulaires couplés à l'injection intracellulaire de neurobiotine pour caractériser les propriétés morphologiques des neurones enregistrés a permis d'approfondir les processus de plasticité synaptique de la voie hippocampe-cortex préfrontal.

*Plasticité à court terme* : les effets de la stimulation en double choc de l'hippocampe sur les différentes composantes de la réponse synaptique ont été analysés dans 67 cellules pyramidales. Pour des intervalles inter-chocs de 80 à 400 ms, les amplitudes des EPSP et IPSP sont réduites dans plus de la moitié des cellules ( $n = 37$ ). Dans 19 autres cellules, l'amplitude de l'EPSP est respectivement diminuée ou augmentée pour des intervalles de 60 à 180 ms et de 180 à 600 ms et il en est de même de l'IPSP. Enfin, dans 9 cellules, les amplitudes des EPSP et des IPSP sont respectivement augmentées et diminuées pour des intervalles de 40 à 350 ms. Ainsi, selon les conditions de stimulation, une facilitation ou une dépression à court terme de la transmission synaptique est observée dans les neurones du cortex préfrontal.

*Plasticité à long terme* : Les effets de la stimulation tétnanique (250 HZ) de l'hippocampe sur les réponses synaptiques induites par la stimulation en choc unique de cette structure indiquent que dans 9 des 13 cellules pyramidales du cortex préfrontal étudiées, l'amplitude de l'EPSP initial est augmentée (plus de

25 %) pendant 30 minutes au moins après l'application de la stimulation téta-nique. Cela démontre l'existence d'une potentialisation à long terme de la transmission synaptique de la voie hippocampe-cortex préfrontal.

Les processus de plasticité synaptiques à court et à long termes observés soulignent l'importance du lien fonctionnel entre l'hippocampe et le cortex préfrontal, deux structures impliquées dans les processus de mémorisation (Y. Gioanni, E. Dégénétais).

### 1.3. RÉGULATION DE LA LIBÉRATION DE L'ACÉTYLCHOLINE ÉVOQUÉE PAR LA STIMULATION DES RÉCEPTEURS NMDA DANS LES STRIOSOMES ET LA MATRICE DU STRIATUM : RÔLE DES PEPTIDES STRIATAUX ET DE LA DOPAMINE (Responsable de l'équipe : Marie-Lou Kemel)

#### 1.3.1. *Caractérisation des récepteurs NK1 classiques et/ou des sous-types de récepteurs NK1 des tachykinines impliqués dans les régulations inhibitrice et excitatrice de la libération de l'acétylcholine dans les striosomes et la matrice du striatum*

L'étude *in vitro* du rôle des tachykinines dans les circuits locaux des striosomes et de la matrice du striatum régulant la libération de l'acétylcholine (formée à partir de [<sup>3</sup>H]choline dans les interneurons cholinergiques) évoquée par le NMDA a été poursuivie chez le rat. Des antagonistes sélectifs des récepteurs des tachykinines de type NK1 (SR140333, RP67580, GR205171 et GR82334), NK2 (SR48968) et NK3 (SR142801) ont été utilisés afin d'apprécier le rôle des tachykinines endogènes libérées dans ces conditions. Les expériences ont été effectuées dans des situations contrôle (NMDA 1 mM + D-sérine 10 µM) et lors de la réduction (NMDA 1 mM) ou suppression (NMDA 1 mM + D-sérine 10 µM en présence d'α-méthyl-p-tyrosine (αMPT), inhibiteur de la synthèse de dopamine) du contrôle dopaminergique inhibiteur de la libération de l'acétylcholine.

Selon nos précédentes données, lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA (NMDA + D-sérine), les tachykinines libérées à partir des collatérales récurrentes des neurones efférents du striatum inhibent indirectement la libération de l'acétylcholine en stimulant celle de la dopamine. En agissant sur des récepteurs NK1, la substance P intervient de façon prédominante dans les striosomes, mais l'effet inhibiteur indirect de la neurokinine A, qui implique des récepteurs NK2, est observé dans les deux compartiments.

Dans la matrice, lors de la suppression du contrôle inhibiteur dopaminergique, les tachykinines libérées (substance P, neurokinines A et B) stimulent la libération évoquée de l'acétylcholine. L'effet facilitateur de la substance P semble être direct, médié par les récepteurs NK1 localisés sur les interneurons cholinergiques, mais les effets facilitateurs des neurokinines A et B impliquant les récepteurs NK2 et NK3 semblent indirects et font intervenir le NO. Les antagonistes sélectifs des récepteurs des tachykinines pourraient donc exercer des effets anti-



cholinergiques et s'avérer bénéfiques dans le rétablissement de la « balance dopamine-acétylcholine » lors d'une déficience de la transmission dopaminergique.

Des données récentes obtenues dans le laboratoire (équipe J.-C. Beaujouan) indiquent la présence de deux sous-types de récepteurs NK1 distincts des récepteurs NK1 classiques dans le cerveau du rat. Ces deux sites qui présentent une forte affinité pour la neurokinine A et les neuropeptides K et gamma se distinguent par une sensibilité différente aux peptides courts de type septide (SP(6-11) et ALIE-124) et aux antagonistes NK1 (RP67580 et GR82334). Cela nous a incité à déterminer si ces sous-types de récepteurs NK1 interviennent dans la régulation de la libération évoquée de l'acétylcholine.

Dans les striosomes, l'effet dopamine-dépendant de l'antagoniste NK1 SR140333 (0.1  $\mu\text{M}$  à 0.1 nM) est reproduit dans la même gamme de concentrations par les autres antagonistes NK1 (GR205171, RP67580, GR82334). Si la neurokinine A réduit les effets du SR140333 et du GR205171, elle est sans action sur ceux induits par le RP67580 ou le GR82334. L'action de la neurokinine A (IC<sub>50</sub> : 0.1 nM) est reproduite par la SP(6-11) (IC<sub>50</sub> : 50 nM). Par contre, les effets du RP67580 et du GR82334 qui restent insensibles à une plus forte concentration de neurokinine A (10 nM) sont réduits par la [Pro<sup>9</sup>]SP (IC<sub>50</sub> : 0.1 nM et 1 nM respectivement). Ainsi des récepteurs NK1 classiques et un sous-site de récepteurs NK1, vraisemblablement de type « septide », interviennent dans cette régulation dopamine-dépendante et la substance P et la neurokinine A sont les médiateurs endogènes activant ces sites ou récepteurs.

Dans la matrice, en absence du contrôle inhibiteur dopaminergique, l'effet de l'antagoniste NK1, le SR140333 (0.1  $\mu\text{M}$ ) est reproduit par le GR205171 (0.1  $\mu\text{M}$ ), mais le RP67580 (0.1  $\mu\text{M}$ ) et le GR82334 (0.1  $\mu\text{M}$ ) sont sans action. De plus, les effets facilitateurs du SR140333 et du GR205171 sont réduits par la neurokinine A (IC<sub>50</sub> : 0.1 nM) et la SP(6-11) (IC<sub>50</sub> : 10 nM). Ces données semblent indiquer que seul un sous-type de récepteur NK1, vraisemblablement de type « septide », intervient dans la régulation excitatrice des tachykinines (substance P et neurokinine A) de la libération évoquée de l'acétylcholine. (S. Pérez, G. Godeheu, M. Jabourian et M.-L. Kemel).

### 1.3.2. *Intervention de l'enképhaline dans la régulation de la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA en présence et en absence de la régulation dopaminergique inhibitrice des neurones cholinergiques*

Comme les tachykinines, des peptides opiacés peuvent être libérés dans certaines conditions à partir des collatérales des neurones Gabaergiques efférents du striatum. Dans les striosomes, l'enképhaline et la dynorphine sont en partie co-localisées avec des tachykinines dans les neurones efférents innervant la substance noire compacte. Dans la matrice, la dynorphine est co-localisée avec la substance P et la neurokinine A dans les neurones innervant la substance noire réticulée et le globus pallidus interne, alors que l'enképhaline est co-localisée avec la neurokinine B dans les neurones se projetant dans le globus pallidus

externe. Les récepteurs opiacés de type mu sont spécifiquement localisés dans les striosomes. Des récepteurs opioïdes kappa sont localisés sur les neurones de la matrice riches en dynorphine et les interneurons possèdent des récepteurs delta. Par une stratégie semblable à celle utilisée dans le cas des tachykinines, nous avons abordé l'étude du rôle des peptides opioïdes et principalement des récepteurs de type mu à l'aide d'un antagoniste de ces récepteurs, la  $\beta$  funaltrexamine :  $\beta$ FNA.

