

UNIVERSITÉ LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG
UFR DES SCIENCES DE LA VIE

THÈSE

Présentée par Peggy JOUVERT

Pour l'obtention du diplôme de :
Docteur de l'Université Louis Pasteur

Discipline Neurosciences

**Régulations de l'expression du gène *egr-1* en
réponse à des traitements aigu ou répété de
cocaïne dans le cerveau de rat**

Soutenue le 13 janvier 2003 devant la commission d'examen :

Docteur Dominique AUNIS
Professeur Alain BERETZ
Docteur Valérie DAUGÉ
Professeur André NIEOULLON
Docteur Jean ZWILLER

Président du Jury
Rapporteur Interne
Rapporteur Externe
Rapporteur Externe
Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Le travail de thèse exposé dans ce mémoire a été réalisé au sein de l'Unité 338 de l'INSERM à Strasbourg sous la direction du Docteur Jean Zwiller.

Je remercie le Docteur Valérie Daugé et les Professeurs Alain Beretz et André Nieoullon d'avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse et de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie le Docteur Dominique Aunis de m'avoir accueillie dans son unité de recherche et d'avoir présidé ce jury.

Je remercie Jean pour sa passion de la neurobiologie et de la Science qu'il a su me faire partager. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour la disponibilité et l'aide précieuse qu'il m'a accordées tout au long de ces années. J'ai beaucoup appris à travers nos longues conversations scientifiques et diverses.

Au cours des années passées à Strasbourg, j'ai eu la chance et la joie d'évoluer dans différents cocons qui m'ont permis de profiter de chaque instant. Le premier est celui du laboratoire et de mon initiation au monde professionnel. Je remercie Marie-Odile pour ses petits gâteaux, sa disponibilité et son soutien quotidiens; Nathalie pour ses encouragements lors de mon arrivée, nos longues conversations et son amitié fidèle depuis Baltimore; Claude pour son humour et l'efficacité de ses recherches sur le net; Jean-Bernard pour son enthousiasme; Keith pour son humour "so british" et ses aides technique et linguistique; Isabelle, Laurence et Raphaël pour leur gentillesse.

J'adresse également mes remerciements à Serge Gobaille pour l'initiation aux micro-injections avec disponibilité et sympathie; Anelise Lazaris et Suzanne Cassel pour nos conversations amicales et leur aide technique si précieuse; Sylvie Dirrig-Grosch pour les observations en microscopie confocale; Laure Pain pour son aimable collaboration au cours du projet "Propofol". Je remercie l'ensemble des membres de l'Unité U338 (nouvellement U575) et du Centre de Neurochimie qui ont pu m'aider d'une façon ou d'une autre au cours de ces années.

Un grand merci aux moniteurs/monitrices et les responsables d'enseignement que j'ai eu le plaisir de côtoyer au cours de mon service de monitorat.

Le deuxième cocon dans lequel j'ai évolué au cours de ces années est ma famille "adoptive". Je remercie mes "sœurs" Claire et Pauline pour les années partagées ensemble au quotidien. Je les remercie pour tous les passionnants instants, les joies et les peines qu'on a traversé ensemble. Je remercie également "tonton" Alexandre qui en quelques mois a su m'initier à sa belle philosophie de vie.

Je remercie mes amis théâtraux pour les inoubliables moments partagés: GG, Francky, Fred et Num; mes amis scientifiques statutaires ou (ex-) thésards de l'Esplanade: Fred, Marco et Steph pour leurs week-ends "découvertes" ponctués de photos concepts et aussi Anne-Marie, Yannick, Jean-Luc, Olive, Nico, Karine, Christian, Valérie, Julien, Amar, Amyaouch, Stéphanie.

Je remercie les physiciens du LDFC (merci Simona et Rémi pour les vacances géniales à Rome), les chimistes et "biologues" d'Ilkirch que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours d'événements festifs et variés.

Ainsi que mes amis non scientifiques: Aurore et Fabio. Je voudrais remercier les amis d'avant Strasbourg qui me sont restés fidèles malgré l'éloignement géographique: Yann, Bruno, Véro, Rachel, Cécile, Laurent, Caro, Ariane, Béa.

Mes derniers remerciements iront à ma famille, mon troisième cocon. Je remercie mes parents, mon frère, Carine, mes grands-mères, mes cousines-cousins et leurs "p'tits bouts de chou", mes tantes et oncles de m'avoir soutenue à plus d'un titre au cours de ces longues études. Merci d'être toujours présents.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DE PUBLICATIONS	1
TABLE DES ILLUSTRATIONS	2
TABLEAUX	5
LISTE DES ABRÉVIATIONS	6
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	11
Chapitre I. Les psychostimulants	12
A. Généralités	12
1. La cocaïne	12
2. Les amphétamines substituées	14
B. Effets psychotropes des stimulants	16
1. Eléments de cinétique	16
2. Effets d'une prise unique	17
3. Effets d'une consommation abusive	17
C. Effets somatiques des psychostimulants	18
1. Manifestations neurologiques	18
2. Activité anesthésique locale	19
3. Toxicité cardio-vasculaire	19
4. Toxicité pulmonaire	20
5. Toxicités diverses	20
Chapitre II. Les neurotransmissions impliquées dans la réponse aux psychostimulants	21
A. Le système dopaminergique	21
1. La dopamine	21
2. La synapse dopaminergique	24
3. Le système dopaminergique	33
B. Interaction avec le système GABAergique	41
1. Le GABA	41
2. Les récepteurs du GABA	42
3. Le système GABAergique	46
C. Interaction avec le système glutamatergique	50
1. Le glutamate	50
2. La synapse glutamatergique	53
3. Le système glutamatergique	58
D. Effets neurobiologiques des psychostimulants	61
1. Cibles moléculaires	61
2. Circuits impliqués dans les effets renforçants des drogues	62
Chapitre III. La voie de transduction du GMPc	69
A. Les peptides natriurétiques	69
1. Synthèse et localisation	69
2. Les récepteurs des peptides natriurétiques	71
3. Rôles physiologiques	73
B. Le GMPc	75
1. Synthèse du GMPc	75
2. Cibles	76

C. Les protéine kinases dépendant du GMPc (PKG)	78
1. Les différentes isoformes	78
2. Mode d'action	80
3. Fonctions et substrats des PKG	82
Chapitre IV. Les gènes à réponse précoce	85
A. Les gènes de la famille <i>egr</i>	85
1. Le gène précoce <i>egr-1</i> et son promoteur	85
2. Le gène <i>egr-2</i>	88
3. Le gène <i>egr-3</i>	88
B. Les facteurs de transcription Egr	89
1. Le facteur de transcription Egr-1	90
2. Le facteur de transcription Egr-2	91
3. Le facteur de transcription Egr-3	91
C. Expression des gènes <i>egr</i> dans le SNC	92
1. Expression d' <i>egr-1</i> dans le SNC	92
2. Expression d' <i>egr-2</i> dans le cerveau mature	93
3. Expression du gène <i>egr-3</i>	94
D. Rôles des facteurs de transcription Egr	96
1. Rôles du facteur de transcription Egr-1	96
2. Rôle d'Egr-2	97
3. Rôles d'Egr-3	97
E. Les co-répresseurs transcriptionnels <i>NAB</i>	98
1. Généralités	98
2. Expression de <i>NAB1</i>	98
3. Expression de <i>NAB2</i>	98
MATÉRIEL ET MÉTHODES	100
A. Préparation des animaux	101
1. Implantations stéréotaxiques de guide canules	101
2. Transfert de gène <i>in vivo</i>	103
3. Microdialyse sur animal vigile	104
4. Injection intra-péritonéale	105
5. Perfusion intra-cardiaque	105
6. Prélèvement de structures cérébrales	107
7. Préparation de synaptosomes	107
B. Analyse des ARN messagers par hybridation <i>in situ</i>	109
1. Linéarisation des plasmides	109
2. Marquage de la sonde	109
3. Hybridation <i>in situ</i> proprement dite	111
C. Etudes immunologiques	113
1. Origine des anticorps	113
2. "Western Blot"	113
3. Marquage immunohistochimique	114
4. Double marquage immunocytochimique	115
5. Observations en microscopie confocale et électronique	116
D. Test de mobilité électrophorétique	117
1. Extraction des protéines nucléaires	117
2. Détection du complexe ADN-protéines	118
E. Mesure de l'activité enzymatique de la PKG	120
F. Mesure de l'activité locomotrice spontanée	121

RÉSULTATS	124
A. Interactions dopamine - glutamate - GABA dans les effets de la cocaïne dans le striatum et le cortex pré-frontal	125
1. Effet d'une injection unique de cocaïne sur l'expression d' <i>egr-1</i>	126
2. Effet d'une injection de kétamine ou de propofol sur l'expression d' <i>egr-1</i>	127
3. Effet modulateur des anesthésiques sur l'expression d' <i>egr-1</i> induite par la cocaïne	128
B. Modulation des neurones dopaminergiques par l'activation de la voie de transduction du GMPc	129
1. Action du neuropeptide CNP	129
2. Activation de la voie du GMPc / PKG	142
3. Sur-expression de la protéine kinase dépendant du GMPc	147
C. Expression différentielle des gènes de la famille Egr et de ses co-répresseurs NAB en réponse à des injections répétées de cocaïne	158
1. Cinétique d'expression du messenger <i>egr-1</i> après l'administration aiguë ou répétée de cocaïne	158
2. Cinétique d'expression de la protéine Egr-1 après l'administration aiguë ou répétée de cocaïne	161
3. Mesure de l'activité de liaison de la protéine Egr-1	163
4. Cinétique d'expression des protéines Egr-2 et Egr-3 après l'administration unique ou répétée de cocaïne	165
5. Cinétique d'expression des messagers des co-répresseurs <i>NAB1</i> et <i>NAB2</i> après l'administration unique ou répétée de cocaïne	166
DISCUSSION	170
A. Interactions dopamine - glutamate - GABA	172
1. Glutamate et gènes à réponse précoce	172
2. Propofol, gènes précoces et dopamine	173
3. Modulation par un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de l'expression d' <i>egr-1</i> induite par la cocaïne	174
4. Modulation par le propofol de l'expression d' <i>egr-1</i> induite par la cocaïne	174
5. Effet permissif de la dopamine dans le striatum	175
B. Modulation de l'activité des neurones dopaminergiques par l'activation de la voie du GMPc	178
1. Action du CNP	178
2. Intervention de la PKG dans la modulation des neurones dopaminergiques	180
3. Perspectives	184
C. Expression différentielle des gènes des familles <i>egr</i> et <i>NAB</i>	186
1. <i>egr-1</i>	186
2. Expression des gènes <i>NAB</i>	188
3. Expression d' <i>egr-2</i> et <i>egr-3</i>	189
4. Conclusion et perspectives	190
DISCUSSION GÉNÉRALE	192
A. <i>egr-1</i> et plasticité synaptique	193
B. Cocaïne, gènes et dépendance	195
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	198

LISTE DE PUBLICATIONS

Nathalie Thiriet, **Peggy Jouvert**, Serge Gobaille, Olga Solov'eva, Bobby Gough, Dominique Aunis, Syed Ali et Jean Zwiller.

C-type natriuretic peptide regulates cocaine-induced dopamine increase and immediate early gene expression in rat brain.

Eur J Neurosci, 2001, **14**: 1702-1708.

Peggy Jouvert, Jean-Bernard Dietrich, Dominique Aunis et Jean Zwiller.

Differential rat brain expression of Egr proteins and of the transcriptional corepressor NAB in response to acute or chronic cocaine administration.

NeuroMolecular Med, 2002, **1**: 137-151.

Peggy Jouvert, Laure Pain, Dominique Aunis et Jean Zwiller.

The anesthetic agents propofol and ketamine inhibit cocaine-induced *egr-1* gene expression in rat forebrain.

Eur J Pharmacol, 2002, **449**: 239-243.

Peggy Jouvert, Keith Langley, Marie-Odile Revel, Dominique Aunis et Jean Zwiller.

Inhibition of cocaine-induced *egr-1* expression by the activation of the cGMP/PKG pathway in rat dopaminergic structures.

En préparation.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Structure de la cocaïne (ester méthylique de benzoylecgonine).	13
Figure 2 : Structure de l'amphétamine.	15
Figure 3 : Métabolisme de la dopamine.	22
Figure 5: Représentation bidimensionnelle du transporteur membranaire humain de la dopamine.	25
Figure 6: Représentation bidimensionnelle du transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2.	26
Figure 7: Structure du récepteur dopaminergique D1.	28
Figure 9: Distribution des noyaux catécholaminergiques dans le système nerveux central de rat.	33
Figure 10 : Les voies dopaminergiques mésencéphaliques	34
Figure 11 : Métabolisme du GABA.	41
Figure 12 : Représentation schématique de la structure du récepteur GABA-A.	43
Figure 13: Modèle tridimensionnel du récepteur GABA-B fonctionnel formé d'un hétérodimère des sous-unités GABA-B1 et GABA-B2.	45
Figure 14 : Les principales projections GABAergiques dans le cerveau de rat.	48
Figure 15 : Schéma des efférences GABAergiques striatales.	49
Figure 16 : Synthèse et métabolisme du glutamate et du GABA dans le cerveau	51
Figure 17 : Les différents transporteurs du glutamate.	52
Figure 18 : Schéma illustrant la localisation des récepteurs métabotropes du glutamate dans le circuit des ganglions de la base.	57
Figure 19 : Organisation schématique de la distribution des récepteurs dopaminergiques et des récepteurs ionotropes du glutamate dans le circuit des ganglions de la base.	60
Figure 20 : Séquences des peptides natriurétiques et structures secondaires.	70
Figure 21 : Modèle hypothétique du cycle activation-désensibilisation du récepteur GC-B.	71
Figure 22 : Mécanismes d'activation et cibles du GMPc.	75
Figure 23 : Structure et homologies de séquence des PKG.	78
Figure 24 : Les éléments régulateurs du promoteur du gène <i>egr-1</i> .	87
Figure 25 : Structure des protéines de la famille Egr.	89
Figure 26 : Schéma d'implantation des guides canules pour les injections intracérébrales.	102
Figure 27: Schéma du transfert de gène à l'aide du PEI.	104
Figure 28: Schéma des niveaux de prélèvement des coupes et zones de quantification de la densité optique.	106
Figure 29 : Description schématique de la préparation de synaptosomes de striata de rat.	108
Figure 30: Séparation des oligonucléotides marqués de l'ATP γ - [³² P] libre sur une colonne séphadex G50.	118
Figure 31 : Les anesthésiques propofol et kétamine modulent l'expression d' <i>egr-1</i> induite par la cocaïne.	126
Figure 32 : Analyse densitométrique de l'expression du gène précoce <i>egr-1</i> réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation <i>in situ</i> .	127
Figure 33 : Modulation de l'expression d' <i>egr-1</i> par le CNP.	130

Figure 34 : Analyse densitométrique de l'expression du gène <i>egr-1</i> réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation <i>in situ</i> .	131
Figure 35 : Analyse densitométrique de l'expression du gène <i>egr-1</i> réalisée à partir des films autoradiographiques.	132
Figure 36 : Modulation par le CNP du taux de dopamine extracellulaire.	134
Figure 37 : Expression de la GC-B dans le cerveau de rat.	137
Figure 38 : Localisation de la GC-B dans deux types cellulaires.	138
Figure 39 : Modulation de l'expression d' <i>egr-1</i> par le CNP injecté dans les structures dopaminergiques.	139
Figure 40 : Analyse densitométrique de l'expression du gène <i>egr-1</i> réalisée à partir des films autoradiographiques.	140
Figure 41 : Expression des messagers <i>egr-1</i> après administration intra-CPu de CNP et injection i.p. de cocaïne, de GBR 12909 ou de D-amphétamine.	141
Figure 42 : Analyse par "Western Blot" de l'expression de la PKG dans des synaptosomes de striata de rats.	142
Figure 43 : Localisation sub-cellulaire de la PKG dans le striatum de rat.	144
Figure 44 : Le 8-Bromo-GMPc module l'expression des messagers <i>egr-1</i> induite par la cocaïne.	145
Figure 45 : Analyse densitométrique de l'expression du gène <i>egr-1</i> , réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation <i>in situ</i> .	146
Figure 46 : Analyse par "Western Blot" de l'expression de la PKG transfectée dans des striata de rats.	147
Figure 47 : Sur-expression de la PKG dans le CPu de rat.	149
Figure 48 : Localisation de la PKG sur-exprimée dans le cerveau de rat.	150
Figure 49 : Localisation de la PKG sur-exprimée dans le cerveau de rat.	151
Figure 50 : Localisation de la PKG dans le CPu de rat.	152
Figure 51 : Protocole d'injection des rats en vue de l'étude par hybridation <i>in situ</i> .	153
Figure 52: L'activation de la PKG module l'expression des messagers <i>egr-1</i> induite par la cocaïne.	154
Figure 53 : Analyse densitométrique de l'expression d' <i>egr-1</i> réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation <i>in situ</i> .	155
Figure 54 : La sur-expression de la PKG réduit l'activité locomotrice induite par la cocaïne.	156
Figure 55: Expression des messagers <i>egr-1</i> , <i>NAB1</i> et <i>NAB2</i> après des traitements aigu ou répété de cocaïne.	159
Figure 56 : Cinétique de l'expression du gène <i>egr-1</i> suite à une administration unique ou répétée de cocaïne.	160
Figure 57 : Expression des protéines Egr-1, Egr-2 et Egr-3 après un traitement aigu ou répété de cocaïne.	161
Figure 58 : Cinétique d'expression de la protéine Egr-1 après une administration aiguë ou répétée de cocaïne.	162
Figure 59 : Activité de liaison du facteur de transcription Egr-1 après une administration unique ou répétée de cocaïne.	164
Figure 60 : Cinétique d'expression de la protéine Egr-3 suite à une administration unique ou répétée de cocaïne	166
Figure 61 : Cinétique de l'expression du gène <i>NAB2</i> suite à une administration aiguë ou répétée de cocaïne.	168

Figure 62 : Régulation de la phosphorylation des récepteurs glutamatergiques dans le neurone épineux de taille moyenne GABAergique du striatum. ____	176
Figure 63 : Régulation de l'activité des neurones épineux GABAergiques du striatum par la phosphoprotéine DARPP-32. _____	183
Figure 64 : Schéma résumant les étapes impliquées dans la formation de la mémoire à long terme dans l'hippocampe. _____	194
Figure 65 : Régulation de l'activité des neurones dopaminergiques par le peptide CART. _____	196

TABLEAUX

Tableau 1 : Voies dopaminergiques dans le système nerveux central. _____	35
Tableau 2 : Caractéristiques de l'activité locomotrice (AL) des souris génétiquement modifiées au niveau des récepteurs dopaminergiques. ____	38
Tableau 3 : Principaux substrats de la PKG, regroupés selon leur fonction. ____	81
Tableau 4 : Gènes connus à ce jour, portant un site EBE dans leur promoteur. _	96
Tableau 5: Anticorps primaires utilisés dans les études immunologiques. _____	113
Tableau 6: Anticorps secondaires correspondants. _____	113
Tableau 7 : Modulation par le CNP de l'activité locomotrice induite par la cocaïne. _____	136
Tableau 8 : Analyse densitométrique de l'expression du gène précoce <i>egr-1</i> réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation <i>in situ</i> . _____	141
Tableau 9 : Mesure de l'activité de la PKG dans des synaptosomes de striata de rats. _____	143
Tableau 10 : Mesure de l'activité enzymatique de la PKG dans des striata de rats. _____	148

LISTE DES ABRÉVIATIONS

[Ca ²⁺] _i	Concentration en calcium intracellulaire libre	GPI	Globus pallidus interne
5-HT	Sérotonine, 5-hydroxytryptamine	GTP	Guanosine triphosphate
6-OHDA	6-hydroxydopamine	HVA	Acide homovanillique
AC	Adénylyl cyclase	i.c.v.	Intra-cérébro-ventriculaire
ADN	Acide désoxyribonucléique	IGF	"Insulin-like growth factor"
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire	i.p.	Intra-péritonéal
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate	IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
AMPc	Adénosine 3'-5'-monophosphate cyclique	L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
ANP	"Atrial natriuretic peptide"	LTD	Dépression à long terme
AP1	"Activator Protein 1"	LTP	Potentialisation à long terme
ARNm	Acide ribonucléique messenger	MAO-A	Monoamine oxydase-A
ATP	Adénosine triphosphate	MAO-B	Monoamine oxydase B
BNP	"Brain natriuretic peptide"	MAP	"Mitogen activated protein"
Br-Gc	8-Bromo-GMPc	NAB	"NGFI-A binding protein"
CamK	Protéine kinase calcium/calmoduline dépendante	NA	Noradrénaline
CgCx	Cortex cingulaire antérieur	NAc	Noyau accumbens
ChAT	Choline acétyl transférase	NAT	Transporteur de la noradrénaline
COMT	Catéchol-O-méthyl-transférase	NGF	"Nerve growth factor"
CPu	Noyau caudé-putamen	NLS	"Nuclear localization signal"
CRE	"cAMP responsive element"	NMDA	N-méthyl-D-aspartate
CREB	"CRE binding protein"	NO	Monoxyde d'azote
DA	Dopamine, 3,4-hydroxy-phényléthylamine	PA	Parvalbumine
DARPP-32	"Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein"	pb	Paire de bases
DAT	Transporteur de la dopamine	PDE	Phosphodiesterase
DCAA	Décarboxylase des acides aminés aromatiques	PDGF	"Platelet derived growth factor"
DNase	Désoxyribonucléase	PFCx	Cortex pré-frontal
DO	Densité optique	PKA	Protéine kinase dépendant de l'AMPc
DOPAC	Dihydroxyphénylacétate	PKC	Protéine kinase dépendant du Ca ²⁺
EBE	"Egr Binding Element"	PKG	Protéine kinase dépendant du GMPc
EGF	"Epidermal growth factor"	PLC	Phospholipase C
<i>egr</i>	"early growth response"	PP	Protéine phosphatase
Enk	Enképhalines	RNAse	Ribonucléase
ERK	"Extracellular receptor-activated protein kinase"	SERT	Transporteur de la sérotonine
GABA	Acide γ-aminobutyrique	SNC	Substance noire pars compacta
GCm	Guanylyl cyclase membranaire	SNC	Système nerveux central
GCs	Guanylyl cyclase soluble	SNr	Substance noire pars reticulata
Glu	Glutamate	SP	Substance P
GMPc	Guanosine 3'-5' monophosphate cyclique	SRE	"Serum responsive element"
GPe	Globus pallidus externe	SRF	"Serum responsive factor"
		SNP	Nitroprussiate de sodium
		TCF	"Ternary complex factor"
		TH	Tyrosine hydroxylase
		TPA	12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
		TRE	"TPA responsive element"
		UTP	Uridine triphosphate
		VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines
		VTA	Aire tegmentale ventrale

Le présent mémoire est divisé en quatre parties. Une première partie "Données Bibliographiques" place notre problématique dans l'ensemble des connaissances actuelles sur les neurotransmetteurs impliqués dans les propriétés stimulantes et renforçantes des psychostimulants. Sont introduits également la voie de transduction impliquant le GMPc et les gènes à réponse précoce des familles *egr* et *NAB*. Suit une partie "Matériel et Méthodes" décrivant la méthodologie utilisée. Une autre partie expose précisément les "Résultats" obtenus au cours de ce travail. Elle est suivie d'une "Discussion", dans laquelle sont abordés les différents aspects du travail. En particulier, nous commentons le rôle essentiel de la dopamine dans la transcription des gènes à réponse précoce dans le mode d'action de la cocaïne et la modulation de ce système par l'activation de la voie du GMPc. Ainsi, que l'importance des gènes à réponse précoce dans les neuro-adaptations prenant place suite à une administration chronique de cocaïne.

Dans le système nerveux central, la communication neuronale est assurée par l'échange de molécules informatives, les neurotransmetteurs. Ces molécules agissent sur les cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs, dont l'activation déclenche une cascade de réactions intracellulaires, comprenant l'activation de seconds messagers et des mécanismes de phosphorylation de protéines. La phosphorylation est la mieux caractérisée des modifications post-traductionnelles, permettant à la cellule d'intégrer les informations portées par les signaux externes. Dans le système nerveux central, les processus de phosphorylation/déphosphorylation interviennent d'une part, dans la régulation immédiate de l'activité neuronale en modifiant les propriétés des canaux ioniques et des récepteurs, et d'autre part, dans les régulations à long terme en induisant la synthèse de nouvelles protéines. Dans un premier temps, cette synthèse résulte de la transcription de gènes à réponse précoce. Ils codent souvent des facteurs de transcription, régulant dans un deuxième temps, l'expression d'une nouvelle vague de gènes, responsables des changements phénotypiques durables des neurones. Les gènes précoces représentent ainsi un intermédiaire entre une stimulation brève de la cellule et son adaptation à long terme en réponse à cette stimulation. Parmi l'ensemble des gènes précoces, *egr-1* est un des mieux caractérisés pour refléter l'activité synaptique, ainsi que pour intervenir dans la mise en place des modifications responsables de la plasticité synaptique, voire de la mémoire à long terme.

Sur le plan pharmacologique, la cocaïne appartient à la classe des psychostimulants, au même titre que les amphétamines ou la caféine. Ils améliorent l'humeur et aiguisent l'intellect, représentant indubitablement un moyen pour accroître les performances mentales. Ces substances, qui produisent un effet de plaisir immédiat, peuvent conduire certains individus à une consommation excessive. Dans le système nerveux central, les monoamines, comprenant principalement la dopamine, la noradrénaline, et la sérotonine, sont définies comme des neurotransmetteurs. D'un point de vue moléculaire, la cocaïne possède la propriété d'inhiber la re-capture de ces trois monoamines, augmentant ainsi leurs neurotransmissions.

L'étude de l'induction du gène précoce *egr-1* par la cocaïne permet de rechercher les structures activées. La stimulation de la neurotransmission dopaminergique par la cocaïne est essentielle dans la transcription de ce gène; toutefois, la participation

d'autres neurotransmetteurs ne peut être exclue. C'est pourquoi, dans un premier temps, nous avons examiné l'intervention des neurotransmetteurs glutamate et GABA dans l'activation de la neurotransmission dopaminergique, provoquée par la cocaïne dans les aires de projection dopaminergique exprimant *egr-1*. Nous avons également caractérisé la modulation de l'activité des neurones dopaminergiques par l'activation de la voie de transduction du GMPc, impliquant le neuropeptide CNP ("C-type natriuretic peptide") et la protéine kinase dépendant du GMPc. Enfin, pour mieux comprendre les mécanismes neuronaux adaptatifs qui se mettent en place après des administrations répétées de cocaïne, nous avons comparé les cinétiques d'expression des gènes de la famille *egr* et de leurs co-répresseurs transcriptionnels *NAB*, suite à une administration aiguë ou répétée de cocaïne.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I. Les psychostimulants

De tout temps, l'homme consomme des substances lui permettant de modifier son état psychologique. La pharmacologie moderne divise les substances psychotropes en diverses classes. Parmi celles-ci, la classe des psychostimulants comprend la cocaïne, les amphétamines substituées et la caféine.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié principalement des effets de la cocaïne. La D-amphétamine a parfois été utilisée à titre de comparaison. Nous détaillerons dans ce chapitre les propriétés pharmacochimiques et les effets psychotropes et somatiques de la cocaïne et ne donneront que quelques éléments des propriétés des amphétamines.

A. Généralités

Les stimulants du système nerveux central (SNC) sont consommés pour l'excitation du psychisme et des facultés intellectuelles qu'ils provoquent. En effet, ils accroissent l'acuité mentale et le niveau d'éveil, aiguïsent l'intellect et améliorent l'humeur.

1. La cocaïne

La cocaïne est un alcaloïde extrait de la feuille de coca. Il existe au moins quatre espèces d'arbustes à coca dont le plus commun est *Erythroxylon Coca*. Ces arbustes sont rencontrés partout le long de la Cordillère des Andes, avec une prédominance en Colombie et au Pérou. Bien que poussant à l'état sauvage, l'arbuste à coca est cultivé, généralement entre 500 et 1500 m d'altitude en climat humide. La feuille vert foncé de ces arbustes contient plusieurs alcaloïdes (de 0,5 à 3%) dont l'un est la cocaïne ; chez certaines espèces, la cocaïne est donc fort peu concentrée.

La "khoca" qui signifie "l'arbre par excellence" en langue aymara, était cultivée bien avant l'Empire inca. La société pré-colombienne a étudié l'usage des plantes, et particulièrement, celui de la coca depuis l'apparition de l'être humain sur le continent sud-américain. Cette consommation avait acquis un caractère mythique et magique, mais aussi religieux et social. Plante médicinale de premier ordre, elle était déjà utilisée pour ses propriétés anesthésiques, lors des interventions chirurgicales (trépanation et autres). Les feuilles de coca sont consommées sous forme d'une chique, que l'on mastique pendant quelques heures. L'appareil digestif est anesthésié, l'utilisateur ne ressent plus la faim. Cette

consommation permettait aussi de se protéger du froid de l'altitude. Dans les mines d'or, d'argent et d'étain de la cordillère des Andes, son usage est considéré par les mineurs comme un moyen de protection de leur santé, ainsi qu'un stimulant pour leur travail. L'arrivée des Conquistadores bouleverse l'existence des peuples sud-américains. Dès le début du XVI^{ème} siècle et jusqu'à la fin du XVIII^{ème} siècle, l'essor de l'exploitation des mines, par les Espagnols, coïncide avec l'expansion de la culture de la coca. Son usage comme stimulant s'est transformé à la suite de la conquête, il s'est trouvé complètement assujéti aux conditions de travail terriblement dures imposées par les Espagnols. Les Conquistadores manifestent plus de mépris que d'intérêt pour la coca.

Ce n'est qu'au Siècle des Lumières que l'Europe commence à s'intéresser réellement à la plante. En 1750, le botaniste De Jussieu décrit les premiers spécimens. Lamarck la nomma *Erythroxylon coca* en 1786. En 1835, Hooker publia un article contenant une traduction d'un livre de Poeppig, dans lequel ce dernier comparait les masticateurs de feuilles aux utilisateurs d'opium, et mettait en garde contre l'usage de coca. En 1855, Gaedcke distille le résidu sec d'un extrait de coca et obtient un produit cristallin qu'il appela "Erythroxylin". En 1859, le naturaliste Von Scherzer envoie des feuilles au célèbre chimiste Wöhler, et c'est au cours de cette même année qu'un de ses élèves, Niemann, isole un alcaloïde de ses feuilles qu'il nomme cocaïne. Trois ans plus tard, Lossen en détermine la formule chimique $C_{17}H_{21}NO_4$ (figure 1).

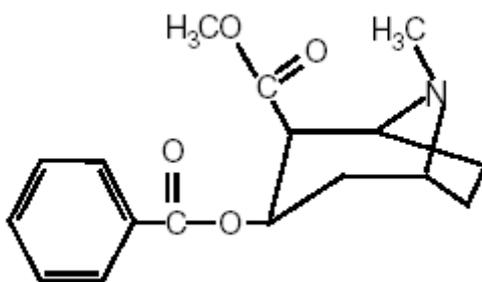


Figure 1 : Structure de la cocaïne (ester méthylique de benzoylecgonine).

L'usage thérapeutique de la coca et de la cocaïne va prendre très rapidement de l'ampleur et se diversifier. Parke Davis vendit un extrait semi-purifié en 1880 et beaucoup de firmes pharmaceutiques l'utilisèrent comme additif à de nombreux médicaments, dont les anesthésiques. La découverte de la cocaïne en tant qu'anesthésique local provoqua un bouleversement dans divers domaines de la médecine, dont l'ophtalmologie. Dans le monde médical se produisit une fétichisation enthousiaste de l'alcaloïde. Les applications

thérapeutiques de la cocaïne commencent dans la chirurgie (ophtalmologie, urologie, gynécologie), dans le traitement de l'alcoolisme et de l'opiomanie (préparation "Theriaki"), dans la médecine générale (cachexie, asthme).

En 1872, un article du journal *Lancet* décrit des propriétés "stimulantes et narcotiques" de la cocaïne, qui fut utilisée pour créer des boissons stimulantes. Le vin Mariani, commercialisé en 1863 par un pharmacien corse du même nom, contenait de fortes doses de cocaïne. Cette préparation a inspiré John Pemmington, un pharmacien de Géorgie, qui a élaboré la boisson Coca-Cola en 1885. Cette boisson aux propriétés toniques contenait des extraits de feuilles de coca, source de cocaïne, et de noix de cola, source de caféine. En 1884, Freud publia son fameux article "Über Coca", décrivant les effets bénéfiques de la cocaïne. Un an après, les premiers cas d'effets toxiques furent publiés, tendance qui s'amplifia jusqu'au début des années 1900. Les techniques de détection de la substance furent mises au point en 1887. Le premier article décrivant la modification des myocytes fut publié en 1888. Bien que Freud signala par la suite, que la cocaïne n'était certainement pas la "substance merveilleuse" qu'il avait cru pouvoir recommander, il fut vivement critiqué, à la suite de nombreux décès qui survinrent suite à la consommation de produit pur.

Les premiers cas de dépendance ont également été décrits à cette époque. Il s'agit là, de la première "épidémie" de consommation de cocaïne. Les Etats-Unis avaient par deux fois mis des restrictions à cette consommation (Pure Food Act de 1906 et Harrison Narcotic Act de 1914). En France, ce n'est qu'en 1916 que l'on a vu apparaître une liste de stupéfiants et une loi prohibant l'usage des drogues. De 1925 à 1970, peu de choses furent rapportées. Mais, dans les années 1970 est apparue une deuxième "épidémie" de consommation de cocaïne largement amplifiée dans les années 1980 avec l'émergence du "crack". Cette forme alcaloïde, insoluble dans l'eau, dite "free base" de la cocaïne peut être fumée, puisque son point de vaporisation est beaucoup moins élevé que celui du chlorhydrate de cocaïne. Depuis 1977, le trafic, l'utilisation et les décès dus à la consommation de cocaïne sont en augmentation constante.

