

Neuropharmacologie

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

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

Séminaires-Symposium

A. FAGOT-LARGEAULT et J. GLOWINSKI
en collaboration avec D. KIPMAN et F. ROUILLON

La psychiatrie face à ses impasses

Anne FAGOT-LARGEAULT, Jacques GLOWINSKI : Présentation.

Frédéric ROUILLON (Hop. Albert Chenevier, Créteil)
Refondation de la politique de santé mentale.

Roland JOUVENT (CNRS Paris Salpêtrière, Sce Prof Allilaire)
Décrire n'est pas expliquer : les limites de la démarche classificatoire.

Jean-Marie DANION (INSERM U.405, Strasbourg)
Limites des modèles expérimentaux en psychiatrie.

Alain PUECH (SANOFI-SYNTHELABO, Chilly Mazarin)
Nouvelles classes de psychotropes.

Florence QUARTIER-FRINGS (Genève, Suisse)
Formation des psychiatres : ouvertures.

Daniel KIPMAN (Paris)
Géopolitique de la psychiatrie.

Jean-Pierre OLIE (CH Ste Anne, Paris)
Stratégies thérapeutiques : quels objectifs ?

Marion LEBOYER (INSERM U.513, Créteil)
L'avenir de la génétique, à propos de l'autisme.

Patrice BOYER (Hop. Salpêtrière, Paris)
Schizophrénie : la succession des hypothèses.

Isabelle FERRAND (Hop. Cochin, Paris)
Addictologie : quelle raison d'être ?

Michel WALTER (CHU Brest)
Enjeux et limites de la suicidologie

Daniel WIDLOCHER (Paris)
Disparition apparente des névroses et les liens difficiles entre la psychanalyse et la psychiatrie.

Jean-Marie LÉGER (CHU Esquirol, Limoges)
La gérontopsychiatrie : une discipline autonome.

Philippe JEAMMET (HIUP, Paris)
Existe-t-il une solution psychiatrique pour les sauvages ?

Daniel KIPMAN et Frédéric ROUILLON : Conclusions.

TRAVAUX DU LABORATOIRE DE NEUROPHARMACOLOGIE
(INSERM U.114)

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

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

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

1.1.1. *Aspect probabiliste de la mémoire intrinsèque des neurones striataux
et rôle fonctionnel*

Les informations corticales accèdent aux ganglions de la base par le striatum. Selon nos données, une forte synchronisation des afférences excitatrices corticales est nécessaire pour induire la décharge des neurones de sortie du striatum. L'activité de ces neurones GABAergiques produit une inhibition des structures de sortie des ganglions de la base et conduit par un processus de désinhibition à l'excitation des noyaux prémoteurs. Ce phénomène déterminant dans le rôle des ganglions de la base, dépend de la probabilité avec laquelle les neurones striataux émettent des potentiels d'action en réponse à une entrée corticale donnée. À l'aide d'enregistrements intracellulaires *in vivo*, nous avons montré qu'une stimulation directe des neurones striataux par l'injection d'un courant dépolarisant augmente à court terme l'excitabilité membranaire de ces cellules. Cette plasticité intrinsèque, qui résulte de la modulation de conductances ioniques non-synap-

tiques et favorise l'apparition de potentiels synaptiques supraliminaires dans les neurones striataux, facilite la transmission cortico-striatale. Cette année, nous avons démontré l'existence fonctionnelle de cette « mémoire intrinsèque » et son rôle dans les relations entrée-sortie au niveau des connexions cortico-striatales.

Déclenchée naturellement par l'activité synaptique spontanée, la décharge d'un potentiel d'action dans les neurones striataux a été utilisée comme stimulus conditionnant pour tester d'éventuels changements d'excitabilité membranaire. Cette décharge spontanée augmente dans une fenêtre temporelle d'une seconde, la probabilité de décharge du neurone striatal évoquée par une entrée synaptique corticale. Une des propriétés essentielles de ce processus est que l'accroissement de probabilité de décharge est inversement proportionnel à la probabilité d'obtention d'un potentiel synaptique supraliminaire dans la situation contrôle. Ainsi, la décharge préalable des neurones striataux améliore la relation entrée-sortie dans le réseau cortico-striatal. Il s'agit de la première démonstration d'une facilitation « probabiliste » de la décharge neuronale liée à une plasticité des propriétés intrinsèques membranaires. Ce phénomène révèle l'existence d'un mécanisme cellulaire non-synaptique permettant au neurone de contrôler, à chaque instant et en fonction de son histoire préalable, sa capacité à décharger un potentiel d'action. À l'origine d'un lien temporel entre des informations corticales sensorielles et motrices au niveau de cellules striatales individuelles, cette facilitation pourrait constituer l'événement cellulaire responsable de l'apprentissage sensori-moteur au niveau du striatum (S. Mahon, S. Charpier).

1.1.2. Organisation du réseau axonal récurrent des neurones de la substance noire réticulée

Recevant des afférences de l'ensemble du cortex cérébral, les ganglions de la base interviennent dans l'intégration sensori-motrice. Ils participent à la sélection des informations pertinentes de l'environnement et à l'organisation des conduites comportementales adaptées. Les messages corticaux qui transitent par le striatum restent largement ségrégués dans les deux principales structures de sortie des ganglions de la base, la pars réticulée de la substance noire (SNR) et le segment interne du globus pallidus.

L'architecture parallèle des circuits des ganglions de la base favorise l'intégration simultanée d'une grande diversité d'informations. Toutefois, l'élaboration d'un comportement cohérent, nécessite des interactions entre les divers circuits parallèles afin d'établir un ordre de priorité entre les circuits qui sont en compétition pour l'accès aux mêmes ressources cognitives ou qui sont impliqués dans la réalisation d'actes moteurs mutuellement exclusifs. Nous nous sommes donc intéressés au réseau axonal récurrent des neurones gabaergiques de la SNR car celui-ci pourrait intervenir dans la sélection de l'information au sein des circuits parallèles des ganglions de la base. En effet, par leur réseau axonal local, les neurones de projection de la SNR pourraient établir des interactions directes

entre neurones de sortie appartenant à des canaux parallèles distincts ou contrôler indirectement la transmission des informations striatales via les neurones dopaminergiques nigro-striataux de la substance noire compacte. Ces hypothèses, ont été testées en caractérisant les réponses électrophysiologiques des neurones de la SNR à la stimulation de différentes aires sensorielles et motrices corticales puis en les marquant par injection juxtacellulaire de neurobiotine afin de reconstruire en trois dimensions leurs arborisations dendritiques et axonales.

Nous avons observé que les projections axonales des neurones de la SNR respectent pour une large part la compartimentation fonctionnelle de la structure. À l'image des projections striato-nigrales, le réseau de collatérales axonales de ces neurones nigraux se distribue sous la forme de lames semi-circulaires qui enveloppent, à la manière de pelures d'oignon, la région dorso-latérale de la SNR. Cette distribution est semblable à celle du champ dendritique de ces neurones. Ces distributions des terminaisons axonales et des champs dendritiques suggèrent que le réseau axonal local des neurones de projection de la SNR intervient dans un processus d'inhibition latéral entre neurones d'un même canal ou de canaux voisins. L'absence de projections substantielles orientées selon une direction orthogonale au grand axe du champ dendritique des neurones suggère que ce processus d'inhibition latéral contribue aux effets de contraste entre neurones qui reçoivent en partie les mêmes afférences striatales. De plus, par leur organisation spatiale au niveau de la substance noire compacte, ces projections axonales pourraient assurer deux fonctions : 1) former des circuits en boucle fermée entre les neurones de la SNR et de la SNC connectés avec les mêmes secteurs striataux, boucles qui permettraient à chaque secteur fonctionnel striatal de contrôler le niveau d'activité de sa propre innervation dopaminergique ; 2) établir des interactions entre canaux en assurant la formation de circuits en boucle ouverte entre neurones de la SNR et de la SNC connectés à des secteurs fonctionnels distincts du striatum (J.-M. Deniau, S. Charpier, A. Menétrey avec la collaboration de P. Mailly).