Dans la matrice, dans les différentes conditions utilisées, en présence ou en absence de transmission dopaminergique, la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA en présence de D-sérine n'est pas affectée par la  $\beta$ FNA (1  $\mu$ M et 10 nM).

Par contre, des effets ont été observés dans les striosomes ce qui est en accord avec la présence de récepteurs de type mu dans ce compartiment. Des différences sont apparues en fonction des heures de la journée. En effet, le matin deux heures après le début de l'éclairage de l'animalerie, la présence de  $\beta$ FNA provoque une augmentation (1  $\mu$ M, + 100 % ; 10 nM, + 66 %) de la libération de l'acétylcholine évoquée par une forte stimulation des récepteurs NMDA (NMDA 1 mM+D-sérine 10  $\mu$ M). Vraisemblablement dopamine-dépendante, cette régulation disparaît à la suite d'une réduction ou suppression de la transmission dopaminergique. Ainsi dans ces conditions expérimentales, l'enképhaline libérée lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA favorise indirectement la libération évoquée de dopamine qui inhibe à son tour la libération de l'acétylcholine. L'effet de  $\beta$ FNA est plus prononcé (1  $\mu$ M, + 400 % ; 10 nM, + 101 %) l'après-midi (sacrifice des animaux 7 heures après l'éclairage de l'animalerie). Une facilitation de la libération évoquée de l'acétylcholine est également observée ( $\beta$ FNA : 1  $\mu$ M, + 200 % ; 10 nM, + 50 %) dans des conditions réduisant ou supprimant les régulations dopamine-dépendantes (NMDA 1 mM seul ou NMDA 1 mM+D-sérine en présence  $\alpha$ MPT) L'enképhaline endogène libérée inhibe donc très fortement la libération de l'acétylcholine par une régulation dépendante de la dopamine et une régulation indépendante de la dopamine Cette dernière régulation inhibitrice, additive avec celle de la dopamine, pourrait être directe si des récepteurs mu étaient localisées sur les interneurons cholinergiques (M. Jabourian, S. Pérez, G. Godeheu et M.-L. Kemel).

#### 1.4. INTERACTIONS DES VOIES MONOAMINERGIQUES ASCENDANTES : CONSÉQUENCES SUR LES PROCESSUS DE PHARMACO-DÉPENDANCE (Responsable de l'équipe : Jean-Pol Tassin)

##### 1.4.1. *Analyse des effets comportementaux communs aux opiacés et aux psycho-stimulants chez des souris dépourvues de récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques et chez des rats traités par un antagoniste $\alpha 1$ -adrénergique*

Depuis plusieurs années, il est généralement admis que l'augmentation excessive de la libération de dopamine dans une structure sous-corticale, le noyau

accumbens, est l'un des facteurs critiques du processus de pharmacodépendance. Chez le rongeur, cette augmentation de libération de dopamine entraîne une hyperactivité locomotrice. Précédemment, nous avons montré que la stimulation de la libération fonctionnelle de dopamine dans le noyau accumbens induite par la D-amphétamine est sous le contrôle permissif de la transmission noradrénergique, plus précisément de l'action de la noradrénaline sur les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques, dans le cortex préfrontal. Des souris dépourvues de récepteurs  $\alpha 1b$ -adrénergiques (fournies par Susanna Cotecchia de l'université de Lausanne) nous ont permis de confirmer ces données. En effet, les réponses hyperlocomotrices évoquées par les psychostimulants (D-amphétamine et cocaïne) et la morphine chez ces souris sont considérablement réduites (de 70 à 90 %) par rapport à celles des souris sauvages. Ces souris dépourvues de récepteurs  $\alpha 1b$ -adrénergiques ont donc été utilisées pour déterminer la contribution de la transmission  $\alpha 1b$ -adrénergique dans le développement du processus de sensibilisation induit par les psychostimulants et les opiacés.

L'augmentation progressive de la réponse locomotrice provoquée par des injections répétées de la même dose d'une substance psychoactive caractérise le processus de sensibilisation. Des doses de produit suffisamment faibles n'évoquant qu'une très faible réponse comportementale chez les souris sauvages lors de la première injection (1,5 et 5 mg/kg, D-amphétamine, cocaïne et morphine, respectivement), et par conséquent peu de différence entre les deux génotypes, ont été utilisées dans nos expériences. Les sensibilisations comportementales obtenues après six injections sont abolies (cocaïne et morphine) ou considérablement réduites (70 %, D-amphétamine) chez les souris dépourvues de récepteurs  $\alpha 1b$ -adrénergiques.

Par ailleurs, des rats ont été traités avec du prazosin (0,5 mg/kg), un antagoniste  $\alpha 1$ -adrénergique, avant chacune des cinq injections de psychostimulant (D-amphétamine — 0,75 mg/kg — ou cocaïne — 5 mg/kg —) qui s'accompagnent d'une sensibilisation comportementale chez les animaux contrôles. Dix jours après la dernière injection, les animaux sont traités avec l'un ou l'autre de ces psychostimulants en absence de prazosin. Dans ces conditions, seuls les rats qui n'ont pas reçu de prazosin au cours des cinq premières injections développent une sensibilisation comportementale (D-amphétamine ou cocaïne).

Enfin, les réponses de récompense pour la cocaïne ou la morphine ont été également étudiées chez des souris dépourvues de récepteurs  $\alpha 1b$ -adrénergiques. L'effet récompensant de la cocaïne a été mesuré à l'aide d'un test de prise orale effectué à l'aide de deux biberons, l'un contenant de l'eau et l'autre de la cocaïne (0,2 mg/ml), ces biberons étant inversés après 12 jours. Si les souris sauvages préfèrent la cocaïne (65 % de la prise totale de liquide), les souris mutées présentent une aversion vis-à-vis de la cocaïne (40 % de la prise totale de liquide). De même, dans un test de préférence de place, seules les souris sauvages présentent une préférence pour le compartiment associé à l'injection de morphine (5 mg/kg). Les phénomènes de récompense à la morphine ont été aussi mesurés chez le rat

dans un test d'auto-administration. Une réduction de 30 % de la quantité auto-administrée de morphine a été observée chez des rats ayant reçu 0,5 mg/kg de prazosin 30 minutes avant la mise en situation d'auto-administration dans laquelle l'animal peut recevoir une injection lorsqu'il introduit son museau dans un orifice muni d'une cellule photo-électrique.

En conclusion, la stimulation des récepteurs  $\alpha 1b$ -adrénergiques intervient dans l'expression des effets locomoteurs et récompensants des psycho-stimulants et de la morphine. Par conséquent, les systèmes noradrénergiques qui se caractérisent par une grande réactivité aux situations environnementales, contribuent très vraisemblablement aux variabilités de sensibilité individuelle vis-à-vis des produits toxicomanogènes (C. Drouin, L. Darracq, G. Blanc).

#### *1.4.2. Intervention des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques dans la réactivité aux psychostimulants : Influence des caractéristiques pharmacologiques et des conditions environnementales*

La réponse locomotrice évoquée par les psycho-stimulants a été étudiée chez le rat dans deux situations environnementales distinctes. Trois psycho-stimulants agissant différemment sur les systèmes noradrénergiques et dopaminergiques ont été utilisés dans cette étude.

Afin de contrôler les effets du stress et de la nouveauté sur l'activité des neurones noradrénergiques, les animaux ont bénéficié de 15 heures d'habituation à leur environnement (« longue habitude ») ou ont reçu des injections répétées de solution de sérum physiologique pendant trois jours consécutifs (« trois sessions »). Les animaux « trois sessions » développent une réponse locomotrice à l'injection de sérum, réponse qui n'est plus visible lorsque l'activité des neurones noradrénergiques est inhibée par un agoniste des récepteurs alpha 2 adrénergiques (clonidine, 20  $\mu$ g/kg) ou lorsque les animaux sont prétraités par un antagoniste  $\alpha 1$ -adrénergique (prazosin, 0,5 mg/kg). Cette absence de réponse est également observée chez des animaux dont les neurones noradrénergiques ont été détruits ou chez des rats préalablement soumis à la procédure de « longue habitude ».