2. *Les amphétamines substituées*

La famille des amphétamines est constituée de substances synthétiques possédant un squelette de type phényl-isopropyl-amine. L'amphétamine (figure 2) a été synthétisée en 1935, par un étudiant en chimie du nom de Gordon Allès, à partir de l'éphédrine,

alcaloïde de l'Ephédra vulgaris, arbuste aux propriétés stimulantes. Il recherchait un analogue de l'adrénaline pour traiter les symptômes de l'asthme. Vendue comme décongestionnant nasal sous forme d'inhalants, l'amphétamine a été commercialisée librement aux États Unis pendant les années 1940. Rapidement, les effets stimulants de ce produit sont devenus populaires, en particulier dans le milieu étudiant.

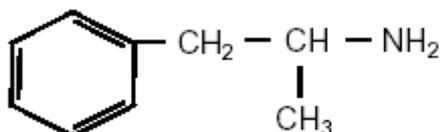


Figure 2 : Structure de l'amphétamine.

L'amphétamine a été utilisée massivement par les pilotes allemands, américains, anglais et japonais au cours de la II^{ème} guerre mondiale. Dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, l'effet de dopage obtenu par les amphétamines a été recherché par des catégories de plus en plus larges : les sportifs, les étudiants, les cadres et décideurs. L'injection intraveineuse d'amphétamine est apparue à cette époque. Des détournements croissants et des toxicomanies à ces produits ont été observés, ce qui a amené les autorités à prendre des mesures pour en restreindre l'accès, jusqu'à l'interdire en 1959.

L'amphétamine est la molécule archétype d'une famille de substances chimiques, qui regroupe des composés synthétiques apparentés. Il existe un grand nombre de dérivés amphétaminiques, dont les plus connus sont la méthamphétamine (Pervitine®, dénommée ice, crystal, shabbu sur le marché illicite), la benzédrine, le méthylphénidate (Ritaline®), les phényléthylamines, auxquelles appartiennent un bon nombre de drogues de synthèse comme la méthylène-dioxyméthamphétamine, généralement abrégée en MDMA (ecstasy) dans les années 1990. D'autres dérivés sont actuellement en pleine émergence en Europe, sur le marché récréatif, comme la 4-MTA (*p*-méthylthioamphétamine) ou la PMA (*p*-méthoxyamphétamine).

Aujourd'hui, l'amphétamine elle-même n'est plus prescrite en clinique, mais des molécules dérivées, présentant moins d'effets secondaires néfastes sont proposées dans de rares indications. Comme traitement du "syndrome d'hyperactivité de l'enfant", le méthylphénidate (Ritaline®) corrige les troubles de l'attention (Scahill et Lynch, 1994; Buncher, 1996). Enfin, l'inhibition de l'appétit reste l'indication majeure. Des dérivés de

l'amphétamine présentant des propriétés anorexigènes, mais dénués d'effets stimulants ont été mis au point. C'est le cas de la fenfluramine (Pondéral®) ou de son isomère D, la dexfenfluramine (Isoméride®). Ces médicaments ont cependant été mis en cause dans la survenue d'hypertension artérielle pulmonaire et retirés du marché (Pouwels *et al.*, 1990; Ferrari *et al.*, 1994).

B. Effets psychotropes des stimulants

Les consommateurs de psychostimulants recherchent un effet aigu de forte excitation psychomotrice, dont les manifestations les plus exacerbées sont volontiers assimilées à un effet de type orgasmique.

Le mode d'action et les effets biologiques des psychostimulants sur le système nerveux central sont traités de manière approfondie dans le chapitre II paragraphe D de ce manuscrit.

La cocaïne est un psychostimulant puissant, dont les effets sont cependant dépendants de la dose et du mode d'administration. Ainsi, les effets de la feuille de coca mâchée de façon traditionnelle par les peuples andins ne sont en aucun cas comparables à ceux observés chez des usagers de "crack".

1. Eléments de cinétique

La cocaïne s'utilise dans les pays occidentaux par trois voies: par voie intraveineuse (i.v.), par voie orale ou par voie pulmonaire. La cinétique d'arrivée au cerveau est un élément essentiel des effets de la cocaïne.

L'injection i.v. produit un effet en quelques minutes qui persiste environ une demi-heure. L'inhalation de la drogue sous forme de poudre la fait passer dans le sang au niveau de la muqueuse nasale ("sniffing"). L'activité de la drogue par cette voie est réduite, du fait d'un premier passage hépatique détruisant 70 à 80% de la dose. L'administration par voie orale subit la même dégradation (Gold et Balster, 1992): l'élévation de la concentration sanguine en cocaïne est lente, le pic plasmatique survenant en plus d'une heure. Les risques de toxicité aiguë sont alors limités.

En revanche, l'inhalation de vapeurs de cocaïne obtenues en chauffant du "crack", et qui franchissent la membrane alvéolaire pulmonaire, produit des effets beaucoup plus intenses comparés à ceux d'une prise i.v. Les effets surviennent en quelques secondes et

durent une dizaine de minutes, ce qui peut inciter l'utilisateur à réitérer très fréquemment l'administration.

La cocaïne est rapidement dégradée dans l'organisme sous l'action d'enzymes hépatiques et sanguines. On estime que la demi-vie de la cocaïne est d'environ une heure.

Les amphétamines peuvent elles-aussi être absorbées sous forme orale (speed ou ecstasy), injectées en i.v., "sniffées" ou fumées (ice). Les voies orale et intraveineuse sont les plus utilisées. Elles passent très facilement la barrière hémato-encéphalique et s'accumulent au niveau du cerveau antérieur. Elles se concentrent également dans le foie, les muscles squelettiques et le lait maternel. Leur fixation aux protéines plasmatiques est faible. La méthamphétamine traverse la barrière hémato-encéphalique plus rapidement et est un stimulant plus intense que l'amphétamine.

2. Effets d'une prise unique

Lors d'un usage occasionnel de psychostimulants, le sujet ressent une sensation d'euphorie et de bien être, une facilitation relationnelle, et un accroissement de la vigilance. Cette phase d'excitation psychique s'accompagne de perturbations de l'humeur, d'une sensation subjective d'amélioration des performances physiques et de l'acuité mentale, d'une diminution de la sensation de fatigue, de l'appétit et du sommeil. Cette phase est dite de "rush" ou de "flash", lorsqu'elle se manifeste de façon aiguë. Si les administrations se succèdent sur une période brève, leur arrêt se traduit par une installation de l'anxiété, voire une dépression, incitant le sujet à reprendre le produit. Cette phase est appelée le "crash".

Chez le rat, une faible dose de cocaïne augmente l'activité locomotrice, alors qu'une forte dose engendre des stéréotypies pouvant provoquer des convulsions et conduire à la mort (Johanson et Fischman, 1989).

3. Effets d'une consommation abusive

Une progression accélérée de la fréquence et de la quantité consommées de psychostimulants par les usagers peut engendrer une phase d'"abus". L'abus correspond à une consommation excessive induisant des dommages somatiques, psychoaffectifs ou sociaux soit pour le sujet lui-même, soit pour son environnement. Parfois, les prises s'intensifient souvent en alternance avec des boissons alcoolisées et l'utilisateur appréhendant

"le crash" essaie d'en retarder l'échéance, d'où le cercle infernal : les prises se rapprochent et les quantités d'alcool atteignent des proportions démesurées.

Chez certains individus, la phase de consommation contrôlée est suivie par la mise en place d'une dépendance à la drogue, caractérisée par une consommation compulsive, indépendante de la volonté du sujet et l'apparition de symptômes de sevrage. Divers paramètres influencent la mise en place de cet état de dépendance : le pouvoir renforçant de la drogue (très fort pour les psychostimulants), la sensibilité du consommateur (facteurs de susceptibilité, état émotionnel et mental) et l'environnement social (accessibilité et tolérance de l'environnement) (Piazza *et al.*, 1991; Kumor et O'Brien, 1994; Lemaire *et al.*, 1994). Les symptômes de sevrage sont proches de ceux observés lors d'un épisode de psychose aiguë : anxiété, dysphorie, délire, troubles du sommeil, agressivité, agitation motrice, pouvant aller jusqu'à des troubles de la perception.

A dose élevée, les amphétamines peuvent également induire des symptômes proches de ceux des schizophrénies de type paranoïde, similaires à celles observée après une consommation de cocaïne. Des hallucinations tactiles ont été aussi décrites. Mais, la consommation répétée d'amphétamines substituées, principalement de méthamphétamine, provoque une importante dégénération neuronale. Le mécanisme d'action de la méthamphétamine est succinctement résumé dans le paragraphe II.D.1.2.

Chez le rat, l'injection répétée d'une même dose de cocaïne produit une augmentation graduelle de l'activité locomotrice et des stéréotypies (Post *et al.*, 1987). Ce phénomène est appelé "sensibilisation comportementale".

C. Effets somatiques des psychostimulants

La consommation de psychostimulants induit de multiples manifestations somatiques. D'une façon générale, la consommation de cocaïne se traduit par une tachycardie, une dilatation pupillaire, une hypertension artérielle, accompagnées parfois de sueurs, de frissons, de nausées ou de vomissements.

1. Manifestations neurologiques

L'usage de la cocaïne peut provoquer une désynchronisation de l'activité électrique du cerveau. Comme la cocaïne abaisse le seuil épiléptogène, des convulsions sont fréquentes et peuvent survenir même au détour d'une administration unique. D'autres

signes sont notés parfois: céphalées, ischémie cérébrale ou hémorragies cérébro-méningées. Une hyperthermie est fréquemment décrite chez les usagers de "crack".

L'usage compulsif et chronique de cocaïne est associé à des perturbations diverses : des accidents cérébro-vasculaires (Lichtenfeld *et al.*, 1984; Levine *et al.*, 1987; Wojak et Flamm, 1987), des perturbations de la circulation sanguine cérébrale (Volkow *et al.*, 1992), voire une atrophie cérébrale diffuse (Pascual-Leone *et al.*, 1991). Ataxie, troubles de l'expression verbale et de la mémorisation semblent être très fréquemment retrouvés chez ces consommateurs (Ardila *et al.*, 1991).

Les troubles persistent pendant une période allant de trois à cinq semaines après le sevrage. Une certaine récupération est toutefois décrite après une abstinence très prolongée (Ardila *et al.*, 1991). L'usage compulsif de cocaïne conduit souvent à une perturbation des tests neuro-psychologiques qui peut être attribuée à un état de dépression.

La consommation chronique d'amphétamines peut elle aussi se révéler destructrice pour l'usager. Celui-ci peut entrer dans un cycle d'excitation maniaque suivie de dépression intense, associé à de nombreux accidents médicaux ou psychiatriques.

2. *Activité anesthésique locale*

Clairement démontrée dès le XIX^{ème} siècle, cette activité de la cocaïne est rapide et réversible, très proche de celle des analogues de synthèse utilisés désormais en médecine, comme par exemple la lidocaïne. La cocaïne bloque des canaux sodiques et potassiques dépendants du potentiel. Elle produit rapidement une insensibilisation temporaire de toutes les terminaisons nerveuses, cutanées et muqueuses.

3. *Toxicité cardio-vasculaire*

Le mécanisme d'action de la cocaïne sur le myocarde demeure complexe. Cette action se solde par une vasoconstriction de la plupart des lits vasculaires, ainsi que par une augmentation du rythme cardiaque, une forte tendance aux arythmies et une ischémie myocardique. La vasoconstriction est susceptible d'induire des nécroses dans certains tissus, notamment au niveau de la cloison nasale, mais surtout au niveau des coronaires, d'où la fréquente survenue d'infarctus. La cardio-toxicité des amphétamines ressemble à celle observée après consommation de cocaïne. Notamment, les amphétamines prescrites

comme "coupe-faim" provoquaient de nombreux accidents vasculaires, et ont été retirées du marché.

4. Toxicité pulmonaire

Les manifestations en sont nombreuses. Elles se traduisent notamment par des pneumothorax, une réduction de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone et des hémorragies alvéolaires, sur fond d'hypertension artérielle pulmonaire (Gold et Balster, 1992). Ces signes apparaissent de façon plus précoce et plus fréquente chez les usagers de "crack", l'on note des toux, des expectorations sanglantes, des douleurs thoraciques, des dyspnées, qui constituent un tableau spécifique dit "lung crack" (Gold et Balster, 1992). Un œdème aigu du poumon accompagne l'intoxication aiguë et peut se développer rapidement, avec dans les cas fulgurants, un décès en quelques heures.

La consommation chronique d'amphétamines entraîne des fibroses pulmonaires, et des maladies pulmonaires obstructives pouvant être létales également. On les rencontre plus fréquemment après injection intraveineuse. Les dérivés amphétaminiques anorexigènes sont susceptibles d'induire, même à dose thérapeutique, une dépression respiratoire.

5. Toxicités diverses

Puisque la demi-vie des psychostimulants est plus longue chez le fœtus que chez la mère, l'abus maternel pendant la grossesse est associé à une diminution du poids, de la taille, et du diamètre crânien du nouveau-né, ainsi qu'à des modifications du comportement de l'enfant (Kaltenbach, 2000).

Rappelons enfin que de nombreuses manifestations cliniques sont induites par l'association de stimulants à d'autres drogues : cocaïne et héroïne ("speed ball"), ou cocaïne et alcool (formation de cocaéthylène).

Chapitre II. Les neurotransmissions impliquées dans la réponse aux psychostimulants

Les psychostimulants agissant au niveau du système nerveux perturbent le fonctionnement de plusieurs systèmes de neurotransmission. En effet, ils interagissent directement avec les systèmes monoaminergiques : dopamine, noradrénaline et sérotonine, eux-même régulés par d'autres neurotransmetteurs, notamment le GABA et le glutamate.

A. Le système dopaminergique

Depuis les travaux de Carlsson (1958), la dopamine (DA) est considérée comme un neurotransmetteur central et périphérique, et non plus comme un simple intermédiaire métabolique de la voie de biosynthèse de la noradrénaline. En effet, la présence de DA en concentration élevée dans le striatum, où la noradrénaline est absente, et la diminution de DA sous l'influence de la réserpine (qui s'oppose au stockage vésiculaire des catécholamines neuronales), ont suggéré que cette monoamine jouait un rôle de neurotransmetteur. Les recherches ultérieures ont non seulement amplement démontré ce rôle, mais ont hissé la DA au premier rang des neurotransmetteurs, en égard à la diversité et à l'importance des fonctions qu'elle contrôle et partant des pathologies dans lesquelles elle est impliquée.

Dans le système nerveux central (SNC), la DA est impliquée dans le contrôle de multiples fonctions, telles que la locomotion, les fonctions sexuelles, l'homéostasie cardiovasculaire, les régulations endocrines et les fonctions cognitives. L'étiologie de certaines pathologies est liée à un dysfonctionnement de la neurotransmission dopaminergique, la mieux caractérisée étant la maladie de Parkinson (Robertson, 1992).

1. La dopamine

1.1. Biosynthèse de la dopamine

L'essentiel de la synthèse des catécholamines se déroule au niveau des terminaisons neuronales. Le métabolisme de la DA commence par la capture de la L-tyrosine, à partir du milieu extracellulaire, par un transporteur des acides aminés neutres (figure 3). Ce mécanisme actif utilise l'énergie de l'ATP. La cellule transforme ensuite la L-tyrosine en

L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA), grâce à une réaction d'hydroxylation en position 3 du noyau phényle. L'enzyme qui catalyse cette réaction est la tyrosine hydroxylase (TH), qui utilise de l'oxygène moléculaire. Elle possède un co-facteur, la tétra-hydrobioptérine. Cette étape a lieu dans le cytosol de la terminaison neuronale.

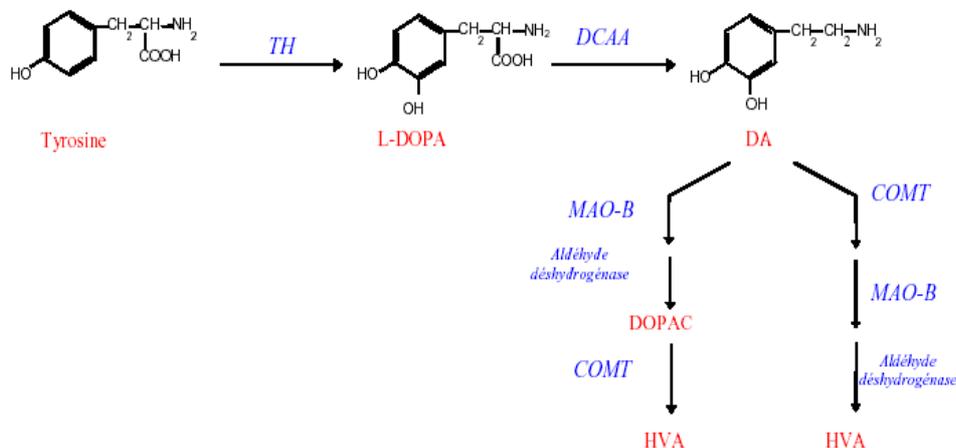


Figure 3 : Métabolisme de la dopamine.

TH: tyrosine hydroxylase; **DCAA:** décarboxylase des acides aminés aromatiques; **COMT:** catéchol-O-méthyl transférase; **DOPAC:** acide dihydroxyphénylacétique; **HVA:** acide homovanillique; **MAO-B:** monoamine oxydase B.

La deuxième étape de synthèse est la transformation de la L-DOPA en dopamine. Cette réaction est une décarboxylation qui nécessite la pyridoxine comme co-facteur. Elle est catalysée par la décarboxylase des acides aminés aromatiques (DCAA) (Christenson *et al.*, 1970).

1.2. Régulation des enzymes de synthèse

La biosynthèse de la DA est contrôlée au niveau de l'activité des enzymes de synthèse. La TH, l'enzyme limitante de la synthèse des catécholamines, est notamment régulée par de multiples facteurs. La DA cytosolique exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité de la TH. La DA extracellulaire exerce une influence inhibitrice par le biais des auto-récepteurs D2 (Onali et Olanas, 1989).

La TH est un tétramère, formé de sous-unités identiques de masse moléculaire d'environ 60 kDa. Chacune des sous-unités possède un domaine catalytique du côté C-terminal de l'enzyme et un domaine régulateur du côté N-terminal. La partie régulatrice est la cible de différentes protéine kinases, qui phosphorylent les résidus sérine en position 19, 31, 40 et 153 (Jedynak *et al.*, 2002) (figure 4).

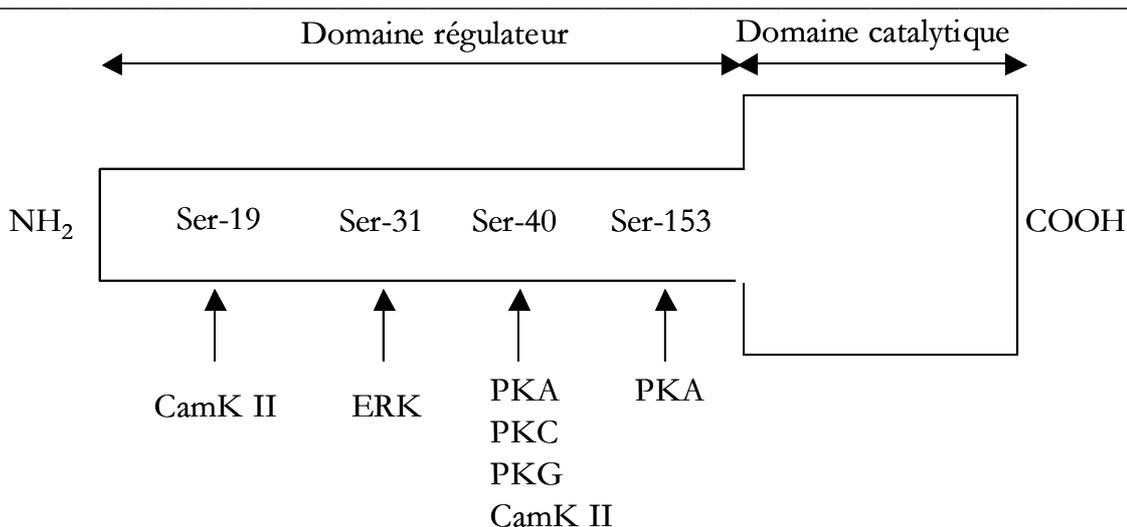


Figure 4: Localisation des sites de phosphorylation de la tyrosine hydroxylase. D'après Weiner et Molinoff (1994) avec modifications.

ERK: "Extracellular receptor-activated protein kinase"; **PKA:** protéine kinase dépendant de l'AMPc; **PKC :** protéine kinase C; **PKG :** protéine kinase dépendant du GMPc; **CamK II:** protéine kinase dépendant du complexe Ca²⁺/calmoduline.

En réponse à une modification de l'activité des neurones au niveau de la terminaison synaptique, deux mécanismes régulant la synthèse de DA ont été décrits. La TH étant inhibée par la DA elle-même, produit final de la voie de synthèse (Alousi et Weiner, 1966), l'activation des neurones entraîne la libération de DA, responsable de la levée de l'inhibition. Pour la même raison, les inhibiteurs de la monoamine oxydase diminuent l'activité de la TH. De plus, la dépolarisation des neurones dopaminergiques provoque une activation de la TH par un mécanisme de phosphorylation. L'augmentation de la concentration de Ca²⁺ intracellulaire induit l'activation d'une protéine kinase dépendant du complexe Ca²⁺/CaM (CaM KII) qui phosphoryle la TH, conduisant à une augmentation de son activité enzymatique (Zigmond *et al.*, 1989). D'autres kinases dépendant de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) ou du GMPc (guanosine monophosphate cyclique) augmentent également son activité (Roskoski *et al.*, 1987; Rodriguez-Pascual *et al.*, 1999).

Lors de modifications à long terme de l'activité des neurones dopaminergiques, on observe une régulation de la transcription de la TH (Molinoff et Axelrod, 1971). En effet, une augmentation prolongée de l'activité neuronale des neurones dopaminergiques provoque une augmentation de la quantité d'ARNm codant cette enzyme (Best *et al.*, 1995). La TH néo-synthétisée est ensuite transportée dans la terminaison nerveuse. On notera que la DCAA ne présente pas une telle régulation.

1.3. Catabolisme de la dopamine

La DA peut être inactivée au niveau intra- et extracellulaire (figure 3). En effet, la DA intracellulaire libre provient de deux sources. La première provient de la synthèse, la deuxième est la dopamine re-capturée du milieu extracellulaire. L'enzyme responsable du catabolisme intracellulaire est la monoamine oxydase de type B (MAO-B) (Karoum *et al.*, 1972). Cette enzyme est associée à la face externe des mitochondries. Le métabolite libéré est l'acide dihydroxy-phénylacétique (DOPAC).

Dans le milieu extracellulaire, principalement dans la fente synaptique, deux mécanismes contribuent à l'élimination de la DA : la re-capture pré-synaptique ou la transformation en 3-méthoxytyramine par la catéchol-O-méthyl transférase (COMT). L'action successive, dans un ordre variable de la COMT et de la MAO-B aboutit à la formation d'acide homovanillique (HVA) (figure 3).

Les taux des métabolites de la DA, le DOPAC et le HVA, peuvent être dosés biochimiquement : ils informent sur l'activité intracellulaire et sur la libération de DA respectivement. Ce sont des indicateurs de l'efficacité d'un traitement pharmacologique sur l'activité des neurones dopaminergiques.

2. La synapse dopaminergique

La DA néo-synthétisée dans le cytosol est concentrée à l'aide d'un transporteur dans les vésicules synaptiques et peut être libérée dans la fente synaptique par les mécanismes d'exocytose. Cette DA ainsi libérée pourra agir sur des récepteurs pré- et/ ou post-synaptiques. La DA extracellulaire peut être inactivée par des mécanismes de re-capture par l'intermédiaire d'un transporteur ou être métabolisée. La description des transporteurs et des récepteurs de la DA va nous permettre de comprendre le fonctionnement de la synapse dopaminergique.

2.1. Les transporteurs de la dopamine

Les transporteurs de la DA sont les cibles des psychostimulants, cocaïne et amphétamines. Dans ce paragraphe, nous allons détailler leur structure et leur fonction.

2.1.1. Le transporteur de la dopamine sur la membrane plasmique

Le transporteur de la dopamine (DAT) a été cloné chez le rat (Giros *et al.*, 1991). Il est très conservé entre les espèces. Il appartient à la famille des transporteurs Na^+/Cl^- dépendant. Cette protéine de 619 acides aminés est organisée en douze segments trans-membranaires, comportant une longue boucle extra-cytoplasmique entre le troisième et le quatrième segment trans-membranaire (figure 5).

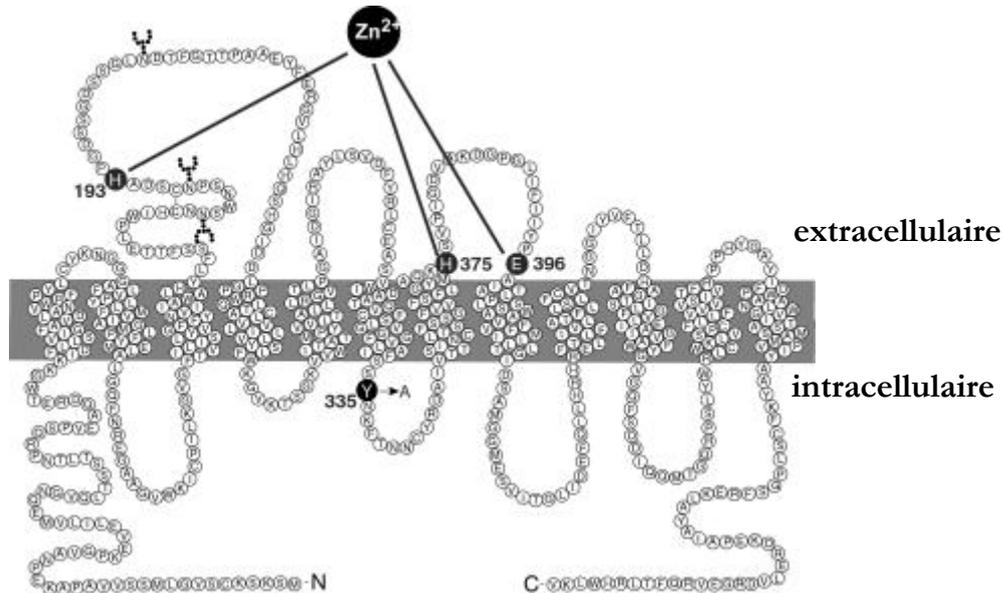


Figure 5: Représentation bidimensionnelle du transporteur membranaire humain de la dopamine. D'après Loland *et al.* (2002).

Les parties N- et C-terminales sont situées dans le cytoplasme. La partie N-terminale jusqu'au cinquième segment trans-membranaire est responsable du passage de la DA, des ions et des autres substrats. La partie centrale (segments de 5 à 8) représente le site de fixation d'antidépresseurs tricycliques et de la cocaïne (Ritz *et al.*, 1987; Buck et Amara, 1994; Giros *et al.*, 1994). Les amphétamines se fixent sur le site de liaison de la DA. Le DAT possède des sites de glycosylation et de nombreux sites de phosphorylation, certains phosphorylés par la PKA, la PKC ou la Cam KII (Giros et Caron, 1993).

L'entrée du substrat dans la cellule est couplée au co-transport de deux ions sodium et d'un ion chlorure, nécessaire au passage de la DA (Sonders *et al.*, 1997). Les ions se fixent d'abord au transporteur et induisent un changement conformationnel qui permet la liaison du substrat, puis son transport. Des expériences de transfection ont permis de mettre en évidence la sélectivité de ce transporteur pour la DA, et des expériences de mutation dirigée et de synthèse de protéines chimères ont permis la mise en évidence des sites d'interaction avec les psychostimulants et les antidépresseurs

(Kitayama *et al.*, 1992). Le DAT est aussi responsable de l'entrée des neurotoxines 6-OHDA et MPTP dans les neurones dopaminergiques (Pifl *et al.*, 1993).

L'ARNm du DAT est localisé dans le mésencéphale, alors que l'on trouve la protéine dans les ganglions de la base, dont le noyau accumbens (NAc), le noyau caudé-putamen (CPU), l'amygdale, le cortex pré-frontal médian (PFCx), et également au niveau des dendrites des neurones dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc) (Shimada *et al.*, 1992; Hersch *et al.*, 1997). Au niveau du striatum, la protéine est co-localisée avec la TH et le récepteur D2, confirmant sa localisation pré-synaptique dopaminergique. Il est important de noter que le DAT est localisé dans les zones adjacentes à la synapse, ce qui implique la diffusion de la DA avant sa re-capture (Kuhar *et al.*, 1998). L'augmentation de la concentration d'AMPC et l'activation de la PKA, en réponse à la stimulation des récepteurs pré-synaptiques D1, augmente l'activité du DAT (Batchelor et Schenk, 1998). Ainsi, par ce mécanisme de phosphorylation du DAT par la PKA, l'augmentation de la DA dans la synapse stimule sa propre re-capture. D'autres mécanismes de régulation de l'activité du DAT par phosphorylation ont été décrits; la phosphorylation par la PKC du DAT réduirait son activité (Zhu *et al.*, 1997), alors que la phosphorylation par la Cam KII l'augmenterait (Pierce et Kalivas, 1997).

2.1.2. Les transporteurs vésiculaires des monoamines

Le transport de la DA du cytoplasme vers l'intérieur des vésicules est couplé à un courant sortant de protons (Liu et Edwards, 1997).

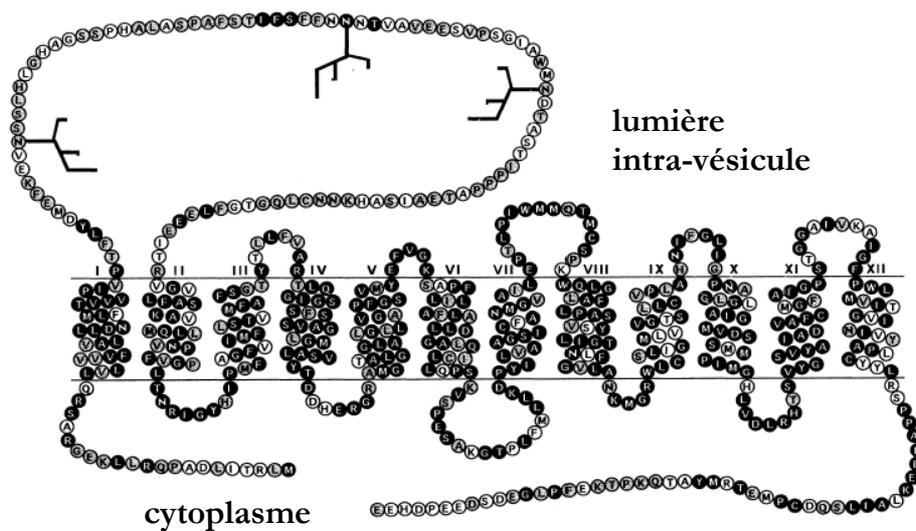


Figure 6: Représentation bidimensionnelle du transporteur vésiculaire des monoamines VMAT2. D'après Erickson *et al.* (1996).

Deux transporteurs vésiculaires des monoamines (VMAT) distincts ont été caractérisés, le VMAT1 et le VMAT2 (figure 6), ce dernier possédant une plus forte affinité pour la DA. Dans les neurones, on trouve surtout le VMAT2. Ces protéines sont également constituées de douze segments trans-membranaires et comportent une longue boucle intra-vésiculaire entre le premier et le deuxième segment trans-membranaire. Il est à noter que ces transporteurs ne sont pas spécifiques de la DA. Ils servent aussi à stocker la sérotonine, la noradrénaline et l'histamine. Alors que la cocaïne ne se lie qu'au DAT, le VMAT est aussi une cible des amphétamines.

2.2. Les récepteurs de la dopamine

Suite à la libération dans la synapse, la DA interagit avec divers récepteurs. L'activation de récepteurs post-synaptiques entraîne la propagation du signal pré-synaptique. La stimulation de récepteurs pré-synaptiques joue un rôle important dans la régulation de la synthèse et de la libération de DA.

2.2.1. Structure des récepteurs de la dopamine

Les études pharmacologiques et biochimiques avaient suggéré, dès 1979, l'existence de deux sous-classes de récepteurs dopaminergiques (Kebabian et Calne, 1979). Toutefois, dans les années 1990, cinq sous-types de récepteurs dopaminergiques ont été clonés (Bunzow *et al.*, 1988; Dearry *et al.*, 1990; Monsma *et al.*, 1990; Sokoloff *et al.*, 1990; Sunahara *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1990; Van Tol *et al.*, 1991).

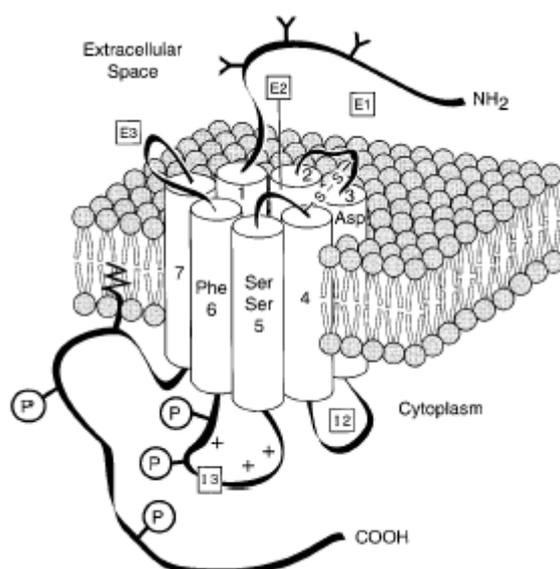
L'ensemble de ces récepteurs peut être regroupés en deux familles :

- la famille D1, dont la partie codante ne présente pas d'introns et qui possèdent une pharmacologie de type D1. Cette famille comprend les récepteurs D1 et D5. Le principal agoniste sélectif du récepteur D1 est le SKF-38393, alors qu'aucun agoniste sélectif n'a été décrit pour le récepteur D5. Le SCH-23390 semble être un antagoniste des deux récepteurs. La dopamine présente environ dix fois plus d'affinité pour le récepteur D5 que pour le D1.