1.1.3. Rôle du noyau réticulaire du thalamus dans l'électrogénèse des épilepsies de type « absence »

L'épilepsie « absence » de l'enfant, ou « petit-mal », correspond à l'épilepsie généralisée idiopathique la plus fréquente. L'« absence » se caractérise par une perte transitoire de la conscience et une diminution d'intensité variable du tonus musculaire. Pendant ces crises, l'électroencéphalogramme (EEG) se caractérise par des décharges de type « pointe-onde » qui surviennent de manière bilatérale et synchrone dans le thalamus et le néocortex. Les mécanismes cellulaires responsables de cette pathologie sont encore mal connus, mais le rôle des neurones thalamiques et corticaux dans l'électrogénèse des « pointe-onde » est maintenant établi.

Les modèles génétiques animaux tels que les rats « GAERS » (Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg), qui présentent spontanément des crises d'« absence » similaires à celles survenant chez l'homme (similarité du tracé électroencéphalographique, du comportement et de la réponse au traitement utilisé chez l'enfant), devraient permettre d'élucider certains des mécanismes physiopathologiques intervenant dans cette maladie. En utilisant ces animaux et en combinant des enregistrements intracellulaires et EEG *in vivo*, nous avons précédemment décrit les événements cellulaires thalamiques et corticaux impliqués dans l'expression des crises d'absence. Ainsi, ces crises sont associées à une activité intracellulaire rythmique des neurones thalamo-corticaux, caractérisée par l'alternance de potentiels synaptiques excitateurs et inhibiteurs à haute fréquence. Récemment, nous avons analysé les propriétés du noyau réticulaire du thalamus (nRT), seule afférence inhibitrice connue des neurones thalamo-corticaux car l'activité inhibitrice de neurones thalamiques contribue au déclenchement de la synchronisation paroxystique dans la boucle thalamo-corticale.

Les neurones du nRT présentent des dépolarisations membranaires rythmiques en phase avec la composante « pointe » de l'EEG. Ces dépolarisations résultent de potentiels calciques à « bas seuil » de grande amplitude déclenchés par une sommation de potentiels synaptiques excitateurs. Ces potentiels calciques induisent des bouffées à haute fréquence de potentiels d'action sodiques probablement à l'origine des inhibitions synaptiques observées dans les neurones thalamo-corticaux. Nous avons également mis en évidence une cohérence temporelle dans la décharge des neurones du nRT responsable d'une puissante inhibition synchronisée dans les noyaux thalamiques de relais. Cette inhibition rythmique dans les circuits thalamo-corticaux participerait vraisemblablement à l'électrogénèse et à la propagation des activités paroxystiques associées aux crises d'« absence » (S. Slaght, S. Charpier, 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. *Effets de la stimulation haute fréquence du noyau subthalamique sur l'activité de la substance noire pars reticulata*

Le striatum reçoit des informations de l'ensemble du cortex cérébral et est relié aux structures de sortie, la substance noire pars reticulata (SNR) et le pallidum interne par une voie directe et une voie indirecte impliquant le pallidum externe et le noyau subthalamique (STN). Le STN peut également être considéré comme une structure d'entrée des ganglions de la base car il reçoit des afférences du cortex cérébral. Si les neurones efférents du STN sont glutamatergiques, les neurones efférents des autres ganglions de la base sont GABAergiques. L'activation des neurones efférents glutamatergiques du STN provoque une activation

des neurones GABAergiques des structures de sortie et, par conséquent, une inhibition de leurs cellules cibles. Inversement, l'activation de la voie GABAergique directe qui relie le striatum aux structures de sortie provoque une désinhibition des cibles prémotrices thalamiques et mésencéphaliques, processus essentiel dans l'initiation du mouvement.

La dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNC) qui innerve les différentes structures des ganglions de la base est à l'origine des troubles moteurs observés dans la maladie de Parkinson qui s'accompagnent d'une modification du mode de décharge des neurones du STN et des structures de sortie des ganglions de la base. La stimulation haute fréquence du STN a été utilisée avec succès pendant ces dernières années pour améliorer les troubles moteurs du malade Parkinsonien. Les mécanismes responsables de cet effet sont encore mal connus. Nous avons donc étudié l'effet de la stimulation par chocs uniques ou à haute fréquence du STN sur l'activité des neurones de la SNR. Nos données préliminaires indiquent que l'application de chocs uniques évoque une réponse excitatrice qui persiste lors de l'application de la stimulation haute fréquence dans une population minoritaire de neurones de la SNR. Cette réponse résulte vraisemblablement de l'activation des projections subthalamo-nigrales glutamatergiques. Toutefois, l'activité spontanée d'une importante proportion de neurones de la SNR est inhibée durant toute la durée de l'application de la stimulation haute fréquence et cet effet s'interrompt dès l'arrêt de la stimulation. L'origine de cette réponse inhibitrice, vraisemblablement à l'origine des effets bénéfiques de la stimulation haute fréquence du STN chez le malade Parkinsonien, reste à préciser (Nicolas Maurice).

1.2.2. Systèmes dopaminergiques ascendants : rôle d'interface entre les circuits limbiques et moteurs

Les neurones dopaminergiques qui innervent la région sensori-motrice du striatum dorsal sont localisés dans la SNC et la région adjacente de l'aire tegmentale ventrale (AVT). Principalement composé du « core » et du « shell » du noyau accumbens, le striatum ventral reçoit une innervation dopaminergique de l'AVT et de la région médiane de la SNC. Selon nos précédentes études, les caractéristiques des circuits des ganglions de la base issus du cortex préfrontal sont semblables à celles des circuits du cortex sensori-moteur, le « core » constituant la principale structure d'entrée des ganglions de la base et la substance noire pars reticulata (SNR), la principale structure de sortie. Par contre, nos données récentes obtenues après injection de WGA-HRP dans les différentes régions du « shell » indiquent que cette structure est principalement innervée par des neurones localisés dans la région CA1/subiculum de l'hippocampe et dans les noyaux postérieurs (basolatéral et basomédian) de l'amygdale et qu'elle se projette sur le complexe AVT/ SNC où sont localisés les neurones dopaminergiques. Selon ces données anatomiques, une population de neurones dopaminergiques innervant les secteurs sensori-moteurs du striatum dorsal recevrait des informations de

structures limbiques via le « shell » du noyau accumbens et jouerait ainsi le rôle d'interface entre les circuits limbiques motivationnels et les circuits moteurs du système extrapyramidal. Cette hypothèse a été confirmée par des données anatomiques et électrophysiologiques.

En effet, à la suite d'injections chez le même animal d'un marqueur rétrograde dans la région sensori-motrice du striatum dorsal et d'un marqueur antérograde dans le « shell », une superposition des neurones marqués rétrogradement et des fibres marquées antérogradement est observée dans la SNC et la région adjacente de l'AVT (en collaboration avec Y. Van Dongen, Amsterdam). Un lien fonctionnel existe entre les afférences issues du « shell » et une sous population de neurones dopaminergiques qui innervent le striatum dorsal puisque la stimulation électrique du « shell » induit une réponse inhibitrice ($L = 17, 8 \pm 0,2$ ms ; $D = 38, 8 \pm 3,0$ ms) dans 45 % des neurones dopaminergiques qui innervent le striatum dorsal (identifiés par la méthode d'activation antidromique). De plus, selon des données préliminaires, la stimulation de l'amygdale induit également une réponse inhibitrice dans 60 % des neurones dopaminergiques qui innervent le striatum dorsal alors que celle de l'hippocampe n'affecte qu'une faible population de ces neurones (8 %). Ces dernières données suggèrent que l'amygdale, via le « shell », module l'activité de neurones dopaminergiques qui projettent aux territoires sensori-moteurs du striatum dorsal. Ainsi, les neurones dopaminergiques nigro-striataux participent vraisemblablement au transfert « motivation-action » (B. Kolomiets, en collaboration avec J.M. Deniau).

1.2.3. *Influence de l'hippocampe sur les interneurones du cortex préfrontal*

Après avoir mis en évidence l'existence d'une projection excitatrice glutamatergique directe issue des régions CA1/subiculum de l'hippocampe sur les aires prélimbique et orbitaire médiane du cortex préfrontal chez le rat, nous avons montré que les cellules pyramidales du CPF reçoivent une influence synaptique complexe de l'hippocampe. En effet, la stimulation de l'hippocampe induit dans la grande majorité des cellules pyramidales un EPSP monosynaptique suivi d'un IPSP de longue durée qui résulte vraisemblablement de la mise en jeu des interneurones GABAergiques locaux. Cette hypothèse a été vérifiée en étudiant l'effet de la stimulation de l'hippocampe sur les interneurones du cortex préfrontal.