Les réponses locomotrices induites par la D-amphétamine ou la cocaïne, des agents qui facilitent les transmissions noradrénergique et dopaminergique, et celle évoquée par le GBR12783, substance qui bloque spécifiquement la recapture de la dopamine, ont été comparées chez des rats soumis aux procédures « longue habitude » ou « trois sessions ». Les réponses induites par la cocaïne et le GBR12783 (utilisées à une dose moyenne) sont deux fois plus importantes chez les animaux « trois sessions » que chez les animaux « longue habitude ». En revanche, celles évoquées par la D-amphétamine sont identiques. Le prazosin (0,5 mg/kg) réduit les réponses locomotrices induites par ces trois produits dans les deux procédures et, comme nous l'avons vu, bloque les sensibilisations comportementales à la D-amphétamine et à la cocaïne. Les injections répétées de GBR12783 n'induisent pas de sensibilisation comportementale durable.

L'ensemble de ces données indique que les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques jouent non seulement un rôle important dans les effets pharmacologiques des psycho-stimulants mais qu'ils interviennent également dans des apprentissages résultant d'expériences vécues par l'animal (Candice Drouin, Gérard Blanc, Anne-Sophie Villégier).

#### *1.4.3. Rôles respectifs des innervations noradrénergique et dopaminergique corticales dans les réponses aiguë et chronique induites par la D-amphétamine*

Des animaux dépourvus d'innervation noradrénergique corticale obtenue par une injection bilatérale de 6-hydroxydopamine dans le pédoncule cérébelleux supérieur ont été utilisés afin de confirmer le rôle des récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques corticaux dans le contrôle des réponses locomotrices induites par des psycho-stimulants. La réponse locomotrice induite par une injection aiguë de D-amphétamine est identique chez les animaux dépourvus d'innervation noradrénergique corticale (NA < 1 % des contrôles) par rapport aux animaux contrôles (opérés mais n'ayant pas reçu de 6-hydroxydopamine). En revanche, les animaux lésés n'ont pas développé de sensibilisation comportementale à la D-amphétamine ce qui confirme le rôle des neurones noradrénergiques dans ce processus.

Paradoxalement, le prazosin bloque la réponse locomotrice évoquée par l'injection aiguë de D-amphétamine chez les rats dépourvus d'innervation noradrénergique corticale. Cela nous a conduit à envisager que la dopamine libérée à partir des fibres dopaminergiques corticales a la capacité de stimuler les récepteurs  $\alpha 1$ -adrénergiques corticaux (l'affinité de la DA pour le récepteur  $\alpha 1$ -adrénergique n'étant que 8 fois plus faible que celle de la NA). Confirmant cette hypothèse, la réponse induite par une injection aiguë de D-amphétamine n'est plus observée lorsque des animaux dépourvus d'innervation noradrénergique corticale sont également dépourvus d'innervation dopaminergique corticale, ces lésions supplémentaires ayant été effectuées par des injections bilatérales de 6-hydroxydopamine dans le cortex préfrontal.

Ces données pourraient également expliquer les conclusions de certains auteurs qui ont trop rapidement éliminé l'hypothèse d'une intervention des neurones noradrénergiques ascendants dans les processus de pharmacodépendance en fonction de la persistance des réponses observées lors des injections aiguës de psychostimulants chez des animaux dépourvus d'innervation noradrénergique corticale (Anne-Sophie Villégier, Gérard Blanc, Candice Drouin).

#### *1.4.4. Rôle des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT<sub>2A</sub> dans la libération fonctionnelle de dopamine induite par la D-amphétamine dans le noyau accumbens*

Aux doses habituellement utilisées (0,75 mg/kg ip), la D-amphétamine ne provoque pas de libération de sérotonine. Néanmoins, nous avons pu montrer

que la réponse locomotrice induite par cette dose de D-amphétamine chez des rats sélectionnés pour leur bonne réactivité à ce traitement est complètement bloquée par un antagoniste des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub>, le SR46349B (0,5 mg/kg i.p). Ces données, qui suggèrent que les neurones sérotoninergiques jouent également un rôle permissif dans les effets de certains psychostimulants, nous ont conduit à analyser l'effet de cet antagoniste 5-HT<sub>2A</sub> sur la libération fonctionnelle de dopamine induite par la D-amphétamine dans le noyau accumbens, ces expériences étant réalisées en utilisant la technique de microdialyse chez des rats éveillés et libres de leurs mouvements.

Nous avons ainsi démontré que le SR46349B bloque la libération fonctionnelle de dopamine dans le noyau accumbens évoquée par la D-amphétamine sans affecter la libération de dopamine non fonctionnelle. En effet, les effets du SR46349B ont été étudiés sur les réponses induites par l'administration périphérique de D-amphétamine (dopamine fonctionnelle) ou de l'application locale par dialyse réverse de la drogue (dopamine non fonctionnelle). Ainsi l'activation par la D-amphétamine des neurones dopaminergiques qui innervent le noyau accumbens pourrait nécessiter une stimulation tonique des récepteur 5-HT<sub>2A</sub>, cette permissivité complétant celle exercée par les récepteurs  $\alpha$ 1B noradrénergiques (Agnès Auclair, Gérard Blanc).

## 2. COMMUNICATION JONCTIONNELLE DANS LES RÉSEAUX ASTROCYTAIRES ET NEURONAUX

(Responsable : Christian Giaume)

### 2.1. INHIBITION PAR LES ENDOTHÉLINES DE LA COMMUNICATION JONCTIONNELLE DES ASTROCYTES DANS DES TRANCHES D'HIPPOCAMPE (Frédrik Blomstrand, Pascal Ezan, Anne-Marie Godeheu)

Les astrocytes possèdent de très nombreuses jonctions communicantes (JC) constituées de protéines jonctionnelles, les connexines, dont les caractéristiques de perméabilité ont été essentiellement étudiées en culture primaire. Les propriétés de ces jonctions ont donc été analysées dans des systèmes plus intégrés en utilisant des coupes de cerveau de rats âgés de 12 à 19 jours. La communication jonctionnelle entre les astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe a été étudiée par des enregistrements en patch-clamp effectués avec des pipettes contenant de la biocytine (traceur intercellulaire de faible poids moléculaire qui diffuse d'une cellule à sa voisine par les canaux jonctionnels). La biocytine diffuse dans plus de 100 cellules (diamètre de diffusion, > 400  $\mu$ M) majoritairement positives pour des marqueurs astrocytaires révélant ainsi l'importance des réseaux astrocytaires dans cette région de l'hippocampe. La grande majorité des astrocytes directement enregistrés présentent un couplage important, une relation courant/voltage linéaire et une résistance d'entrée faible. Ce couplage est largement réduit (dans 50 % des astrocytes enregistrés) par la carbenoxolone, un inhibiteur des canaux jon-

tionnels, mais aussi par les endothélines-1 et -3 (0.1  $\mu\text{M}$ ), le diamètre de diffusion étant dans ce dernier cas inférieur à 50  $\mu\text{M}$ . L'inhibition évoquée par l'endothéline-3 est bloquée par le BQ788, un antagoniste du récepteurs ETB des endothélines et une co-application de BQ788 et de BQ123 (antagoniste du récepteur ETA) est nécessaire pour bloquer l'effet inhibiteur de l'endothéline-1. Des immunoblots effectués avec des anticorps dirigés contre la connexine 43 (Cx43, connexine abondamment exprimée par les astrocytes) ont permis de montrer que cette protéine jonctionnelle est déphosphorylée sous l'action des endothélines-1 ou -3 et que cette réponse présente une sensibilité aux antagonistes identique à celle observée pour le couplage. Ces résultats démontrent pour la première fois une régulation de l'étendue des réseaux astrocytaires par un composé endogène agissant par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire. Ils révèlent aussi l'action inhibitrice *in situ* des endothélines sur la communication jonctionnelle des astrocytes.