- la famille D2, dont la partie codante des gènes possède des introns susceptibles de produire des variants par épissage alternatif, et dont la pharmacologie est de type D2. Cette famille comprend les récepteurs D2, D3 et D4. Deux isoformes du récepteur D2 ont été caractérisées, la forme longue D2L et la forme courte D2S (Dal Toso *et al.*, 1989).

La région codante du gène du récepteur D2 possède 6 introns (Giros *et al.*, 1989; Grandy *et al.*, 1989; Monsma *et al.*, 1989), celle du récepteur D3 en possède 5 (Sokoloff *et al.*, 1990) et celle du récepteur D4 en possède 3 (Van Tol *et al.*, 1991). La dopamine présente environ vingt fois plus d'affinité pour les récepteurs D3 et D4 que pour le D2. Le principal agoniste sélectif du récepteur D2 est la bromocriptine et le principal antagoniste est l'halopéridol, un neuroleptique. Peu de composés pharmacologiques sont décrits pour discriminer spécifiquement les récepteurs D3 et D4. Cependant, le composé U99194A semble être sélectivement un antagoniste du récepteur D3. La clozapine est un antagoniste non sélectif de l'ensemble des récepteurs D2 de la dopamine.

Ces récepteurs sont tous des récepteurs métabotropes à sept hélices trans-membranaires couplés à une protéine G (figure 7).



Les résidus impliqués dans la liaison de la DA sont cités dans les domaines trans-membranaires. Les sites potentiels de phosphorylation et de glycosylation sont représentés respectivement dans les parties intra- et extracellulaires.

Figure 7: Structure du récepteur dopaminergique D1. D'après Missale *et al.* (1998).

La partie N-terminale possède un nombre similaire d'acides aminés dans tous les sous-types de récepteurs. Par contre, on trouve des différences dans le nombre de sites de N-glycosylation.

La partie C-terminale est environ sept fois plus grande chez les récepteurs de la famille D1 par rapport aux membres de la famille D2. Cette région est riche en résidus sérine et thréonine, des sites potentiels de phosphorylation, et contient un résidu cystéine qui est conservé dans tous les récepteurs couplés aux protéines G.

2.2.2. Voies de transduction

Les récepteurs de la famille D1 ont été décrits initialement comme couplés positivement à l'adénylyl cyclase, et les récepteurs de la famille D2 couplés négativement (Kebabian et Calne, 1979).

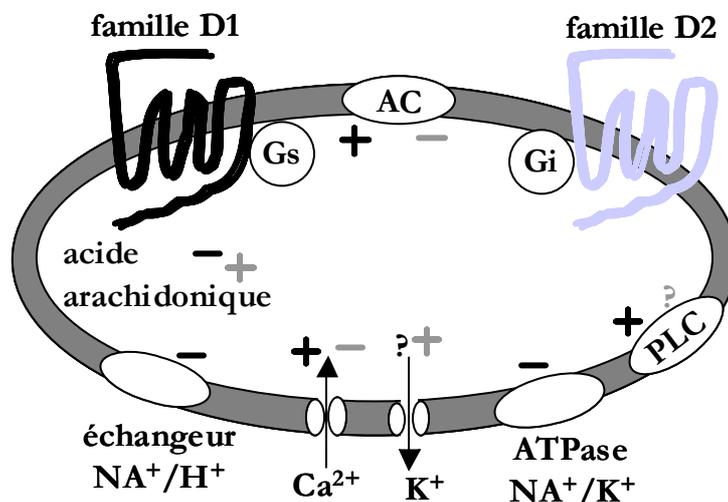


Figure 8: Les voies de transduction des récepteurs de la dopamine. D'après Missale *et al.* (1998).

AC: adénylyl cyclase; PLC: phospholipase C.

Toutefois, il faut noter que les récepteurs de la dopamine peuvent présenter une transduction plus complexe, puisqu'ils peuvent être liés à des systèmes de transduction additionnels. L'activation des récepteurs D1 peut conduire à une augmentation de l'activité de la phospholipase C (Undie et Friedman, 1990; Undie *et al.*, 1994). La famille des récepteurs D2 peut activer le canal K^+ GIRK ("G-protein activated inwardly rectifying K^+ ") (Vallar et Meldolesi, 1989). Les récepteurs de la dopamine présentent des actions antagonistes sur la concentration de Ca^{2+} intracellulaire ; la famille D1 provoque sa mobilisation (Frail *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 1995), alors que la famille D2 augmente son stockage (Seabrook *et al.*, 1994a; Seabrook *et al.*, 1994b). Il en est de même pour la voie de transduction de la phospholipase A2 (Felder *et al.*, 1990; Piomelli *et al.*, 1991; Schinelli *et al.*, 1994; Keefe et Gerfen, 1995). Les pompes ATPases Na^+/K^+ sont essentielles au maintien du gradient électrochimique qui est responsable de l'excitabilité des cellules nerveuses. Des études ont montré que l'activation du récepteur D1 inhibait l'activité de ces pompes (Horiuchi *et al.*, 1993; Laitinen, 1993).

2.2.3. Localisation cérébrale des récepteurs de la dopamine

- La famille des récepteurs D1

Le récepteur D1 est le récepteur de la dopamine le plus répandu dans le SNC et il est le plus intensément exprimé parmi tous les sous-types (Dearry *et al.*, 1990; Fremeau *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 1991). La distribution de l'ARN messager du récepteur D1 est assez bien corrélée avec celle de la protéine, à l'exception de la substance noire (SN) (Spano *et al.*, 1977). L'ARNm est intensément exprimé dans le CPu, le NAc et les tubercules olfactifs. Il est également présent dans le cortex cérébral, le système limbique, l'hypothalamus et le thalamus. D'autres structures montrent des sites de liaison pour le récepteur D1, sans qu'aucun ARNm ne soit détecté, ce qui suggère que le récepteur D1 possède une localisation pré-synaptique dans ces structures. Il s'agit du globus pallidus (GP) et de la SN pars réticulata (SNr), où les récepteurs D1 sont localisés dans des neurones GABAergiques du CPu. Dans le striatum, le récepteur D1 est préférentiellement localisé dans les neurones GABAergiques co-exprimant la substance P (SP) (Gerfen *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1990).

Comparé au récepteur D1, le récepteur D5 est peu exprimé dans le SNC de rat et présente une distribution différente. En effet, il est majoritairement localisé dans l'hippocampe et des noyaux thalamiques, où le récepteur D1 n'est que peu détecté (Tiberi *et al.*, 1991; Meador-Woodruff *et al.*, 1992). On ne trouve que peu de messagers du récepteur D5 dans le striatum dorsal, le NAc, les tubercules olfactifs ou des aires corticales du cerveau antérieur. A un degré moindre, il est exprimé dans des régions postérieures, comme l'aire tegmentale ventrale (VTA) (Choi *et al.*, 1995; Huntley *et al.*, 1992; Rappaport *et al.*, 1993).

Les récepteurs D1 et D5 sont co-exprimés dans des neurones pyramidaux des cortex cingulaire antérieur (CgCx), pré-moteur et entorhinal, dans l'hippocampe et le gyrus denté (Huang *et al.*, 1992a; Smiley *et al.*, 1992; Bergson *et al.*, 1995a; Bergson *et al.*, 1995b). Une étude en microscopie électronique a démontré que dans le PFCx, les récepteurs D1 et D5 présentaient une localisation pré- et post-synaptique, avec toutefois une forte prédominance dans la zone post-synaptique. Par contre, l'analyse ultra-structurale montre que dans certains neurones pyramidaux, les récepteurs D1 et D5 ont une localisation sub-cellulaire distincte. En effet, le récepteur D1 est concentré dans les épines dendritiques, alors que le récepteur D5 lui est concentré le long des dendrites (Smiley *et al.*, 1992; Bergson *et al.*, 1995b). Dans le striatum, quelques neurones

GABAergiques épineux de taille moyenne co-expriment les récepteurs D1 et D5 (Huang *et al.*, 1992a; Smiley *et al.*, 1992; Bergson *et al.*, 1995b). Mais, en général, le récepteur D5 est principalement détecté dans les inter-neurons cholinergiques du striatum, ce qui n'est pas le cas du récepteur D1 (Bergson *et al.*, 1995b). Les récepteurs D1 sont présents dans la SN, alors que les récepteurs D5 ne le sont pas (Levey *et al.*, 1993; Bergson *et al.*, 1995b; Hersch *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent que si les récepteurs D1 et D5 sont détectés dans les neurones GABAergiques épineux de taille moyenne du striatum, seuls les récepteurs D1 sont transportés le long de l'axone jusqu'à la terminaison dopaminergique. Ces différences de localisation cellulaire et sub-cellulaire montrent que, même si les récepteurs D1 et D5 présentent une pharmacologie similaire, ils ne sont pas redondants sur le plan fonctionnel.

- La famille des récepteurs D2

Le premier récepteur dopaminergique à avoir été cloné est le récepteur D2 du striatum de rat (Bunzow *et al.*, 1988); il est donc le mieux étudié des récepteurs de cette famille. Dans l'ensemble, la distribution de l'ARNm du récepteur D2 est bien corrélée avec la localisation de la protéine. Le récepteur D2 est détecté majoritairement dans les tubercules olfactifs et le CPU et le NAc, et plus fortement dans la partie "core" (Bouthenet *et al.*, 1991). Le récepteur D2 est aussi localisé dans les neurones GABAergiques épineux de taille moyenne du CPU, où il est exprimé dans des neurones GABAergiques co-exprimant l'enképhaline (Enk) (Le Moine *et al.*, 1990; Le Moine et Bloch, 1995). Dans ces neurones GABAergiques, il est principalement concentré dans les épines dendritiques par rapport au soma. Le récepteur D2 est aussi détecté dans le cortex cingulaire antérieur, entorhinal et temporal, dans le septum, dans le noyau central de l'amygdale et dans les cellules granulaires de l'hippocampe (Bouthenet *et al.*, 1991; Levey *et al.*, 1993; Jackson et Westlind-Danielsson, 1994). Il est aussi exprimé dans les neurones dopaminergiques de l'hypothalamus, la SNc et la VTA (Meador-Woodruff *et al.*, 1989; Bouthenet *et al.*, 1991; Weiner *et al.*, 1991). De plus, dans ces structures, il est présent dans le perikaryon et les dendrites. Ces données sont en accord avec un rôle à la fois pré- et post-synaptique, et suggère que le récepteur D2 contrôle directement l'activité des neurones dopaminergiques.

Des messagers du récepteur D3 sont détectés dans la SNc et la VTA, mais ce récepteur est exprimé dans beaucoup moins de neurones dopaminergiques que le

récepteur D2 (Diaz *et al.*, 1994; Diaz *et al.*, 1995). Le récepteur D3 présente une distribution spécifique dans des aires limbiques (Landwehrmeyer *et al.*, 1993a ; 1993b). En effet, il est détecté dans la partie ventro-médiane du "shell" du NAc, où il est exprimé dans les neurones contenant la neurotensine et la SP et projetant sur le pallidum ventral. Il est aussi présent dans les tubercules olfactifs et les îlots de Calleja (Bouthenet *et al.*, 1991 ; Levesque *et al.*, 1995). Par contre, il est peu exprimé dans la partie dorsale du striatum (Sokoloff *et al.*, 1990; Bouthenet *et al.*, 1991 ; Levesque *et al.*, 1995). Le récepteur D3 est aussi exprimé, quoique à un très faible niveau, dans l'hippocampe, le septum et dans quelques couches corticales du lobe temporal (Bouthenet *et al.*, 1991).

Le récepteur D4 n'est que faiblement exprimé dans les ganglions de la base. Par contre, il est fortement exprimé dans le cortex frontal, l'amygdale, l'hippocampe, l'hypothalamus, le mésencéphale et la rétine (Van Tol *et al.*, 1991; O'Malley *et al.*, 1992; Cohen, 1993). A un degré moindre, il est localisé dans le globus pallidus, la SNr et le noyau réticulaire du thalamus (Mrzljak *et al.*, 1996). Des études immunohistologiques montrent que le récepteur D4 est présent dans les neurones pyramidaux et non-pyramidaux du cortex cérébral, identifiés comme étant des inter-neurones GABAergiques (Mrzljak *et al.*, 1996). Ainsi, dans le cortex cérébral, la dopamine par le récepteur D4, pourrait moduler la neurotransmission GABAergique.

De manière générale, on trouve les récepteurs de la famille D1 principalement localisés sur les neurones post-synaptiques, alors que les récepteurs de la famille D2 ont une localisation à la fois pré- et post-synaptique.

La question de la co-localisation des récepteurs D1 et D2 dans un même neurone a été longtemps controversée. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que les récepteurs D1 et D2 n'étaient pas exprimés dans les mêmes neurones du striatum. En effet, l'ARNm du récepteur D1 est détecté dans les neurones à SP de la voie striatonigrale, alors que celui du récepteur D2 est présent dans les neurones à Enk de la voie striatopallidale (Gerfen *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1991; Le Moine et Bloch, 1995). De plus, les expériences d'immunohistochemie ont montré que les deux récepteurs sont détectés dans des neurones distincts du striatum (Hersch *et al.*, 1995). Dans le cerveau de primate, le récepteur D5 est co-localisé avec le récepteur D2 dans les interneurones cholinergiques du striatum (Bergson *et al.*, 1995a). Dans le striatum ventral, les récepteurs D1 et D3 sont également présents dans un même neurone (Le

Moine et Bloch, 1995). Ainsi, en général, un même neurone exprimerait les récepteurs D1 et D3/D4 ou les récepteurs D2 et D5.

Le rôle des récepteurs dopaminergiques est décrit dans le paragraphe A.3.2. de ce chapitre.

3. Le système dopaminergique

Les neurones dopaminergiques du SNC ont été localisés par des expériences d'histofluorescence réalisées par Dahlström et Fuxe en 1964. Ces auteurs ont dénombré 16 noyaux catécholaminergiques (A1 à A16), dont neuf sont dopaminergiques, de A8 à A16 (figure 9). Le système dopaminergique central comprend ainsi un ensemble de plusieurs noyaux qui font partie de systèmes anatomiques distincts.

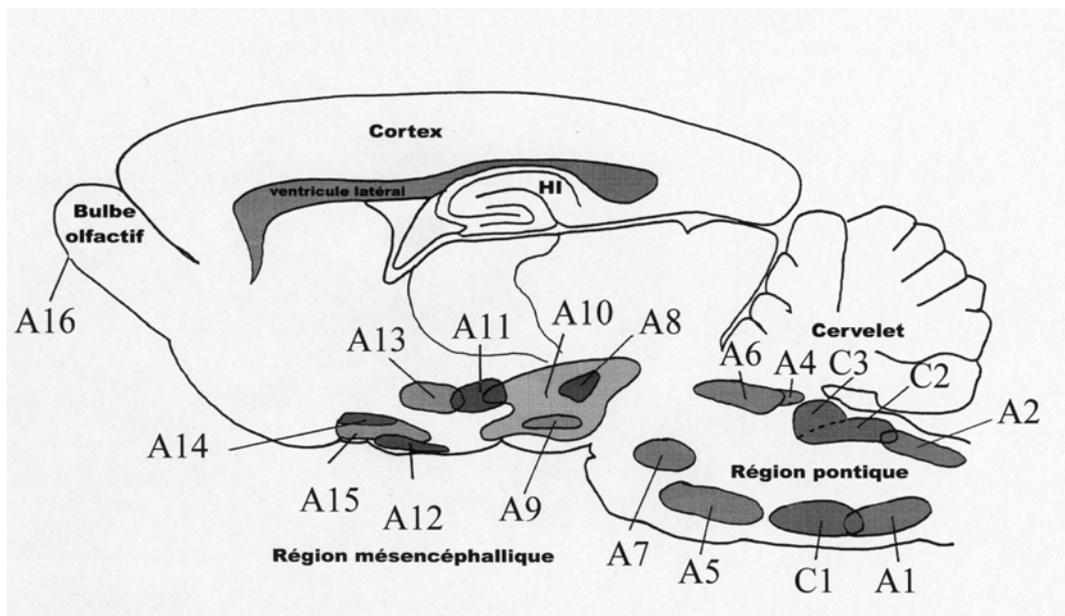


Figure 9: Distribution des noyaux catécholaminergiques dans le système nerveux central de rat.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement au système dopaminergique ascendant mésencéphalique. En effet, au niveau du mésencéphale, on observe deux structures juxtaposées, la SN et la VTA, qui hébergent des corps cellulaires dopaminergiques. Elles ont été sous-divisées en trois noyaux :

- A8 : l'extension postéro-latérale de la SN, appelée SN pars réticulata ou réticulée (SNr)
- A9 : la substance noire pars compacta ou compacte (SNc)

- A10 : la VTA qui est située dans le mésencéphale ventral, limitée dorsalement par le noyau rouge et latéralement par la SN.

Les autres noyaux contenant des corps cellulaires dopaminergiques (A11 à A16) constituent en majorité le système hypothalamique. Les voies issues du noyau arqué hypothalamique (A12) exercent une activité inhibitrice sur le processus de libération des hormones hypophysaires, notamment la prolactine.

3.1. Description anatomique

3.1.1. Les voies dopaminergiques

Les connaissances actuelles, concernant l'organisation anatomique du système dopaminergique au niveau du SNC, sont basées sur des études histochimiques à l'aide de marqueurs non spécifiques comme l'acide glyoxylique (Falck, 1972), sur des études de traçage des voies avec la "horseradish" peroxydase (LaVail et LaVail, 1974), et aussi sur des études de détermination des taux de DA et de l'activité enzymatique de la TH dans les structures cérébrales (Ben-Ari *et al.*, 1975).

Sept systèmes de projections dopaminergiques ont été décrits dans le cerveau de rat et sont répertoriés dans le tableau 1. Seuls les systèmes mésostriatal et mésocorticolimbique seront détaillés dans ce manuscrit (figure 10).

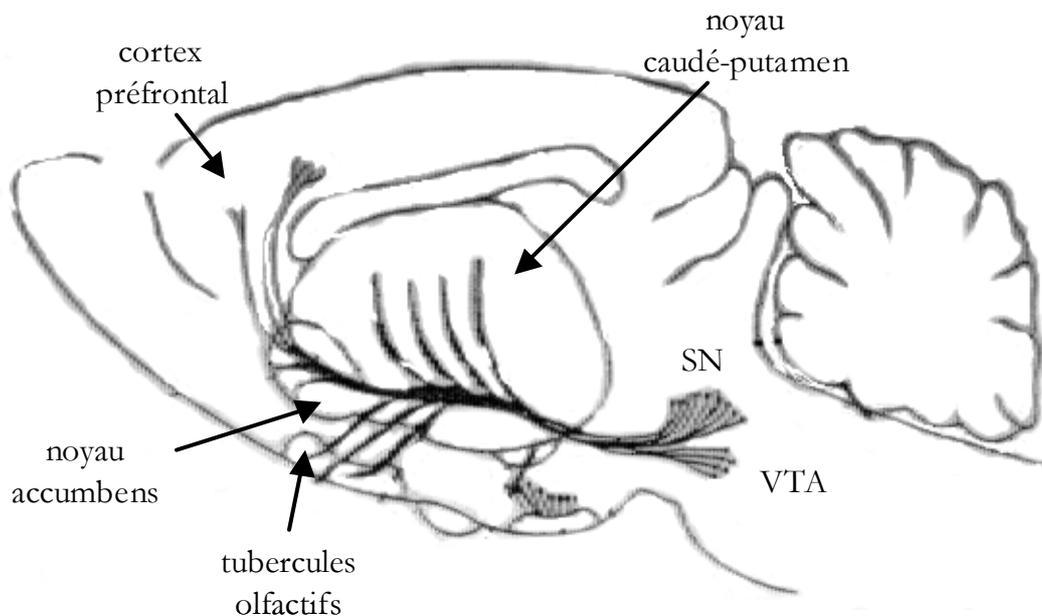


Figure 10 : Les voies dopaminergiques mésencéphaliques

Nom	Origine des corps cellulaires	Projections
système mésostriatal	substance noire (SNc)	noyau caudé-putamen (CPU), "core" du noyau accumbens (NAc), globus pallidus
système mésolimbique	aire tegmentale ventrale (VTA)	"shell" du noyau accumbens (NAc), cortex cingulaire antérieur (CgCx), amygdale, septum, tubercules olfactifs, cortex piriforme, cortex entorhinal
Système péri-ventriculaire	thalamus péri-ventriculaire substance grise péri-aqueducale mésencéphalique	thalamus et hypothalamus médial
système incerto-hypothalamique	zona incerta et hypothalamus	zona incerta, hypothalamus antérieur, pré-optique et péri-ventriculaire, septum
système tubéro-hypophysaire	noyaux arqué (A12) et péri-ventriculaire de l'hypothalamus	éminence médiane, hypophyse intermédiaire et nerveuse
système péri-glomérulaire	bulbe olfactif	projections dendritiques dans les glomérules olfactifs
système rétinien	dans les cellules amacrines de la rétine	projections dendritiques locales

Tableau 1 : Voies dopaminergiques dans le système nerveux central.

Les neurones de la SN projettent principalement sur le CPU, le noyau sous-thalamique (NST) et le GP. L'innervation principale provient de la SNc (A9). Toutefois, il est à noter qu'il existe une innervation faible du CPU par la VTA (A10). Ces voies de projection constituent le système mésostriatal ou nigrostrié.

Le système mésocorticolimbique désigne les neurones dopaminergiques provenant majoritairement de la VTA, et quelques uns de la SNc, qui projettent sur des structures sous-corticales et corticales. Ces structures sont le NAc, le septum et l'amygdale, les bulbes et les tubercules olfactifs, ainsi que les cortex piriforme, cingulaire, entorhinal, périrhinal et frontal. Les tubercules et le noyau olfactifs sont largement innervés par les fibres dopaminergiques originaires aussi bien de la VTA que de la SN. En ce qui concerne les projections corticales, on distingue principalement des terminaisons dopaminergiques

sur la partie antérieure du cortex cingulaire (CgCx), provenant de la VTA (A10) (Kandel et Schwartz, 1987).

3.1.2. Structures cibles dopaminergiques

Deux structures cérébrales particulières recevant des innervations dopaminergiques nous ont intéressées dans ce travail. Il s'agit du CPu, du NAc, qui appartiennent au striatum, et du CgCx. Seules ces structures sont présentées dans le présent manuscrit.

Le striatum est la cible de nombreuses structures cérébrales dont la SNc et la VTA mais, aussi de l'ensemble du cortex et de certains noyaux thalamiques. Il appartient fonctionnellement aux ganglions de la base, et est impliqué dans le contrôle de la motricité et dans la régulation des fonctions cognitives et émotionnelles.

Il peut être divisé anatomiquement en trois parties distinctes :

- **le noyau caudé-putamen**, qui dans sa partie dorso-latérale chez le rat, constitue le striatum sensori-moteur, et reçoit des afférences dopaminergiques de la SNc. Dans sa partie ventro-médiane, il reçoit surtout des afférences de la VTA. Il est aussi appelé néo-striatum.

- **le noyau accumbens**, qui peut être lui-même divisé en trois compartiments. La partie "core" proche du CPu, est principalement innervée par des neurones issus de la SNc. La partie "shell" plutôt limbique, est innervée majoritairement par des neurones issus de la VTA. Le pôle rostral, le troisième compartiment, est un chevauchement entre les parties shell et core (Zahm, 2000). Il est innervé principalement par des neurones en majorité dopaminergiques co-libérant la cholécystokinine (CCK), issus de la VTA et de la SNc (Lanca *et al.*, 1998).

Le NAc forme une interface entre les systèmes limbique et moteur (Jones et Mogenson, 1980). La division anatomique entre core et shell permet de clarifier le rôle du NAc dans les fonctions motivationnelles, telles que le comportement moteur et appétitif (Robbins et Everitt, 1996). Il reçoit des afférences glutamatergiques du PFCx, l'hippocampe et de l'amygdale, et envoie des projections GABAergiques principalement vers la SNr et le pallidum ventral (Nauta *et al.*, 1978).

- **le globus pallidus** est innervé principalement par des neurones provenant de la SN et du CPU dorsal. Il est aussi appelé paléo-striatum.

La structure cellulaire du striatum et les innervations corticales glutamatergiques seront détaillées ultérieurement dans le manuscrit (paragraphe B.3.1.1. et C.3.2. respectivement) et un schéma de synthèse est présenté dans la figure 19.

Le cortex pré-frontal médian, qui appartient au système limbique, est impliqué notamment dans les fonctions cognitives et émotionnelles. Il peut être divisé en cinq parties anatomiquement distinctes selon Paxinos et Watson (1997): les cortex infralimbique, cingulaires antérieurs ventral (Cg1) et dorsal (Cg2, abrégé ici en CgCx), prélimbique (Cg3) et l'aire frontale 1. Ces structures reçoivent toutes des afférences catécholaminergiques; le CgCx recevant principalement des projections dopaminergiques issues de la VTA. Il est également innervé par des neurones glutamatergiques provenant du thalamus.

La structure cellulaire du PFCx sera détaillée ultérieurement dans ce manuscrit (paragraphe II. C. 3.1.).

3.2. Fonctions des voies dopaminergiques mésencéphaliques

3.2.1. La voie nigrostriée

La voie mésostriatale ou nigrostriée est impliquée principalement dans l'initiation et l'harmonisation de la motricité. De nombreuses études indiquent que la maladie de Parkinson résiderait dans la dégénérescence progressive des neurones formant cette voie (Graybiel *et al.*, 1990).

Le contrôle de la motricité est principalement régulé dans le striatum dorsal par l'intermédiaire des récepteurs D1, D2 et D3 (Nieoullon et Kerkerian-Le Goff, 1992). L'activation des auto-récepteurs D2, qui réduit la quantité de DA libérée, s'est avérée inhiber l'activité locomotrice spontanée (Jackson et Westlind-Danielsson, 1994), tandis que l'activation des récepteurs D2 post-synaptiques l'augmente. L'activation seule des récepteurs D1 a peu ou pas d'effets sur l'activité locomotrice (Gershanik *et al.*, 1983). Pourtant, il semble que l'interaction en synergie entre les récepteurs D1 et D2 soit nécessaire pour le contrôle de la locomotion. En effet, une stimulation du récepteur D1 est essentielle pour que les agonistes D2 produisent une activité locomotrice maximale

(Breese *et al.*, 1987 ; Dreher et Jackson, 1988). Le récepteur D3 semble jouer un rôle inhibiteur sur la locomotion spontanée. En effet, un agoniste préférentiel du récepteur D3 (7-OH-DPAT) administré par voie i.p., inhibe l'activité locomotrice (Daly et Waddington, 1993; Sokoloff et Schwartz, 1995), tandis qu'un antagoniste (nafadotride) de ce même récepteur administré par voie i.p., provoque une activation motrice (Waters *et al.*, 1993; Sokoloff et Schwartz, 1995). Enfin, l'intervention des récepteurs dopaminergiques, dans le contrôle de la motricité, a été précisée par l'apport de souris génétiquement modifiées. Les caractéristiques principales de ces souris au niveau de l'activité locomotrice, sont reportées dans le tableau 2.

Récepteur modifié	Invalidation totale	Délétion partielle
D1	Augmentation de l'AL basale et à un nouvel environnement	Diminution de l'AL basale, Augmentation de l'AL à un nouvel environnement
D2	Anormalités posturales, Retard dans l'initiation des mouvements	Posture normale, diminution de l'AL avec un retard de l'initiation des mouvements
D3	Augmentation de l'AL basale, Habituation rapide à un nouvel environnement	Habituation rapide et augmentation de l'AL à un nouvel environnement
D4	?	Réduction de l'AL à un environnement familier et nouveau Augmentation de la coordination motrice
D5	?	Augmentation de la coordination motrice, Augmentation de l'exploration

Tableau 2 : Caractéristiques de l'activité locomotrice (AL) des souris génétiquement modifiées au niveau des récepteurs dopaminergiques. D'après Glickstein et Schmauss (2001).

3.2.2. La voie mésocorticolimbique

Les neurones dopaminergiques projetant sur les régions limbiques et corticales sont impliqués principalement dans le contrôle des émotions et des fonctions cognitives (Nieoullon, 2002). Il n'est donc pas étonnant de les trouver associés à des psychoses, telles que la schizophrénie ou à des désordres affectifs ou liés au stress. L'intervention de

la voie mésocorticolimbique dans les effets des psychostimulants est présentée dans le paragraphe D.2. de ce chapitre.

Cette voie dopaminergique est également impliquée dans des processus liés à l'apprentissage et la mémoire. Des animaux lésés au niveau de la VTA, par injection de 6-OHDA, une neurotoxine spécifique des neurones catécholaminergiques, présentent en plus d'une hyperactivité locomotrice, des déficits d'attention à un stimulus spécifique (Le Moal et Simon, 1991). Ainsi, par rapport aux animaux témoins, les animaux lésés présentent des déficits d'exploration à un nouvel environnement, et montrent une incapacité d'adaptation comportementale. Chez des souris, l'inactivation du récepteur D4 est aussi associée à une réduction de l'exploration d'un nouvel environnement (Dulawa *et al.*, 1999). Ces expériences démontrent l'implication de la dopamine dans les adaptations comportementales à engendrer aux changements environnementaux. La lésion de la VTA induit également un déficit sévère de rétention dans les tests de mémoire (Simon *et al.*, 1980). Les mêmes observations sont réalisées après lésion du PFCx (Wortwein *et al.*, 1994). De plus, dans le cerveau de singe, les neurones dopaminergiques de la VTA sont impliqués dans les changements transitoires, qui se mettent en place lors des processus motivationnels sous-tendant l'apprentissage et les comportements cognitifs (Schultz *et al.*, 1993). Les souris, dont le gène codant le récepteur D1, a été invalidé présentent des déficits d'apprentissage spatial (El-Ghundi *et al.*, 1999). Ainsi, ces résultats suggèrent l'implication du récepteur D1 dans les processus de mémorisation au niveau du PFCx. Toutefois, les récepteurs de la famille D2 semblent aussi impliquer. En effet, l'activation concomitante des récepteurs des familles D1 et D2 dans le PFCx augmentent les performances dans des tests de mémoire de travail (Sawaguchi et Goldman-Rakic, 1991, 1994; Arnsten *et al.*, 1995). Des animaux lésés, par infusion de 6-OHDA, au niveau des champs de projection dopaminergique, soit dans le septum, l'amygdale, l'hippocampe ou l'habénula, présentent des déficits de mémorisation dans différents tests comportementaux (Simon *et al.*, 1986; Le Moal et Simon, 1991). Enfin, des expériences de lésion au niveau du PFCx, ont permis de mettre en évidence le rôle de la dopamine dans la régulation de l'attention (Jones et Robbins, 1992). Une telle lésion augmente la libération de DA au niveau des structures sous-corticales, en particulier dans le shell du NAc (Kelly, 1975; Oades *et al.*, 1986), suggérant que la diminution de DA au niveau cortical est associée à des changements au niveau des systèmes sous-corticaux. Chez le singe, une sous-population de neurones dopaminergiques du striatum ventral présentent

des changements d'activité, suite à la mise en place de processus attentionnels dans le PFCx (Boussaoud et Kermadi, 1997), ce qui suggère que le NAc participe au réseau neuronal impliqué dans l'attention.

B. Interaction avec le système GABAergique

L'acide γ -amino-butérique (GABA), est le neurotransmetteur le plus répandu dans le SNC. On évalue à 30% la proportion des synapses du SNC dans lesquelles il intervient. Il véhicule plusieurs types d'inhibition. Il est présent à des concentrations très élevées dans certaines régions du cerveau, notamment dans les ganglions de la base.

Dans ce chapitre, nous allons décrire la neurotransmission GABAergique dans le cadre de ses interactions avec le système dopaminergique, c'est-à-dire au niveau du striatum et du mésencéphale.

1. Le GABA

Le GABA est spécifique du tissu nerveux où on le trouve non seulement dans les neurones, mais aussi dans les cellules gliales.

1.1. Biosynthèse du GABA

Le GABA est formé dans les neurones au niveau des mitochondries par une décarboxylation du glutamate (figure 11). La réaction est catalysée par une enzyme spécifique, la "glutamic acid decarboxylase" ou GAD, dont le coenzyme est le phosphate de pyridoxal (vitamine B6). On dispose de divers inhibiteurs de la GAD, utilisés pour freiner la synthèse de GABA, comme l'allyglycine ou la cyclosérine.

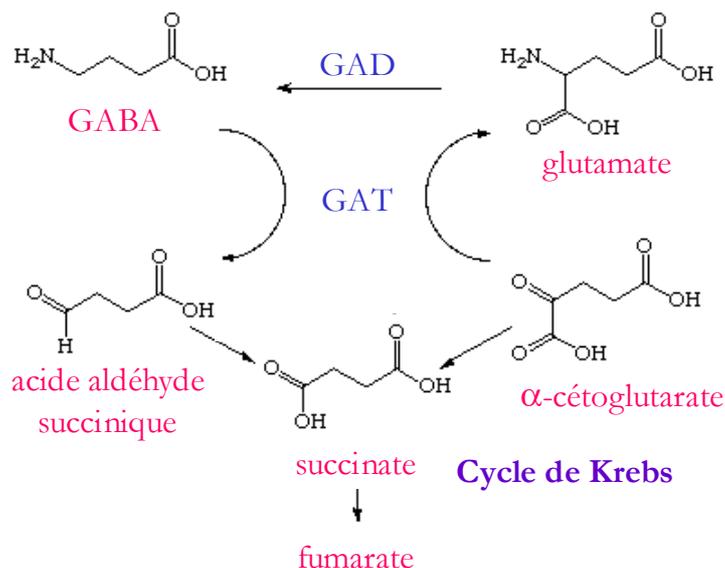


Figure 11 : Métabolisme du GABA.