Les enregistrements intracellulaires des interneurones *in vivo* étant particulièrement difficiles, cette étude a été effectuée à l'aide d'enregistrement extracellulaires couplés à l'injection juxtacellulaire de neurobiotine afin d'identifier morphologiquement les neurones enregistrés. Les neurones présentant les caractéristiques morphologiques des interneurones ont une décharge spontanée élevée et des potentiels d'action de courte durée. La stimulation de l'hippocampe induit une réponse excitatrice composée de un à quatre potentiels d'action dans 81 % des interneurones enregistrés ($n = 40$). La latence des réponses ($16,8 \pm 3,6$ ms)

est compatible avec la durée de conduction de la voie hippocampe-CPF. La voie hippocampe-CPF active donc directement les interneurons qui, via leur réseau local de projection sur les cellules pyramidales, contrôlent dans le temps et l'espace l'influence excitatrice de l'hippocampe sur les neurones efférents du cortex préfrontal (Yves Gioanni, Éric Dégénétais).

1.3. RÉGULATION DE LA TRANSMISSION CHOLINERGIQUE STRIATALE : RÔLE DES PEPTIDES

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

1.3.1. *Régulation de la libération de l'acétylcholine dans les striosomes et la matrice du striatum chez le rat : étude des effets du SSR240600, un nouvel antagoniste des sous-types de récepteurs NK1 des tachykinines*

L'étude *in vitro* dans les compartiments striaux du rôle des tachykinines dans les circuits locaux intervenant dans la régulation de la libération de l'acétylcholine (formée à partir de [³H]choline) évoquée par le NMDA à partir des interneurons cholinergiques a été poursuivie. Nous avons analysé les effets du SSR240600, un nouvel antagoniste des récepteurs NK1 des tachykinines qui traverse plus facilement la barrière hémato-encéphalique que le SR140333. Les expériences ont été réalisées dans une situation contrôle (NMDA 1 mM+D-sérine 10 μM) ou après suppression du contrôle dopaminergique inhibiteur de la libération de l'acétylcholine (NMDA 1 mM+D-sérine 10 μM en présence d'alpha-méthyl-p-tyrosine — alpha-MPT — un inhibiteur de la synthèse de dopamine).

Les tachykinines endogènes sont libérées à partir des collatérales récurrentes des neurones efférents lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA. Au niveau des striosomes, nous avons montré que la stimulation des récepteurs NK1 par les tachykinines inhibe indirectement la libération de l'acétylcholine en stimulant celle de dopamine. Dans la matrice, inversement, la stimulation des récepteurs NK1 par le(s) ligand(s) endogène(s) amplifie la libération évoquée de l'acétylcholine, cet effet n'étant observé que lors de la suppression du contrôle inhibiteur dopaminergique. Ces récepteurs NK1 sont très vraisemblablement localisés sur les interneurons cholinergiques. En exerçant des effets anticholinergiques, les antagonistes sélectifs des récepteurs NK1 pourraient s'avérer bénéfiques dans le rétablissement de la « balance dopamine-acétylcholine » lors d'une déficience de la transmission dopaminergique.

Selon des données du laboratoire (équipe J.-C. Beaujouan), deux sous-types de récepteurs NK1 qui se distinguent des récepteurs NK1 classiques par leur affinité vis-à-vis de certaines tachykinines endogènes ou d'antagonistes NK1 sont également présents dans le cerveau du rat. Nous avons donc tenté d'identifier les types de récepteurs NK1 impliqués dans la régulation de la libération évoquée d'acétylcholine. Des récepteurs NK1 classiques et un sous-site de récepteurs

NK1 semblent intervenir dans les striosomes et un seul sous-type de récepteurs NK1 sensible à la substance P et/ou la neurokinine A semble impliqué dans la matrice. Par conséquent, seuls les antagonistes NK1 présentant une bonne affinité pour ce sous-type de récepteurs NK1 pourraient avoir les effets anticholinergiques décrits précédemment.

Dans les striosomes, le SSR240600 (0.1 μ M à 0.1 nM) reproduit les effets facilitateurs dopamine-dépendants des antagonistes NK1 (SR140333, GR205171, GR82334, RP67580) sur la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA. La neurokinine A (IC₅₀ : 5 pM) et la substance P(6-11) (IC₅₀ : 5 nM) qui présentent une forte affinité pour les sous-sites NK1, réduisent la réponse facilitatrice du SSR240600 ce qui est en accord avec ce qui avait été observé avec le SR140333 et le GR205171.

Dans la matrice, en l'absence de transmission dopaminergique, le SSR240600 (0.1 μ M) reproduit les effets inhibiteurs du SR140333 et du GR205171 sur la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA. L'effet inhibiteur du SSR240600 est réduit par la neurokinine A (IC₅₀ : 0.1 nM) et la substance P(6-11) (IC₅₀ : 10 nM). Selon ces données, le SSR240600 module la libération évoquée de l'acétylcholine en s'opposant à l'action de la substance P et/ou de la neurokinine A endogènes sur les sous-types de récepteurs NK1 des tachykinines (S. Pérez, G. Godeheu).

1.3.2. *Intervention des peptides opioïdes dans la régulation de la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA en présence et en absence de la transmission dopaminergique*

Des expériences effectuées dans les striosomes avec la β -funtaltrexamine (1 μ M-10 nM) nous avaient permis de montrer que la présence de cet antagoniste des récepteurs mu opiacés facilite selon des processus dopamine-dépendant et dopamine-indépendant la libération de l'acétylcholine évoquée par une forte stimulation des récepteurs NMDA et que ces réponses sont réduites par un agoniste spécifique des récepteurs mu, le DAGO (1 μ M) qui, seul, ne modifie pas la libération évoquée de l'acétylcholine. Par conséquent l'enképhaline endogène libérée à partir des collatérales récurrentes des neurones efférents lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA (1 mMNMDA+D-sérine) inhibe la libération de l'acétylcholine en agissant sur les récepteurs de type mu spécifiquement localisés dans ce compartiment. Cette régulation est complexe et dépendante du cycle diurne des animaux. En effet, l'enképhaline inhibe la libération de l'acétylcholine par deux modalités de régulation, l'une dopamine-dépendante non liée au cycle diurne et l'autre dopamine-indépendante observée uniquement l'après-midi (7 heures après l'éclairage de l'animalerie).

Des expériences effectuées avec le naltrindole (antagoniste spécifique des récepteurs de type delta) ont de plus permis de mettre en évidence que l'enképhaline libérée lors d'une forte stimulation des récepteurs NMDA régule la transmis-

sion cholinergique en stimulant les récepteurs opiacés de type delta. Observées dans les striosomes mais aussi dans la matrice, ces régulations sont dépendantes du cycle diurne. En effet, l'après-midi (sacrifice des animaux 7 heures après l'éclairage de l'animalerie), le blocage des récepteurs delta par le naltrindole (0.1 μ M-10 nM) s'accompagne d'une augmentation de la libération de l'acétylcholine évoquée par le NMDA. Cette réponse semble indépendante de la dopamine puisqu'elle persiste en présence d'alpha-méthyl para tyrosine, l'inhibiteur de la synthèse de la dopamine. Aucun effet n'est observé le matin (sacrifice des animaux 2 heures après l'éclairage de l'animalerie) en présence ou absence de transmission dopaminergique.

En conclusion, l'enképhaline endogène libérée inhibe fortement la libération évoquée de l'acétylcholine dans les striosomes selon des processus dopamine-dépendant impliquant les récepteurs mu et dopamine-indépendant impliquant les récepteurs mu et delta, ces derniers effets n'étant observés que l'après-midi. Si les récepteurs delta sont localisés sur les interneurons cholinergiques, la localisation des récepteurs mu n'a pas encore été précisée.

Des études complémentaires effectuées en collaboration avec Sylvie Bourgoïn-Hamon (INSERM U288) indiquent que les taux d'enképhaline dans les striosomes sont plus faibles (-30 %) l'après-midi que le matin. Inversement, les amplitudes des libérations spontanées et évoquées (potassium, forte stimulation des récepteurs NMDA) de l'enképhaline sont nettement plus élevées l'après-midi que le matin, ce qui est en accord avec les données obtenues indirectement en analysant les effets des antagonistes opioïdes sur la libération évoquée d'acétylcholine (M. Jabourian, S. Pérez).