## 2.2. ÉTUDE DE LA COMMUNICATION JONCTIONNELLE ASTROCYTAIRE LORS DE SITUATIONS INFLAMMATOIRES (William Mème, Marc Mesnil)

Selon plusieurs données, les dommages neuronaux intervenant dans la maladie d'Alzheimer seraient associés à une réponse inflammatoire résultant d'une réaction gliale impliquant les cellules microgliales et les astrocytes. Les modifications fonctionnelles des astrocytes pourraient retentir sur les interactions neurone-astrocyte et contribuer à la dégénérescence des neurones. Nous avons donc recherché si ces jonctions, et les connexines qui les composent, constituent des cibles potentielles des différentes cytokines inflammatoires et de nucléotides libérés dans l'espace extracellulaire lors d'une inflammation. Des cultures primaires d'astrocytes corticaux de souriceaux ont été utilisées dans ces expériences et l'étude de la diffusion intercellulaire du marqueur fluorescent jaune Lucifer et des enregistrements en double patch-clamp ont permis d'apprécier les modifications de perméabilité des jonctions communicantes.

La perméabilité de ces jonctions n'est pas modifiée à la suite de réactions inflammatoires provoquées pendant 24 heures par différentes cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  ou LPS) ou de l'exposition pendant 4 jours des cellules au fragment amyloïde- $\beta$ . Par contre, les inhibitions partielles du couplage jonctionnel induites par les nucléotides ADP ou ATP (5-100  $\mu\text{M}$ ) sont accrues lorsque les astrocytes sont prétraités avec l'IL-1 $\beta$  ou le fragment amyloïde- $\beta$ . De plus, dans ces conditions, l'UTP réduit considérablement la perméabilité des jonctions gap (58 % d'inhibition à 100  $\mu\text{M}$ ) ce qui suggère l'expression d'une nouvelle classe de récepteurs purinergiques de type P<sub>2Y2</sub>. Ces agents inflammatoires augmentent également la réactivité des cellules à l'endothéline-1, les jonctions communicantes étant fortement inhibées (73 %) lors de l'application de 10<sup>-9</sup>M d'endothéline-1 sur des astrocytes prétraités avec l'IL-1 $\beta$  alors qu'une concentration 10 fois

plus élevée du peptide est nécessaire pour provoquer le même effet dans les conditions contrôles. Des enregistrements effectués à l'aide de la technique de double patch-clamp sur des paires d'astrocytes isolées ont permis de confirmer le rôle inhibiteur de l'endothéline-1 et des nucléotides purinergiques sur le couplage astrocytaire et la sensibilisation de ces réponses par les cytokines inflammatoires.

### 2.3. COMMUNICATION JONCTIONNELLE ASTROCYTAIRE ET INTERACTIONS NEURO-GLIALES

(Nathalie Rouach, Annette Koulakoff)

Les associations étroites entre les terminaisons astrocytaires et les synapses favorisent les interactions astrocyto-neuronales. Selon des données récentes, les astrocytes contribueraient en effet à la formation des synapses et contrôleraient leur efficacité. Dans ce contexte, nous avons cherché à déterminer si les communications jonctionnelles astrocytaires sont impliquées dans les interactions astrocyto-neuronales en utilisant des co-cultures astrocyte-neurones et des cultures primaires, enrichies en neurones ou en astrocytes issues du striatum ou du cortex de rat ou de souris.

Les accroissements de l'étendue de la diffusion intercellulaire de jaune Lucifer, et de l'expression de la Cx43 dans les astrocytes ont permis de conclure que la présence des neurones augmente le couplage des astrocytes dans les co-cultures. Cet effet permissif des neurones sur les jonctions gap astrocytaires est réversible et dépend de leur stade de différenciation. La poursuite de ces études sur les co-cultures de striatum a également permis de démontrer que cette augmentation du couplage ne résulte pas de la libération d'un facteur soluble ou de neurotransmetteurs, d'une modification du potentiel de membrane, du niveau de  $Ca^{2+}$  cytosolique ou encore du volume des astrocytes, mais de l'activité synaptique spontanée des neurones. En effet, l'action inhibitrice des neurones sur les jonctions gap astrocytaires disparaît lorsque les co-cultures sont exposées pendant des durées de 24 à 72 h à la tétrodontoxine, des antagonistes des récepteurs  $GABA_A$  (bicuculline ou picrotoxine) ou un antagoniste des récepteurs AMPA (CNQX), des traitements qui réduisent l'activité  $GABA$ ergique synaptique des neurones striataux.

Ce contrôle de la communication jonctionnelle astrocytaire par l'activité neuronale permet d'envisager des effets réciproques, c'est-à-dire que les astrocytes modulent l'activité neuronale selon l'étendue de leur couplage jonctionnel. Pour vérifier cette hypothèse, l'activité des neurones hippocampiques a été analysée dans des co-cultures traitées par la carbenoxolone (100  $\mu$ M, 10 min). Des enregistrements simultanés en patch-clamp et en imagerie calcique ont permis de conclure que les fréquences des potentiels d'action, des courants synaptiques et des oscillations calciques spontanées des neurones sont très fortement diminuées (de 80 à 95 %) en présence de cet inhibiteur des jonctions gap astrocytaires. L'effet inhibiteur de la carbenoxolone sur l'activité spontanée est réversible et n'est pas observé dans les cultures neuronales dépourvues d'astrocytes. La carbenoxolone



diminue également (64 %), de manière réversible, l'activité neuronale oscillatoire de type épileptique déclenchée par l'application de bicuculline. Ces effets ne résultent pas d'une altération des propriétés intrinsèques des neurones car les caractéristiques des courants sodiques, des potentiels d'action et des courants miniatures ne sont pas affectées par la carbenoxolone. L'inhibition de la communication jonctionnelle astrocytaire semble effectivement impliquée dans ce phénomène puisque ces modifications des propriétés neuronales ne sont pas reproduites en présence de l'acide glycyrrhizique, l'analogue inactif de la carbenoxolone, et qu'aucun couplage électrique ne peut être détecté entre les neurones.

Obtenus en collaboration avec E. Avignone et M. Segal (Weizmann Institute, Israël), ces résultats indiquent que les activités spontanée et épileptique des neurones dépendent étroitement du couplage des astrocytes et par conséquent que les jonctions communicantes astrocytaires interviennent dans les interactions neurone-astrocytes. Ces deux types cellulaires exercent donc un contrôle mutuel de leur modalité respective de communication : la transmission synaptique dans le cas des neurones et la communication jonctionnelle dans celui des astrocytes.

#### 2.4. IDENTIFICATION DES CONNEXINES EXPRIMÉES DANS LES NEURONES STRIATAUX ET LES ASTROCYTES HIPPOCAMPIQUES PAR LA TECHNIQUE DE « SINGLE-CELL RT-PCR » (Laurent Venance, Pascal Ezan)

Diverses connexines sont exprimées dans le SNC des mammifères, cette diversité résultant en partie des nombreux types cellulaires couplés par des jonctions communicantes : les neurones, les cellules gliales et endothéliales, les cellules épendymaires et celles des méninges. Chacun de ces types cellulaires et notamment les neurones et les astrocytes, les populations cellulaires cérébrales les plus nombreuses, expriment vraisemblablement plusieurs connexines. Les populations astrocytaires étant aussi hétérogènes que les populations neuronales, le patron d'expression établi pour un type de neurones, ou d'astrocytes, ne peut donc être généralisable ne serait-ce qu'au sein d'une même structure cérébrale. L'identité moléculaire des connexines exprimées dans une cellule donnée doit donc être déterminée et cette identification est d'autant plus justifiée par les propriétés de sélectivité, de compatibilité et de régulation sont spécifiques à chacune de ces connexines.