GAD: "glutamic acid decarboxylase"; GAT: "glutamic acid transaminase".

1.2. Catabolisme du GABA

Après l'exocytose de GABA, il est éliminé de la fente synaptique par re-capture, soit par le neurone pré-synaptique, soit par les cellules gliales avoisinantes. La re-capture est assurée par des transporteurs dépendant d'ions Na^+ et Cl^- , qui sont au nombre de quatre : trois transporteurs neuronaux nommés GAT-1 (Nelson *et al.*, 1990), GAT-2 (Borden *et al.*, 1992) et GAT-3 (Borden *et al.*, 1994), et un transporteur glial nommé BGT-1 (Borden *et al.*, 1995). A l'instar du DAT, ce sont des protéines possédant douze domaines trans-membranaires. La "glutamic acid transaminase" ou GAT, étant absente de l'espace synaptique, l'inactivation du GABA est réalisée à l'intérieur de la cellule au niveau de la mitochondrie, par une réaction de transamination, qui régénère du glutamate, en présence d' α -cétoglutarate (figure 11). Le métabolisme du GABA est donc relié au cycle de Krebs. La GAT, qui a pour coenzyme le phosphate de pyridoxal comme la GAD, peut être inhibée par le valproate, le γ -vinyl-GABA et l' amino-oxyacétate.

2. Les récepteurs du GABA

Le GABA possède trois récepteurs dans le SNC. Deux sont des récepteurs ionotropes couplés à une conductance chlorure, ce sont les récepteurs GABA-A et GABA-C, et un récepteur métabotrope couplé à une protéine G : le récepteur GABA-B (Macdonald et Olsen, 1994; Misgeld *et al.*, 1995; Barnard *et al.*, 1998). Dans le SNC, le récepteur GABA-C est exprimé exclusivement dans la rétine, donc, nous ne le détaillerons pas ici (Zhang *et al.*, 1995).

Les récepteurs GABA-A et GABA-B présentent des propriétés pharmacologiques distinctes. La bicuculline est un antagoniste du récepteur GABA-A, alors que le muscimol est le principal agoniste. Le phaclofène est le principal antagoniste du récepteur GABA-B et le baclofène est le principal agoniste.

2.1. Le récepteur GABA-A

Le récepteur GABA-A possède un canal ionique qui s'ouvre après fixation du GABA sur ses sites, et permet un flux entrant d'ions chlorure qui provoque une hyperpolarisation du neurone (figure 12).

Le récepteur GABA-A possède une pharmacologie très riche. En effet, les benzodiazépines, les barbituriques, les neurostéroïdes, l'alcool, des anesthésiques dont le

propofol, peuvent se lier au récepteur GABA-A sur des sites particuliers et ainsi, moduler son fonctionnement. L'occupation des sites régulateurs peut altérer les caractéristiques d'un autre, donc engendrer une modulation allostérique de la liaison de GABA ou de l'ouverture du canal chlorure (Barnard *et al.*, 1998).

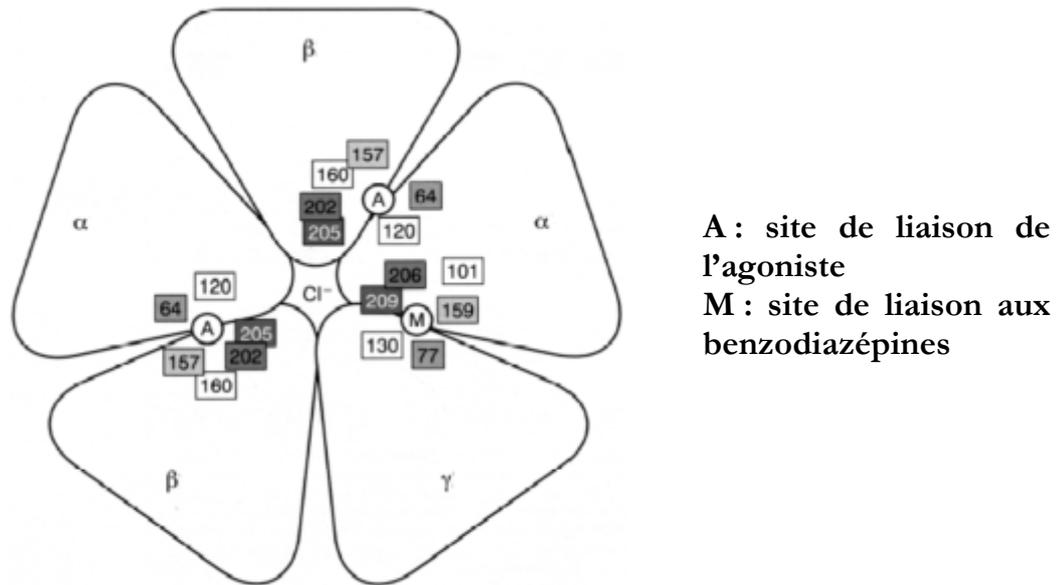


Figure 12 : Représentation schématique de la structure du récepteur GABA-A.

Le récepteur GABA-A est formé de cinq sous-unités, qui sont assemblées autour du canal ionique central. Il appartient à la famille des récepteurs ionotropes pentamériques, dont le chef de file est le récepteur nicotinique de l'acétylcholine. Les sous-unités des récepteurs de cette famille possèdent toutes une grande boucle intracellulaire portant de nombreux sites potentiels de phosphorylation (Macdonald et Olsen, 1994; Belelli *et al.*, 1999).

Treize sous-unités différentes constituant le récepteur GABA-A ont été décrites dans le SNC. Elles ont été classées en quatre types selon leur séquence : on compte six sous-unités α, trois β, trois γ et une sous-unité δ (Sieghart *et al.*, 1999).

Le récepteur GABA-A est localisé principalement dans le cervelet, l'amygdale, l'hypothalamus, le thalamus, la moelle épinière et le cortex cérébral. Dans ces régions, toutes les sous-unités sont exprimées (Pirker *et al.*, 2000). Par contre, dans l'hippocampe, le globus pallidus, la SNr, la SNC, la VTA, le CPu et le NAc, seules certaines sous-unités du récepteur GABA-A semblent présentes (Pirker *et al.*, 2000).

Dans la SNr, le récepteur GABA-A est exprimé au niveau pré- et post-synaptique, mais aussi dans les champs péri-synaptiques (Kneussel, 2002). Dans la VTA et la SNC, il

est présent sur les neurones dopaminergiques (Miralles *et al.*, 1999), bien qu'il puisse être localisé sur les neurones GABAergiques (Churchill *et al.*, 1992; Nicholson *et al.*, 1992). Autant dans le CPU que dans le NAc, il est localisé au niveau pré- et post-synaptique (Fujiyama *et al.*, 2002). Le récepteur GABA-A est exprimé dans les inter-neurones cholinergiques, en plus des neurones GABAergiques épineux de taille moyenne (Rodriguez-Pallares *et al.*, 2000). Mais, il est difficile de conclure quant à sa localisation sur les projections dopaminergiques innervant le striatum (Rodriguez-Pallares *et al.*, 2000).

Le propofol (2,6-diisopropylphénol, Diprivan®) est un agent anesthésique utilisé en médecine humaine. Il est administré par voie intraveineuse pour maintenir des anesthésies générales depuis le milieu des années 1980. Les patients anesthésiés au propofol décrivent à leur réveil, des effets positifs sur l'humeur, une certaine euphorie, voire un état d'enivrement. Il est intéressant de noter qu'un cas de dépendance au propofol, utilisé à une dose sub-anesthésique, a été décrit dans la littérature (Zacny *et al.*, 1993b).

Sur le plan pharmacologique, le propofol possède plusieurs cibles. Il est très probable qu'il se lie au récepteur GABA-A et module son activité, une propriété partagée avec d'autres anesthésiques (Belelli *et al.*, 1999; Krasowski et Harrison, 1999; Trapani *et al.*, 2000). Des études électrophysiologiques ont montré que, le propofol augmentait l'action du GABA, en se liant au récepteur GABA-A (Hales et Lambert, 1991). Il prolonge aussi les courants post-synaptiques inhibiteurs, médiés par ce récepteur, et altère sa désactivation et sa désensibilisation (Bai *et al.*, 1999). A fortes doses, le propofol a la capacité d'ouvrir le canal ionique du récepteur GABA-A, même en l'absence de GABA; ce phénomène est appelé "activation directe" (Hales et Lambert, 1991; Hara *et al.*, 1993).

Mais, le propofol a également d'autres effets, comme antagoniser le récepteur NMDA du glutamate, ou de bloquer les canaux Na⁺ et Ca²⁺ sensibles au voltage (Ratnakumari et Hemmings, 1996; Hirota *et al.*, 2000). Nous décrivons l'action sur le récepteur NMDA ultérieurement (paragraphe II.C.2.1.1).

2.2. Le récepteur GABA-B

Le récepteur GABA-B provoque une dépression synaptique et contribue à l'inhibition neuronale. Il est couplé à une protéine Gi/o et à divers systèmes d'effecteurs intracellulaires, dont l'activation du canal potassique GIRK ("G-protein activated inwardly

rectifying K⁺"), l'inhibition des canaux calciques dépendant du voltage de type L et N, la stimulation de la phospholipase A2, l'inhibition de l'adénylyl cyclase et l'activation de la phospholipase C (Misgeld *et al.*, 1995). C'est une protéine d'environ 80 kDa, qui comporte sept domaines trans-membranaires (figure 13).

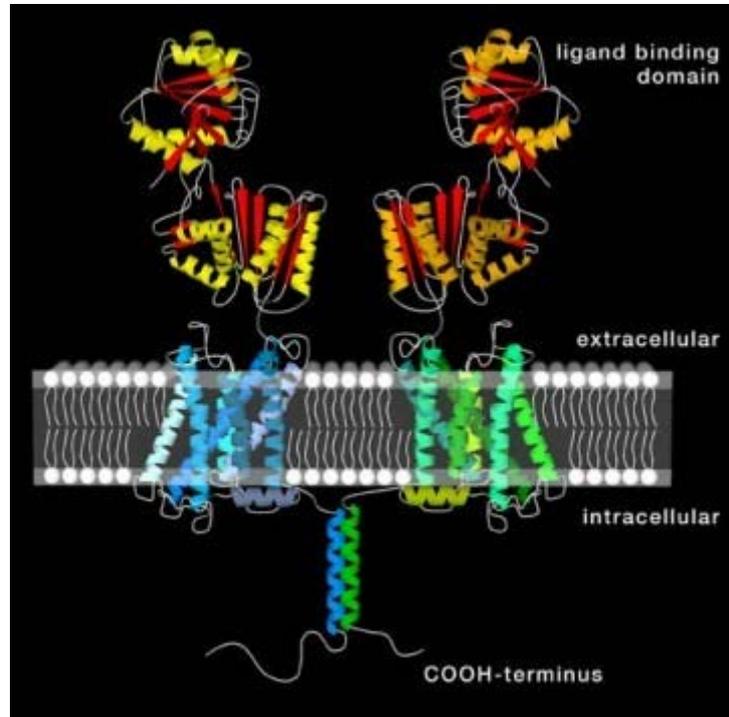


Figure 13: Modèle tridimensionnel du récepteur GABA-B fonctionnel formé d'un hétérodimère des sous-unités GABA-B1 et GABA-B2.

Deux gènes ont été caractérisés comme codant le récepteur GABA-B : GABA-B1 et GABA-B2. Le récepteur GABA-B1 existe sous deux isoformes, nommées GABA-B1a et GABA-B1b, qui résultent d'un épissage alternatif à partir du même gène (Bowery et Brown, 1997; Kaupmann *et al.*, 1997; Isomoto *et al.*, 1998; Pfaff *et al.*, 1999; Schwarz *et al.*, 2000). Le récepteur GABA-B2 peut s'associer au récepteur GABA-B1, pour former un hétérodimère (White *et al.*, 1998) (figure 13).

Les différentes isoformes sont très exprimées dans le cortex cérébral de rats adultes (Munoz *et al.*, 2001). Des études en microscopie électronique révèlent que le récepteur GABA-B est présent au niveau de synapses excitatrices et inhibitrices. Sur le plan sub-cellulaire, il est localisé dans les zones pré- et post-synaptiques, mais aussi en dehors des contacts synaptiques (Gonchar *et al.*, 2001; Kulik *et al.*, 2002). Des études pharmacologiques et électrophysiologiques ont montré que, l'activation du récepteur GABA-B supprimait l'exocytose de neurotransmetteur dans le néo-cortex, en inhibant l'influx de Ca²⁺, via des canaux calciques pré-synaptiques (Howe *et al.*, 1987; Deisz *et al.*,

1993). Au niveau post-synaptique, il diminue l'excitabilité neuronale, en activant un canal K^+ (Kaupmann *et al.*, 1998).

Le récepteur GABA-B est présent sur les neurones dopaminergiques de la SNc et de la VTA (Wirtshafter et Sheppard, 2001). Au niveau de la SNr, il a une localisation pré-synaptique, puisqu'il est co-localisé avec la parvalbumine, un marqueur des neurones GABAergiques (Wirtshafter et Sheppard, 2001). L'isoforme GABA-B1 est beaucoup plus exprimée dans ces régions mésencéphaliques que l'isoforme GABA-B2 (Ng et Yung, 2000). Au niveau du striatum, le récepteur GABA-B1 est exprimé dans tous les types de neurones : neurones épineux de taille moyenne, inter-neurones GABAergiques et cholinergiques. Une étude en microscopie électronique montre qu'il est présent dans différentes terminaisons innervant le striatum (Charara *et al.*, 2000). Le récepteur GABA-B2 présente une localisation plus restreinte, puisqu'il n'est exprimé qu'au niveau des terminaisons dopaminergiques innervant le striatum (Ng et Yung, 2001). La signification de la distribution hétérogène des isoformes du récepteur GABA-B est controversée.

3. Le système GABAergique

Les deux types de récepteurs GABA sont à l'origine d'une très grande part des activités inhibitrices du SNC. Le nombre très important de voies de projection ou de voies locales impliquant le GABA témoigne de la multiplicité des rôles de ce neurotransmetteur, qui participe entre autres, à la régulation de la motricité et des fonctions cognitives.

3.1. Description anatomique des neurones GABAergiques

Nous ne détaillerons le système anatomique GABAergique qu'au niveau des interactions avec le système dopaminergique, c'est-à-dire dans le striatum et le mésencéphale. En effet, de nombreux neurones et inter-neurones GABAergiques ont leurs corps cellulaires ou projettent dans ces régions cérébrales.

3.1.1. Dans le striatum

Les neurones épineux de taille moyenne sont GABAergiques (Nagai *et al.*, 1983; Oertel et Mugnaini, 1984) et représentent 90% de l'ensemble des neurones du striatum (Kemp et Powell, 1971b). Ce sont les neurones de projection du striatum. Ils possèdent

de très nombreuses épines dendritiques, et une arborisation axonale locale abondante et ont un diamètre d'environ 15 μm (Kemp et Powell, 1971a ; Wilson et Groves, 1980). Des études immunohistochimiques ont détecté dans ces neurones, la présence de peptides tels que des tachykinines dont la substance P (SP) et la neurokinine A (Kanazawa *et al.*, 1977), les enképhalines (Enk) (Sar *et al.*, 1978) et les dynorphines (Vincent *et al.*, 1982). Certains de ces peptides coexistent dans les mêmes neurones. En effet, il semble que 90% des neurones expriment la SP et les dynorphines (Anderson et Reiner, 1990; Besson *et al.*, 1990). Par contre, les neurones exprimant les Enk ne synthétisent pas d'autres neuropeptides.

Les récepteurs D1 de la dopamine sont à plus de 90% exprimés dans les neurones GABAergiques synthétisant la SP (Gerfen *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1991), alors que les récepteurs D2 sont très majoritairement exprimés dans les neurones à Enk (Gerfen *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1991).

Les deux types de récepteurs GABA sont eux aussi exprimés dans les neurones épineux de taille moyenne. Certaines sous-unités du récepteur GABA-A sont exprimées dans l'arbre dendritique de ces neurones (Schwarzer *et al.*, 2001). Le récepteur GABA-B1 est exprimé dans toutes les populations neuronales du striatum, aussi bien sur les membranes pré- que post-synaptiques (Yung *et al.*, 1999). Par contre, le récepteur GABA-B2 semble exprimer que sur les terminaisons dopaminergiques innervant le striatum.

On trouve une deuxième catégorie de neurones GABAergiques dans le striatum : les inter-neurones non épineux de taille moyenne à grande (Bolam *et al.*, 1983; Oertel et Mugnaini, 1984). Leurs dendrites présentent souvent des varicosités. Ces inter-neurones représentent environ 3% des inter-neurones du striatum. Ils sont immunoréactifs à la parvalbumine, comme les neurones épineux de taille moyenne (Gerfen *et al.*, 1985; Cowan *et al.*, 1990; Kita *et al.*, 1990). Certains d'entre eux expriment également le neuropeptide Y (Vuillet *et al.*, 1989) ou la somatostatine (Smith et Parent, 1986). Certaines sous-unités du récepteur GABA-A sont présentes au niveau dendritique, mais il ne s'agit sans doute pas des sous-unités exprimées dans les neurones épineux de taille moyenne (Schwarzer *et al.*, 2001). Le récepteur D1 est exprimé dans ces inter-neurones, mais pas le récepteur D2 (Bracci *et al.*, 2002).

3.1.2. Dans le mésencéphale

De nombreux neurones et inter-neurones GABAergiques sont présents dans le mésencéphale : les neurones de projection vers le thalamus sont de forme ronde avec un diamètre de 20 à 22 μm (Rodriguez et Gonzalez-Hernandez, 1999) et les inter-neurones GABAergiques du mésencéphale sont de forme plus allongée et ont un diamètre plus petit, de 13 à 15 μm . Les neurones GABAergiques sont majoritairement présents dans la SNr et expriment des auto-récepteurs GABA-A et GABA-B. Ce sont les neurones de projection de la SNr. Par contre, au niveau de la SNc et de la VTA, on ne trouve pas de neurones de projection GABAergiques, mais uniquement des inter-neurones qui régulent l'activité des neurones dopaminergiques. On retrouve d'ailleurs, dans ces structures, les récepteurs GABA majoritairement en position post-synaptique sur les neurones dopaminergiques. Il s'agit de nombreuses sous-unités du récepteur GABA-A (Schwarzer *et al.*, 2001) et de l'isoforme GABA-B1.

3.2. Les principales voies GABAergiques

Le GABA étant le neurotransmetteur inhibiteur le plus répandu du SNC, il possède de nombreuses voies de projection qui sont résumées dans la figure 14. Nous ne détaillons dans ce manuscrit que les voies de projection en relation avec le système dopaminergique.

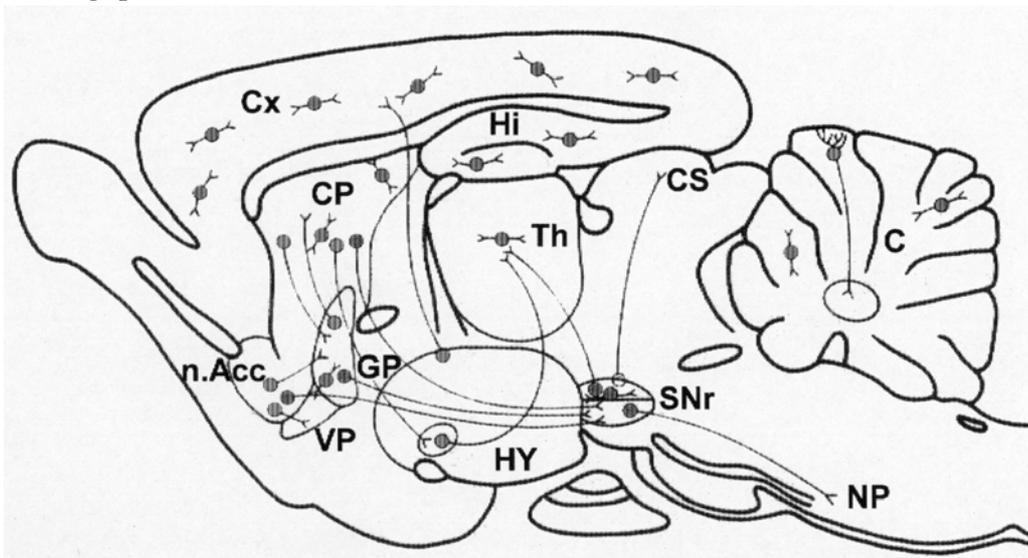


Figure 14 : Les principales projections GABAergiques dans le cerveau de rat. Cx: cortex cérébral; Hi: hippocampe; CP: noyau caudé-putamen; n.Acc: noyau accumbens; VP: pallidum ventral; GP: globus pallidus; HY: hypothalamus; Th: thalamus; CS: colliculus supérieur; SNr: substance noire pars reticulata; NP: noyaux pontiques; C: cervelet.

Les axones des neurones épineux de taille moyenne constituent la voie de sortie du striatum (figure 15).

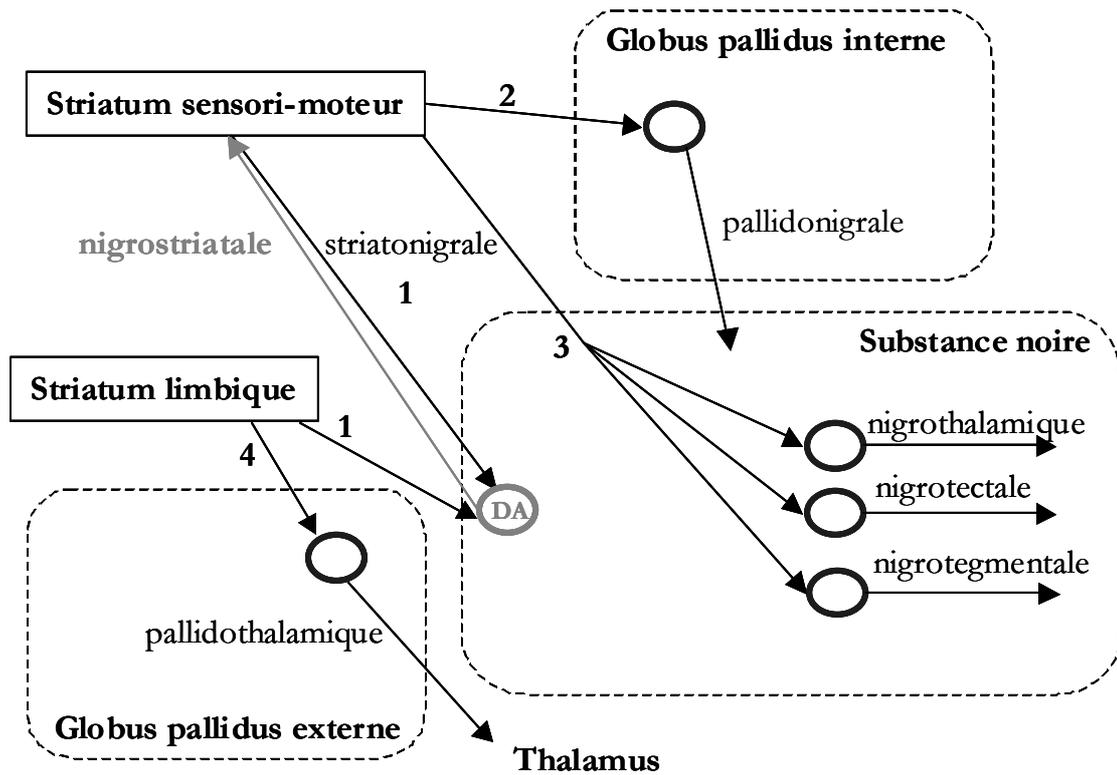


Figure 15 : Schéma des efférences GABAergiques striatales. D'après Smith et Bolam (1989) avec modifications.

Les efférences GABAergiques innervent la SNr et le globus pallidus externe et interne. Mais, il existe des différences notables entre les neuropeptides libérés avec le GABA. La voie striatonigrale (1) contient de la SP et/ou de la dynorphine, alors que la voie striatopallidale (2) contient de l'Enk. On distingue quatre types de projections originaires des neurones épineux de taille moyenne du striatum. La voie GABAergique striatonigrale directe (1) entraîne un effet inhibiteur sur les neurones de la SN (Chevalier et Deniau, 1990), alors que la voie GABAergique striato-pallido-nigrale (indirecte) (2) est à l'origine d'une désinhibition des neurones de la SN, parce que la voie pallido-nigrale est également GABAergique (Smith et Bolam, 1989). On distingue également des neurones projetant sur la SNr, puis sur les aires pré-motrices sous-corticales (3) (tectum et tegmentum). Il existe également des neurones GABAergiques projetant sur le globus pallidus externe (4), projetant eux-mêmes sur le thalamus, et qui en retour forme la boucle de rétro-contrôle vers le cortex.

C. Interaction avec le système glutamatergique

Le glutamate (Glu) est le principal neurotransmetteur excitateur du SNC. En effet, plus de 40% des synapses excitatrices sont glutamatergiques. Il est présent à des concentrations très élevées dans certaines régions du cerveau, notamment dans le cortex cérébral et l'hippocampe, et intervient dans de nombreux phénomènes physiologiques, tels que la plasticité synaptique, les fonctions cognitives et le développement du système nerveux. Il est aussi le principal neurotransmetteur impliqué dans l'excitotoxicité neuronale.

Dans ce chapitre, nous détaillerons la neurotransmission glutamatergique dans le cadre de ses interactions avec le système dopaminergique, c'est-à-dire au niveau du striatum et du PFCx.

1. Le glutamate

Le glutamate (Glu) est un acide aminé naturel (sous la forme isomère L). C'est l'acide α -amino-glutarique (figure 16). Il participe à la constitution des protéines et intervient dans diverses réactions du métabolisme cellulaire.

1.1. Métabolisme du glutamate

Le Glu est un acide aminé non-essentiel, donc synthétisé par l'organisme, mais comme il ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique, il ne peut être apporté par la circulation et est élaboré dans le SNC. Les voies de biosynthèse du Glu sont en relation étroite avec le cycle de Krebs et la voie de biosynthèse du GABA (figure 16).

Il peut être produit par transamination de l' α -cétoglutarate par la glutamate déshydrogénase (GDH) ou par déamination de la glutamine par la glutaminase. L'importance relative de ces voies n'est pas bien connue et pourrait d'ailleurs, changer selon les régions cérébrales considérées.

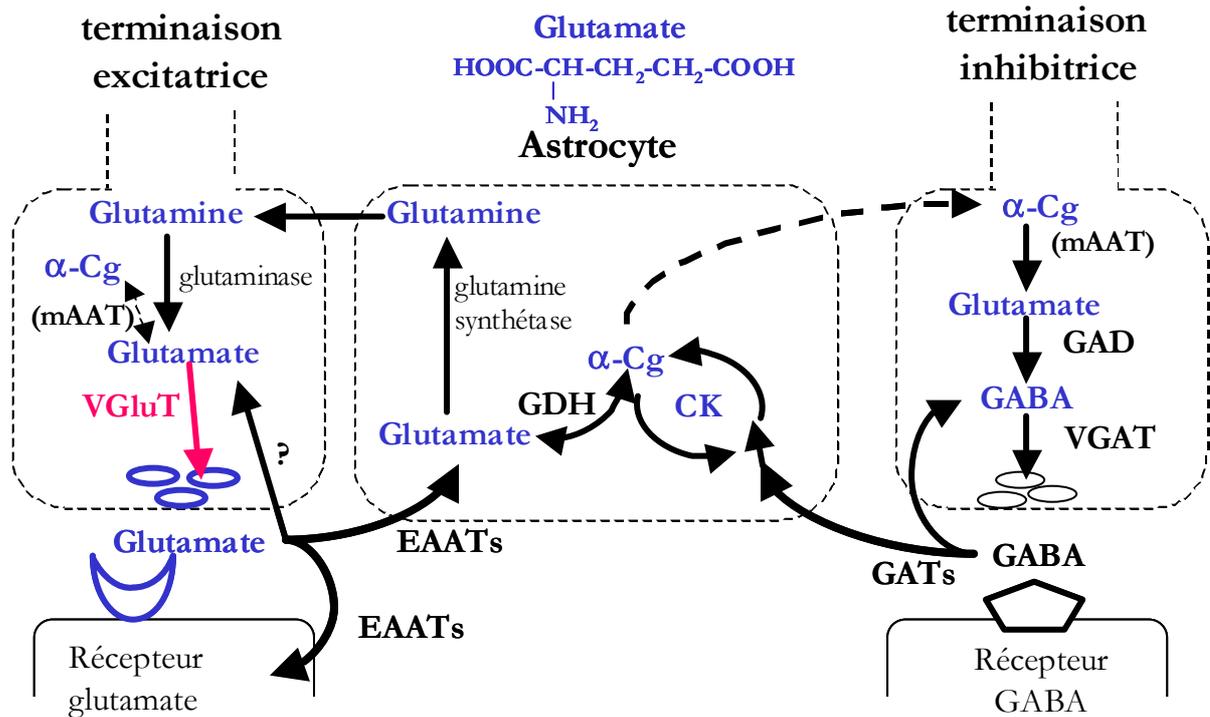


Figure 16 : Synthèse et métabolisme du glutamate et du GABA dans le cerveau. D'après Kaneko et Mizuno (1994) avec modifications.

GAD: "glutamate acid decarboxylase"; VGAT: "vesicular GABA transporter"; GAT: "plasma membrane GABA transporter"; GDH: "glutamate deshydrogenase"; mAAT: "mitochondrial aspartate aminotransferase"; EAAT: "plasma membrane excitatory amino acid transporter"; VGlut: "vesicular glutamate transporter"; α -Cg: α -cétoglutarate; CK: cycle de Krebs.

1.2. Stockage du glutamate

On trouve le Glu du système nerveux dans trois compartiments : extracellulaire, cytosolique et vésiculaire, respectivement à des concentrations de 1 μM , 10 mM et 100 mM. Ces compartiments ne sont pas indépendants, du fait de l'existence d'un système de transporteurs membranaires très actifs. Les propriétés des transporteurs de la membrane plasmique nommés EAATs ("plasma membrane excitatory amino acid transporter") se distinguent de celles des transporteurs de la paroi vésiculaire nommés VGlut ("vesicular glutamate transporter") par leur affinité et leur spécificité. Ces transporteurs sont représentés dans la figure 17.

Deux transporteurs vésiculaires du Glu ont été décrits : VGlut1 (initialement appelé "brain-specific Na^+ -dependent inorganic phosphate cotransporter" ou BNPI; Kanai *et al.*, 1994) et VGlut2 (initialement appelé "differentiation-associated Na^+ -dependent inorganic phosphate cotransporter" ou DNPI; Aihara *et al.*, 2000). Ces

transporteurs possèdent six domaines trans-membranaires (Kanai *et al.*, 1994). Ils sont localisés au niveau des terminaisons axonales glutamatergiques et représentent donc des marqueurs de ces neurones. Par contre, ces deux transporteurs ne sont pas exprimés dans les mêmes structures cérébrales. VGluT1 est majoritairement exprimé dans les couches corticales, l'hippocampe et le CPU alors que VGluT2 est exprimé principalement dans le diencéphale et dans des régions du tronc cérébral (Bellocchio *et al.*, 1998).

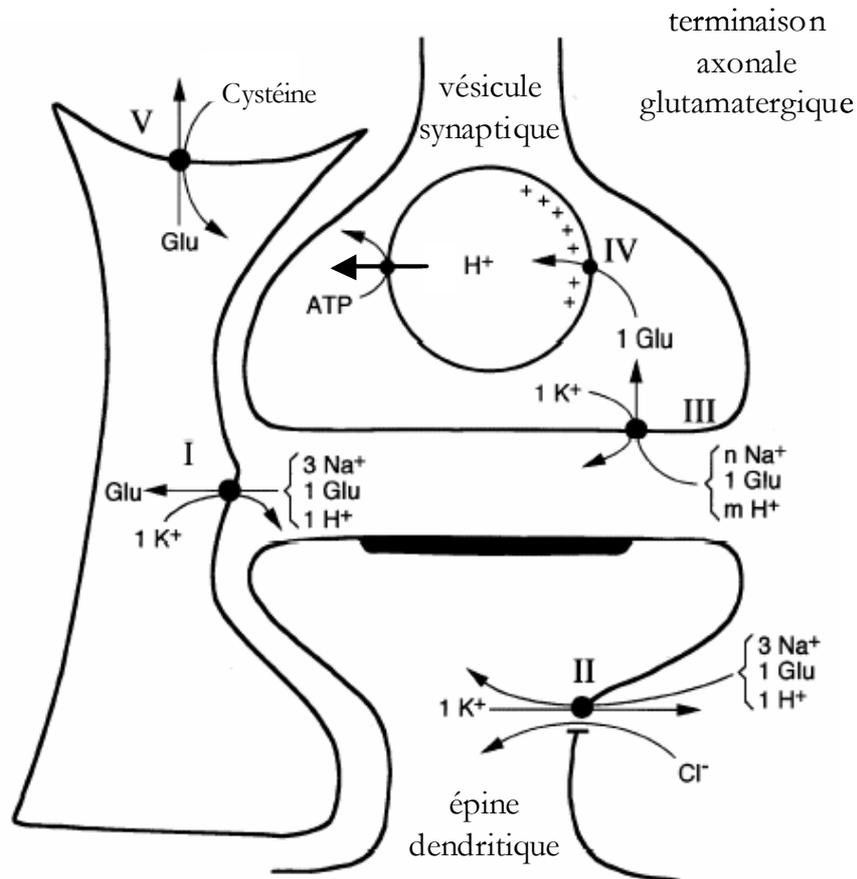


Figure 17 : Les différents transporteurs du glutamate. D'après Danbolt (2001).