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 de la D-amphétamine sur la libération de dopamine dans le noyau accumbens de souris dépourvues de récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques*

L'augmentation excessive de libération de dopamine dans une structure sous-corticale, le noyau accumbens, joue un rôle déterminant dans les processus de pharmacodépendance. Les psychostimulants tels que la D-amphétamine ou la cocaïne augmentent cette libération de dopamine et déclenchent une hyperactivité locomotrice chez le rongeur. Toutefois, nous avons montré que le blocage pharmacologique des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques par la prazosine réduit considérablement les effets locomoteurs de ces psychostimulants. Comme cela a été mis en évidence dans le cas de la D-amphétamine, la réduction de cette réponse comportementale résulte du blocage de la libération fonctionnelle de dopamine évoquée par cette drogue. Dépendante de l'activité des neurones dopaminer-

giques, cette libération fonctionnelle ne représente qu'une faible fraction de la dopamine libérée par la D-amphétamine chez le rat (Darracq *et al.*, 1998, 2001).

Plus récemment, nous avons également montré que la réponse locomotrice évoquée par les psychostimulants était considérablement diminuée chez des souris dépourvues de récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques par rapport à celle mesurée chez des souris sauvages (Drouin *et al.*, 2002). La réduction de cette réponse comportementale résulte d'une réduction de la libération de dopamine au niveau du noyau accumbens. Cela a pu être montré après avoir développé la technique de microdialyse chez la souris libre de ses mouvements. En effet, le taux de libération basale de dopamine dans le noyau accumbens des souris mutées est 30 % plus faible de celui observé chez les souris sauvages. De plus, la D-amphétamine (3 et 6 mg/kg i.p) n'induit plus de libération de dopamine chez ces souris mutées qui présentent par ailleurs une très faible réponse locomotrice (Agnès Auclair).

Ces résultats confirment l'influence permissive des systèmes noradrénergiques sur la libération de dopamine sous-corticale. Ils diffèrent toutefois de ceux observés chez le rat car dans ce cas, le blocage pharmacologique des récepteurs $\alpha 1$ -adrénergiques ne provoque qu'une réduction limitée de la libération totale de dopamine induite par la D-amphétamine, cette libération étant constituée d'une libération fonctionnelle (dépendante de l'activité nerveuse et sensible au blocage) et d'une libération non fonctionnelle beaucoup plus importante (indépendante de l'activité nerveuse et insensible au blocage). De fait, selon des données complémentaires la libération non fonctionnelle de dopamine évoquée par l'application locale (microdialyse inverse) de D-amphétamine dans le noyau accumbens est trois fois plus faible chez la souris C57BL6 que celle observée chez le rat bien que les affinités apparentes de la D-amphétamine soient identiques chez les deux espèces (15 et 11 μM , respectivement pour la souris et le rat).

Ces expériences effectuées chez la souris confirment que la libération de dopamine fonctionnelle induite par les psychostimulants, impliquée dans la réponse locomotrice (utilisée comme index d'une conduite d'addiction), résulte d'une facilitation de la transmission noradrénergique via des récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques situés à distance du noyau accumbens (Agnès Auclair, Gérard Blanc).

1.4.2. *Effets de la stimulation des neurones noradrénergiques sur l'activité locomotrice*

Nous venons de voir que le blocage pharmacologique ou génétique des récepteurs $\alpha 1b$ -adrénergiques diminue de façon importante les réponses locomotrices évoquées par les psychostimulants. Inversement, l'activité locomotrice pourrait être augmentée par la stimulation de ces récepteurs. Ne disposant pas d'agoniste $\alpha 1$ -adrénergique pur, nous avons stimulé l'activité des neurones noradrénergiques chez le rat en bloquant les autorécepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques par le Dexefaroxan. L'injection périphérique de cet antagoniste des récepteurs $\alpha 2$ -adrénergiques chez des animaux habitués à leur environnement augmente significativement l'activité

locomotrice (+ 100 %, + 150 % et + 100 %, pour 0,63, 2,5 et 10 mg/kg de Dexefaroxan, respectivement) et cette réponse est considérablement amplifiée (+ 700 % pour 10 mg/kg de Dexefaroxan) lorsque la recapture de dopamine est partiellement bloquée par une faible dose de GBR 12783 (10 mg/kg, i.p). Des résultats identiques ont été obtenus sur des souris de la souche C57BL6. Ainsi, l'augmentation de l'activité des neurones noradrénergiques semble déclencher une activation phasique des neurones dopaminergiques dont l'expression comportementale est favorisée par l'inhibition de la recapture de dopamine (Anne-Sophie Villégier, Jean-Charles Bizot, Gérard Blanc).

1.4.3. *Analyse de la sensibilisation comportementale à la nicotine : rôle des monoamines oxydases*

Chez l'homme, la nicotine est généralement considérée comme la substance responsable du processus d'addiction induit par le tabac. Néanmoins, il n'existe pas d'individus dépendants de la nicotine pure et les substituts de nicotine tels que la « gomme » ou le « patch » ne permettent que rarement d'arrêter la consommation de tabac.

La répétition de prises identiques de psychostimulants augmente la libération de dopamine et la réponse locomotrice, un phénomène connu sous le nom de sensibilisation comportementale qui se maintient plusieurs mois après la dernière injection. Selon plusieurs auteurs, le processus d'addiction induit par la nicotine impliquerait des mécanismes identiques à ceux intervenant dans les effets toxicomanogènes des opiacés et des psychostimulants. Certaines données ne sont pas en faveur de cette affirmation. La nicotine n'induit pas d'hyperactivité locomotrice chez la souris. Nous avons en outre démontré que la répétition des prises « désensibilise » progressivement la transmission dopaminergique dans le noyau accumbens chez le rat (Vézina *et al.*, 1992). Selon des données complémentaires obtenues récemment chez le rat, la sensibilisation comportementale évoquée par l'administration répétée de D-amphétamine (0,75 mg/kg) persiste après trois périodes de sevrage (15 jours, 1 mois, 1 mois). Par contre, la sensibilisation comportementale induite par l'administration répétée de nicotine (0,5 mg/kg) disparaît complètement dans les mêmes conditions expérimentales (Anne-Sophie Villégier).

La fumée de tabac contient 4 000 substances parmi lesquelles se trouvent des inhibiteurs de monoamines oxydases. De la tranylcypromine (10 mg/kg), un inhibiteur des monoamines oxydases A et B a donc été injecté avec la nicotine chez le rat. Dans ces conditions, la sensibilisation comportementale est maintenue malgré des périodes de sevrage identiques aux précédentes. Ainsi, les inhibiteurs de monoamines oxydases contenus dans la fumée du tabac pourraient contribuer de façon importante aux effets addictifs de la nicotine. Il nous reste à vérifier si la facilitation des transmissions noradrénergique ou sérotoninergique induite par

l'inhibition des monoamines oxydases est responsable des effets observés (Anne-Sophie Villégier, Gérard Blanc).

1.4.4. *Rôle des récepteurs alpha1-adrénrgiques dans la réponse comportementale aiguë et chronique à la nicotine*

La nicotine induit une activation importante des neurones noradrénrgiques du locus coeruleus qui semble devoir être attribuée aux effets périphériques de la drogue. Cette activation pourrait être responsable de l'hyperactivité locomotrice induite chez le rat par une injection aiguë de nicotine. Effectivement, nous avons montré que l'hyperactivité locomotrice induite par la nicotine (0,5 mg/kg) disparaît complètement après le blocage des récepteurs α 1-adrénrgiques par la prazosine (0,5 mg/kg i.p). De même, l'injection concomitante de prazosine avec la nicotine s'oppose au développement de la sensibilisation comportementale induite par des injections répétées de nicotine seule (Anne-Sophie Villégier, Gérard Blanc).

1.4.5. *Rôle des récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT2A dans la réponse comportementale à la D-amphétamine*

À faible dose (0,75 mg/kg), la D-amphétamine ne facilite pas la libération de sérotonine. Toutefois, nous avons pu montrer chez le rat qu'un antagoniste des récepteurs 5-HT2A, le SR46349B, inhibe l'activité locomotrice induite par la D-amphétamine ainsi que la libération de dopamine fonctionnelle dans le noyau accumbens. Cette réponse comportementale peut être reproduite en injectant le SR46349B dans l'aire tegmentale ventrale. Il importe de montrer par des expériences de microdialyse que l'application locale de cet antagoniste sérotoninergique réduit également la libération de dopamine dans le noyau accumbens évoquée par la D-amphétamine (Agnès Auclair, Gérard Blanc).