Le développement récent de la technique de patch-clamp sur tranches de cerveaux combinée avec celle de RT-PCR sur cellule unique permet cette identification. L'utilisation de cette double approche et des sondes nucléotidiques spécifiques des 16 connexines identifiées chez les mammifères a permis de démontrer l'expression des ARNm de cinq connexines (Cx32 : 11 %, Cx36 : 20 %, Cx31.1 : 30 % et Cx47 : 39 %) dans les neurones GABAergiques éfferents du striatum de rat et des ARNm de 5 connexines sur 6 testées (Cx26 : 64 %, Cx30 : 73 %, Cx32, 68 % : Cx40, 55 % : Cx43, 59 % ; Cx46, 0 %) dans les astrocytes de la région CA1 de l'hippocampe de rat. Comme l'indique la compa-

raison de ces patrons d'expression, la composition moléculaire des jonctions communicantes varie selon le type cellulaire considéré. La présence de nombreux messagers dans une seule cellule suggère l'existence d'une combinatoire relativement complexe des connexines constitutives des canaux jonctionnels. Elle permet d'envisager l'existence de propriétés de communication intercellulaire multiples, ce que nous sommes en train de vérifier par une approche électrophysiologique.

#### 2.5. EFFETS DE L'ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE (LPA) ET DE LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE (S1P) SUR LES ASTROCYTES ET LES CELLULES MICROGLIALES

(Martine Tencé, Alice Pébay, Jocelyne Cordier, en collaboration avec Charles-Félix Calvo, Edwige Amigou, Joël Prémont)

Nous avons poursuivi l'étude des effets biologiques du LPA et de la S1P, deux nouveaux médiateurs lipidiques d'origine plaquettaire libérés dans le système nerveux central au niveau des lésions vasculaires. L'objectif est d'identifier les cellules sensibles à ces médiateurs et de mettre en évidence des altérations des fonctions cellulaires importantes pour le fonctionnement et/ou la survie neuronale.

Les astrocytes sont des cibles du LPA et de la S1P. Nous avons montré en effet que ces cellules expriment plusieurs types de gènes *Edg* codant pour les récepteurs membranaires spécifiques de l'un et l'autre de ces médiateurs. Le LPA et la S1P activent les mêmes cascades de signalisation intracellulaires, mais ont des effets différents sur certaines fonctions astrocytaires. Si le LPA ou la S1P ne semblent pas avoir de rôle régulateur sur le métabolisme énergétique ou la capture du glutamate, contrairement au LPA, la S1P induit une prolifération des astrocytes, un phénomène susceptible d'intervenir dans la gliose réactionnelle. La S1P est également un puissant découplant des jonctions gap alors que le LPA n'a qu'un effet partiel. Des protéines Gi/Go, des PI 3-kinases et des MAP kinases semblent être impliquées dans l'effet mitogène de la S1P. Les mécanismes responsables de l'effet inhibiteur de la S1P sur la perméabilité des jonctions gap sont également recherchés car selon certaines données, la fermeture des jonctions gap astrocytaires augmenterait la vulnérabilité des neurones vis-à-vis des agents neurotoxiques.

Les cellules microgliales sont également des cibles du LPA et de la S1P. En effet, nous avons montré que le profil des récepteurs *Edg* présents sur ces cellules diffère de celui des astrocytes. De plus, le LPA s'avère un puissant activateur de la production d'AMP cyclique et exerce sur cette réponse des effets synergiques avec d'autres médiateurs pro-inflammatoires tels que la prostaglandine E2. L'un de nos objectifs est d'identifier la ou les isoforme(s) d'adénylate cyclase(s) responsable(s) de cet effet. Selon certaines données, l'AMP cyclique inhiberait la production microgliale de cytokines neurotoxiques telles que le TNF $\alpha$ . Des résultats préliminaires indiquent que le LPA réduit effectivement la production de TNF $\alpha$  dans les microglies en culture.

### 3. RELATIONS ASTROCYTO-NEURONALES : PROCESSUS DE NEUROTOXICITÉ ET RÉPONSE ASTROCYTAIRE AUX SITUATIONS D'AGRESSION

#### 3.1. ANALYSE DE MÉCANISMES IMPLIQUÉS OU ASSOCIÉS AUX PROCESSUS NEUROTOXIQUES

(Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

##### 3.1.1. *Mise en évidence d'effets « non ionotropiques » des récepteurs NMDA* (Christian Gauchy, Sylvie Trocmé)

Ces dernières années, nos travaux ont été consacrés à l'analyse des mécanismes impliqués dans les effets neurotoxiques du glutamate, du zinc et de l'eau oxygénée. Dans ce cadre, nous avons découvert que ces trois agents provoquent une inhibition de la synthèse protéique dans les neurones par des mécanismes distincts. Nos travaux ont également permis de confirmer le rôle primordial de l'élévation de la concentration de calcium cytosolique dans les effets neurotoxiques du glutamate et de mettre en évidence son implication dans l'inhibition de la synthèse protéique. Progressivement, ces observations nous ont orientés vers la mise en évidence de nouveaux systèmes de transduction associés aux récepteurs ionotropiques du glutamate.

De fait, l'étude du mécanisme intervenant dans l'effet neurotoxique de l'eau oxygénée, nous avait permis de constater que les antagonistes des récepteurs NMDA exercent un effet neuroprotecteur important vis-à-vis de cet agent neurotoxique. Toutefois, la composante neurotoxique de l'eau oxygénée sensible à ces antagonistes était indépendante de la présence de  $\text{Ca}^{2+}$ , de sodium et de  $\text{Mg}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. Cette observation suggérait que l'activation des récepteurs NMDA pouvait provoquer la mort de neurones par un mécanisme insensible à la présence de magnésium dans le milieu externe et indépendant de l'influx de calcium et de sodium. Nous avons aussi démontré que l'eau oxygénée inhibe la synthèse protéique par un mécanisme précoce impliquant la phosphorylation du facteur d'élongation des protéines, eEF2, par eEF2 kinase, une kinase activée lors d'une augmentation de calcium cytosolique. Ces données nous ont conduits à rechercher si le NMDA n'induit pas également une augmentation du calcium cytosolique en absence de calcium dans le milieu extracellulaire.

Le NMDA augmente effectivement le calcium cytosolique indépendamment de la présence de calcium, de sodium, ou de magnésium dans le milieu externe. En absence de calcium externe, le calcium mobilisé provient de stocks du réticulum endoplasmique sensible à la thapsigargine. Observé dans des cultures de neurones originaires du cortex cérébral, du striatum et des grains du cervelet d'embryons de rats, cet effet ne résulte pas de l'activation secondaire de récepteurs métabotropiques par du glutamate ambiant selon un mode paracrine. Cela suggère qu'une partie des effets liés à la stimulation des récepteurs NMDA

pourrait résulter de l'intervention d'un système de transduction indépendant des propriétés ioniques de ces récepteurs.

### 3.1.2. *Interactions de protéines G avec les récepteurs AMPA*

(Christian Gauchy, Yvette Torrens)

Nous avons aussi constaté qu'en l'absence de calcium dans le milieu extracellulaire, l'activation des récepteurs AMPA provoque également une mobilisation du calcium cytosolique des neurones corticaux. Toutefois, dans les mêmes conditions expérimentales, à l'inverse de ce qui intervient lors de l'activation des récepteurs NMDA, l'augmentation du calcium cytosolique induite par l'AMPA persiste après une déplétion des stocks de calcium du réticulum endoplasmique. L'analyse du mécanisme intervenant dans cette réponse semble indiquer les implications de stocks de calcium localisés dans les mitochondries et d'un influx de sodium résultant de l'ouverture de canaux sodiques sensibles à la tétrodotoxine.

Des données de la littérature obtenues à l'aide de cellules non neuronales transfectées, indiquent que l'interaction de protéines G avec les sous-unités alpha des canaux sodiques rapides (type IIA) conduit à une diminution de la vitesse de désensibilisation et facilite l'ouverture de ces canaux. De façon similaire, des expériences effectuées sur des cultures de neurones du cortex cérébral de la souris nous ont permis de montrer que la stimulation des récepteurs AMPA augmente la liaison de protéines G à la sous-unité alpha des canaux sodiques voltage-dépendants. Des expériences effectuées par Laurent Fagni (laboratoire de J. Bockaert, Montpellier) à l'aide de la technique de patch perforé ont confirmé que l'AMPA facilite l'ouverture des canaux sodiques. L'entrée accrue de sodium dans le cytosol serait suffisante pour inverser la fonction de l'échangeur sodium/calcium des mitochondries et ainsi permettre la sortie de calcium dans le cytosol. De fait, en absence de calcium externe, la mobilisation de calcium cytosolique induite par l'AMPA est bloquée par la tétrodotoxine et par un inhibiteur spécifique de l'échangeur sodium/calcium mitochondrial. Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que l'AMPA facilite l'ouverture des canaux sodiques par un mécanisme impliquant des protéines G.