I. Transporteur du Glu sur les membranes plasmiques des cellules gliales. II. Transporteur du Glu présent sur les neurones post-synaptiques. III. Transporteur du Glu présent sur les terminaisons nerveuses pré-synaptiques. IV. Transporteur vésiculaire du Glu nommé VGluT1 et VGluT2. V. La cystéine est transportée dans les cellules en échange du Glu.

1.3. Re-capture et catabolisme du glutamate

Après sa libération par exocytose, le Glu est rapidement éliminé de la fente synaptique. Ceci évite d'induire la toxicité. Dans le milieu extracellulaire, il n'existe pas de mécanisme de dégradation du Glu. Par contre, il peut être re-capturé par des transporteurs présents sur les membranes plasmiques au niveau des éléments pré- et post-

synaptiques, mais également par les cellules gliales avoisinantes, principalement les astrocytes (figure 17). A ce jour, trois types de transporteurs plasmiques ont été décrits : ceux à haute affinité, ceux à faible affinité et les échangeurs cystéine-Glu. Les transporteurs à haute affinité sont couplés au flux de Na^+ et H^+ et sont au nombre de cinq, nommés EAAT1 à EAAT5. L'existence de transporteurs à faible affinité est très controversée. Il semble toutefois qu'il existe des transporteurs du Glu indépendant du flux de Na^+ , possédant des propriétés distinctes de celles des transporteurs à haute affinité (Danbolt, 2001). Enfin, des échangeurs cystéine-Glu présents sur les membranes plasmiques des astrocytes, permettent l'entrée de cystéine dans les cellules contre la sortie de Glu.

Une fois re-capturé du milieu extracellulaire, le Glu peut être transformé en glutamine par la glutamine synthétase, stocké dans les vésicules synaptiques, ou être utilisé pour la synthèse de GABA (figure 16).

2. La synapse glutamatergique

Les récepteurs du Glu sont responsables de la neurotransmission excitatrice dans le SNC des mammifères. Ils participent aux modifications de l'efficacité de la transmission synaptique sous-tendant les mécanismes de la mémoire et de l'apprentissage.

Deux classes principales de récepteurs du Glu peuvent être distinguées, les métabotropes (mGluR) et les ionotropes (iGluR). Ces derniers sont divisés en trois groupes : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA), kaïnate et N-méthyl-D-aspartate (NMDA). A ce jour, ont été clonés huit gènes codant des récepteurs métabotropes et quatorze des récepteurs ionotropes dans le SNC des mammifères. Quatre sous-unités ont été isolées formant le récepteur AMPA, nommées GluR1 à GluR4, cinq constituant le récepteur kaïnate nommées GluR5, GluR6, GluR7, KA1 et KA2 et cinq pour le récepteur NMDA nommées NR1, NR2A, NR2B, NR2C et NR2D. Les sous-unités des récepteurs métabotropes ont été nommées mGluR1 à mGluR8.

2.1. Les récepteurs ionotropes du glutamate (iGluR)

Sur la base de la spécificité des agonistes, on a séparé les récepteurs ionotropes du Glu en trois groupes: les récepteurs AMPA, kaïnate et NMDA. Cependant, la pharmacologie des récepteurs AMPA et kaïnate a montré que ces récepteurs n'avaient pas

d'antagonistes spécifiques et de ce fait, il est convenu de les replacer dans la même sous-classe des récepteurs non-NMDA.

Toutes les sous-unités des iGluR ont en commun un grand domaine N-terminal extracellulaire, trois segments trans-membranaires et un domaine C-terminal intracellulaire (Laube *et al.*, 1997).

2.1.1. Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA fonctionnels sont des hétérodimères composés d'une sous-unité NR1 et d'une sous-unité NR2. Il existe donc de multiples compositions du récepteur NMDA. Le canal ionique présente une très haute perméabilité au Ca^{2+} , tandis que le Mg^{2+} le bloque (Ascher et Nowak, 1988). La glycine est un co-agoniste indispensable à l'activation du récepteur NMDA (Vyklicky *et al.*, 1990). Selon leurs sites d'action sur le récepteur NMDA, les antagonistes sont classés en quatre groupes : ceux agissant sur le site de reconnaissance NMDA (Glu), ceux qui se lient au site de liaison de la glycine, ceux agissant sur le site de liaison intra-canal et ceux modulant d'autres sites, tels que le site Zn^{2+} , le site sensible au H^+ ou le site de liaison des polyamines (Sucher *et al.*, 1996).

Les récepteurs NMDA sont distribués dans l'ensemble du SNC, avec une présence prépondérante dans le cerveau antérieur. On trouve les plus hauts niveaux d'expression dans l'aire CA1 de l'hippocampe. Dans le cerveau des rongeurs, la sous-unité NR1 est localisée de façon ubiquitaire, alors que les sous-unités NR2 présentent des localisations spécifiques de certaines régions. Ainsi, la sous-unité NR2A est principalement exprimée dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet. La sous-unité NR2B est présente sélectivement dans le cerveau antérieur avec un haut niveau d'expression dans le cortex cérébral, le septum, le CPU et les bulbes olfactifs. La sous-unité NR2C est localisée de façon prépondérante dans les cellules de la couche granulaire du cervelet et la sous-unité NR2D est localisée, quoique à de très faibles niveaux, dans le thalamus, le tronc cérébral et les bulbes olfactifs. On retrouve toutes les sous-unités du récepteur NMDA dans les densités post-synaptiques, mais pas dans les terminaisons pré-synaptiques.

Le récepteur NMDA permet l'entrée massive de Ca^{2+} dans l'élément post-synaptique, ce qui initie des changements plastiques des connexions synaptiques. Le récepteur NMDA se trouve ainsi impliqué dans les mécanismes responsables de la plasticité synaptique, tels que la potentialisation à long terme (LTP) ou la dépression à

long terme (LTD), notamment dans l'hippocampe et le néo-cortex (Bliss et Collingridge, 1993).

Le fonctionnement anormal du récepteur NMDA peut mener à une variété de désordres neurologiques. Ainsi, la sur-activation de ces récepteurs peut conduire à la mort neuronale dans les attaques ischémiques, les crises épileptiques et les chocs traumatiques (Choi et Rothman, 1990). La neurotoxicité du Glu est principalement due à l'entrée excessive de Ca^{2+} dans les cellules, responsables de la mort neuronale. Les antagonistes de ces récepteurs ont parfois été considérés comme des agents thérapeutiques neuroprotecteurs. Mais, les antagonistes non-compétitifs, tels que la phencyclidine ou le MK-801 induisent des effets psychotiques et cytotoxiques (Olney, 1994). Cet effet est à rapprocher au fait que l'hypo-fonction de ces récepteurs peut provoquer un état psychotique proche de la schizophrénie (Javitt et Zukin, 1991).

La kétamine (forme chlorhydrate du [2-(2-chlorophényl)-2-(méthylamino)-cyclohexanone]), Imalgene®) est un agent anesthésique utilisé en médecine humaine et présente des propriétés similaires à la phencyclidine (Krystal *et al.*, 1994). C'est un antagoniste non-compétitif du récepteur NMDA, qui se lie à l'intérieur du canal NMDA ouvert et bloque le flux de Ca^{2+} (Blanpied *et al.*, 1997).

En plus de ses propriétés agonistes sur le récepteur GABA-A, le propofol présente des effets antagonistes du récepteur NMDA (Yamakura *et al.*, 1995). En effet, à une dose anesthésique, il est capable de réduire, bien que faiblement, l'activité du récepteur NMDA. Il est également décrit comme régulant l'activité de canaux Na^+ et Ca^{2+} , qui contribuerait à ses actions anesthésiques, amnésiques et anti-convulsives.

2.1.2. Les récepteurs non NMDA

Les propriétés du canal ionique des récepteurs non-NMDA sont moins bien caractérisées que celles du récepteur NMDA. En effet, les courants de ces récepteurs sont de plus faible amplitude, la durée d'ouverture du canal est très brève et enfin, les récepteurs non-NMDA adoptent de multiples états après leur activation.

Le récepteur AMPA, nommé initialement récepteur quisqualate, est fonctionnellement soit un homo- soit un hétérodimère. Le récepteur-canal AMPA présente une très forte perméabilité aux ions Na^+ et K^+ et une très faible perméabilité au Ca^{2+} (Ozawa et Iino, 1993). Il est localisé de façon ubiquitaire dans le SNC, mais on note des différences de son taux d'expression. Ainsi, il est exprimé très fortement dans l'aire

CA1 de l'hippocampe, le gyrus denté et les couches superficielles du cortex cérébral. A un niveau moyen d'expression, on le trouve dans les couches profondes du cortex cérébral et le CPU et enfin, à faible niveau, il est localisé dans le diencéphale, le mésencéphale et le tronc cérébral (Olsen *et al.*, 1987). Il est présent exclusivement dans les densités post-synaptiques. Le récepteur AMPA est nécessaire à l'action du Glu sur le récepteur NMDA. De façon générale, l'activation du récepteur AMPA par le Glu provoque une dépolarisation rapide et transitoire du neurone et ainsi, lève l'inhibition du Mg^{2+} sur le récepteur NMDA. Ce dernier devient perméable au Ca^{2+} , dont l'entrée massive provoque la dépolarisation du neurone post-synaptique (Desce *et al.*, 1992; Raiteri *et al.*, 1992).

Quant au récepteur kaïnate, il présente une très forte perméabilité au Ca^{2+} , sous forme d'homodimère GluR5 ou GluR6. Mais, les autres homo- ou hétérodimères présentent une perméabilité plus forte aux ions monovalents Na^+ et K^+ . Toutes les sous-unités sont exprimées dans le SNC, avec toutefois une répartition hétérogène. Les sous-unités KA1 et KA2 sont majoritairement exprimées dans l'aire CA3 et le gyrus denté de l'hippocampe. La sous-unité GluR5 est localisée dans le cortex piriforme et cingulaire et dans les cellules de Purkinje du cervelet. La sous-unité GluR6 est abondante dans les cellules de la couche granulaire du cervelet et est exprimée plus faiblement dans le CPU et l'hippocampe. La sous-unité GluR7 est présente dans les couches corticales profondes, le cortex cingulaire et le CPU. Chacune de ces sous-unités est exprimée non seulement dans les densités post-synaptiques, mais aussi au niveau pré-synaptique. Des sous-unités des récepteurs AMPA et kaïnate peuvent co-exister dans un même neurone (Wenthold *et al.*, 1994). Nos connaissances sur les propriétés fonctionnelles du récepteur kaïnate sont limitées, principalement à cause du manque de pharmacologie spécifique permettant de distinguer le récepteur AMPA du récepteur kaïnate. Toutefois, il a été suggéré que le récepteur kaïnate pré-synaptique régulerait négativement la libération de Glu (Malva *et al.*, 1995).

2.2. Les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR)

Les mGluR forment une superfamille de récepteurs couplés aux protéines G, qui inclut aussi le récepteur sensible au Ca^{2+} de la glande parathyroïde. Les huit sous-types de mGluR ont été regroupées en trois groupes selon leur séquence. Ainsi, le groupe I comprend mGluR1 et mGluR5, le groupe II mGluR2 et mGluR3 et le groupe III

mGluR4, mGluR6, mGluR7 et mGluR8 (Pin et Duvoisin, 1995). Cette classification tient compte aussi des cascades de transduction auxquelles ils sont associées, et de leur pharmacologie respective. Ainsi, le groupe I est couplé à l'activation de la phospholipase C, mais mGluR1 est aussi couplé positivement à l'adénylyl cyclase (Aramori et Nakanishi, 1992). Les groupes II et III sont couplés à une protéine G_i , négativement au système de l'adénylyl cyclase (Duvoisin *et al.*, 1995). Une des fonctions principales des mGluRs est de réduire la transmission glutamatergique du neurone pré-synaptique. Les mGluRs jouent également un rôle d'hétéro-récepteurs impliqués dans la réduction de la libération de GABA. Par contre, de part leur localisation post-synaptique, ils jouent un rôle important dans la régulation de l'excitabilité neuronale et des conductances ioniques mises en jeu par les iGluRs. La localisation et l'implication des mGluRs dans le circuit des ganglions de la base, notamment sur la voie nigrostriée dopaminergique est résumée dans la figure 18.

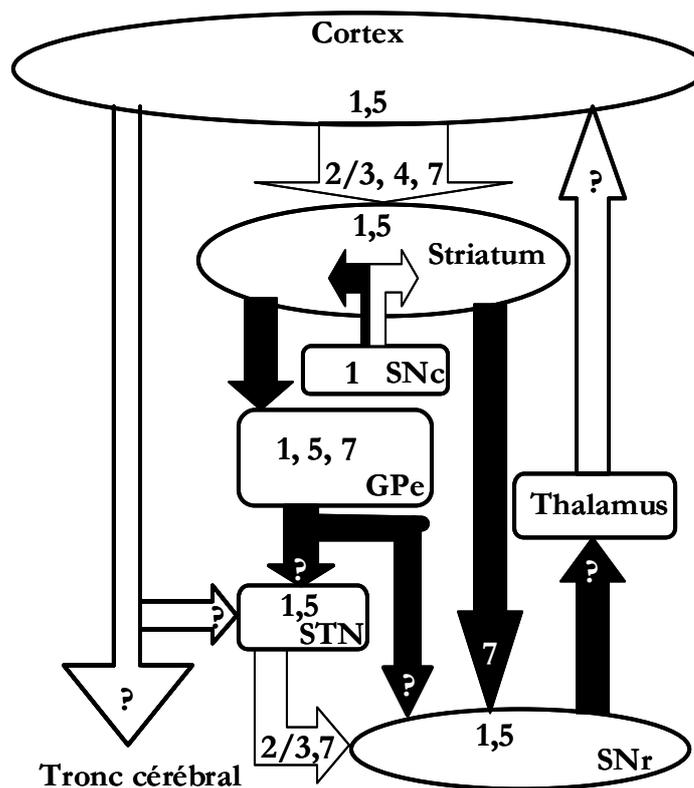


Figure 18 : Schéma illustrant la localisation des récepteurs métabotropes du glutamate dans le circuit des ganglions de la base. D'après Rouse *et al.* (2000). Les chiffres indiquent le sous-type de mGluR soit en position pré-, soit post-synaptique. Les flèches noires montrent les projections inhibitrices et les flèches blanches les projections excitatrices. GPe : globus pallidus externe ; SNc : substance noire compacte ; SNr : substance noire réticulée ; STN : noyau sous-thalamique.

3. Le système glutamatergique

La neurotransmission glutamatergique est impliquée dans de nombreux phénomènes physiologiques. Dans ce paragraphe, nous décrirons principalement les interactions DA-Glu.

3.1. Au niveau du cortex pré-frontal

L'ensemble du néo-cortex, dont le PFCx, peut être divisé en six couches cellulaires. La couche I est la couche superficielle. Elle est composée en majorité de cellules gliales et de quelques corps cellulaires de neurones GABAergiques. La couche II est constituée en majorité de petits neurones pyramidaux, tandis que la couche III est constituée de neurones pyramidaux de grande taille. Ces deux couches constituent les voies de sortie vers les autres aires corticales. La couche IV est très riche en neurones étoilés et constitue la zone cérébrale recevant le plus d'afférences provenant du thalamus. La couche V est riche en neurones pyramidaux et constitue la voie de sortie vers le striatum, le tronc cérébral et la moelle épinière. La couche VI est riche en neurones pyramidaux projetant vers le thalamus. Les neurones pyramidaux synthétisent et libèrent le Glu. Ils sont entourés d'interneurones GABAergiques (Kandel et Schwartz, 1987).

Récemment, une modulation différentielle par la dopamine sur les réponses post-synaptiques NMDA dans le PFCx a été décrite (Seamans *et al.*, 2001). Dans cette structure cérébrale, le récepteur D1 est vingt fois plus abondant que le récepteur D2 (Goldman-Rakic *et al.*, 1990). La dopamine, par son action sur les récepteurs D1, augmente l'excitabilité des neurones pyramidaux (Henze *et al.*, 2000), en augmentant un courant Na^+ et en inactivant un courant K^+ (Gorelova et Yang, 2000). Les réponses NMDA se trouvent potentialisées par de faibles concentrations de DA, par l'activation des récepteurs D1, alors que de fortes concentrations de DA les réduisent en activant les récepteurs D2.

En modulant la neurotransmission GABAergique, la DA peut aussi indirectement influencer la neurotransmission glutamatergique. En effet, l'activation des récepteurs D1 provoque l'inhibition indirecte de la transmission du Glu, via l'activation d'interneurones GABAergiques corticaux (Grobin et Deutch, 1998). Il est probable que par cet effet, la DA diminue la génération des potentiels d'action des neurones pyramidaux dans la couche V (Gulledge et Jaffe, 2001). De nombreuses études ont montré que la DA était

impliquée dans la plasticité synaptique. Ainsi, l'action excitatrice des agonistes du récepteur D1 sur les neurones pyramidaux du PFCx semble être primordiale pour l'induction de la LTP dans la voie hippocampo-corticale, voie qui est impliquée dans la formation de la mémoire de travail (Laroche *et al.*, 2000). D'autre part, la DA facilite, probablement par une action de type D2, la LTD des afférences glutamatergiques sur la couche III du PFCx induite par une stimulation téτανique (Otani *et al.*, 1998). En effet, les récepteurs D2 et les récepteurs mGluR des groupes II et III sont connus pour coopérer dans l'induction de la LTD dans les couches superficielles du PFCx (Otani *et al.*, 1999).

3.2. Au niveau du striatum

Au niveau du striatum, l'activité des neurones GABAergiques est régulée par les afférences glutamatergiques provenant de l'hippocampe, du PFCx et de l'amygdale, elles-même modulées par la DA. En effet, la voie DA mésocorticolimbique régule la transmission glutamatergique, notamment au niveau du NAc. Cette modulation joue un rôle essentiel dans le comportement motivationnel, associé à l'auto-administration de drogues (Di Chiara *et al.*, 1992). L'amygdale, quant à elle, semble essentielle aux aspects motivationnels négatifs des drogues (Koob, 1996).

Le NAc reçoit une innervation glutamatergique dense de l'amygdale, de l'hippocampe et du PFCx (Mulder *et al.*, 1998). La stimulation téτανique de la fimbria (voie de sortie glutamatergique de l'hippocampe) augmente le niveau de DA dans le NAc, menant à une potentialisation de l'activité des neurones épineux GABAergiques par l'activation des récepteurs D1 (Floresco et Phillips, 2001). L'augmentation de la libération de DA dans cette structure provient de l'activation des neurones de la VTA par les projections glutamatergiques issues de l'hippocampe. En effet, une stimulation chimique de l'hippocampe augmente l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA (Floresco *et al.*, 2001). De façon similaire, la stimulation de la voie glutamatergique provenant de l'amygdale et innervant le NAc augmente la DA libérée par l'activation des récepteurs D1, NMDA et AMPA (Floresco et Phillips, 2001). Cette augmentation de DA libérée dans le NAc est due à l'activation directe des terminaisons DA (Howland *et al.*, 2002), mais aussi à une activation indirecte par la stimulation des neurones du PFCx (Jackson et Moghaddam, 2001). En effet, l'activation du PFCx *in vivo* stimule la VTA, ce qui conduit à l'augmentation de DA libérée dans le NAc (Taber et Fibiger, 1995; Taepavaraprak *et al.*,

2000). Ces études suggèrent que l'augmentation de la libération de DA dans le NAc, en réponse à la stimulation du PFCx est étroitement contrôlée par l'intensité du stimulus. Une forte stimulation l'augmente, alors qu'une stimulation faible ou physiologique réduit la libération de DA dans le NAc (Jackson *et al.*, 2001). En 1985, DeFrance *et al.* ont postulé l'hypothèse selon laquelle la DA joue un rôle permissif en modulant le taux signal/bruit dans le NAc, par l'intermédiaire d'actions opposées. En effet, l'activation des récepteurs D2 pré-synaptiques, en réduisant la libération de DA, baisse la transmission glutamatergique dans les neurones épineux GABAergiques (Harvey et Lacey, 1996), alors que l'activation des récepteurs D1 post-synaptiques augmentent la réponse neuronale au Glu dans les neurones épineux GABAergiques du NAc (Chergui et Lacey, 1999). Il semble donc que le Glu et la DA exercent un contrôle réciproque sur leur libération respective dans les ganglions de la base (Mogenson *et al.*, 1988). Le mécanisme moléculaire de la permissivité de la DA sur l'activation glutamatergique dans le NAc sera discutée ultérieurement.

La figure 19 présente un schéma qui intègre les interactions DA-Glu-GABA dans les ganglions de la base.

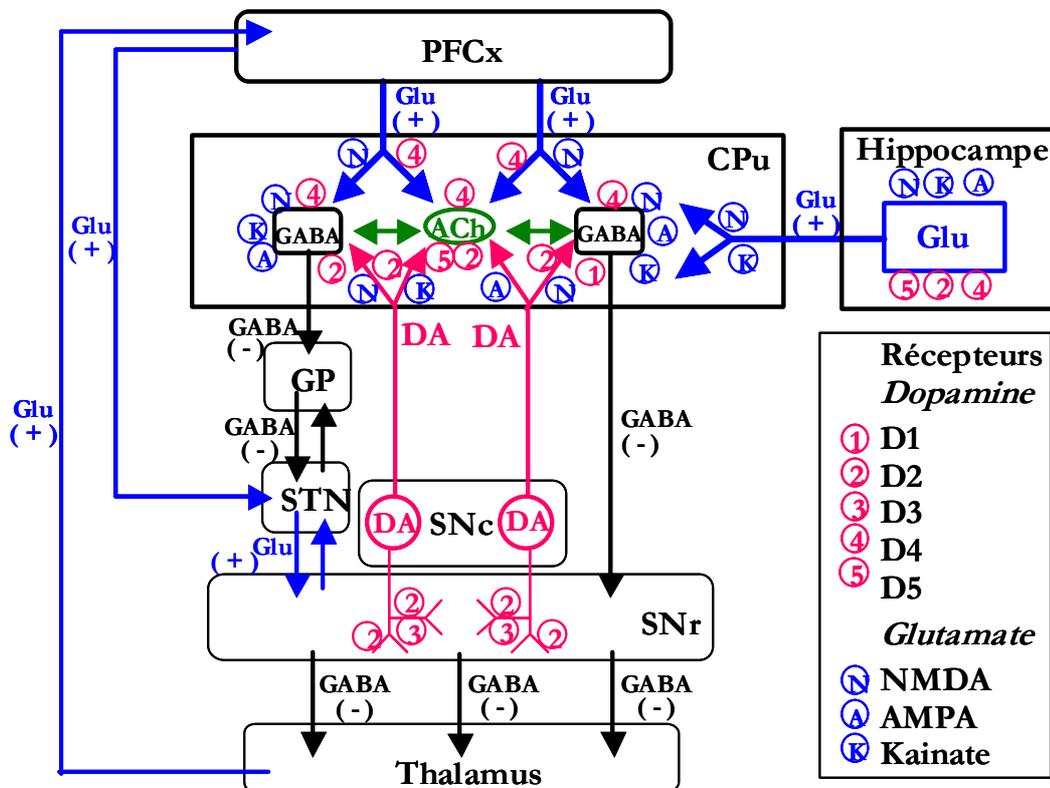


Figure 19 : Organisation schématique de la distribution des récepteurs dopaminergiques et des récepteurs ionotropes du glutamate dans le circuit des ganglions de la base. D'après Tarazi et Baldessarini (1999).

ACh: acétylcholine; DA: dopamine; Glu: glutamate; GP: globus pallidus; STN: noyau sous-thalamique.

D. Effets neurobiologiques des psychostimulants

Après avoir décrit les effets psychotropes et somatiques des stimulants et les systèmes de neurotransmission sur lesquels ils agissent dans les chapitres I et II A.B.C., ce paragraphe est consacré à la description de leur mode d'action sur le plan neurobiologique.

1. Cibles moléculaires

1.1. Cocaïne

Sur le plan moléculaire, la cocaïne se fixe et inhibe les transporteurs de la DA, le DAT, la noradrénaline (NA), le NAT et la sérotonine (5-HT), le SERT (Memo *et al.*, 1981). Elle est à l'origine de l'augmentation de la neurotransmission dopaminergique, noradrénergique et sérotoninergique (Koe, 1976; Reith *et al.*, 1986; Ritz *et al.*, 1987). La cocaïne présente une affinité pour le SERT cinq fois supérieure à celle pour le DAT, et trois fois plus pour le DAT que pour le NAT (White et Kalivas, 1998). Par ailleurs, la cocaïne a aussi été décrite comme un antagoniste du récepteur 5-HT₃ (King *et al.*, 1994). Ses effets comportementaux et son fort pouvoir renforçant ont été attribués à une stimulation du système dopaminergique mésocorticolimbique (Wise, 1984; Ritz *et al.*, 1987; Woolverton et Kleven, 1988). Cependant, aucun des systèmes de neurotransmetteurs ne semble à lui seul responsable de la totalité des effets psychostimulants de la cocaïne. Au contraire, divers arguments expérimentaux plaident en faveur d'une interaction entre les systèmes dopaminergique et sérotoninergique qui serait fondamentale, dans les processus de renforcement positif induits par la cocaïne. Ainsi, en modifiant le système sérotoninergique, l'efficacité de ce renforcement positif a pu être modulée chez l'animal (Woolverton et Johnson, 1992).

Chez le rat, des études *in vivo* ont montré que l'administration aiguë de cocaïne provoquait des modifications du métabolisme de la DA et de la 5-HT dans plusieurs régions cérébrales, dont le PFCx, le NAc, le CPu, les tubercules olfactifs et l'amygdale (Imperato *et al.*, 1992; Baumann *et al.*, 1993). L'inhibition de la synthèse de neurotransmetteur est plus prononcée dans les neurones sérotoninergiques que dans les neurones dopaminergiques.

1.2. Amphétamines substituées

L'amphétamine et ses analogues sont des substrats des transporteurs des monoamines. La D-amphétamine présente une affinité égale pour le DAT et le NAT, qui est dix fois moindre pour le SERT (White et Kalivas, 1998). Elles induisent la libération de neurotransmetteurs par les neurones pré-synaptiques, tout en inhibant faiblement leur re-capture. Les amphétamines sont des analogues de la DA. Elles se fixent sur le DAT et sont transportées dans le cytoplasme. Les amphétamines sont également des inhibiteurs de MAO; bloquant ainsi la dégradation de la DA. Au niveau des vésicules, les amphétamines bloquent le VMAT en dissipant le gradient de protons du fait de leur nature basique. La DA s'accumule dans le cytoplasme en grande quantité, et est ensuite rejetée dans la synapse par le DAT qui fonctionne alors en sens inverse (Amara et Sonders, 1998). La concentration de DA dans l'espace synaptique est augmentée davantage qu'en réponse à la cocaïne (Pifl *et al.*, 1995; Scarponi *et al.*, 1999).

Les amphétamines, comme la cocaïne, agissent essentiellement sur le système dopaminergique, bien que la 5-HT soit aussi impliquée (Seiden *et al.*, 1993). De fortes augmentations des concentrations de DA et de 5-HT extracellulaires ont été observées dans le NAc, le CPu et le PFCx après leur administration. L'augmentation considérable de la concentration de DA dans la synapse est responsable également de l'importante neurotoxicité provoquée par certaines amphétamines, en particulier la méthamphétamine. En effet, la DA est oxydée en semi-quinone, ce qui génère des radicaux superoxydes, qui réagissent avec le monoxyde d'azote (NO) pour former l'ion peroxy-nitrite ONOO⁻. Ces réactifs oxygénés sont réputés pour perturber le fonctionnement des neurones et conduire à leur dégénérescence par apoptose. La mort cellulaire ou du moins la dégénérescence des terminaisons est reflétée par une importante diminution des taux de DA et de 5-HT, ainsi que de la quasi-disparition des transporteurs et des enzymes de synthèse (Seiden *et al.*, 1988).

2. Circuits impliqués dans les effets renforçants des drogues

Depuis la découverte fondamentale par Olds et Milner en 1954, décrivant les circuits de récompense et de renforcement positif liés à une stimulation électrique dans le cerveau de rat, de nombreuses recherches ont montré l'implication de ces circuits dans les effets renforçants des drogues. Killam *et al.*, ont montré dès 1957, que les substances

ayant un pouvoir renforçant activaient les circuits de récompense, étant ainsi responsables du "rush" recherché par le consommateur. A la suite de ces résultats, de multiples recherches ont été réalisées pour cartographier les sites et les circuits de récompense, puis dans un deuxième temps, pour déterminer quels étaient les neurotransmetteurs impliqués. Deux approches expérimentales permettent l'analyse des effets renforçants d'une drogue : l'auto-administration et le test de "préférence de place". En 1962, Weeks a montré que des rats s'auto-administraient volontairement des composés présentant un pouvoir renforçant par l'intermédiaire d'une canule intra-veineuse.

Les résultats des dernières décennies concernant les sites et les circuits de récompense peuvent être résumés en quatre points (Chen, 1993) :

- le principal système impliqué dans les circuits de récompense sensibles aux drogues est la voie dopaminergique mésocorticolimbique
- cette même voie, activée par les psychotropes présentant un pouvoir renforçant, est en fait impliquée dans les processus physiologiques de récompense liés aux comportements alimentaires et sexuels
- le pouvoir renforçant de la quasi-totalité des drogues est le résultat d'une action directe ou indirecte sur la neurotransmission dopaminergique au niveau du système mésolimbique
- enfin, la lésion du système mésolimbique atténue ou abolit l'auto-administration de drogue chez les animaux de laboratoire

2.1. Implication du système dopaminergique

Des expériences de microdialyse *in vivo* ont montré que l'inhibition de la re-capture de DA par la cocaïne augmentait la quantité de DA extracellulaire dans le CPu (Church *et al.*, 1987), le NAc (Di Chiara et Imperato, 1988) et le PFCx (Maisonneuve *et al.*, 1990). Cette augmentation de DA extracellulaire semble directement corrélée avec une augmentation de sa synthèse, puisque l'activité de l'enzyme TH est augmentée dans la VTA, lors de prises répétées de cocaïne (Masserano *et al.*, 1996). L'action de la cocaïne sur la neurotransmission dopaminergique comporte deux phases. Tout d'abord, elle augmente la quantité de DA extracellulaire, ce qui conduit à une stimulation des récepteurs dopaminergiques post-synaptiques du CPu, du NAc et du PFCx. La stimulation de ces neurones post-synaptiques est responsable de la diminution de l'activité électrique

spontanée des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Pitts et Marwah, 1987; Einhorn *et al.*, 1988). La diminution de la synthèse de DA est observée après l'activation des récepteurs D2, présents sur les terminaisons dopaminergiques (Nielsen *et al.*, 1983; Galloway *et al.*, 1986).

2.1.1. Effet de la lésion des neurones dopaminergiques

Le rôle de la DA dans les propriétés renforçantes de la cocaïne a été confirmé par des expériences de lésion du système dopaminergique par la 6-OHDA. En effet, la déafférentation du NAc ou la lésion de la VTA, suite à l'injection de 6-OHDA, produit une extinction progressive de l'auto-administration de cocaïne (Roberts *et al.*, 1980; Roberts et Koob, 1982). Par contre, la déafférentation du PFCx suite à une lésion analogue bloque l'initiation de l'auto-administration (Goeders et Smith, 1986), alors qu'elle n'a aucun effet sur le maintien de cette auto-administration (Martin-Iverson *et al.*, 1986). Une autre structure, le globus pallidus, qui reçoit des afférences à la fois du NAc et de la VTA, participe aussi à la locomotion et aux effets renforçants induits par les stimulants. L'injection de cocaïne ou d'amphétamine dans cette structure induit un effet appétitif pour la drogue (Gong *et al.*, 1996). A l'opposé, la lésion de cette structure diminue l'auto-administration et la préférence pour le compartiment apparié à la cocaïne lors du test de préférence de place (Gong *et al.*, 1996).

2.1.2. Modulation du transporteur et des récepteurs dopaminergiques

Un rat s'auto-administre le GBR 12909 en i.v., un inhibiteur sélectif du DAT (Roberts, 1993), alors qu'il ne s'auto-administre aucun inhibiteur sélectif du SERT (Lamb et Griffiths, 1990). Il semble que le nombre de sites DAT n'est pas modifier dans le striatum lors d'une exposition chronique à la cocaïne, alors qu'il est réduit dans la VTA et la SN (Letchworth *et al.*, 1999). Chez des souris dont le gène codant le DAT a été invalidé, la DA libérée reste dans la synapse environ cent fois plus longtemps, jusqu'à ce qu'elle soit métabolisée. Ces souris sont hyperactives et aucune stéréotypie n'est observée en réponse à l'administration de psychostimulants. Il peut paraître surprenant que ces souris DAT^{-/-} s'auto-administrent la cocaïne (Rocha *et al.*, 1998). Mais, les souris chez lesquelles les deux gènes codant le DAT et le SERT ont été invalidés, sont encore plus actives que les souris DAT^{-/-}. Il est intéressant de noter que, chez ces souris double "knocked-out", il n'y a plus de préférence pour le compartiment apparié à la cocaïne, lors du test de

préférence de place (Sora *et al.*, 2001). L'ensemble de ces résultats montrent que la dopamine n'est pas seule responsable des effets renforçants de la cocaïne et que la 5-HT participe à ses effets.