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

(Responsable : Christian Giaume)

2.1. AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DES CONNEXINES 30 ET 43 DANS LES ASTROCYTES DE SOURIS CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE NEURONES (Annette Koulakoff, Pascal Ezan)

In situ, les jonctions communicantes (JC) astrocytaires sont composées de deux protéines jonctionnelles, les connexines 30 et 43 (Cx30 et Cx43), qui se distinguent par leur distribution et leur apparition au cours du développement. Dans les cultures d'astrocytes, la communication jonctionnelle est assurée majoritairement par la Cx43. L'influence des neurones sur l'expression de ces connexines

astrocytaires a été étudiée à l'aide de co-cultures préparées à partir de cortex cérébral de souris. Le niveau d'expression et la distribution de ces connexines ont été analysés par immunoblotting et immunofluorescence.

Après trois semaines de culture, les astrocytes expriment abondamment la Cx43, la Cx30 étant difficilement détectable. L'expression de ces deux connexines est augmentée lorsque ces astrocytes sont cultivés pendant une semaine en présence de neurones et une distribution punctiforme de Cx30 peut être observée en microscopie confocale dans quelques astrocytes. Les nombres de cellules positives et de points d'immunoréactivité par cellule augmentent lorsque la co-culture est poursuivie pendant une semaine. L'expression de Cx30 n'est pas uniforme et n'intervient que dans des groupes de cellules exprimant le marqueur astrocytaire S100 β . Certaines de ces cellules sont également GAP-positives suggérant l'existence de sous-populations. Des études effectuées avec des souris dépourvues de Cx43 indiquent que les canaux jonctionnels constitués de Cx30 sont fonctionnels puisqu'ils sont perméables à la biocytine. En conclusion, la présence des neurones favorise l'expression de Cx30 ce qui est en accord avec ce qui avait été observé dans le cas de la Cx43 au niveau des astrocytes striataux de rat.

2.2. INHIBITION DE LA COMMUNICATION JONCTIONNELLE DANS LES ASTROCYTES PAR LES CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES ET L'AMYLOÏDE β (William Mème, Pascal Ezan)

La maladie d'Alzheimer est associée à une réponse inflammatoire caractérisée par une expression chronique de cytokines et la présence d'astrocytes et de cellules microgliales réactifs au voisinage des dépôts d'amyloïde β ($A\beta$). Suggérant une intervention de la réponse inflammatoire dans le développement de cette pathologie, des études récentes indiquent que les traitements anti-inflammatoires réduisent la fréquence des cas de maladie. Les cytokines sécrétées lors de l'inflammation et l' $A\beta$ pourraient affecter les communications jonctionnelles (CJ) astrocytaires. Des études effectuées avec des cultures d'astrocytes de cortex cérébral de souris ont permis de le confirmer.

Des traitements prolongés avec des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL6 ou IFN γ ; 10 ng/ml, 24 h) sont sans effet sur la CJ et l'expression de la connexine 43 (Cx43). Par contre, la co-application d'IL-1 β et de TNF- α ou des traitements au LPS (10 μ g/ml) inhibent fortement ces deux propriétés. Indiquant la spécificité de ces phénomènes, les co-applications d'IL6 ou d'INF γ avec le TNF- α ou l'IL-1 β n'ont aucun effet. Les inhibitions de la CJ et de l'expression de Cx43 induites par la co-application d'IL-1 β et de TNF- α persistent lorsque les astrocytes sont cultivés en présence de neurones. Seule l' $A\beta$ (30 μ M, 1-4 jours) est sans action sur la CJ, mais elle amplifie l'effet inhibiteur de la co-application de l'IL-1 β et du TNF- α sur le couplage astrocytaire. Enfin, l'IL-1 β

ou le TNF- α augmentent l'effet inhibiteur de l'ATP et de l'endothéline 1 sur la CJ. Ces observations suggèrent que des situations inflammatoires sensibilisent les astrocytes à l'action de l'A β et à celle d'agonistes de récepteurs purinergiques et peptidergiques (libérés en plus grande quantités dans la maladie d'Alzheimer). Ces inhibitions de la CJ pourraient affecter les interactions neurone-glie et contribuer aux dommages neuronaux associés à cette pathologie.

2.3. ÉTUDE DES EFFETS INHIBITEURS DU CARBENOXOLONE

SUR L'ACTIVITÉ NEURONALE SPONTANÉE

(Elena Avignone, Annette Koulakoff, Nathalie Rouach)

L'activité électrique de réseaux neuronaux est fortement inhibée par les bloquants des CJ astrocytaires. Pour mieux comprendre le rôle des astrocytes dans ce processus, l'activité électrique de neurones a été enregistrée dans des co-cultures astrocyto-neurales car les astrocytes sont fortement couplés par des JC alors que les neurones ne présentent pas de couplage diffusif.

L'application de carbenoxolone (Cbx, 20-100 μ M), un inhibiteur de la CJ astrocytaire, provoque une diminution rapide (5-10 min) et réversible de l'activité neuronale spontanée. De nouvelles données indiquent que les astrocytes ne sont pas impliqués dans cette réponse. a) L'endothéline 1 (100 nM), un autre puissant inhibiteur de la CJ astrocytaire, ne reproduit pas et ne prévient pas l'effet inhibiteur de la Cbx sur l'activité neuronale. b) L'effet de la Cbx est observé dans des cultures neuronales dépourvues d'astrocytes et dans des co-cultures de neurones et d'astrocytes de souris déficientes pour la Cx43. d) La Cbx (100 μ M) réduit l'excitabilité neuronale en diminuant le seuil d'obtention et le nombre de potentiels d'action évoqués par des sauts dépolarisants. Enfin d) la Cbx (100 μ M) inhibe des courants sortants potassiques dans les neurones. L'effet inhibiteur de la Cbx sur l'activité neuronale pourrait résulter de l'inhibition d'un faible couplage entre les neurones dont la présence n'est pas révélée par la diffusion de traceurs intercellulaires et/ou à des effets de cette molécule sur d'autres canaux ioniques impliqués dans l'activité neuronale.

2.4. ÉTUDE DES SYNAPSES ÉLECTRIQUES

DANS LES NOYAUX DES GANGLIONS DE LA BASE

(Laurent Venance, Marie Vandecasteele, Pascal Ezan)

La communication intercellulaire a été évaluée dans des tranches de cerveaux « cortico-striatales » par des enregistrements en patch-clamp associés à des injections de biocytine dans les neurones efférents striataux. Élevée au début du développement postnatal, l'incidence de couplage diminue par la suite (70 % à P₅, 64 % à P₁₅ et 23 % P₃₀), par contre aucun couplage n'est observé en présence de carbenoxolone. La présence d'ARNm pour 4 connexines (Cx31, 32, 36 et 47) a été identifiée dans ces neurones par la technique de RT-PCR sur cellule unique.

La mesure du courant jonctionnel entre ces cellules indique que l'incidence du couplage électrique est relativement faible (7 %, rapport de couplage inférieur à 0.1). La localisation des sites de couplage au niveau des dendrites secondaires pourrait expliquer cette faible incidence de couplage. De plus, les différents exemples de couplage électrique dans le SNC concernent des populations neuronales très spécifiques, notamment des interneurons GABAergiques qui présentent les mêmes patrons de décharge. Cela nous a conduit à rechercher l'existence d'une hétérogénéité des propriétés électrophysiologiques au niveau des neurones efférents striataux. La présence d'une sous-population (28 % à P15) de neurones présentant un phénomène d'adaptation de leur fréquence de décharge, un délai d'apparition du premier potentiel d'action très réduit et un seuil d'activation augmenté a pu être démontrée. Les courants jonctionnels enregistrés n'ont été observés que dans cette population de neurones.

2.5. EFFETS DU LPA (ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE) ET DE LA S1P (SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE) SUR LES CELLULES GLIALES ET LES NEURONES (Martine Tencé, Jocelyne Cordier, Alice Pébay, Yasmina Chalal)

Le LPA et la S1P sont des phospholipides d'origine plaquettaire libérés dans le SNC au niveau d'une lésion vasculaire et d'une hémorragie. Ces médiateurs pourraient affecter la viabilité et/ou l'activité des neurones, ces effets éventuellement neurotoxiques pouvant résulter d'une action directe sur les neurones ou d'altérations des fonctions gliales. Nous avons déjà montré que les astrocytes striataux et les macrophages cérébraux de souris en culture primaire expriment, avec des profils différents, plusieurs récepteurs de ces médiateurs (récepteurs « edg », couplés aux protéines G). Dans ces deux types cellulaires, le LPA et la S1P ont des effets différentiels sur des fonctions déterminantes dans la survie neuronale. Ainsi, dans les astrocytes, seule la S1P stimule la prolifération cellulaire et inhibe efficacement la perméabilité des JC. Dans les macrophages, seul le LPA inhibe la production de $TNF\alpha$.