### 3.1.3. *Protéines G et effet neurotoxique du GABA*

(Marion Maus-Moatti)

Selon des données de la littérature, le GABA provoque un influx de calcium lorsqu'il est appliqué sur des neurones embryonnaires. Tenant compte de l'importance des augmentations de calcium cytosolique dans la survie neuronale, nous avons recherché un éventuel effet neurotoxique du GABA sur les neurones striataux de rat.

Nous avons ainsi constaté que le GABA provoque une neurotoxicité massive dans cette structure cérébrale et que des protéines G sensibles à la toxine de

pertussis sont impliquées dans la cascade d'événements conduisant à la mort neuronale. L'effet délétère du GABA ne résulte pas d'une activation secondaire des récepteurs NMDA puisqu'il persiste en présence d'antagonistes de ces récepteurs. Il ne résulte pas non plus d'une libération secondaire d'autres neurotransmetteurs puisqu'il n'est pas aboli par la tétrodontoxine ou la toxine tétanique. Les récepteurs GABAergiques connus ne paraissent pas intervenir dans cet effet neurotoxique du GABA puisque celui-ci persiste en présence des antagonistes des récepteurs GABA A, B ou C. Par contre, les inhibiteurs du transport du GABA bloque l'effet neurotoxique de ce médiateur. Cet effet neurotoxique pourrait intervenir dans des conditions physiologiques au cours du développement pour éliminer certaines populations neuronales ou dans des pathologies neurodégénératives chez l'adulte.

#### 3.1.4. *Rôle des macrophages cérébraux dans les processus inflammatoires* (Edwige Amigou, Charles-Félix Calvo)

Une inflammation locale intervient à la suite d'une lésion expérimentale ou pathologique du SNC conduisant au processus de mort neuronale. Cette inflammation se traduit par une réactivité astrocytaire et par une transformation des microglies qui adoptent alors le phénotype activé de macrophage cérébral associé à la production de facteurs comprenant des cytokines, des facteurs de croissance, ou des chimiokines. Diverses études indépendantes réalisées *in vivo* et/ou *in vitro*, ont permis d'attribuer des fonctions biologiques antagonistes aux macrophages cérébraux et suggèrent que les macrophages cérébraux ont un double rôle neurotrophique mais aussi neurotoxique. Ces observations nous ont conduits à envisager l'existence de populations macrophages distinctes responsables des propriétés neuroprotectrice ou neurotoxique de ces cellules, chacune de ces populations sécrétant respectivement et exclusivement des cytokines anti-inflammatoires ou pro-inflammatoires.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons préparé des cultures de macrophages cérébraux de souris. Ces cellules récoltées ont été stimulées par le LPS en présence de différents agents bloquant le transport et donc la sécrétion des cytokines. Une technique de marquage intracellulaire utilisant des anticorps anti-cytokines couplés à des fluorochromes distincts devrait nous permettre de vérifier si une cytokine est synthétisée ou non de façon exclusive par une sous-population cellulaire activée en analysant le matériel par cytométrie de flux.

D'autre part, une collaboration entreprise avec Élodie Mordelet (Unité d'oncologie virale, Institut Pasteur) nous a permis de procéder à la transduction de macrophages cérébraux en culture par un vecteur rétroviral avant de les injecter dans le striatum du rat. L'expression du gène GFP localisé dans le vecteur a permis de montrer que les macrophages transduits sont encore détectables trois mois après l'injection, avec un phénotype ramifié et en l'absence d'inflammation locale. Les macrophages transduits peuvent ainsi constituer un véhicule pour obtenir l'expression spécifique d'un gène dans le cerveau.

### 3.1.5. *Identification des sites de liaison de type NK2 dans le cerveau de rat adulte*

(Jean-Claude Beaujouan et Monique Saffroy)

Paradoxalement, en dépit de la présence de neurokinine A dans le cerveau et de nombreuses observations indiquant que des effets médiés par cette tachykinine endogène ou des analogues spécifiques des récepteurs des tachykinines sont bloqués par des récepteurs NK2, nous n'avons que peu d'informations directes sur la présence effective de ces récepteurs dans le cerveau. Précédemment, en utilisant la [<sup>125</sup>I]-neukinine A ([<sup>125</sup>I]-NKA) comme radioligand, nous avons décrit les caractéristiques cinétiques et pharmacologiques de deux sous-types de récepteurs NK1 présents, comme les récepteurs NK1 classiques, sur des membranes de diverses structures cérébrales de rat. Ce ligand se fixe également sur des sites NK3 centraux. L'expérience acquise dans ces expériences nous a conduit à tenter d'identifier des sites de liaison de type NK2 centraux à l'aide de ce radioligand.

Afin d'éviter la fixation de [<sup>125</sup>I]-NKA sur les sites NK1 et NK3 centraux, des membranes de différentes structures cérébrales de rat adulte ont été incubées avec ce ligand en présence d'un agoniste ([Pro<sup>9</sup>]SP) ou d'un antagoniste (SR140333) NK1 et d'un agoniste NK3 (senktide). Dans ces conditions, la [<sup>125</sup>I]-NKA se lie sélectivement avec une haute affinité sur des sites NK2 de membranes d'hippocampe. Cette liaison est dépendante de la température, réversible, et sensible au GTP gammaS et correspond à une seule population de sites de liaison ( $K_D$  : 2,2 nM et  $B_{max}$  : 7,3 fmol/mg prot.). Des études de compétition effectuées avec diverses tachykinines et analogues des tachykinines ont révélé l'existence de sites NK2 liant la [<sup>125</sup>I]-NKA dont les caractéristiques pharmacologiques sont identiques à celles des sites NK2 périphériques du duodénum et de la vessie de rat étudiés parallèlement. La NKA, le neuropeptide K, le neuropeptide gamma ainsi que des antagonistes sélectifs NK2 présentent une affinité nanomolaire pour ces sites. La distribution régionale des sites NK2 diffère complètement de celles des sites NK1 et NK3. L'hippocampe, le thalamus et le septum sont les structures les plus riches en sites NK2 alors que les autres structures cérébrales en sont quasiment dépourvues. Une analyse autoradiographique préliminaire confirme et affine ces données. Ainsi après avoir été les premiers à caractériser les sites NK1 et NK3 dans le cerveau, nous avons aussi réussi à caractériser les sites NK2 centraux.

### 3.2. PHOSPHORYLATION DE PROTÉINES ASTROCYTAIRES ET NEURO-ONCOLOGIE

(Responsable de l'équipe Hervé Chneiweiss) (Brigitte Canton, Étienne Formstecher, Marie-Pierre Junier, François Renault, Darina Zvalova).

Les astrocytes constituent la première ligne de défense du tissu nerveux lors des agressions infectieuses, traumatiques ou liées à des désordres vasculaires. Les nombreuses études du système nerveux effectuées dans ces conditions soulignent la grande capacité de survie des astrocytes, ce qui s'inscrit en contraste

avec la mort neuronale ou oligodendrocytaire par apoptose fréquemment observée. 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. Les astrocytes semblent également à l'origine de la majorité des tumeurs primitives du système nerveux et participent à la formation d'une réaction tissulaire particulière lors du développement des tumeurs. Les analyses des réactions astrocytaires lors d'un stress cellulaire et des mécanismes présidant à la survie et au contrôle du cycle cellulaire dans l'astrocyte normal ont donc été poursuivies parallèlement.