De nombreuses études pharmacologiques, électrophysiologiques et comportementales montrent que le récepteur dopaminergique D1 est impliqué dans les propriétés renforçantes de la cocaïne. Il semble que les agonistes sélectifs du récepteur D1 reproduisent les effets comportementaux de la cocaïne, alors que les antagonistes de ce récepteur ne les reproduisent pas (Spealman *et al.*, 1997; Sinnott et Nader, 2001). De plus, certains agonistes du récepteur D1 induisent une préférence de place (Abrahams *et al.*, 1998), tandis que les antagonistes du même récepteur D1 réduisent l'auto-administration de cocaïne (Kita *et al.*, 1999). Lors de sessions d'auto-administration de cocaïne chez des singes, il a été montré que le nombre de récepteurs D1 est augmenté, alors que celui du récepteur D2 est diminué dans le striatum et le PFCx (Nader *et al.*, 2002). Une observation similaire a été réalisée dans le NAc et le CPU de rats, après des injections répétées de cocaïne. L'augmentation du nombre de récepteurs D1 est couplée à une stimulation accrue de la voie de transduction de l'AMPC/PKA (Unterwald *et al.*, 1996). Chez des souris dont le gène codant le récepteur D1 a été invalidé, l'activité locomotrice induite par la cocaïne est fortement réduite par rapport aux souris contrôles. Elles présentent une activité locomotrice en réponse à une injection de cocaïne semblable à celle obtenue après une injection de solution saline (Xu *et al.*, 2000). Ces souris D1 *-/-* présentent des réponses comportementales similaires aux souris témoins après un traitement chronique à l'amphétamine (Xu *et al.*, 2000).

Il semble que le récepteur D2 intervienne aussi dans les effets des stimulants, puisque le récepteur D2, localisé dans le NAc, participe à la locomotion induite par les stimulants (Neisewander *et al.*, 1995). Chez le rat, l'administration d'agonistes du récepteur D2 augmente l'activité locomotrice, génère des stéréotypies et induit un pouvoir renforçant. Tous ces effets sont similaires à ceux observés en réponse à une injection de cocaïne (Woolverton et Kleven, 1988). D'autre part, des antagonistes D2 bloquent la plupart des effets comportementaux, dont l'auto-administration de cocaïne (Kita *et al.*, 1999). Pourtant, des études pharmacologiques et comportementales réalisées sur des souris D2 *-/-* montrent que ce récepteur n'est pas nécessaire à l'auto-administration de cocaïne, mais pourrait limiter la quantité de drogue administrée lors d'une session d'auto-administration (Caine *et al.*, 2002).

D'autres auteurs ont suggéré l'implication du récepteur D3 dans le phénomène de rechute se produisant parfois après l'arrêt de consommation de cocaïne chez le rat (Pilla *et al.*, 1999). La stimulation de ce récepteur D3 augmente le renforcement positif induit par la cocaïne (Caine et Koob, 1993), alors que son inhibition atténue la recherche de cocaïne et ses effets renforçants (Vorel *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données suggère que la neurotransmission dopaminergique est régulée positivement par une exposition prolongée à la cocaïne. Mais, bien sûr d'autres neurotransmissions sont perturbées par les psychostimulants dans le système nerveux central.

2.2. Implication du système sérotoninergique

L'inhibition de la re-capture de 5-HT par la cocaïne est responsable d'une augmentation de la neurotransmission sérotoninergique (Ross et Renyi, 1969; Reith *et al.*, 1983). Les conséquences de cette augmentation sont:

- la suppression de l'activité électrique spontanée des neurones sérotoninergiques du noyau du raphé dorsal, responsable d'une hyperpolarisation de ces neurones. Elle est due à la stimulation de l'auto-récepteur 5-HT_{1A}, présent sur le soma et les dendrites des neurones du raphé dorsal (Pitts et Marwah, 1987; Cunningham et Lakoski, 1988).

- une diminution de la biosynthèse et de la libération de 5-HT dans le cerveau antérieur (Galloway, 1990).

Bien que des inhibiteurs sélectifs de la re-capture de 5-HT n'aient pas d'effets comportementaux similaires à ceux de la cocaïne, il semble que le système sérotoninergique contribue aux effets comportementaux de la cocaïne (Koob, 1992; Woolverton et Johnson, 1992). En effet, l'inhibition de la synthèse de 5-HT diminue les effets locomoteurs induits par la cocaïne (Scheel-Krüger *et al.*, 1987).

L'activation du système sérotoninergique est inversement corrélée à l'auto-administration de cocaïne chez le rat. Ainsi, lorsque l'on augmente la neurotransmission sérotoninergique, par l'administration répétée, soit d'un inhibiteur sélectif de la re-capture de 5-HT, comme la fluoxétine, soit du précurseur de la 5-HT, le L-tryptophane, on observe une diminution de l'auto-administration intra-veineuse de cocaïne chez le rat (Carroll *et al.*, 1990a, b). Inversement, la lésion du noyau du raphé dorsal par la 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT), une neurotoxine spécifique des neurones

sérotoninergiques, provoque une augmentation de l'auto-administration de cocaïne (Loh et Roberts, 1990). Un résultat similaire a été obtenu par l'injection d'un antagoniste du récepteur 5-HT_{2C} (Fletcher *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que la 5-HT régule négativement la composante "renforcement positif" de la cocaïne. On peut penser que la 5-HT contribue à installer des effets déplaisants de la cocaïne, limitant son auto-administration (Woolverton et Johnson, 1992). Notons que chez l'homme, les troubles liés au sevrage de cocaïne peuvent être attribués à un dysfonctionnement sérotoninergique. En effet, parmi ces troubles, on remarque anxiété, troubles du sommeil, dépression et agressivité.

2.3. Implication des autres systèmes de neurotransmission

La plupart des psychostimulants ciblent aussi le transporteur de la NA. Chez le rat, la perfusion de cocaïne dans la VTA induit une augmentation de la concentration de NA extracellulaire dans le PFCx et la VTA (Pan *et al.*, 1996). Toutefois, les neurones noradrénergiques ne semblent pas impliqués dans les effets majeurs de la cocaïne. En effet, les inhibiteurs sélectifs de la re-capture de NA ne reproduisent aucun des effets de la cocaïne (Koob, 1992; Woolverton et Johnson, 1992). Par ailleurs, ni l'administration conjointe d'antagonistes de récepteurs noradrénergiques, ni la lésion du système noradrénergique ne modifie les paramètres de l'auto-administration de cocaïne (Koob, 1992; Woolverton et Johnson, 1992).

Le Glu est impliqué dans l'effet des psychostimulants, notamment dans la sensibilisation comportementale (Wolf, 1998). En effet, l'administration d'antagonistes des récepteurs AMPA ou NMDA empêche la mise en place de cette sensibilisation, en régulant les neurones dopaminergiques de la VTA. Comme décrit plus haut (paragraphe C.3.), les voies glutamatergiques issues du PFCx et projetant sur la VTA, modulent l'activité de la voie mésocorticolimbique (Taber et Fibiger, 1995). La stimulation par la DA des récepteurs D1, situés sur les terminaisons glutamatergiques dans la VTA, augmente la libération de Glu, ce qui se traduit par l'activation accrue des récepteurs NMDA sur le neurone dopaminergique. Ces derniers sont responsables de l'activation des neurones dopaminergiques.

Le GABA participe aussi aux effets de la cocaïne. En effet, l'injection dans la VTA de baclofène, un agoniste du récepteur GABA-B, réduit l'auto-administration de cocaïne

(Shoaib *et al.*, 1998). Des études pharmacologiques ont montré que la stimulation du récepteur GABA-B dans la VTA inhibait l'activité électrique des neurones dopaminergiques, donc inhibait la libération de DA dans le NAc (Kalivas *et al.*, 1990; Yoshida et Stein, 1999). Cette modulation des neurones de la VTA suffit à expliquer l'effet du GABA sur l'auto-administration de cocaïne. Mais on sait que la neurotransmission GABAergique interagit à plus d'un titre avec la voie dopaminergique mésocorticolimbique.

Chapitre III. La voie de transduction du GMPc

Le nucléotide guanosine monophosphate cyclique ou GMPc a été découvert en 1963 comme un analogue de l'AMPc (Ashman *et al.*, 1963). Très rapidement, on découvre que de nombreux agents, incluant des hormones et des neurotransmetteurs augmentaient la concentration intracellulaire de GMPc. L'enzyme responsable de cette synthèse fut isolée en 1969 par trois groupes différents (Ishikawa *et al.*, 1969 ; Schultz *et al.*, 1969; White et Aurbach, 1969). Cette enzyme, la guanylyl cyclase, catalyse la production de GMPc à partir de GTP (Hardman et Sutherland, 1969). On distingue la guanylyl cyclase soluble (GCs) et plusieurs guanylyls cyclases membranaires (GCm) (Kimura et Murad, 1974).

Dans les années 1980, la découverte du messager intercellulaire NO et des peptides natriurétiques, comme ligands naturels respectivement de la GCs et de GCm, ont relancé l'intérêt du GMPc et de sa transduction.

A. Les peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques constituent une classe de peptides synthétisés dans divers tissus, dont le SNC. Ils agissent comme hormones ou neuromédiateurs. En 1981, un peptide de 28 acides aminés, l'ANP ou "atrial natriuretic peptide" fut découvert dans le cœur (de Bold *et al.*, 1981). Ce peptide, stocké dans des granules au niveau des oreillettes, est libéré en cas de distension cardiaque ou d'augmentation de la pression artérielle (Lang *et al.*, 1985; Rosenzweig et Seidman, 1991). Rapidement deux autres éléments de cette famille furent découverts. Le BNP ou "brain natriuretic peptide", qui compte 26 à 32 acides aminés selon les espèces, fut trouvé dans le cerveau, mais il s'est avéré plus tard qu'il était présent en concentration plus importante dans le cœur (Sudoh *et al.*, 1988). Le CNP ou "C-type natriuretic peptide" est un peptide plus court (22 acides aminés), qui est localisé presque exclusivement dans les systèmes nerveux central et périphérique (Sudoh *et al.*, 1990).

1. Synthèse et localisation

Les précurseurs de l'ANP, du BNP et du CNP dérivent de trois ARNm différents. Même si ces peptides possèdent une faible identité de séquence au niveau de leur ADN,

les peptides matures présentent une analogie de structure; en effet, ils sont tous constitués d'une boucle de 17 acides aminés, qui résulte de la formation d'un pont disulfure entre deux résidus cystéine conservés (Kojima *et al.*, 1989; Sudoh *et al.*, 1990). Les peptides ANP et BNP possèdent deux extensions, alors que le CNP n'en possède qu'une seule du côté N-terminal. Chez le rat, deux peptides CNP ont été caractérisés ; le CNP-22 et le CNP-53, moins abondant, qui possède un fragment N-terminal plus long. Les peptides ANP et CNP ont été très conservés durant l'évolution des espèces.

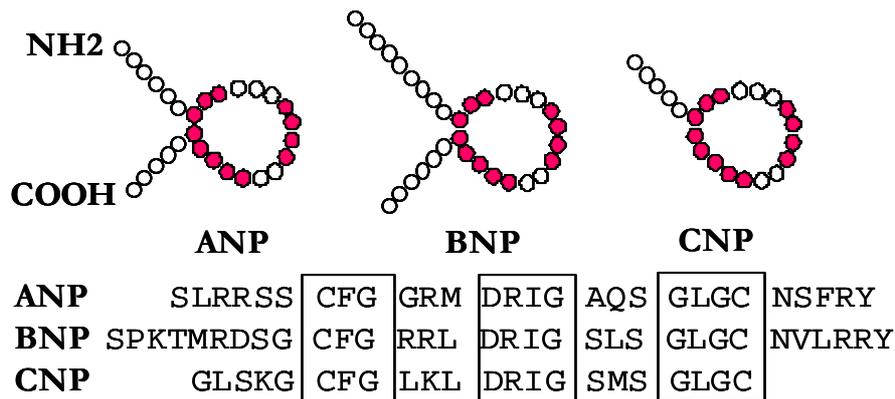


Figure 20 : Séquences des peptides natriurétiques et structures secondaires. D'après Sudoh *et al.* (1990).

ANP: "atrial natriuretic peptide"; BNP: "brain natriuretic peptide"; CNP: "C-type natriuretic peptide". Les homologies de séquence sont encadrées et correspondent aux acides aminés colorés en rose.

La détection de l'ANP par immunohistochimie dans le cerveau de rat a montré que, ce peptide était localisé dans des noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation centrale des fonctions endocrines et autonomes, en particulier le noyau arqué, les noyaux paraventriculaires, le noyau du tractus solitaire (Saper *et al.*, 1985; Standaert *et al.*, 1986). L'ANP a aussi été détecté dans des régions discrètes du cortex et dans plusieurs régions du système limbique, comme l'habénula, l'hippocampe et le noyau central de l'amygdale (Kawata *et al.*, 1985). Les expériences d'hybridation *in situ* sur coupes de cerveau de rat ont indiqué une localisation similaire du messenger de l'ANP, mais ont en plus révélé son expression dans le noyau olfactif antérieur et dans les cortex entorhinal, piriforme et cingulaire (Langub *et al.*, 1995a).

La localisation du BNP est moins bien décrite et les études d'hybridation *in situ* n'ont pas montré d'expression du BNP dans les structures cérébrales (Langub *et al.*, 1995a).

Le précurseur du CNP semble fortement exprimé dans le cerveau. Langub *et al.* ont montré, par hybridation *in situ*, l'expression du CNP dans différentes couches du cortex, le noyau arqué, le cervelet, l'hippocampe, l'amygdale, la SN, la VTA. Une expression plus faible a été notée dans les cortex entorhinal, piriforme et cingulaire (Langub *et al.*, 1995b). Le gène du peptide CNP est aussi transcrit dans différents noyaux du tronc cérébral. Une autre étude a montré que le peptide CNP était exprimé dans la glande pinéale chez le bœuf (Middendorff *et al.*, 1996).

2. Les récepteurs des peptides natriurétiques

2.1. Caractérisation

Les récepteurs des peptides natriurétiques sont au nombre de trois. Ils ne possèdent qu'un seul segment trans-membranaire. Deux d'entre eux sont des guanylyls cyclases membranaires présentant une forte homologie de séquence: la guanylyl cyclase A (GC-A) lie les peptides ANP et BNP et la guanylyl cyclase B (GC-B) lie préférentiellement le CNP (Garbers, 1992). La structure et le mécanisme de leur activation-désensibilisation sont schématisés dans la figure 21.

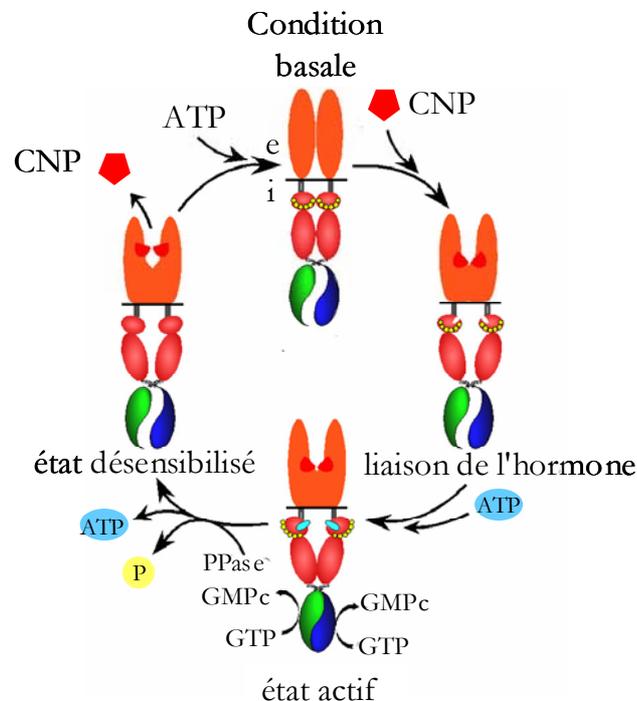


Figure 21 : Modèle hypothétique du cycle activation-désensibilisation du récepteur GC-B. D'après Potter et Hunter (2000).

Les récepteurs GC-A et GC-B possèdent un domaine extracellulaire qui lie le peptide, tandis que leur partie cytoplasmique porte l'activité guanylyl cyclasique (Hardman et Sutherland, 1969). Ils sont actifs sous forme de dimère. Ils possèdent aussi un segment portant un domaine "kinase-like" inhibiteur (site de liaison de l'ATP), qui intervient dans la régulation du récepteur. Ils sont régulés par des mécanismes de phosphorylation. A ce jour, 5 résidus sérine et thréonine, phosphorylés dans la partie "kinase-like" de GC-B, ont été identifiés à l'état basal, mais les protéine kinases impliquées ne le sont pas (Potter et Hunter, 1998). La liaison du CNP permettrait un changement conformationnel de la protéine GC-B facilitant la liaison de l'ATP au domaine "kinase-like" (Chinkers et Garbers, 1989). Une fois l'ATP fixé, l'effet inhibiteur du domaine "kinase-like" serait levé, les domaines guanylyl cyclasiques s'associeraient, et deux sites enzymatiquement actifs par dimère, catalyseraient l'hydrolyse du GTP. Le changement de conformation généré par la liaison du CNP, rendrait accessible les résidus phosphorylés du domaine "kinase-like" à des protéine phosphatases. Une fois déphosphorylé, le récepteur est désensibilisé (Jewett *et al.*, 1993).

Le troisième récepteur, nommé récepteur C, fixe indifféremment les trois peptides. Il possède une partie cytoplasmique relativement courte dépourvue d'activité enzymatique. On a longtemps considéré que ce récepteur intervenait dans la régulation du taux circulant des peptides natriurétiques. Le fait qu'il ne possède aucune spécificité pour l'un ou l'autre peptide confortait cette hypothèse. D'autres données indiquent que ce récepteur serait couplé à l'inhibition de l'adénylyl cyclase (Anand-Srivastava *et al.*, 1990), mais cette étude n'a pas été confirmée à ce jour.

2.2. Localisation

La localisation des messagers des récepteurs GC-A et GC-B a été réalisée dans le cerveau de rat par hybridation *in situ* (Herman *et al.*, 1996). Le gène du récepteur GC-A est exprimé dans les cellules mitrales du bulbe olfactif, l'habénula et l'area postrema. Sa présence dans la substance blanche du cerveau antérieur suggère qu'il est surtout exprimé dans les cellules gliales. Le messager du récepteur GC-B est exprimé plus largement dans tout le cerveau avec un niveau d'expression variable. Un signal abondant a été mis en évidence dans le cortex limbique et le néocortex, le bulbe olfactif, l'hippocampe et l'amygdale. Une expression intermédiaire est notée dans les noyaux du tronc cérébral qui

contrôlent les fonctions autonomes, dans la SNC, dans la VTA ainsi que dans le globus pallidus externe.

Des expériences de liaison avec des analogues iodés des peptides, ciblant spécifiquement ce récepteur, ont montré que le récepteur C était exprimé dans le bulbe olfactif et dans les plexus choroïdes, confortant l'idée qu'il régule le taux circulant de peptides natriurétiques (Zorad *et al.*, 1992).

3. Rôles physiologiques

3.1. L'ANP et le BNP

L'ANP joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et du volume sanguin. C'est l'étirement des cardiocytes des oreillettes lors d'une hypertension qui constitue le signal de libération des peptides natriurétiques. Des rats soumis à un stress voient leur concentration sanguine en peptide natriurétique augmenter (Ledsome et King, 1995). L'ANP stimule la diurèse et la natriurèse en agissant directement sur des récepteurs rénaux, permettant ainsi de réduire la pression artérielle.

Dans le cerveau, l'ANP est libéré par des neurones hypothalamiques en réponse à la stimulation de barorécepteurs périphériques (Antunes-Rodrigues *et al.*, 1992). Il module les centres de régulation du système cardiaque (Sills *et al.*, 1985). La localisation des peptides natriurétiques dans l'hypothalamus suggère qu'ils sont impliqués dans la libération de neurohormones. L'activité des neurones à vasopressine est effectivement diminuée par l'ANP (Standaert *et al.*, 1987). L'ANP et le BNP induisent une accumulation de DA, dans des neurones dopaminergiques de l'hypothalamus de rat en culture (Kadowaki *et al.*, 1992).

La présence du peptide ANP et de son récepteur, dans le système limbique, en particulier dans l'hippocampe, est en accord avec une éventuelle participation dans le contrôle des fonctions mnésiques. A ce jour pourtant, un effet de l'ANP n'a été mis en évidence que dans un test d'évitement. En effet, il retarde l'extinction du comportement d'évitement (Bidzseranova *et al.*, 1991).

3.2. Le CNP

Contrairement à l'ANP, l'administration intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) de CNP à un rat augmente sa consommation d'eau (Samson *et al.*, 1991) et la libération de

prolactine (Huang *et al.*, 1992b). Dans l'hypothalamus, le CNP régule également la libération de diverses hormones au niveau de l'hypophyse antérieure, dont l'hormone lutéinisante (Samson *et al.*, 1993) et l'hormone adrénocorticotrope (Charles *et al.*, 1992). Chez le mouton, l'administration i.c.v. de CNP induit une diminution de la pression artérielle. A noter que des propriétés anxiolytiques ont été attribuées au CNP. Elles sont inhibées par l'administration au préalable d'un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D2 (Biro *et al.*, 1996).

La stimulation du récepteur GC-B dans les cellules chromaffines augmente la synthèse des messagers de la TH, et ainsi entraîne une augmentation de la synthèse des catécholamines (Tsutsui *et al.*, 1994; Takekoshi *et al.*, 2000). Dans ces mêmes cellules, la stimulation de la voie du GMPc par le CNP ou par le NO, diminue la libération de catécholamines induite par l'acétylcholine, mais reste sans effet sur la libération basale (Rodriguez-Pascual *et al.*, 1996). Le CNP est co-libéré avec la DA dans des cellules chromaffines en culture; il est intéressant de noter dans ce contexte, qu'il inhibe la libération de catécholamines, sans doute en inhibant l'entrée de Ca^{2+} par des canaux dépendants du potentiel. D'autres auteurs proposent l'implication du récepteur C dans la libération de DA (Babinski *et al.*, 1995; Kanwal *et al.*, 1999).

B. Le GMPc

Le GMPc est un second messenger essentiel dans la mesure où il contrôle un grand nombre de fonctions physiologiques comme la photo-transduction, l'olfaction, les transports ioniques dans l'intestin et le rein, l'agrégation des plaquettes et la contraction des muscles cardiaques et lisses (Schmidt *et al.*, 1993) (figure 22).

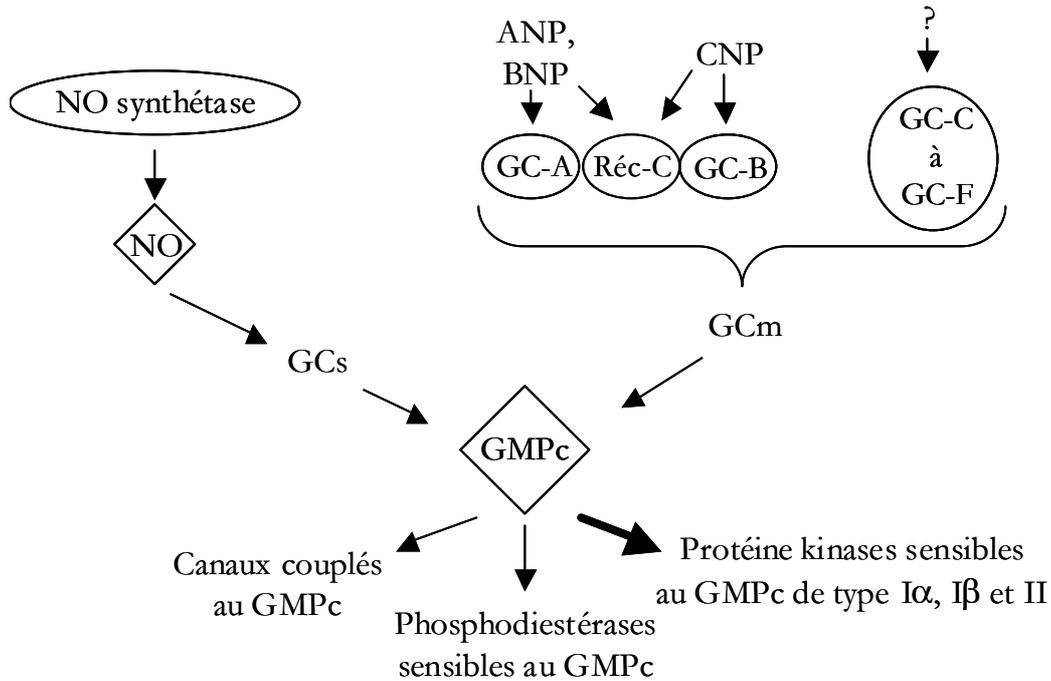


Figure 22 : Mécanismes d'activation et cibles du GMPc. D'après Schmidt *et al.* (1993).

1. Synthèse du GMPc

1.1. La guanylyl cyclase soluble (GCs)

La GCs est un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Quatre formes différentes ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$) de ces sous-unités ont été mises en évidence (Wedel et Garbers, 1997).

Dans le cerveau, les taux de messagers de la GCs sont supérieurs à ceux de l'adénylyl cyclase. L'ARNm de la GCs est surtout exprimé dans le striatum, les cellules granulaires et pyramidales de l'hippocampe, le système olfactif, les colliculi inférieur et supérieur, les cellules de Purkinje du cervelet, le locus coeruleus, le cortex occipital, ainsi que les cellules pyramidales des couches II, III et V du cortex cérébral (Matsuoka *et al.*, 1992).

Le changement conformationnel de la protéine qui résulte de la liaison du NO à l'hème contenue dans l'enzyme, est à l'origine de son activation (Garbers et Lowe, 1994). Ce sont les complexes $\alpha 1/\beta 1$ et $\alpha 2/\beta 1$ qui présentent l'activité guanylyl cyclase stimulée par le NO, alors que l'expression individuelle de chacune des isoformes est dénuée d'activité catalytique.

1.2. Les autres guanylyls cyclases membranaires (GCm)

On dénombre six GCm nommées GC-A à GC-F (Wedel et Garbers, 1997). Comme vu précédemment (III.A.2), les peptides natriurétiques se lient aux récepteurs GC-A et GC-B. Des entérotoxines thermostables d'*Escherichia Coli* ou leurs homologues de mammifères, la guanyline et l'uroguanyline, lient le récepteur GC-C. Le récepteur GC-D a été isolé dans le système olfactif, tandis que GC-E et GC-F ont été identifiées respectivement dans la rétine et dans la glande pinéale.

2. Cibles

Les cibles du GMPc sont au nombre de trois. Au niveau des photorécepteurs, ce nucléotide peut agir directement sur des canaux cationiques membranaires. Le GMPc régule aussi l'activité de phosphodiésterases (PDE), et module le taux de nucléotides cycliques intracellulaires. Mais, une grande partie des effets biologiques du GMPc est relayée par l'activation de protéine kinases dépendant du GMPc (PKG). Les propriétés de ces enzymes sont décrites dans le paragraphe C de ce chapitre.

2.1. Les canaux

Un certain nombre de canaux sont régulés par la liaison de GMPc, comme des canaux cationiques de la rétine ou de l'épithélium olfactif. Dans les cellules en bâtonnets de la rétine, la fixation du GMPc à ces canaux ioniques non sélectifs permet l'entrée de sodium (Fesenko *et al.*, 1985). A l'obscurité, la concentration intracellulaire de GMPc est élevée, maintenant les canaux ouverts et la membrane des bâtonnets dépolarisée. La lumière provoque l'activation d'une phosphodiésterase, qui hydrolyse le GMPc, et par conséquent, l'hyperpolarisation de la cellule et la genèse de l'information visuelle.

2.2. Les phosphodiesterases

Les phosphodiesterases, qui hydrolysent les nucléotides cycliques AMPc et GMPc sont classées en sept familles. Celles-ci diffèrent par leur structure primaire, leurs affinités pour l'AMPc et le GMPc et leurs régulations. Ces enzymes jouent un rôle important dans la mesure où elles contrôlent l'amplitude et la durée des signaux que constituent le GMPc et l'AMPc. La PDE1, activée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline, hydrolyse à la fois le GMPc et l'AMPc (Yan *et al.*, 1996). La PDE2 lie le GMPc sur un site régulateur non-catalytique, ce qui stimule l'hydrolyse du GMPc et de l'AMPc (Yang *et al.*, 1994). La PDE5 est spécifique du GMPc et est exprimée dans le NAc (Kraus et Prast, 2002).

C. Les protéine kinases dépendant du GMPc (PKG)

Une protéine kinase activée par le GMPc a été découverte en 1970 (Kuo et Greengard, 1970). Elle appartient à la famille des sérine/thréonine protéine kinases.

1. Les différentes isoformes

Chez les mammifères, on distingue deux formes de PKG, appelées I et II, qui ont été clonées et caractérisées. Elles présentent des homologies de séquence de l'ordre de 50% et possèdent la même organisation structurale (Sandberg *et al.*, 1989; Wernet *et al.*, 1989; Uhler, 1993; Jarchau *et al.*, 1994). La PKG-I est un homodimère; on connaît deux isoformes α et β , qui présentent 91% d'homologie de séquence. La PKG-II a été initialement décrite comme un monomère (de Jonge, 1981; Jarchau *et al.*, 1994; Vaandrager *et al.*, 1997), mais des études plus récentes montrent qu'elle existe sous forme de dimère comme la PKG-I (Jarchau *et al.*, 1994; Vaandrager *et al.*, 1997).

1.1. Structure

Les divers membres de la famille des PKG ($I\alpha$, $I\beta$ et II) sont constitués d'homodimères de masse monomérique respectivement 76, 78 et 86 kDa (figure 23).

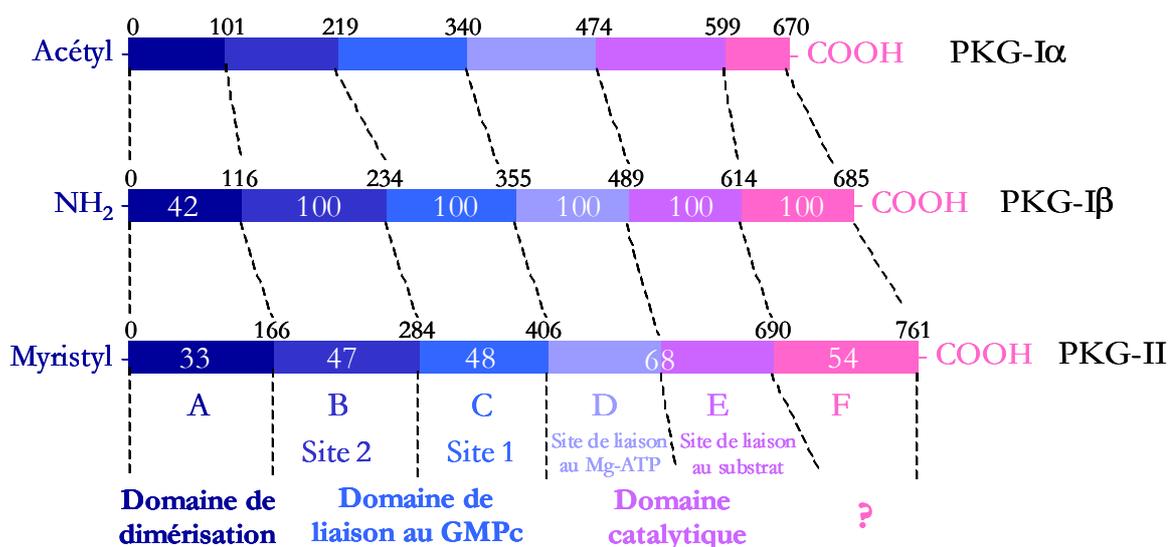


Figure 23 : Structure et homologies de séquence des PKG. D'après Lohmann *et al.* (1997).

Les pourcentages d'homologie de la PKG-I β et de la PKG-II par rapport à la PKG-I α , sont indiqués dans les différents domaines.

Les isoformes α et β de la protéine kinase de type I sont homologues dans la partie allant du résidu sérine 89 de l'isomère α (correspondant à la sérine 104 de l'isomère β) jusqu'à l'extrémité C-terminale, mais elles diffèrent grandement dans la partie N-terminale, où elles ne présentent plus que 42% d'homologie. Cette divergence abrupte d'identité entre les deux isoenzymes suggère que les deux formes proviennent d'un épissage alternatif (Francis *et al.*, 1988).

La PKG-II présente une homologie totale d'environ 54% avec la PKG-I. Elle atteint 68% dans le domaine catalytique, alors qu'elle n'est que de 47% dans le domaine liant le GMPc, et est très faible dans le domaine de dimérisation (Uhler, 1993).

Les différentes isoformes de la PKG présentent cinq domaines fonctionnels (figure 23) (Francis et Corbin, 1994; Vaandrager *et al.*, 1996) :

- **un domaine A de dimérisation** : un motif "glissière à leucine" localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine assure la dimérisation des monomères. Ce domaine comprend aussi une région comportant des sites d'autophosphorylation, et un domaine auto-inhibiteur. Cette région auto-inhibitrice réduit l'activité de l'enzyme en l'absence de GMPc.

- **deux domaines successifs B et C de liaison au GMPc** sont situés du côté N-terminal du domaine catalytique. L'occupation des deux sites par le GMPc est nécessaire pour l'activation optimale. La liaison du GMPc sur la kinase induit un changement conformationnel, qui lève l'auto-inhibition de la kinase.

- **les domaines D et E constituent le site actif**. Le site D correspond au domaine de liaison de l'ATP et du magnésium, alors que la partie E correspond au site de liaison de l'enzyme à son substrat. C'est la région la mieux conservée parmi les diverses PKG, et présente même une homologie avec le domaine catalytique de la PKA. Dans son état inactif, le domaine catalytique est complexé avec le domaine auto-inhibiteur. Un site NLS ("signal de localisation nucléaire") a été mis en évidence dans le domaine de liaison de l'ATP de la PKG (Gudi *et al.*, 1997). Ce site lui permet de pénétrer dans le compartiment nucléaire par un processus actif. Toutefois, la PKG ne migre dans le noyau qu'après avoir été activée par le GMPc, c'est-à-dire quand ce site n'est pas lié au site auto-inhibiteur.