Cette étude a été poursuivie par l'analyse des effets de ces médiateurs sur la capture du glutamate, une fonction astrocytaire impliquée dans la régulation de la neurotoxicité. La S1P, et dans une moindre mesure le LPA, sont sans effet sur la capture de ce neurotransmetteur dans les astrocytes embryonnaires (E16) du striatum mais inhibent ce processus dans les astrocytes post-nataux (P1). L'effet inhibiteur de la S1P, qui peut atteindre 40 %, n'affecte pas l'affinité du transporteur pour le glutamate et ne dépend pas de l'activation des récepteurs « Edg » couplés à des protéines G de type Gi/Go ou Gq. Le glutamate stimule d'une façon concentration-dépendante ($EC50 = 200 \mu M$, effet maximal à 1 mM) la capture de glucose dans les astrocytes post-nataux du striatum mais pas dans les astrocytes embryonnaires. Il nous reste à démontrer que le S1P qui inhibe la capture de glutamate réduit également celle de glucose.

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

3.1. ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES NEUROTOXIQUES ET DES MODIFICATIONS DU PROTÉOME NEURONAL ET ASTROCYTAIRE (Responsable de l'équipe : Joël Prémont)

3.1.1. *Poursuite de l'analyse du mécanisme impliqué dans les effets neurotoxiques du GABA* (Marion Maus)

Précédemment, nous avons montré que le GABA induit un effet neurotoxique dans des cultures neuronales de striatum de souris embryonnaires. Cet effet qui est spécifique, car il n'est pas observé dans des cultures de neurones corticaux, ouvre une nouvelle perspective de recherche dans l'étiologie de certaines maladies neurodégénératives en particulier dans la Chorée de Huntington caractérisée par une dégénérescence striatale. La toxicité du GABA semble impliquer un transporteur neuronal du GABA (vraisemblablement GAT 1) et des protéines Gi/o de transduction.

Selon des données de la littérature, le transporteur GAT 1 interagit avec la syntaxine 1A, une des protéines impliquées dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. D'autre part, la syntaxine 1A peut se lier aux sous-unités G $\beta\gamma$ des protéines Gi/o de transduction. La mise en jeu de la chaîne d'interaction protéique GAT1-syntaxin 1A-G $\beta\gamma$ est donc l'un des axes de recherche poursuivi. Par ailleurs, une acidification intracellulaire induite par le GABA pourrait également intervenir dans son effet neurotoxique car selon certains auteurs, l'effet neurotoxique du glutamate impliquerait un processus d'acidification. Cette acidification induite par le GABA a pu être mise en évidence au niveau cellulaire à l'aide d'une sonde fluorescente. Elle est accompagnée d'une faible inhibition de la synthèse protéique ce qui nous a conduit à montrer qu'une acidification plus prononcée (exposition transitoire des neurones au chlorure d'ammonium) inhibe de façon plus marquée la synthèse protéique.

3.1.2. *Analyse des modifications du protéome neuronal par le NMDA dans les neurones du cortex cérébral de la souris en culture* (Christian Gauchy, Sylvie Trocmé)

Précédemment, nous avons montré que les trois principaux agents neurotoxiques, le glutamate, l'eau oxygénée et le zinc inhibent la synthèse protéique dans les neurones et les astrocytes du cortex cérébral de la souris. Cette inhibition résulte de deux phénomènes distincts, un blocage de l'élongation lié à une augmentation de la concentration de calcium dans le cytosol (glutamate) et une

inhibition de l'étape d'initiation résultant de l'activation de kinases particulières liées au « stress » du réticulum endoplasmique (eau oxygénée et zinc).

Des inhibitions pharmacologiques partielles de l'étape d'élongation de la traduction des protéines peuvent conduire à des mécanismes de super induction entraînant des augmentations paradoxales de la synthèse de certaines protéines. Un tel mécanisme a été observé sur des préparations de synaptosomes d'hippocampe de rat où une inhibition transitoire de la synthèse protéique globale évoquée par l'activation de récepteurs NMDA provoque une augmentation spécifique de la traduction de l'alpha-CaMkinase-II. Une inhibition de la synthèse protéique d'amplitude similaire induite par le cycloheximide conduit au même résultat. D'autre part, selon plusieurs études, la régulation paradoxale de la traduction de certains messagers serait due à une cascade d'événements : polyadénylation du mRNA liée à la présence de séquences particulières situées dans les régions non traduites des ARN messagers concernés, activation de la kinase AURORA et phosphorylation de protéines conduisant à la désinhibition de facteurs de pré-initiation. Ces différentes observations nous ont conduit à développer une thématique originale et de nouvelles techniques pour la mettre en œuvre.

L'un de nos objectifs est d'identifier les protéines disparaissant ou apparaissant après une exposition transitoire au NMDA des neurones du cortex cérébral d'embryons de souris et ainsi de déterminer le rôle de ces protéines dans la survie neuronale et dans les mécanismes de plasticité neuronale. Nous avons mis au point les techniques d'analyse protéomique. Cette technique consiste à séparer les protéines par les procédés classiques (électrophorèse à deux dimensions). Repérées par une coloration à l'argent, les protéines sont ensuite excisées puis soumises à un traitement par la trypsine. La taille des peptides ainsi produits est mesurée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) en collaboration avec Philippe Marin (Laboratoire de J. Bockaert, Montpellier). L'ensemble des données, poids moléculaire, point isoélectrique, nombre et taille des peptides produits par le traitement des échantillons par la trypsine, permet d'identifier les protéines grâce aux banques de données dédiées à cette application (SwissProt).

Selon nos données préliminaires, les taux de douze protéines augmentent ou diminuent fortement, 24 heures après une exposition transitoire des neurones au NMDA (200 μ M). Dix d'entre elles appartiennent à la famille CRMPs (Collapsin-response-mediated-protéins). Bien que cela soit encore débattu, ces protéines semblent impliquées dans le guidage axonal et plus précisément dans la voie de signalisation de la Sémaphorine 3a. Selon diverses études, la stimulation des récepteurs NMDA provoquerait la rétractation des neurites en induisant l'activation de Rho-kinase, mais d'autres études indiquent qu'une sur-expression de ces protéines accélère la croissance axonale.

En liaison avec l'unité de Marie-Françoise Belin (INSERM, Lyon), qui dispose d'anticorps dirigés contre les différentes formes de ces CRMPs, nous projetons de déterminer l'identité des isoformes induites ou réprimées après un traitement

des neurones corticaux par le NMDA et d'analyser les isoformes phosphorylées pour chacune de ces CRMPs. Pour déterminer le rôle de ces protéines dans le mécanisme neurotoxique du NMDA ou dans des modifications persistantes des propriétés neuronales induites par le NMDA, nous rechercherons leurs partenaires par la technique du « fishing ». Cette méthode consiste à immobiliser des protéines recombinantes (les CRMPs) sur un support et à identifier les protéines qui interagissent avec elles par les techniques d'analyse protéomique décrites succinctement ci-dessus. L'intérêt de cette étude à long terme est renforcé par deux séries d'observations. 1) Des neurones ayant déjà été exposés de façon transitoire (30 minutes) au NMDA deviennent résistants à une seconde exposition au NMDA effectuée 24 heures plus tard (données du laboratoire). Ces neurones présentent alors un patron de CRMPs très particulier par rapport à celui des neurones n'ayant jamais été exposés au NMDA. 2) Des auto-anticorps dirigés contre des CRMPs, capables de traverser certaines cellules comme les oligodendrocytes, apparaissent dans le plasma de certains malades atteints de cancer à des stades débutants et pourraient être responsables de ce qu'il est convenu d'appeler le syndrome paranéoplasique (données obtenues par l'unité de Madame Belin).