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

La famille des MAPkinases est impliquée dans la plupart des mécanismes essentiels de la cellule. On oppose classiquement ERK, qui intervient dans la survie de la cellule et dont l'activation nucléaire est essentielle pour l'entrée de la cellule dans le cycle de division, et JNK et p38/SAPK2, des kinases activées lors de la réponse de la cellule à une agression dont les rôles pro- ou anti-apoptotique dépendent du contexte dans lequel se trouve la cellule au moment de l'agression. Afin de poursuivre l'analyse des différents mécanismes qui peuvent protéger les astrocytes de l'apoptose lors d'un stress cellulaire, nous avons étudié les effets de chocs osmotique, thermique, à l'arsénique, ainsi que ceux des cytokines pro-inflammatoires, TNF alpha et IL 1beta sur des cellules en culture primaire en comparant les amplitudes des activations de JNK et p38/SAPK2 et celle d'ERK. Le stress cellulaire induit une fermeture des jonctions communicantes des astrocytes. Le choc osmotique induit une activation prolongée et réversible de la MAP kinase p38/SAPK2, qui dépend à la fois d'une activation secondaire de la PKC et de la MAP kinase ERK. De plus, nous venons de démontrer que la fermeture des jonctions gap est dépendante de l'activation de p38/SAPK2. Le décours temporel de la fermeture puis de la réouverture des communications intercellulaires suit celui de l'activation de p38/SAPK2. Un inhibiteur spécifique de la kinase abolit l'effet du choc osmotique sur la communication intercellulaire. L'activation de la cascade de stress p38/SAPK2 induit donc une réponse immédiate de défense tissulaire en isolant la cellule agressée des cellules voisines (Darina Zvalova, Jocelyne Cordier).

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

Précédemment, nous avons identifié une nouvelle phosphoprotéine de 15 kDa, PEA-15, qui est enrichie dans les astrocytes normaux et qui module plusieurs fonctions cellulaires. L'expression de la protéine diminue la sensibilité des cellules à l'insuline et pourrait participer à la résistance à l'hormone observée au cours du diabète de type 2. La protéine est également capable de supprimer l'effet inhibiteur de H-Ras sur la signalisation des intégrines. PEA-15 est totalement conservée chez les mammifères. La phosphorylation de la protéine est

modulée par des neurotransmetteurs tels que la noradrénaline, le glutamate, l'endothéline et l'EGF par exemple. La phosphorylation porte sur deux résidus serine, S104 et S116, respectivement substrats de la protéine kinase C et de la kinase dépendante de la calmoduline et de calcium de type 2. De plus, PEA-15 présente un module d'interaction protéine-protéine, appelé DED, nécessaire à la transduction intracellulaire des signaux conduisant à l'apoptose.

L'analyse du rôle de PEA-15 dans l'apoptose induite par le TNFalpha a été étudiée sur deux modèles : 1) des lignées stables de fibroblastes NIH3T3 exprimant à des niveaux différents la protéine en fusion avec la protéine fluorescente GFP et 2) des cultures primaires d'astrocytes dérivées d'animaux knock-out pour le gène de PEA-15. Dans les deux cas, nous avons pu mettre en évidence un rôle protecteur de l'expression de la protéine. Toutefois, les astrocytes expriment de façon très faible FADD et caspase-8, ce qui nous a conduit à nous interroger sur le véritable partenaire physiologique de PEA-15.

En collaboration avec le J. Camonis (Institut Curie, Paris), nous avons développé dans le laboratoire une stratégie de recherche des interactions protéine-protéines par double hybride dans la levure. Une banque astrocytaire de cDNA insérés dans le vecteur pGADGE a été préparée et utilisée dans ces expériences. Nous avons ainsi pu déceler qu'une kinase clé de la cascade des MAP kinase/ERK est l'un des principaux partenaires de PEA-15. Dans un premier temps, nous avons démontré que l'expression de PEA-15 coïncide avec une activation de la cascade ERK (Collaboration avec M. Ginsberg et J. Ramos, Scripps Institute, La Jolla, Californie). Nous avons déterminé que l'interaction était spécifique de ERK1 et ERK2 à l'exclusion des autres MAPKs, JNK ou p38, ou des autres partenaires d'ERK, MEK ou MKP3, qu'elle n'était pas de type enzyme/substrat, et que PEA-15 n'était pas phosphorylée par ERK. En fait, PEA-15 inhibe la translocation d'ERK du cytosol vers le noyau lors d'une stimulation de la cellule par du sérum. Il en résulte une inhibition de la phosphorylation de Elk1 et une inhibition de la transcription dépendante de l'élément de transcription SRE. De fait, la réponse du gène immédiat-précoce c-fos lors d'une stimulation est diminuée par l'expression cellulaire de PEA-15. L'analyse comparée des astrocytes issus de la souris PEA-15<sup>-/-</sup>, et d'astrocytes issus de souris sauvages apparentées, révèle une capacité de prolifération augmentée pour les astrocytes n'exprimant pas PEA-15, avec des cinétiques d'entrée dans le cycle cellulaire très accélérées, par rapport à celle observée dans les cellules exprimant la protéine. Nos données suggèrent donc que PEA-15 localise ERK dans le cytosol, inhibe les réponses de type mitogénique et dirige l'enzyme vers des substrats spécifiques.

#### PUBLICATIONS ORIGINALES

N. ROUACH, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Activity-dependent neuronal control of gap-junctional communication in astrocytes*. (J. Cell Biol., 149 n° 7, 1513-1526, 2000).



M. TOUTANT, J.-M. STUDLER, F. BURGAYA, A. COSTA, P. EZAN, M. GELMAN, J.-A. GIRAULT, *Autophosphorylation of Tyr397 and its phosphorylation by Src-family kinases are altered in focal-adhesion-kinase neuronal isoforms.* (Biochem. J., 348 (1), 119-128, 2000).

Y. TORRENS, J.-C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, J. GLOWINSKI, *Further evidence for the presence of « septide-sensitive » tachykinin binding sites in tissues possessing solely NK-1 tachykinin receptors.* (Biochem. Biophys. Res. Commun., 270 (2), 668-672, 2000).

J.-C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, *Different subtypes of tachykinin NK1 receptor binding sites are present in the rat brain.* (J. Neurochem., 75 (3), 1015-1026, 2000).

C.-F. CALVO, F. CESSÉLIN, M. GELMAN, J. GLOWINSKI, *Identification of an opioid peptide secreted by rat embryonic mixed brain cells as a promoter of macrophage migration.* (EJN 12, 2676-2684, 2000).

G. GAMKRELIDZE, C. GIAUME, K. PEUSNER, *Firing properties and dendrotoxin-sensitive sustained potassium current in vestibular nuclei neurons of the hatchling chick.* (Exp. Brain Res., 134, 398-401, 2000).

A. DOBBERTIN, A. GERVAIS, J. GLOWINSKI, M. MALLAT, *Activation of ionotropic glutamate receptors reduces the production of transforming growth factor- $\beta$  by developing neurons.* (EJN 12, 1-6, 2000).

R. DELLA MORTE, C. SQUILLACIOTTI, C. GARBI, P. DERKINDEREN, M.-A. BELISARI, J.-A. GIRAULT, P. DI NATALE, L. NITSC, N. STAIANO, *Echistatin inhibits pp125FAK autophosphorylation, paxillin phosphorylation and pp125FAK paxillin interaction in fibronectin-adherent melanoma cells.* (Europ. J. Biochem., 267 (16), 5047-5054, 2000).

J.-W. RAMOS, E. HUGHES, P.E. RENSHAW, M.-A. SCHWARZ, E. FORMSTECHE, H. CHNEIWEISS, M.-H. GINSBERG, *Death effector domain protein PEA-15 potentiates ras activation of extracellular signal receptor-activated kinase by an adhesion-independent mechanism.* (Mol. Biol. Cell, 11 (9), 2863-2872, 2000).

P. BOYER, J.-P. TASSIN, B. FALISSA, S. TROY, *Sequential improvement of anxiety, depression and anhedonia with sertraline treatment in patients with major depression.* (J. Clin. Pharm. Ther., 25 (5), 363-371, 2000).

Y. ZHANG, O. REDINA, Y.-M. ALTSHULLER, M. YAMAZAKI, J. RAMOS, H. CHNEIWEISS, Y. KANAHO, M.-A. FROHMAN, *Regulation of expression of phospholipase D1 and D2 by PEA-15, a novel protein that interacts with them.* (J. Biol. Chem., 275 (45), 35224-35232, 2000).