- à l'extrémité C-terminale est présent un **domaine F** dont la fonction reste indéterminée.

1.2. Localisation cérébrale

La PKG-I est localisée principalement dans les cellules de Purkinje du cervelet (Lohmann *et al.*, 1981). Elle est aussi exprimée dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum, dans l'hippocampe et l'hypothalamus dorso-médian (Ariano et Matus, 1981; Ariano, 1983 ; Zhuo *et al.*, 1994; El-Husseini *et al.*, 1999), ainsi que dans quelques noyaux du tronc cérébral (De Camilli *et al.*, 1984).

La PKG-II est exprimée dans de nombreuses structures cérébrales du cerveau antérieur jusqu'au tronc cérébral. Elle est surtout présente dans les neurones, mais également, à un moindre niveau, dans des astrocytes et des oligodendrocytes (de Vente *et al.*, 2001). Une étude enzymatique portant sur la phosphorylation de DARPP-32 ("dopamine AMPc-regulated phosphoprotein", de masse moléculaire 32 kDa) par la PKG, montre qu'elle est présente dans les neurones dopaminergiques de la SN et du CPU (Walaas *et al.*, 1989). Mais cette étude ne discrimine pas les différentes isoformes. Les deux isoformes de la PKG-I sont exprimées dans le cytoplasme des neurones, alors que la PKG-II est ancrée aux membranes cellulaires par son extrémité N-terminale (Vaandrager *et al.*, 1996).

2. Mode d'action

2.1. Activateurs pharmacologiques

Des analogues de nucléotides cycliques perméables aux membranes sont utilisés pour étudier le rôle des protéine kinases dépendant de ces nucléotides.

Pour stimuler la PKG dans le système nerveux, nous avons utilisé le 8-Bromo-GMPc (Br-Gc). C'est un meilleur activateur de la PKG que le GMPc lui-même, et est plus lipophile (Butt *et al.*, 1992; Finn *et al.*, 1996). De plus, son affinité pour la PKG est 1200 fois supérieure à celle pour la PKA. Enfin, il n'est pas hydrolysé par les PDE, et ne module pas de façon significative l'activité enzymatique des différentes PDE (Finn *et al.*, 1996). On connaît deux autres activateurs de la PKG, le N²-2-O-dibutyryl-GMPc et le 8-(*p*-chlorophénylthio-)GMPc (8pCPT-GMPc) (Corbin *et al.*, 1986).

Nous avons également utilisé un antagoniste de la PKG, le KT 5823, un dérivé d'un inhibiteur général des Ser/Thr kinases, le K-252a. Il présente un Ki pour la PKG de 0,2 µM alors que son Ki pour la PKA est supérieure à 10 µM (Kase *et al.*, 1987).

2.2. Spécificité de substrat

Un grand nombre de substrats des PKG avaient été caractérisés comme des substrats de la PKA auparavant. Il a fallu attendre de nombreuses années avant de caractériser des substrats sélectifs des PKG (Colbran *et al.*, 1992; Butt *et al.*, 1994a).

La spécificité de substrat des isoformes I et II semble très proche (Vaandrager et de Jonge, 1996). Des études de spécificité de substrats ont montré, d'une part, que le motif minimal de phosphorylation de la PKG-I était RKXS/T et que, d'autre part, les meilleures cinétiques étaient obtenues avec le motif KRKKS/T (Tegge *et al.*, 1995). Dans le tableau 3 sont regroupées des protéines phosphorylées par la PKG.

Protéine	Taille (kDa)	Séquence de phosphorylation	Km (μ M)
<i>Implications de nucléotides cycliques</i>			
su R1 de la PKA	47	GRRRRGAI \underline{S} AE	2,2
PDE-5	93	RKI \underline{S} ASEFDRPLR	68
NOS	150	RKT \underline{S} SL, RK \underline{S} SGD	
PKG-I α (autophosphorylation)	78	IGPRTT \underline{I} RAQGI	578
PKG-I α (autophosphorylation)	78	QSASTL \underline{Q}	
<i>Associées au cytosquelette</i>			
VASP Peptide 1	45-50	LRKV \underline{S} SKQE	94
Vimentine	57		
CNPase	46	RKD \underline{S} RP	
<i>Régulation de phosphatases</i>			
Substrat G	23	RRKD \underline{T} PALH	0,21
DARPP-32	32	RRRRP \underline{T} PAMLF	5,4
Inhibiteur I	23	RRRRP \underline{T} PATL	25
<i>Signal calcium</i>			
IP3R	240	GRRE \underline{S} LTSFG	
RyR	400	KKK \underline{T} RKI \underline{S} QTAQTYD	
Phospholambane	5	TRSAIRRA \underline{S} TIEMP	
Canal calcium L su- α	210	RKRRKM \underline{S} RGL	
Canal calcium L su- β	55		
Canal calcium N su- α	250	RRRA \underline{S} QLK	15
<i>Canaux ioniques</i>			
GABA-A	169	RRRA \underline{S} QLK	15
Canal K $^{+}$	5	RKA \underline{S} TLE	50
Canal Na $^{+}$			
<i>Protéines G</i>			
Rap1B	21	KARKK \underline{S} SCQLL	
G $_{i\alpha}$	40	LNKRK \underline{D} TKE	

Tableau 3 : Principaux substrats de la PKG, regroupés selon leur fonction. D'après Wang and Robinson (1995). Les sites de phosphorylation de la PKG sont soulignés. su : sous-unité.

3. Fonctions et substrats des PKG

3.1. Interaction avec le cytosquelette

Deux substrats connus de la PKG jouent un rôle dans la régulation du cytosquelette : la VASP ("vasodilator stimulated phosphoprotein") et la vimentine. La VASP est associée aux filaments d'actine et aux plaques d'adhésion focale (Butt *et al.*, 1994b). La vimentine est une protéine des filaments intermédiaires. La vimentine est en fait complexée à la PKG et la phosphorylation de la vimentine entraîne une redistribution de la PKG (Pryzwansky *et al.*, 1995).

3.2. Régulation de la protéine phosphatase de type 1 (PP1)

Deux substrats bien caractérisés de la PKG sont des inhibiteurs de la protéine phosphatase de type I : le substrat G et la DARPP-32 (Aswad et Greengard, 1981). Le substrat G est exprimé dans les cellules de Purkinje, et DARPP-32 dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum (Walaas *et al.*, 1983). Ces neurones expriment aussi la guanylyl cyclase soluble et la PKG (Ariano et Ufkes, 1983).

La protéine DARPP-32 est phosphorylée *in vivo* après stimulation des récepteurs dopaminergiques D1, mais aussi suite à la stimulation du récepteur GC-A par l'ANP (Snyder *et al.*, 1992), ou par la stimulation de la GCs par le NO (Tsou *et al.*, 1993). La protéine DARPP-32 régule la libération de GABA et contrôle ainsi la neurotransmission dopaminergique (Fienberg *et al.*, 1998). C'est ainsi qu'elle est impliquée dans le phénomène de sensibilisation comportementale observée en réponse à la cocaïne (Hiroi *et al.*, 1999). Le mécanisme de l'implication de DARPP-32 dans les neurones épineux GABAergiques sera discuté ultérieurement.

3.3. Effets sur la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

La stimulation de la PKG induit souvent une diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, donc une modulation de nombreux phénomènes physiologiques contrôlés par ce cation, comme la libération de neurotransmetteurs. Plusieurs substrats de la PKG concourent à la baisse de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. La PKG inactive des canaux calcium de type L et N dans certains neurones (Hell *et al.*, 1993; Hell *et al.*, 1994; Meriney *et al.*, 1994). La phosphorylation du récepteur de l'inositol-1,4-5-triphosphate (IP3) contribue aussi à la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$,

puisqu'elle bloque la libération de Ca^{2+} à partir du réticulum endoplasmique. La phosphorylation du phospholambane active une ATPase, qui diminue la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Sarcevic *et al.*, 1989). Enfin, l'activation de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, par phosphorylation par la PKG, participe à la régulation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Furukawa *et al.*, 1991). L'intervention de la PKG dans la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et son implication dans la libération de neurotransmetteurs seront discutées ultérieurement.

3.4. Induction de gènes

Contrairement à l'effet de l'AMPc sur l'expression des gènes (Sheng *et al.*, 1990; Angel et Karin, 1991), les données concernant la voie du GMPc sont plus récentes. Des études réalisées au laboratoire ont montré que des gènes à réponse précoce étaient transcrits suite à l'activation de la voie du GMPc. En effet, la stimulation de cellules PC12 par du nitroprussiate de sodium, qui libère spontanément du NO, s'est avérée induire la transcription des gènes *c-fos* et *junB*, et augmenter l'activité de liaison du facteur AP1 (Haby *et al.*, 1994). Cette activation de la transcription implique le GMPc et la stimulation de la PKG. Des sites SRE ("serum responsive element") et TRE ("TPA responsive element") sont concernés par la stimulation de la transcription par la PKG (Pilz *et al.*, 1995; Gudi *et al.*, 1996). Les peptides natriurétiques ANP, BNP et CNP, par l'activation de la transduction du GMPc, induisent l'expression des gènes *c-fos*, *egr-1* et *junB* dans des cellules PC12 et des cellules C6 (Thiriet *et al.*, 1997).

3.5. Potentialisation et dépression à long terme

La voie de transduction du GMPc est impliqué dans ces modèles d'apprentissage. L'administration de GMPc dans l'hippocampe a révélé son rôle dans les premières étapes de la mémorisation (Bernabeu *et al.*, 1997). La potentialisation à long terme (LTP) est un événement éminemment post-synaptique, mais son maintien résulte d'évènements pré-synaptiques. Ce phénomène de plasticité synaptique a été décrit d'abord dans l'hippocampe, et a été généralisé dans le cortex cérébral et le striatum (Kombian et Malenka, 1994). Dans l'hippocampe, le NO, formé par la NO synthétase, stimulée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline dans le neurone post-synaptique, est un candidat pour relayer l'information de manière rétrograde à travers l'espace synaptique (Zhuo *et al.*, 1994). Il induit alors des adaptations pré-synaptiques, notamment au niveau de la

libération de neurotransmetteurs (Nei *et al.*, 1996). La participation de la voie du GMPc dans ce phénomène a été démontrée. En effet, l'activation de la PKG, par des analogues du GMPc, induit une sensibilisation du système de libération de neurotransmetteurs, ainsi qu'une potentialisation de la réponse synaptique (Arancio *et al.*, 1995; Centonze *et al.*, 2001).

En plus de la LTP, on a décrit le phénomène de dépression à long terme (LTD). Ce phénomène a été décrit dans le cervelet, mais également dans le striatum et l'hippocampe. Il s'agit d'une baisse de la libération de neurotransmetteurs par la terminaison pré-synaptique, créant ainsi une diminution de l'efficacité dans la réponse post-synaptique. Au niveau des neurones épineux de taille moyenne du striatum, la stimulation simultanée des afférences glutamatergiques corticales et dopaminergiques nigrostriatales provoque des modifications à long terme de l'excitabilité synaptique. La stimulation répétée des fibres corticales produit une libération massive de DA et de Glu dans le striatum, et selon le type de récepteurs dopaminergiques (et glutamatergiques) activés au niveau post-synaptique, soit une LTP, soit une LTD est induite. Lorsque les récepteurs des familles D1 et D2 interagissent de façon synergique, la LTD est induite ; lorsqu'ils agissent de façon opposée, on observe l'induction de la LTP. La genèse de ces formes de plasticité synaptique nécessite l'activation de la PKG et de la PKA, et la phosphorylation de DARPP-32 (Centonze *et al.*, 2001).

Chapitre IV. Les gènes à réponse précoce

La neurotransmission est un événement bref, qui déclenche des modifications synaptiques à court terme. Dans certains cas, les neurotransmetteurs entraînent des changements durables du phénotype, et par conséquent, du fonctionnement cellulaire. La découverte des gènes à réponse précoce a permis une avancée considérable dans l'étude des processus permettant à la cellule de s'adapter à son environnement, puisque ce sont précisément des gènes transcrits de manière rapide et transitoire, en réponse à des stimuli extracellulaires, tels que des neurotransmetteurs, des hormones, des facteurs de croissance, des agents mitogènes ou des facteurs de stress cellulaire. Leur induction ne nécessite pas de synthèse de nouvelles protéines. Certains gènes précoces codent des facteurs de transcription, régulant la transcription d'une deuxième vague de gènes exprimés plus tardivement. Ainsi, les gènes précoces représentent un intermédiaire entre une stimulation brève de la cellule et son adaptation à long terme en réponse à cette stimulation.

Plusieurs familles de gènes à réponse précoce ont été grandement étudiées, notamment, la famille des gènes *fos* et *jun*, codant le facteur de transcription AP1. Pour notre part, nous nous sommes intéressés essentiellement à l'expression des gènes de la famille *egr*.

A. Les gènes de la famille *egr*

Parmi l'ensemble des gènes à réponse précoce, le gène *egr-1* (acronyme pour "early growth response") est un des mieux caractérisés comme reflétant l'activité synaptique, ainsi que pour intervenir dans la mise en place des modifications phénotypiques responsables de la plasticité synaptique (Worley *et al.*, 1991; Dragunow, 1996). Il est le principal membre d'une famille de gènes à réponse précoce, comprenant aussi *egr-2*, *egr-3* et *egr-4*. *Egr-1*, *egr-2* et *egr-3* codent des facteurs de transcription, alors qu'*egr-4* code un répresseur transcriptionnel (Zipfel *et al.*, 1997).

1. Le gène précoce *egr-1* et son promoteur

Le gène *egr-1* a été découvert en tant que gène induit, soit par des agents mitogènes d'où son nom (Sukhatme *et al.*, 1987), soit par l'ester de phorbol TPA (12-O-

tétradécanoyl-phorbol-13-acétate), un activateur de la PKC. Il a été nommé dans ce cas *TIS8* ("TPA inducible sequence") (Lim *et al.*, 1987). Le facteur de différenciation cellulaire NGF induit également sa transcription, d'où l'appellation *NGFI-A* ("nerve growth factor induced") (Milbrandt, 1987). Un rôle dans la neurogénèse postnatale lui a valu le nom de *Krox-24* ("boîte de Krüppel") (Lemaire *et al.*, 1988). Il est nommé également *zif 268* ("zinc finger cDNA") car il a été découvert en tant que protéine possédant des motifs en doigt de zinc (Christy *et al.*, 1988). Enfin, le nom de ZENK lui a été attribué pour son rôle dans le chant des oiseaux (Mello *et al.*, 1992).

Les gènes *egr-1* murin (3,8 kb) et humain (3,6 kb) (Sakamoto *et al.*, 1991) possèdent deux exons et un intron d'environ 700 paires de base (Tsai-Morris *et al.*, 1988).

Les éléments régulateurs du promoteur du gène *egr-1* ont été conservés au cours de l'évolution (Sakamoto *et al.*, 1991). On trouve, en effet, dans l'ensemble des promoteurs étudiés, les sites régulateurs suivants : 5 sites SRE ("serum responsive element"), 2 sites CRE ("cAMP responsive element"), 1 site TRE ("TPA responsive element"), 2 sites Sp1, 2 sites AP-1 et 3 sites EBE ("Egr binding element"), reconnu par la protéine Egr-1 elle-même (Sakamoto *et al.*, 1991; Cao *et al.*, 1990; Christy et Nathans, 1989a; Tsai-Morris *et al.*, 1988) (figure 24).

1.1. La séquence SRE

Parmi les cinq sites SRE présents dans le promoteur d'*egr-1*, seuls deux sont fonctionnels. Leur activation nécessite la présence de motifs Ets (McMahon et Monroe, 1995). Il est démontré que la séquence SRE CC(A/T)₆GG du gène murin est responsable de la transcription d'*egr-1* par le sérum, le PDGF ("platelet-derived growth factor"), le FGF ("fibroblast growth factor"), le NGF ("nerve growth factor"), l'IGF ("insulin-like growth factor"), l'EGF ("epidermal growth factor") (Christy et Nathans, 1989a), et également par des oncogènes (*ras*, *raf*, *src*, ...), par des cytokines et par un ensemble de stimuli qui activent les voies des MAP kinases ("mitogen-activated protein kinases") ERK, JNK et p38 kinase (Treisman, 1992). L'élément SRE est reconnu par la phosphoprotéine nucléaire SRF ("serum responsive factor"). Toutefois, la liaison de SRF à la séquence SRE nécessite le recrutement d'un facteur de la famille TCF ("ternary complex factor"), dont le plus connu est le facteur Elk-1, un membre de la famille Ets (Dalton et Treisman, 1992). Elk-1 se fixe sous forme monomérique sur le complexe SRF/SRE, après avoir été activé

par phosphorylation par l'ensemble des MAP kinases (Gille *et al.*, 1992). Puisque la séquence SRE est occupée de façon constitutive (Treisman, 1992), l'activation par phosphorylation d'Elk-1 représente le mécanisme le plus probable par lequel les MAP kinases induisent l'expression du gène *egr-1*.

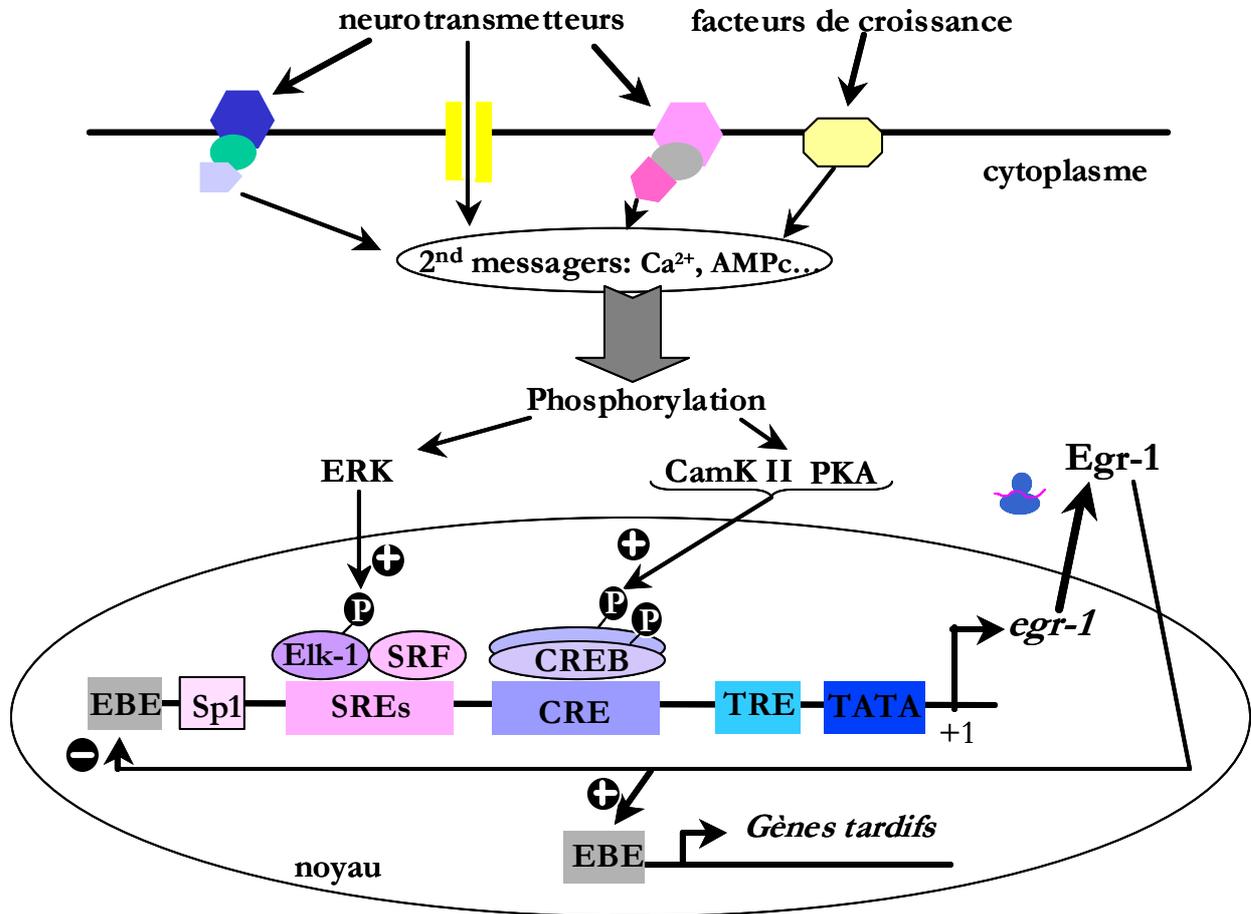


Figure 24 : Les éléments régulateurs du promoteur du gène *egr-1*. D'après Sakamoto *et al.*, (1992) avec modifications.

ERK: "extracellular receptor-activated protein kinase"; CamK II: protéine kinase dépendant du complexe Ca²⁺/calmoduline de type II; SRE: "serum responsive element"; SRF: "serum responsive factor"; CRE: "cAMP responsive element"; CREB: "CRE binding protein"; EBE: "Egr-1 binding element"; TRE: "TPA responsive element".

1.2. La séquence CRE

La séquence CRE ("cAMP responsive element") sert de relais aux seconds messagers Ca²⁺ et AMPc, qui activent respectivement une protéine kinase dépendant du complexe Ca²⁺/Calmoduline (CamK), et la protéine kinase dépendant de l'AMPc (PKA). Ces mécanismes assurent la transcription d'*egr-1*, en réponse aux neurotransmetteurs ou aux hormones utilisant le Ca²⁺ ou l'AMPc comme second messager (Sheng *et al.*, 1994).

Dans la cellule au repos, l'homodimère CREB est lié au motif CRE et c'est sa phosphorylation sur le résidu sérine 133 par la PKA ou la CamKII, qui conduit à l'activation de la transcription (Lee *et al.*, 1995)(figure 24). Ce site est déphosphorylé par la protéine phosphatase de type 2A (PP2A), qui représente un élément supplémentaire régulant l'expression d'*egr-1* par la protéine CREB (Wadzinski *et al.*, 1993). L'activation de la transcription par CREB est contrecarrée par un élément modulateur, la protéine CREM ("cAMP responsive element modulator"), et ce par la formation d'un hétérodimère (Foulkes *et al.*, 1991). Plusieurs isoformes de protéines CREM (α , β , γ , τ) ont été décrites.

1.3. Les autres éléments régulateurs

L'élément TRE ("TPA responsive element") est responsable de la transcription d'*egr-1* par le TPA (Christy et Nathans, 1989b). Ce site TRE est également le site de fixation du facteur de transcription AP1 (Sakamoto *et al.*, 1991). Ainsi, la transcription d'*egr-1* peut être régulée par les protéines Jun et Fos, via les sites AP1 (Dragunow *et al.*, 1994).

La régulation de la transcription d'*egr-1* par la protéine Egr-1 elle-même, se fait par l'intermédiaire des régions EBE (Cao *et al.*, 1990). La protéine Egr-1 inhibe sa propre transcription, alors que Sp1 active la transcription du gène (Cao *et al.*, 1993).

2. Le gène *egr-2*

Egr-2, appelé aussi *Krox-20*, a été découvert comme un gène induit par le sérum dans des fibroblastes NIH 3T3 (Chavrier *et al.*, 1988). Le promoteur d'*egr-2* possède différents éléments régulateurs, dont deux sites SRE, 3 sites TRE, 2 sites Sp1 et 2 sites CRE (Chavrier *et al.*, 1989).

3. Le gène *egr-3*

Egr-3, appelé aussi *PILOT*, a été découvert comme un gène induit par des cytokines dans des lymphocytes T (Patwardhan *et al.*, 1991; Mages *et al.*, 1993). A ce jour, aucune étude n'a porté sur la description des éléments régulateurs présents dans le promoteur d'*egr-3*.

B. Les facteurs de transcription Egr

Les principales caractéristiques structurales des protéines codées par les membres de la famille *egr* sont résumées dans la figure 25.

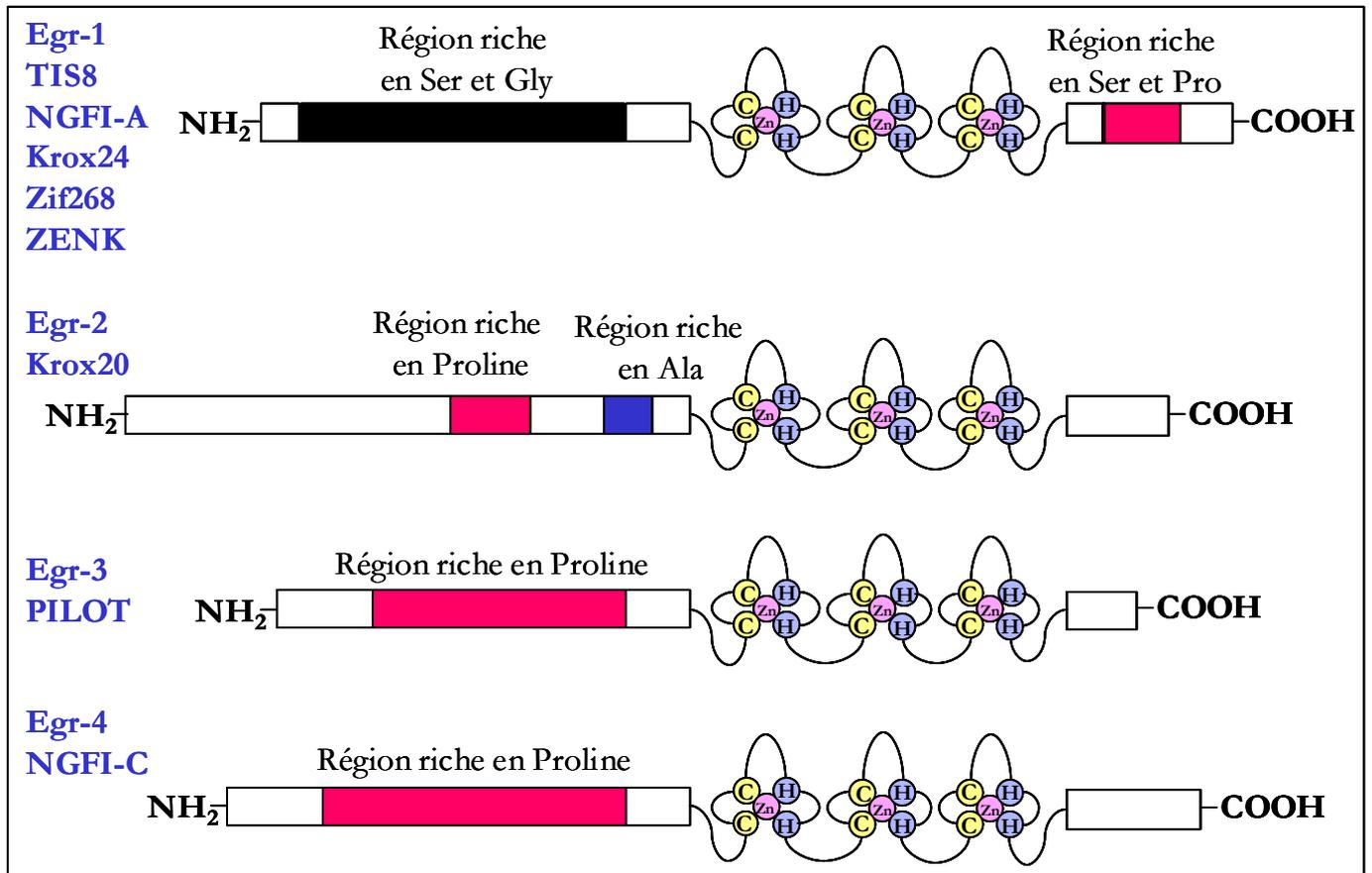


Figure 25 : Structure des protéines de la famille Egr. D'après O'Donovan *et al.* (1999) avec modifications.

Les facteurs de transcription de la famille Egr se lient à l'ADN sur une séquence consensus: GCG(G/T)GGGGCG, nommée EBE (Christy et Nathans, 1989b; Cao *et al.*, 1990; Crosby *et al.*, 1991; Patwardhan *et al.*, 1991). Ces protéines contiennent toutes un domaine de liaison à l'ADN, composé de trois boucles appelées motifs en "doigts de zinc", caractérisés par la répétition d'une séquence de 28 à 30 acides aminés contenant deux résidus cystéine et deux résidus histidine conservés. Ces quatre résidus coordonnent un ion zinc suivant un motif Cys₂His₂, et le repliement de la protéine facilite l'interaction avec l'ADN, via les résidus basiques des boucles. Dans ce domaine, les protéines Egr présentent plus de 90% d'homologie de séquence alors que l'on ne retrouve qu'une très faible homologie dans les autres domaines. Ce domaine de liaison à l'ADN contient également un site NLS ("nuclear localization signal"), qui est indispensable au passage des facteurs de transcription dans le noyau (Matheny *et al.*, 1994).

Les protéines Egr-1, Egr-2 et Egr-3 contiennent un domaine inhibiteur de 34 acides aminés du côté N-terminal des "doigts de zinc", appelé R1. Ce domaine interagit avec deux protéines nommées NAB1 et NAB2 ("NGFI-A binding protein"). La liaison d'une protéine NAB sur le domaine R1 conduit à inhiber l'activité trans-activatrice des protéines Egr (Russo *et al.*, 1995; Svaren *et al.*, 1996).

1. Le facteur de transcription Egr-1

2.1. Structure

La structure de la protéine Egr-1 est proche de celle des facteurs de transcription TFIIA (Miller *et al.*, 1985) et Sp1 (Kadonaga *et al.*, 1988). Elle possède trois domaines particuliers (figure 25) : la partie N-terminale (acides aminés 1 à 331), riche en résidus sérine et thréonine, la partie C-terminale (acides aminés 417 à 533), riche en résidus proline, et un domaine central basique contenant les trois doigts de zinc (Sukhatme *et al.*, 1988). Deux formes d'Egr-1 co-existent : une première est localisée dans le noyau (82 kDa) et l'autre est cytoplasmique (54 kDa). La forme cytoplasmique est tronquée en avant du domaine contenant les doigts de zinc. De ce fait, elle ne possède plus le motif NLS, lui permettant de migrer dans le noyau (Matheny *et al.*, 1994). La forme nucléaire possède un motif NLS "bipartite", situé dans le domaine des trois doigts de zinc. Ce motif "bipartite" est composé de deux acides aminés acides, d'une région "espace" d'environ dix acides aminés, suivi d'un ensemble d'acides aminés basiques (Gashler *et al.*, 1993).

2.3. Régulation post-traductionnelle

La régulation de l'activité transcriptionnelle d'Egr-1 est assurée par des mécanismes de phosphorylation et d'oxydo-réduction. Mais, on trouve également une régulation de l'activité d'Egr-1 par les protéines NAB. Cette dernière est décrite dans le paragraphe E.

2.3.1. Régulation de l'activité par des mécanismes de phosphorylation

L'activité de liaison d'Egr-1 est régulée par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation (Cao *et al.*, 1990; Lemaire *et al.*, 1990; Huang et Adamson, 1994). Cette régulation a lieu dans le domaine N-terminal, riche en résidus sérine et thréonine. Ceci est conforté par le fait que l'addition d'inhibiteurs de

phosphatases conduit à une hyperphosphorylation de la protéine et à une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Cao *et al.*, 1992). On ignore toutefois la nature des protéines kinases et des protéines phosphatases incriminées.

2.3.2. Régulation de l'activité par des mécanismes d'oxydo-réduction

Des mécanismes d'oxydo-réduction régulent la liaison du facteur de transcription Egr-1 à l'ADN. La liaison d'Egr-1 est diminuée par l'altération de l'état d'oxydo-réduction du domaine contenant les doigts de zinc. En effet, Egr-1 sous forme réduite, est douée d'une activité de liaison, alors que la forme oxydée ne l'est pas. Un facteur nucléaire ubiquitaire, Ref-1 ("redox factor-1") semble intervenir dans ce processus (Huang et Adamson, 1993). Notons que ce facteur est lui-même régulé par des réactions d'oxydo-réduction.

2. Le facteur de transcription Egr-2

Le gène *egr-2* code un facteur de transcription possédant qu'une faible homologie de séquence avec Egr-1, sauf dans le domaine des trois doigts de zinc où l'homologie est de 92% (Joseph *et al.*, 1988) (figure 25). La protéine Egr-2 contient trois domaines particuliers, une région riche en résidus proline, une autre riche en résidus alanine du côté N-terminal, et un domaine central basique contenant les trois doigts de zinc (Mack *et al.*, 1992). Comme pour le facteur Egr-1, deux formes d'Egr-2 ont été décrites, une présente dans le cytoplasme (55 kDa) et l'autre dans le noyau (79 kDa) (Mack *et al.*, 1992; Herdegen *et al.*, 1993). L'activité du facteur de transcription Egr-2 semble être également régulée par des mécanismes d'oxydo-réduction, sans doute de façon similaire à la régulation d'Egr-1 (Huang et Adamson, 1993).

3. Le facteur de transcription Egr-3

Le gène *egr-3* code également un facteur de transcription possédant un domaine à trois doigts de zinc, permettant sa liaison à l'ADN (figure 25). La protéine Egr-3 possède une très grande région riche en résidus proline du côté N-terminal. A ce jour, une seule protéine Egr-3 (80 kDa) a été décrite, ce qui la diffère des protéine Egr-1 et Egr-2 (Beckmann et Wilce, 1997).

C. Expression des gènes *egr* dans le SNC

1. Expression d'*egr-1* dans le SNC

L'expression des gènes à réponse précoce, dont le gène *egr-1*, a été largement étudiée dans le système nerveux des mammifères pour deux raisons principales. D'une part, l'induction d'un tel gène permet de cartographier les structures cérébrales activées ; d'autre part, la compréhension de son induction permet de mieux caractériser les événements successifs qui mènent de la stimulation neuronale aux changements phénotypiques durables.