3.1.3. *Analyse des modifications du protéome astrocytaire par la substance P* (Jean-Claude Beaujouan, Yvette Torrens et Monique Saffroy)

Nous avons mis en évidence l'existence de récepteurs NK1 des tachykinines sur des astrocytes de souris. Afin de mieux cerner le rôle de ces récepteurs dans les propriétés fonctionnelles des astrocytes, nous avons appliqué la stratégie définie ci-dessus (analyse protéomique). Les premiers résultats indiquent que l'application pendant 12 heures de substance P sur des cultures d'astrocytes du striatum induit un remaniement important du patron des protéines dans ces cellules, certaines protéines disparaissant et d'autres étant sur exprimées. L'identification de ces protéines est en cours.

3.1.4. *Rôle fonctionnel des macrophages cérébraux au cours de l'inflammation* (Charles-Félix Calvo et Edwige Amigou)

Les macrophages cérébraux activés par une grande variété de stimuli *in vitro* ou *in vivo* secrètent des facteurs exerçant directement ou indirectement des effets toxiques (TNF α , IL1, NO) ou trophiques (IL10, NGF, TGF β) sur les neurones, mais ces observations sont le résultat d'études réalisées sur une population macrophagique globale. Nous avons proposé que chaque groupe de facteurs exerçant une fonction neuroprotectrice ou neurotoxique pourrait être sécrété de façon exclusive par des sous-populations macrophagiques distinctes au cours de leur activation/différenciation.

Dans un modèle de stimulation (LPS) *in vitro* des macrophages cérébraux de souris et par marquage intracellulaire avec des anticorps spécifiques sur les

cellules fixées, nous avons pu mettre en évidence l'existence de plusieurs sous-populations fonctionnelles détectées par cytométrie de flux ou imagerie confocale.

Pour les marquages intracellulaires, l'anti TNF α -FITC a été choisi comme marqueur candidat du groupe de facteurs proinflammatoires, tandis que l'anti IL10 indirectement couplé au Cy3 constitue un marqueur candidat du groupe de facteurs anti-inflammatoires. Nous avons pu ainsi, mettre en évidence l'existence de plusieurs sous-populations fonctionnelles, sur la base de l'accumulation des cytokines dans le compartiment intracellulaire, en présence de monensine. En effet, nous pouvons visualiser des cellules synthétisant exclusivement chacune des cytokines, une population dépourvue de marquage, et enfin une faible proportion de cellules doublement marquées, ceci aussi bien au stade E16 qu'aux stades post-nataux P1 et P8. Pour mieux envisager l'analyse fonctionnelle de ces sous-populations, nous recherchons des marqueurs de surface qui pourraient être associés à la présence de certaines cytokines. De tels marqueurs permettraient de trier les cellules afin d'étudier les fonctions respectives des sous-populations macrophagiques identifiées.

3.2. NEURO-ONCOLOGIE :

APPROCHE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE DU DÉVELOPPEMENT DES GLIOMES

(Responsable de l'équipe : Hervé Chneiweiss) (Brigitte Canton, Jocelyne Cordier, Étienne Formstecher, Marie-Pierre Junier, François Renault, Ariane Shariff, Darina Zvalova)

Les astrocytes constituent la première ligne de défense du tissu nerveux en cas d'agression infectieuse, traumatique ou liée 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 qui se traduisent 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. De plus, ils participent à la formation d'une réaction tissulaire particulière lors du développement des tumeurs.

3.2.1. *Fonctions(s) de PEA-15*

Nous avons poursuivi l'analyse des fonctions de la protéine PEA-15, que nous avons préalablement identifiée. Il s'agit d'une phosphoprotéine de 15 kDa, PEA-15, enrichie dans les astrocytes normaux, qui agit comme une double-clé contrôlant les cascades menant la cellule vers l'entrée dans le cycle de division ou sa mort par activation du programme d'apoptose.

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 supprime également l'effet inhibiteur de H-Ras sur la signalisation des intégrines. L'expression de PEA-15 est augmentée dans les gliomes et semble corrélée à la résistance des cellules tumorales à l'apoptose induite par les cytokines de la famille du Tumor Necrosis Factor, en particulier TRAIL. De fait, nous avons démontré le rôle anti-apoptotique de PEA-15 dans les astrocytes normaux.

L'analyse des interactions protéines-protéines par double hybride dans la levure nous a permis de montrer que les kinases ERK1 et ERK2 sont les principales protéines d'interaction avec PEA-15. L'interaction est spécifique de ERK1 et ERK2 à l'exclusion des autres MAPKs, JNK ou p38, ou des autres partenaires d'ERK, MEK ou MKP3. L'interaction n'est pas de type enzyme/substrat, et PEA-15 n'est pas phosphorylée par ERK. En fait, PEA-15 localise préférentiellement ERK dans le cytoplasme. 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, l'expression cellulaire de PEA-15 diminue la réponse du gène immédiat précoce *c-fos* lors d'une stimulation par le serum, de cellules préalablement sevrées. L'analyse comparée des astrocytes issus de la souris PEA-15^{-/-}, et 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 aux cellules exprimant la protéine.

Nous avons ensuite poursuivi l'analyse du mécanisme d'action de PEA-15. La protéine est capable de se lier à ERK activée ou non, dans le cytoplasme comme dans le noyau. Nous avons identifié un mécanisme d'exportation active du noyau pour PEA-15 via son interaction avec le transporteur CRM1. PEA-15 lie ERK dans le noyau et la transporte rapidement vers le cytoplasme.

3.2.2. Développement de modèles d'analyse des gliomes *in vivo*

Les gliomes sont les plus fréquentes des tumeurs primaires du système nerveux central qui représentent 2 % de l'ensemble des tumeurs malignes chez l'homme. L'expression de TGF α et de son récepteur, *erbB*, est augmentée dans ces tumeurs et même corrélée avec le grade tumoral tandis que PEA15, sur-exprimée dans les tumeurs de bas grade, disparaît dans les formes hautement malignes. Or, le développement des gliomes se caractérise par une période initiale de latence, pendant laquelle semble se maintenir un équilibre entre apoptose et prolifération bien que, dès ce stade, certaines cellules tumorales commencent à migrer à distance, ce qui explique l'échec des traitements chirurgicaux.

Notre objectif est de mieux comprendre les rôles de PEA-15 et de TGF α dans la prolifération et la migration à distance des cellules tumorales. Pour ce faire, nous souhaitons adopter une double approche : moléculaire et cellulaire, afin de mieux comprendre les mécanismes de signalisation intracellulaires mis en jeu,

et *in vivo* pour mieux comprendre les changements de communication intercellulaire qui font de la tumeur un nouveau tissu au sein du parenchyme cérébral.

Nous savions que PEA-15 interagit avec la signalisation des intégrines. Nous avons analysé les conséquences de l'expression de PEA-15 sur la motilité astrocytaire et de cellules gliomales. Des résultats préliminaires indiquent que son expression est associée à une inhibition de la migration cellulaire. Des facteurs intrinsèques peuvent intervenir car les astrocytes n'exprimant pas PEA-15 présentent une motilité accrue. De plus, les tissus cérébraux n'exprimant pas PEA-15 sont plus permissifs à la diffusion de cellules tumorales que les tissus normaux ce qui suggère également l'intervention de facteurs extrinsèques. Les remaniements du cytosquelette sous-jacents à la motilité cellulaire peuvent également être modulés par la signalisation associée au couple EGFR/TGF α . Nous analysons actuellement l'effet *in vivo* de la sur-expression continue de TGF α .

PUBLICATIONS ORIGINALES

A. PEBAY, M. TOUTANT, J. PREMONT, C.F. CALVO, L. VENANCE, J. CORDIER, J. GLOWINSKI, M. TENCE, *Sphingosine-1-phosphate induces proliferation of astrocytes: regulation by intracellular signalling cascades*. (EJN, 13, 2067-2076, 2001).

E. FORMSTECHE, J.W. RAMOS, M. FAUQUET, D.A. CALDERWOOD, J.C. HSIEH, B. CANTON, X.T. NGYEN, J.V. BARNIER, J. CAMONIS, M.H. GINSBERG, H. CHNEIWEISS, *PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase*. (Development Cell, 1, 239-250, 2001).

B.P. KOLOMIETS, J.M. DENIAU, P. MAILLY, A. MENETREY, J. GLOWINSKI, A.M. THIERRY, *Segregation and convergence of information flow through the cortico subthalamic pathways*. (The Journal of Neuroscience, 21 (15) 5764-5774, 2001).