M. ALIREZAEI, P. MARIN, C. NAIRN, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Inhibition of protein synthesis in cortical neurons during exposure to hydrogen peroxide.* (J. Neurochem., 76, 1080-1088, 2001).

L. DARRACQ, C. DROUIN, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.-P. TASSIN, *Stimulation of metabotropic but not ionotropic glutamatergic receptors in the nucleus accu-*

*bens is required for the D-amphetamine-induced release of functional dopamine.* (Neuroscience, 103 (2), 395-403, 2001).

I. DULUBOVA, A. HORIUCHI, G.L. SNYDER, J.-A. GIRAULT, A.J. CZERNIK, L. SAO, R. RAMABHADRAN, P. GREENGARD, A.C. NAIRN, *ARPP-16/ARPP-19: a highly conserved family of cAMP-regulated phosphoproteins.* (J. Neurochem., 77 (1), 229-238, 2001).

R. BYCHKOV, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Sequential and opposite regulations of two outward potassium currents by endothelin-1 in cultured striatal astrocytes.* (American J. Physiol., mai 2001).

J.-C. CORVOL, J.-M. STUDLER, J.-S. SCHONN, J.-A. GIRAULT, D. HERVE, *G-alpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in qthe striatum.* (J. Neurochem., 76 (5), 1585-1588, 2001).

#### REVUES GÉNÉRALES

R. ROZENTAL, C. GIAUME, D.C. SPRAY, *Gap junctions in the nervous system.* (Brain Res. Reviews, 32 (1), 11-15, 2000).

C. GIAUME, L. VENANCE, *A further step in the characterization of neuronal gap junctions.* (In : NeuroReport, vol. 11, n° 7, pp. 7-8, 2000).

J.-P. TASSIN, *Variabilités individuelles des sensibilités à la dépendance.* (In : « Questions en Santé publique », chap. 2, discussion, p. 13, chap. 5, discussion, p. 47, Conclusions, p. 107, eds. J.-P. Tassin, B. Doray, R. Fuhrer, P. Mormède, INSERM, 2000).

A.-M. THIERRY, Y. GIOANNI, E. DEGENETAIS, J. GLOWINSKI, *The hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics.* (In : Hippocampus, 10, 411-419, 2000).

L. VENANCE, *Analysis of connexin expression in brain slices by single-cell reverse transcriptase polymerase chain reaction.* (In : Methods in Molecular Biology: Connexin Methods and Protocols, ed. R. Bruzzone & C. Giaume, Humana Press, vol. 154, chap. 8, pp. 1-15, 2000).

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

C. DROUIN, A.-S. VILLEGIER, G. BLANC, S. COTECHIA, J. GLOWINSKI, J.-P. TASSIN, *Role of alpha1b-adrenergic transmission in the psychostimulant effects of drugs of abuse.* FENS 2000, Brighton, Grande-Bretagne, 24-28/06/2000.

C. GIAUME, *Gap junctional communication in brain glial cells: a basis of a multicellular behavior.* XXII<sup>e</sup> congrès de la SEBBM, Grenade, Espagne, 14-19/09/2000.

C. DROUIN, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.-P. TASSIN, *Rôle de la transmission alpha1b-adrénergique dans les effets psychostimulants des drogues toxicomanogènes*. École Doctorale 2000, Roscoff, 17-19/09/2000.

T. HÖFER, L. VENANCE, C. GIAUME, R. HEINRICH, *Modelling intercellular calcium waves in astrocyte networks*. « Experimental and theoretical aspects of calcium signaling », Dresde, Allemagne, 10/2000.

J.-M. DENIAU, B.P. KOLOMIETS, J. GLOWINSKI, A.-M. THIERRY, *Do inputs originating from functionally distinct cortical areas segregate or converge in the subthalamic nucleus ?* 30th Annual Meeting Society of Neuroscience, New Orleans, 04-09/11/2000.

L. VENANCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Analysis of neuronal gap junctions in rat striatum*. 30th Annual Meeting Society of Neuroscience, New Orleans, 04-09/11/2000.

Y. TORRENS, J.-C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, J. GLOWINSKI, *Presence of « septide-sensitive » tachykinin binding sites in tissues possessing solely NK1 tachykinin receptors*. Intern. Tachykinins Conf., La Grande Motte, 17-20/10/2000.

J.-C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, *Classical tachykinin NK2 binding sites in the rat brain*. Intern. Tachykinins Conf., La Grande Motte, 17-20/10/2000.

J.-C. BEAUJOUAN, M. SAFFROY, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, *Presence of two subtypes of tachykinin NK1 receptor binding sites in the rat brain in addition to classical NK1 binding sites*. Intern. Tachykinins Conf., La Grande Motte, 17-20/10/2000.

N. ROUACH, M. TENCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Stimulation of neuronal receptors modulates gap junctional communication in astrocytes*. Israel Society for neurosciences, 9th Annual meeting, Eilat (Israël), 3-6/12/2000.

A. PEBAY, M. TOUTANT, C. CALVO, J. PREMONT, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, M. TENCE, *Les astrocytes sont des cellules cibles de la sphingosine-1-phosphate : activation des cascades de signalisations intracellulaires et stimulation de la prolifération*. 5<sup>e</sup> colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

M. MAUS-MOATTI, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Neurotoxicité de l'acide gamma-aminobutyrique dans les neurones embryonnaires de striatum en culture primaire*. 5<sup>e</sup> colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

M.L. KEMEL, S. PEREZ, G. GODEHEU, P. SOUBRIE, J. GLOWINSKI, *Contrôle par les tachykinines endogènes de la libération de l'acétylcholine évoquée par stimulation des récepteurs NMDA, dans les striosomes et la matrice du striatum, en absence de transmission dopaminergique*. 5<sup>e</sup> colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

A.S. VILLEGIER, G. BLANC, C. DROUIN, J. GLOWINSKI, J.-P. TASSIN, *Rôle des innervations noradrénergique et dopaminergique corticale dans les effets*

*comportementaux de la D-amphétamine*. 5<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

A. AUCLAIR, G. BLANC, J. GLOWINSKI, J.-P. TASSIN, *Étude du rôle des récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> sur les libérations de dopamine fonctionnelle et non fonctionnelle induites par la D-amphétamine dans le noyau accumbens*. 5<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

C. DROUIN, G. BLANC, S. COTECCHIA, J. GLOWINSKI, J.-P. TASSIN, *Implication de la noradrénaline dans la sensibilité aux psychostimulants et aux opiacés*. 5<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

E. FORMSTECHE, J.-W. RAMOS, M. FAUQUET, B. CANTON, D.A. CALDERWOD, H. LE, X.T. NGUYEN, J.-V. BARNIER, J. CAMONIS, H. INSBERG, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *La phospho-protéine enrichie dans les astrocytes PEA-15 inhibe l'entrée dans le cycle cellulaire en assignant ERK/MAPK (extracellular signal regulated kinase/mitogen activated protein kinase) dans le cytoplasme*. 5<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

N. ROUACH, M. TENCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *La stimulation de récepteurs neuronaux inhibe la communication jonctionnelle des astrocytes*. 5<sup>e</sup> Colloque Sté Neurosciences, Toulouse, 28-31/05/2001.

M. ALIREZAEI, P. MARIN, A.C. NAIRN, J. GLOWINSKI, J. PREMONT, *Inhibition of protein synthesis in cortical neurons during exposure to hydrogen peroxide*. FEBS 2001, Lisbonne, Portugal, 30/06-05/07/2001.

D. ZVALOVA, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *A PKC dependent pathway mediates p38/SAPK2-induced protein phosphorylations observed after an osmotic stress in astrocytes*. FEBS 2001, Lisbonne, Portugal, 30/06-05/07/2001.

#### LISTE DES DIPLÔMÉS - 2000-2001

VILLEGIER Anne-Sophie (sous la direction de J.-P. Tassin)

Couplage noradrénaline/dopamine : conséquences d'une destruction des fibres ascendantes noradrénergiques sur l'action comportementale aiguë et chronique de la D-amphétamine.

DEA de Neurosciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, sept. 2000.

ALIREZAEI Mehrdad

Régulation de la synthèse protéique dans les neurones et les astrocytes.

Thèse de doctorat de l'Université René Descartes, Paris V soutenue le 22 juin 2001.