P. MAILLY, S. CHARPIER, S. MAHON, A. MENETREY, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, J.M. DENIAU, *Dendritic arborizations of the rat substantia nigra pars reticulata neurons: spatial organization and relation to the lamellar compartmentation of striato-nigral projections*. (The Journal of Neuroscience, 21 (17) 6874-6888, 2001).

M. SAFFROY, Y. TORRENS, J. GLOWINSKI, J.C. BEAUJOUAN, *Presence of NK2 binding sites in the rat brain*. (J. Neurochem., 79, 985-996, 2001).

R. SANCHEZ-ALVAREZ, A. TABERNEO L.I. SANCHEZ-ABARCA, A. ORFAO, C. GIAUME, J.M. MEDINA, *Proliferation of C6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide*. (FEBS Letters, 509 (2) 202-206, 2001).

A. TABERNEO, C. JIMENEZ, A. VELASCO, C. GIAUME, J.M. MEDINA, *The enhancement of glucose uptake caused by the collapse of gap junction communication*

is due to an increase in astrocyte proliferation. (J. Neurochem., 78 (4) 890-898, 2001).

A. DROUIN, G. BLANC, F. TROVERO, J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Cortical alpha1-adrenergic regulation of acute and sensitized morphine locomotor effects*. (Neuroreport, 12 (16), 3483-3486, 2001).

E. DEGENETAIS, A.M. THIERRY, J. GLOWINSKI, Y. GIOANNI, *Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex : an in vivo intracellular recording study*. (Cerebral cortex, 12, 1-16, 2002).

C. DROUIN, G. BLANC, A.S. VILLEGIER J. GLOWINSKI, J.P. TASSIN, *Critical role of alpha1-adrenergic receptors in acute and sensitized locomotor effects of D-amphetamine, cocaine and GBR 12783 : influence of preexposure conditions and pharmacological characteristics*. (Synapse, 43 (1) 51-61, 2002).

N. ROUACH, M. TENCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Costimulation of NMDA and muscarinic neuronal receptors modulates gap junctional communication in striatal astrocytes*. (PNAS, 99 (2) 1023-1028, 2002).

N. ROUACH, C.F. CALVO, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Brain macrophages inhibit gap junctional communication and downregulate connexin 43 expression in cultured astrocytes*. (European J. Neuroscience, 15 (2) 403-40, 2002).

M.L. KEMEL, S. PEREZ, G. GODEHEU, P. SOUBRIE, J. GLOWINSKI, *Facilitation by endogenous tachykinins of the NMDA-evoked release of acetylcholine after acute and chronic suppression of dopaminergic transmission in the matrix of the rat striatum*. (The Journal of Neuroscience, 22 (5) 1929-1936, 2002).

E. MORDELET, K. KISSA, C.F. CALVO, M. LEBASTARD, G. MILON, S. VAN DER WERF, C. VIDAL, P. CHARNEAU, *Brain engraftment of autologous macrophages transduced with a lentiviral flap vector : an approach to complement brain dysfunctions*. (Gene Therapy, 9, 46-52, 2002).

S. SLAGHT, N. LERESCHE, J.M. DENIAU, V. CRUNELI, S. CHARPIER, *Activity of thalamic reticular neurons during spontaneous genetically determined spike and wave discharges*. (The Journal of Neuroscience, 22 (6) 2323-2334, 2002).

C. DROUIN, L. DARRACQ, F. TROVERO, G. BLANC, J. GLOWINSKI, S. COTECCHIA, J.P. TASSIN, *Alpha1b-adrenergic receptors control locomotor and rewarding effects of psychostimulants and opiates*. (The Journal of Neuroscience, 22 (7) 2873-2884, 2002).

REVUES GÉNÉRALES

N. ROUACH, N.C. GIAUME, *Connexins and gap junctional communication in astrocytes are targets for neuroglial interaction*. (Progress in Brain Research, 132 chapter 18, pp. 213-224, 2001).

D. ZVALOVA, E. FORMSTECHE, M. FAUQUET, B. CANTON, H. CHNEIWEISS, *Keeping TNF-induced apoptosis under control in astrocytes : PEA-15 as a « double key » on caspase-dependent and MAP-kinase-dependent pathway.* (Progress in Brain Research, 132 chapter 18, pp. 455-467, 2001).

F. KIRCHHOFF, R. DRINGEN, G. GIAUME, *Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection.* (European Archives Psychiatry & Clin. Neurosci., 251 (4) pp.159-169, 2001).

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

C. GIAUME, *Astrocyte networks and gap junctional communication.* International Union of Physiological Societies. New Zeland, 08/01.

W. MEME, M. MESNIL, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Effect of inflammatory treatments on astrocyte gap junctional communication.* 12^e colloque Canaux Ioniques, La Londe les Maures, 30/09-03/10/01.

A. POPRATILOFF, Y.Z. WANG, C. GIAUME, R. PETRALIA, K. PEUSNER, *Differential expression of AMPA glutamate receptor subunits in chick tangential vestibular nuclei.* Society for Neuroscience, USA (nov. 2001).

F. BLOMSTRAND, L. VENANCE, P. EZAN, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Endothelins inhibit astrocyte gap junctional communication in rat hippocampal slices.* Society for Neuroscience, USA (nov. 2001).

L. VENANCE, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Gap junctions and connexin expression in rat striatal neurons.* Society for Neuroscience, USA (nov. 2001).

N. ROUACH, E. AVIGNONE, C. GIAUME, M. SEGAL, *Gap junction communication among astrocytes controls spontaneous an epileptic activity in cultured neuronal networks.* Society for Neuroscience, USA (nov. 2001).

B. CANTON, E. FORMSTECHE, J.W. RAMOS, M. FAUQUET, D.A. CALDERWOOD, HAI LE, X.T. NGUYEN, J.V. BARNIER, J. CAMONIS, M.H. GINSBERG, J. GLOWINSKI, H. CHNEIWEISS, *The ded-containing protein pea-15 inhibits erk map-kinase nuclear signaling by enforcing cytoplasmic localization of erk1 and erk2.* Europ. Conf : Cell signaling, transcriptona and translation as therapeutic targets. Luxembourg, 30/01/02-02/02/02.

C. GIAUME, F. BLOMSTRAND, *Cell-cell communication in astrocytes : potential role of gap junction signalling in neuroprotection.* International symposium on Neuroprotection : molecular-cellular basis of novel treatment strategies for neuropsychiatric disease. Göttingen, 25-26/04/02.

A. KOULAKOFF, P. EZAN, J. GLOWINSKI, C. GIAUME, *Neuron-induced up-regulation of connexin-43 and connexin-30 expression in mouse cultured astrocytes.* V. europ. Meeting on glial cell functions, Rome, May 2002.

LISTE DES DIPLÔMÉS — 2001-2002

JABOURIAN Maritza (sous la direction de M.L. Kemel)

Rôle des opiacés dans la régulation glutamatergique de la libération de l'acétylcholine dans les striosomes et la matrice d striatum de rat : importance de la transmission dopaminergique.

DEA de Neurosciences, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, juillet 2001.

TROCME Sylvie (sous la direction de J. Prémont)

Étude des fonctions métabotropiques du récepteur NMDA.

DEA de Neuropharmacologie, Université René Diderot, juillet 2001.

RENAULT François (sous la direction de H. Chneiweiss)

Étude de l'influence de PEA-15 sur les phénomènes de migration cellulaire.

DEA de Pharmacochimie, pharmacologie et métabolisme des médicaments, Université René Descartes Paris V, juillet 2001.

PEBAY Alice

Effets biologiques de l'acide lysophosphatidique et de la sphingosine-1-phosphate dans les cellules gliales.

Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie, Paris VI, soutenue le 14 septembre 2001.

DROUIN Candice

Rôle de la transmission alpha-1-adrénergique dans les effets comportementaux des psychostimulants et des opiacés.

Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie, Paris VI, soutenue le 28 novembre 2001.

ZVALOVA Darina

Étude de la modulation de la communication entre astrocytes par les jonctions de type GAP au cours du stress cellulaire.

Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie, Paris VI, soutenue le 22 janvier 2002.

FORMSTECHEUR Étienne

Rôle de PEA-15 dans la régulation de l'apoptose et de l'activité ERK MAP kinase.

Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie, Paris VI, soutenue le 4 février 2002.

ROUACH Nathalie

Contribution de la communication jonctionnelle astrocytaire dans les interactions entre réseaux neuronaux et gliaux.

Thèse de Doctorat de l'Université P. et M. Curie, Paris VI, soutenue le 13 février 2002.