1.1. Expression basale

Une étude détaillée de l'expression basale du messager *egr-1* dans le cerveau de rat montre que les messagers sont présents dans le néo-cortex (couche IV et VI), le cortex entorhinal et moteur, l'amygdale, le cortex cérébelleux et l'hippocampe. Un faible niveau d'expression a été décrit dans le striatum (Schlingensiepen *et al.*, 1991).

Dans les conditions basales, la protéine Egr-1 est localisée dans des neurones du cortex cérébral (couches II, IV et VI et plus faiblement dans les couches III et V), l'hippocampe, le thalamus et aussi dans l'amygdale, le septum latéral et les tubercules olfactifs (Herdegen *et al.*, 1990; Mack *et al.*, 1990; Waters *et al.*, 1990; Gass *et al.*, 1993).

1.2. Induction de l'expression d'*egr-1*

De nombreux stimuli extracellulaires ont été décrits comme induisant l'expression d'*egr-1* dans le SNC. Nous limitons cette description aux neurotransmissions dopaminergique et glutamatergique.

1.2.1. Par la dopamine

L'activation des récepteurs D1 par l'agoniste SKF-38393 augmente la transcription d'*egr-1* dans des neurones du striatum en culture. Cet effet est bloqué par l'activation des récepteurs D2 (Simpson et Morris, 1995).

In vivo, l'induction de l'expression d'*egr-1*, en réponse à la stimulation des récepteurs D1, est majoritairement localisée dans les neurones épineux GABAergiques de taille moyenne du NAc et du CPu (Martin et Magistretti, 1998). D'autre part, l'administration

de SCH23390, un antagoniste des récepteurs D1 réduit l'expression d'*egr-1* (Mailleux *et al.*, 1992). La lésion des neurones dopaminergiques par la neurotoxine 6-OHDA empêche l'induction d'*egr-1* (Bhat *et al.*, 1992b). Concernant le récepteur D2, ce sont les antagonistes de ce récepteur qui induisent l'expression d'*egr-1* dans le striatum, comme l'atteste une étude réalisée au laboratoire (Esteve *et al.*, 1995).

De nombreuses études, dont certaines réalisées au laboratoire, ont montré qu'une injection aiguë de cocaïne induisait rapidement et transitoirement la synthèse d'*egr-1*, dans des neurones du cerveau antérieur (Hope *et al.*, 1992; Bhat et Baraban, 1993; Daunais et McGinty, 1996; Humblot *et al.*, 1998; Thiriet *et al.*, 1998). Cette induction résulte de l'activation accrue des récepteurs D1 du striatum, en réponse à l'accumulation de DA dans la synapse (Drago *et al.*, 1996). Mais le système sérotoninergique est impliqué dans cette expression (Morinobu *et al.*, 1997; Humblot *et al.*, 1998; Thiriet *et al.*, 1998). Par contre, des injections répétées de cocaïne ont été décrites, comme n'induisant plus l'expression du messenger *egr-1* durant les quelques heures suivant la dernière injection (Bhat *et al.*, 1992a; Daunais et McGinty, 1994; Moratalla *et al.*, 1996b).

Les amphétamines substituées, dont la méthamphétamine, sont également capables d'induire l'expression d'*egr-1* dans le cerveau antérieur (Wang et McGinty, 1996; Rodriguez et Gonzalez-Hernandez, 1999; Thiriet *et al.*, 2001).

1.2.2. Par le glutamate

L'activation neuronale, en stimulant l'ensemble des récepteurs du Glu, est susceptible d'induire l'expression d'*egr-1*. Par exemple, une injection *in vivo* de NMDA augmente de façon dose-dépendante le taux de protéine Egr-1 dans le cortex cérébral, l'hippocampe (neurones pyramidaux de l'aire CA3 et gyrus denté), le cervelet et les tubercules olfactifs (Beckmann *et al.*, 1997). Il semble que l'induction d'*egr-1* soit due à l'entrée de Ca²⁺ et à l'activation des MAP kinases (Xia *et al.*, 1996).

2. Expression d'*egr-2* dans le cerveau mature

2.1. Expression basale

En hybridation *in situ*, *egr-2* est détecté en condition basale principalement au niveau du tronc cérébral et faiblement dans le cortex cérébral de rat adulte (Mack *et al.*, 1992). On retrouve une faible expression de la protéine Egr-2 dans des neurones du

cortex cérébral (couches II et III), l'hippocampe et des structures diencephaliques, dont le thalamus et l'hypothalamus (Mack *et al.*, 1992). La protéine est aussi présente dans les cellules de Schwann, les cellules myélinisantes du système nerveux périphérique, ainsi que dans leur précurseur cellulaire. (Herdegen *et al.*, 1993).

2.2. Induction de l'expression

Très peu de stimuli se sont avérés capable d'induire l'expression d'*egr-2* dans le cerveau mature. Une injection de kainate induit une faible expression de la protéine Egr-2 dans l'hippocampe et le gyrus denté (Gass *et al.*, 1994). L'injection d'apomorphine à des rats préalablement traités à la réserpine, induit une expression d'*egr-2*, quoique plus faible que celle d'*egr-1*, dans le striatum et les tubercules olfactifs (Bhat *et al.*, 1992b).

Comme *egr-1*, *egr-2* est induit en réponse à une stimulation tétanique pouvant induire la LTP dans le cortex cérébral. Le maximum d'expression du messenger apparaît 1 h après la stimulation et un fort taux d'expression de la protéine Egr-2 est maintenu jusqu'à 24 h. Ce résultat suggère qu'*egr-2*, comme *egr-1*, pourrait participer à la stabilisation de la LTP (Williams *et al.*, 1995).

3. Expression du gène egr-3

3.1. Expression basale

Le messenger *egr-3* est présent dans les conditions basales dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le gyrus denté, le CPU et l'amygdale (Yamagata *et al.*, 1994; Honkaniemi et Sharp, 1999), alors que la protéine Egr-3 n'a été localisée à ce jour, que dans les couches II et IV du cortex cérébral.

3.2. Induction de l'expression

Peu d'études ont été consacrées à l'expression du gène *egr-3* dans le cerveau adulte. On peut noter, toutefois, que l'activation des récepteurs NMDA corticaux conduit à l'expression rapide et transitoire d'*egr-3*. De même, l'halopéridol augmente la transcription des messagers *egr-3* dans le striatum, avec des cinétiques d'expression similaires à celles observées pour *egr-1*. De plus, une injection de cocaïne induit la transcription d'*egr-3* dans le striatum et le cortex cérébral (Yamagata *et al.*, 1994). Cette étude a aussi montré que le

messenger *egr-3* était localisé dans les mêmes neurones du cortex cérébral que ceux exprimant *egr-1*. On peut penser que les deux facteurs interagissent pour réguler les phénomènes de plasticité synaptique.

D. Rôles des facteurs de transcription Egr

De nombreux gènes possèdent dans leur promoteur un site EBE. Il est donc probable que leur transcription soit sous le contrôle des facteurs de transcription Egr.

1. Rôles du facteur de transcription Egr-1

1.1. Induction de gènes à réponse tardive

Dans le tableau 4, sont cités des gènes cibles déjà décrits pour le facteur de transcription Egr-1 (tableau 4).

<i>Gènes cibles</i>	<i>Site EBE</i>	
Acétylcholine estérase	A	A : activation et R : répression de la transcription après fixation d'Egr-1 sur le site EBE. su : sous-unité. nACh : récepteur nicotinique de l'acétylcholine.
Adénosine déaminase	R	
Egr-1	R	
Hormone lutéinisante	A	
NAB1 et NAB2	A	
Neurofilament	A	
Récepteur P ⁷⁵ du NGF	A	
Phényléthanolamine-N-méthyl-transférase	A	
Synapsine I	A	
su α_7 du récepteur nACh	A	
su NR1 du récepteur NMDA	A	
Tyrosine hydroxylase	A	

Tableau 4 : Gènes connus à ce jour, portant un site EBE dans leur promoteur. D'après Beckmann and Wilce (1997) avec modifications.

1.2 Les souris "knock-out"

Les souris dont le gène *egr-1* a été invalidé, sont viables et présentent peu d'anormalités. Aucune expression compensatoire des autres protéines Egr n'a été observée chez ces souris. On a noté, toutefois, chez les souris femelles, une infertilité et une réduction drastique de la synthèse de l'hormone lutéinisante pituitaire (Lee *et al.*, 1996).

1.3. Implication dans la mémoire à long terme

Des études récentes ont montré que le gène *egr-1* était essentiel à la transition entre plasticité synaptique à court terme et modifications à long terme (Jones *et al.*, 2001).

L'activation de la transcription du gène *egr-1* correspond au seuil d'activation de la LTP (Worley *et al.*, 1993). En effet, l'expression d'*egr-1* est induite après dix minutes et jusqu'à deux heures, suite à une stimulation induisant la LTP dans le gyrus denté et le cortex cérébral, ce qui n'est pas le cas de *c-fos* par exemple (Cole *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1999). Sa cinétique d'expression suggère qu'elle est impliquée dans les étapes précoces de la LTP (Abraham *et al.*, 1991; Abraham *et al.*, 1993). Son rôle essentiel dans l'acquisition de la mémoire à long terme a été confirmé par des études réalisées chez des souris, dont l'inactivation du gène *egr-1* a été spécifiquement ciblée dans l'hippocampe (Jones *et al.*, 2001).

2. Rôle d'Egr-2

A l'heure actuelle, le seul rôle que l'on connaisse pour Egr-2 est son implication dans la différenciation des rhombomères 3 et 5 lors du développement (Schneider-Maunoury *et al.*, 1993). Les souris dont le gène *egr-2* a été sélectivement invalidé, présentent un déficit de myélinisation des fibres du système nerveux périphérique, qui est dû à une diminution du nombre de cellules de Schwann (Voiculescu *et al.*, 2000).

Notons dans le même ordre d'idées que des mutations dans le gène *egr-2* humain ont été détectées chez des patients atteints de myélinopathies sévères, ou du syndrome de "Marie-Charcot-Tooth" (Bellone *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 1999).

3. Rôles d'Egr-3

Morris *et al.* ont montré qu'*egr-3* était le seul gène de la famille *egr* à être induit par un stimulus visuel dans le noyau suprachiasmatique, une structure impliquée dans le contrôle de l'horloge biologique sous-tendant les rythmes comportementaux (Morris *et al.*, 1998).

Des souris dont le gène *egr-3* a été invalidé, présentent une ataxie sévère due à l'absence d'innervation des fibres musculaires (Tourtellotte et Milbrandt, 1998). En effet, *egr-3* est fortement exprimé dans les cellules musculaires post-synaptiques au cours des premières étapes de la différenciation musculaire chez les souris témoins, suggérant un rôle essentiel d'*egr-3* au cours du développement du système nerveux périphérique (Tourtellotte *et al.*, 2001).

E. Les co-répresseurs transcriptionnels *NAB*

1. Généralités

L'existence d'une protéine régulant l'activité de liaison de la protéine Egr-1 a été suggérée dès 1993 (Gashler *et al.*, 1993). En effet, une protéine chimère Egr-1, qui ne possédait pas la partie N-terminale, présentait une activité de liaison augmentée d'environ dix fois par rapport à la protéine Egr-1 native (Gashler *et al.*, 1993; Russo *et al.*, 1993). Ce n'est que deux ans plus tard, qu'un facteur cellulaire inhibant l'activité de liaison d'Egr-1, a été découvert et appelé NAB1 pour "NGFI-A binding protein 1" (Russo *et al.*, 1995). Puis, un deuxième facteur, le facteur NAB2 a été décrit (Svaren *et al.*, 1996). Ces protéines se lient à Egr-1, Egr-2 et Egr-3 dans le domaine inhibiteur R1, lorsqu'elles sont elles-mêmes liées à l'ADN, et inhibent l'activité des protéines Egr (Swirnoff *et al.*, 1998). La protéine Egr-4 ne possédant pas de domaine R1, n'est pas affectée par les protéines NAB. La situation est plus complexe puisque les protéines Egr stimulent l'expression des gènes *NAB1* et *NAB2*, régulant ainsi leur propre activité (Mechta-Grigoriou *et al.*, 2000). D'autre part, sur certains sites, NAB2 agit comme un co-activateur transcriptionnel, et non comme un répresseur (Sevetson *et al.*, 2000).

Les protéines NAB sont des phosphoprotéines nucléaires de masse apparente de 54 k, constituées de 570 acides aminés. Elles possèdent deux domaines NCD ("NAB conserved domain"), caractéristiques des protéines NAB au cours de l'évolution. Dans le deuxième de ces domaines, NCD2 (acides aminés 283 à 421), elles possèdent un motif bipartite NLS, indispensable à leur transfert dans le noyau (Swirnoff *et al.*, 1998).

2. Expression de NAB1

La protéine NAB1 est un régulateur transcriptionnel constitutif, qui est exprimée de façon ubiquitaire à travers le SNC. De plus, il semble que la transcription de *NAB1* ne soit pas dépendante de l'activité neuronale (Swirnoff *et al.*, 1998).

3. Expression de NAB2

A l'opposé de *NAB1*, l'expression de *NAB2* est régulée par les mêmes stimuli que ceux induisant l'expression d'*egr-1* (Svaren *et al.*, 1996). En effet, dans des cellules PC12,

les messagers *NAB2* sont induits de façon rapide et transitoire en réponse au sérum et au NGF (Svaren *et al.*, 1996).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour des raisons de clarté et de compréhension, les compositions des solutions utilisées sont détaillées en annexes à la fin de ce chapitre.

A. Préparation des animaux

Les études présentées dans ce travail ont toutes été réalisées avec des rats mâles adultes de la souche Wistar (200-250 g) provenant de l'élevage Janvier (Le Genest-St-Isle, France). Les animaux ont été maintenus dans un cycle contrôlé (12 h de lumière/12 h d'obscurité) avec un accès en nourriture et eau *ad libitum*.

1. Implantations stéréotaxiques de guide canules

Les animaux sont anesthésiés avec une solution de kétamine (Imalgene®, Merial, Lyon) à une dose de 100 mg/kg par voie intra-péritonéale (i.p.), puis placés dans un cadre stéréotaxique. Les guides canules (diamètre externe: 0,4 mm; diamètre interne: 0,3 mm; longueur : 12 mm) sont implantés bilatéralement aux coordonnées reportées dans la figure 26 selon Paxinos et Watson (1997):

Au niveau du noyau caudé-putamen (CPu) :

- antéro-postérieure : 0,3 mm du bregma,
- médio-latérale : \pm 3,5 mm,
- dorso-ventrale : - 4,8 mm.

Au niveau de la substance noire compacte (SNc) ou aire 9 (A9) :

- antéro-postérieure : 2,3 mm du lambda,
- médio-latérale : \pm 2 mm,
- dorso-ventrale : - 6,5 mm.

Au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA) ou aire 10 (A10) :

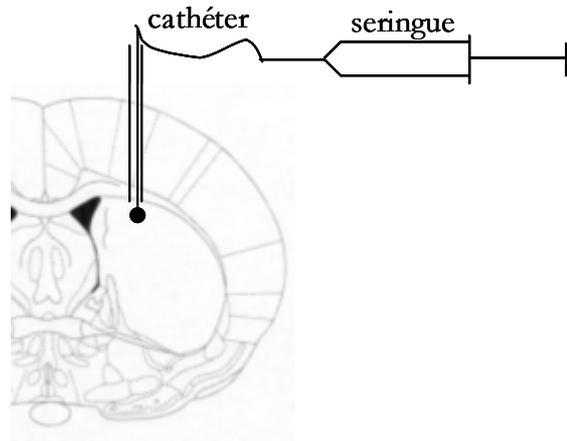
- antéro-postérieure : 2,3 mm du lambda,
- médio-latérale : \pm 0,5 mm,
- dorso-ventrale : - 7,7 mm.

Pour l'injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v), le guide canule est implanté au niveau du 4^e ventricule, dont les coordonnées stéréotaxiques sont:

- antéro-postérieure : 0,5 mm du lambda
- médio-latérale : 0 mm
- dorso-ventrale : - 4,5 mm

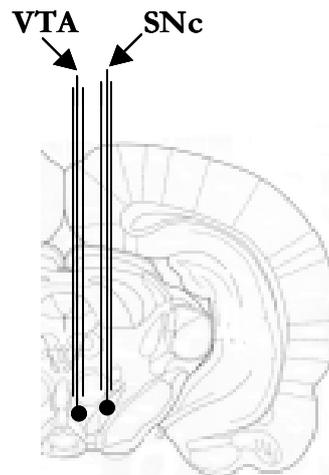
Au niveau du CPu :

- antéro-postérieure: 0,3 mm du bregma
- médio-latérale: \pm 3,5 mm
- dorso-ventrale: - 4,8 mm



Au niveau de la SNc:

- antéro-postérieure: 2,3 mm du lambda
- médio-latérale: \pm 2 mm
- dorso-ventrale: - 6,5 mm



Au niveau de la VTA:

- antéro-postérieure: 2,3 mm du lambda
- médio-latérale: \pm 0,5 mm
- dorso-ventrale: - 7,7 mm

Au niveau du 4^e ventricule :

- antéro-postérieure: 0,5 mm du lambda
- médio-latérale: 0 mm
- dorso-ventrale: - 4,5 mm

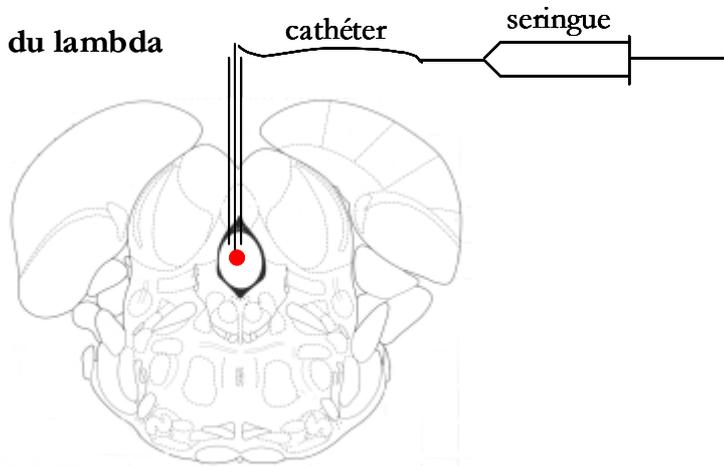


Figure 26 : Schéma d'implantation des guides canules pour les injections intracérébrales. Coordonnées stéréotaxiques d'après Paxinos & Watson, 1997.

Pour l'expérience de microdialyse, la sonde de dialyse est implantée dans le CPu aux coordonnées :

- antéro-postérieure : 0 mm du bregma
- médio-latérale : 3,5 mm
- dorso-ventrale : - 4 mm

Les guides canules sont maintenus de façon permanente à la surface de la boîte crânienne au moyen de vis et de ciment dentaire. Les injections intra-structures sont réalisées 4 jours après l'opération. Les substances pharmacologiques sont injectées dans les structures cérébrales au moyen d'une pompe d'injection (CMA 100, Carnergie Medicine, Suède) à un débit de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ à l'aide d'une micro-seringue Exmire, par l'intermédiaire d'une canule d'injection (diamètre externe: 0,28 mm; diamètre interne: 0,18 mm; longueur: 25 mm) calibrée descendant à une coordonnée ventrale de 1 mm en dehors du guide canule, soit de - 5,8 mm pour l'injection intra-CPu, de - 7,5 mm pour l'injection intra-SNc, de - 8,7 mm pour l'injection intra-VTA et de - 5,5 mm pour l'injection i.c.v. à partir de l'os du crâne (figure 26).

Deux microlitres d'une solution de 0,01, ou 0,1 ou 1 mM de CNP (rat CNP-22, Sigma, USA), préparée dans du NaCl 0,9%, sont administrés pendant 1 min du côté droit de l'encéphale. Le côté gauche est injecté avec un volume équivalent de NaCl 0,9%.

2. Transfert de gène *in vivo*

Dans le laboratoire, le gène humain codant la protéine kinase dépendant du GMPc de type I- α a été cloné et inséré dans un plasmide p513, un vecteur eucaryote d'expression transitoire (Esteve *et al.*, 2001). Sept et demi μg de ce plasmide sont complexés à 15 nmoles de polyéthylénimine (PEI) de 22kDa (obtenu du laboratoire du Pr. Behr, UMR 7514, Faculté de Pharmacie, Illkirch) dans une solution de glucose 5% (complexe PEI/ADN avec un rapport charges positives apportées par le PEI/charges négatives apportées par l'ADN égal à 5). Deux μl (0,5 μg) de cette solution sont injectés dans l'encéphale droit des animaux. L'injection dans l'encéphale gauche de la même quantité de plasmide p513 "vide" (ne contenant pas le gène codant la PKG) complexé au PEI correspond au traitement témoin du précédent.

Les complexes cationiques ADN/PEI pénètrent dans les cellules par endocytose. Dans le cytoplasme, l'ADN plasmidique est libéré, entre dans le noyau et est exprimé par la machinerie nucléaire (figure 27).

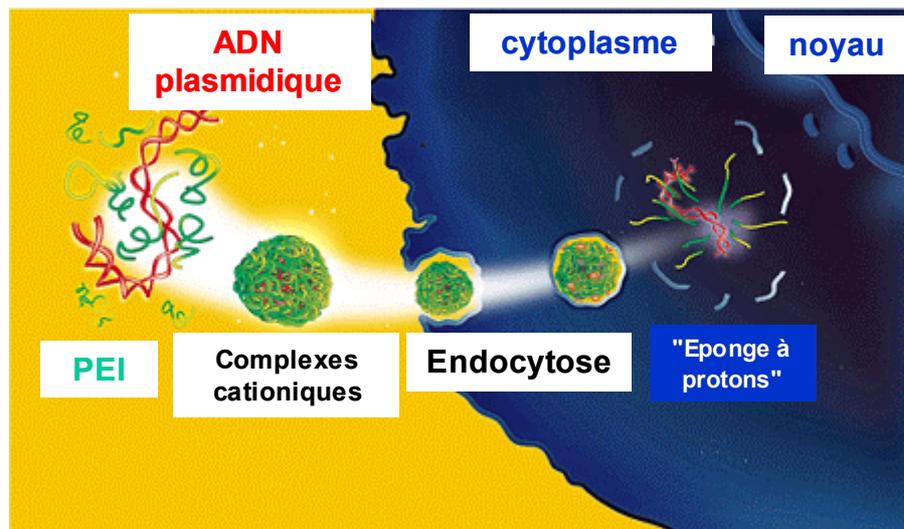


Figure 27: Schéma du transfert de gène à l'aide du PEI.

Plusieurs heures après cette transfection *in vivo*, 1 μ l d'une solution 20 mM de 8-Bromo-GMPc (Sigma, USA) (Br-cG), préparée dans du NaCl 0,9%, est injecté des deux côtés de l'encéphale, en vue d'activer la PKG. Un inhibiteur sélectif de cette protéine kinase, le KT5823 (Calbiochem, USA), est injecté également dans les structures cérébrales. Un μ l d'une solution 0,2 μ M de KT5823, préparée dans du NaCl 0,9%, est injecté bilatéralement 10 min avant la micro-injection de Br-cG.

3. Microdialyse sur animal vigile

Les animaux sont placés dans des bols hémisphériques de 40 cm de diamètre. La sonde de microdialyse, connectée à une pompe de microinjection CMA100 (Carnegie Medicine, Suède) est insérée dans le guide canule du noyau caudé-putamen. La membrane de la sonde est en cellulose (2 x 0,5 mm; C-D Medical, Miami, USA); elle a une efficacité *in vitro* pour la DA, le DOPAC et le HVA comprise entre 13 et 18% à un flux de 1 μ l/min. Elle est perméable à des composés ayant un poids moléculaire inférieur à 5000 Da. La solution de dialyse contient 147 mM de NaCl, 4 mM de KCl, 1,3 mM de CaCl₂, pH 6,9. La cocaïne administrée par la sonde de dialyse est dissoute dans cette solution à une concentration de 1 mg/ml et perfusée pendant 10 min à un flux de 1 μ l/min.

Dans les échantillons prélevés (volume de 20 μ l) toutes les 20 min, on mesure les taux de DA, de DOPAC et de HVA, par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur une colonne en phase inverse, munie d'un système de détection électrochimique (BAS, West Lafayette, USA). Ce système comprend une phase mobile de

nature polaire, et une phase stationnaire de nature hydrophobe. La phase mobile est constituée d'une solution comprenant 0,1 M de NaH_2PO_4 , 1 mM de sulfonate de sodium, 0,5 mM EDTA et 6% de méthanol, pH 3. Le flux est de 0,8 ml/min à une température contrôlée de 30°C.

Les valeurs basales de DA sont exprimées comme la moyenne de 3 échantillons obtenus avant le traitement. Les différences sont jugées significatives après une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes (test de Student-Newman-Keuls).

4. Injection intra-péritonéale

Diverses substances pharmacologiques sont injectées par voie intra-péritonéale. Une solution de 6 mg/ml de cocaïne (Sigma, USA) est préparée dans du NaCl 0,9% et injectée à une dose de 20 mg/kg. La D-amphétamine est préparée à une concentration de 1 mg/ml dans du NaCl 0,9% et injectée à une dose de 2 mg/kg. Une solution de 3 mg/ml de GBR 12909 (Sigma, USA) est préparée dans de l'eau stérile et injectée à une dose de 20 mg/kg. Le propofol (Diprivan®; Zeneca, Grande-Bretagne) est préparé à une concentration de 10 mg/ml dans une émulsion lipidique (Braun médical, Paris) et injecté à des doses de 10 ou 100 mg/kg. Les animaux sont euthanasiés par une injection létale de pentobarbital (100 mg/kg, i.p.).

5. Perfusion intra-cardiaque

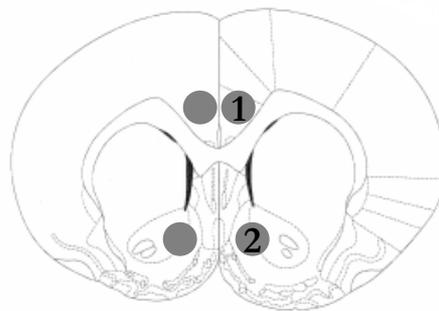
Pour les études d'immunohistochimie ou d'hybridation *in situ*, on réalise une perfusion intracardiaque de 50 ml de NaCl 0,9% à 4°C, suivie d'une perfusion de 250 ml de paraformaldéhyde 1% à 4°C, préparé dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) (pH 7,2). Les cerveaux sont alors prélevés et post-fixés dans le même fixateur pendant 1 h à 4°C, puis cryoprotégés par immersion dans une solution de saccharose 15%, préparée dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2) à 4°C pendant 15 h, congelés dans l'isopentane refroidi à -40°C et stockés à -80°C. Des coupes frontales d'une épaisseur de 10 µm sont réalisées à l'aide d'un cryostat à -20°C et montées sur des lames gélatinées, puis stockées à -80°C.

En vue des observations par microscopie électronique, la perfusion intracardiaque est réalisée avec 250 ml de paraformaldéhyde à 4%, préparé dans du tampon phosphate

0,1 M, (pH 7,2). Après décapitation, l'encéphale est prélevé, puis plongé dans du tampon phosphate pendant 48 h. Des coupes de 40 μ m sont réalisées en série dans du tampon phosphate à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000S). Les coupes sélectionnées sont regroupées dans des puits contenant 600 μ l de tampon phosphate pour le marquage immunohistologique. Cette technique d'immunomarquage est donc réalisée sur "coupes flottantes". Les coupes sont réalisées à plusieurs niveaux selon Paxinos et Watson (1997)(figure 28):

- au niveau du noyau accumbens (NAc)
- au niveau du noyau caudé-putamen (CPu)
- au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA)

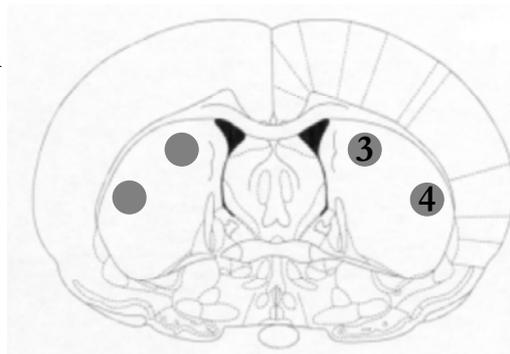
Niveau NAc
Bregma: 1,5 mm



1. CgCx

2. Shell du NAc

Niveau CPu
Bregma: 0,3 mm



3. CPu dorso-médian

4. Striatum latéral

Niveau VTA/ SNc
Lambda: 2,3 mm

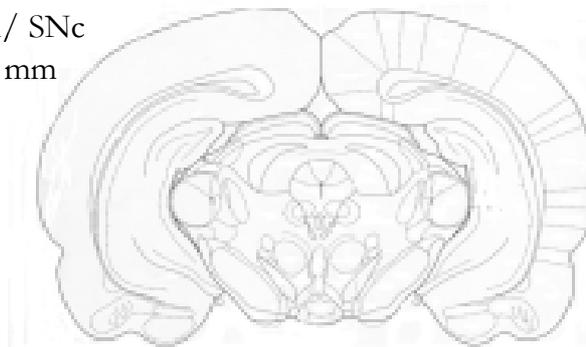


Figure 28: Schéma des niveaux de prélèvement des coupes et zones de quantification de la densité optique. Coordonnées stéréotaxiques d'après Paxinos et Watson, 1997.

6. Prélèvement de structures cérébrales

Après l'injection des substances pharmacologiques, les animaux sont sacrifiés et les structures cérébrales suivantes prélevées: noyau accumbens, noyau caudé-putamen, cortex frontal et cervelet. Ces structures sont immédiatement plongées dans l'azote liquide, puis stockées à - 80°C jusqu'à l'homogénéisation des tissus. Les protéines cytosoliques sont extraites en vue de la technique de "western blot" et de la mesure de l'activité enzymatique de la PKG, alors que les protéines nucléaires sont préparées en vue du test de mobilité électrophorétique.

7. Préparation de synaptosomes

Les synaptosomes de striatum de rat sont préparés selon la technique de Morgan *et al.* (1971). Les striata de rats sont homogénéisés à l'aide d'un Potter-Elvehjem pendant 30 secondes (1000 tours/min) à 4°C dans 10 volumes de tampon SEP (saccharose-EDTA-phosphate) (10 ml/g de tissu). La fraction synaptosomale est obtenue par centrifugation (53500 x g, 1 h, 4°C) sur un gradient discontinu de Ficoll, préparé dans le tampon SEP (figure 29). Les synaptosomes sont retrouvés dans les fractions 12 et 16% de Ficoll, dilués trois fois dans du tampon SEP et stockés à - 80°C, en vue de la détermination enzymatique de la PKG et études en "western blot".

B. Analyse des ARN messagers par hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* permet de localiser et de quantifier des ARNm dans un tissu. Pour ce faire, les coupes de cerveau sont hybridées avec une sonde ARN antisens marquée par un isotope radioactif. Afin d'éviter l'action de ribonucléases, les solutions et la verrerie utilisées sont préalablement stérilisées. Cette technique est essentiellement réalisée suivant le protocole décrit par Ruberte *et al.* (1990).

1. Linéarisation des plasmides

La sonde utilisée dans cette analyse est obtenue à partir d'ADN complémentaire de souris. L'ADN du gène *egr-1* a été inséré dans un plasmide pBluescript-SK (+) (fourni par le Dr. Herschman, Californie, USA), alors que les ADN des gènes *NAB1* et *NAB2* ont été insérés dans un plasmide pCite3 (fournis par le Dr Milbrandt, Missouri, USA). Dans un premier temps, les plasmides sont linéarisés par des enzymes de restriction (1U d'enzyme/1 µg d'ADN): HindIII pour *egr-1* et BamH1 pour *NAB1* et *NAB2*, à 37°C pendant 2 h. Le milieu réactionnel est ensuite chauffé à 65°C pendant 10 min. On vérifie que la coupure est satisfaisante en faisant migrer le plasmide dans un gel d'agarose 1% en présence de bromure d'éthidium 0,5 µg/ml. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon TAE (Tris-acide acétique-EDTA) 1X, à 80 V pendant 30 min. Les plasmides linéarisés sont ensuite extraits par le phénol-chloroforme (v/v), précipités à l'éthanol et repris dans l'eau stérile.

2. Marquage de la sonde

2.1. Transcription et digestion de la matrice

Les sondes ARN antisens sont préparées à partir des plasmides linéarisés. Leur transcription est catalysée par une ARN polymérase, polymérase T₃ pour *egr-1* et polymérase T₇ pour *NAB1* et *NAB2*. Ces enzymes se fixent en amont du gène; en présence d'UTP α-[³⁵S], elles conduisent à la synthèse d'ARN marqué. La synthèse des ribosondes antisens est réalisée à 37°C pendant 2 h dans le milieu réactionnel (20 µl) suivant :

-
- 1 µg de plasmide linéarisé
 - 2 µl de dithiothreitol (DTT) 100 mM pour la synthèse avec T₇
 - 1 µl de chacun des 3 nucléotides (10 mM): ATP, CTP, GTP
 - 3 µl d'UTP non marqué 100 µM
 - 3 µl d'UTP α-[³⁵S], d'activité spécifique 1000 Ci/mmol
 - 10 unités de ARN polymérase (T₃ ou T₇)
 - 4 µl de tampon de transcription 5X (200 mM Tris-HCl (pH 7,9), 30 mM MgCl₂, 50 mM NaCl et 10 mM de spermidine)
 - eau bidistillée stérile qsp 20 µl

L'ADN plasmidique est ensuite hydrolysé par l'ADNase I (1 U d' "ADNase I RNase free") pendant 15 min à 37°C afin de purifier l'ARN radio-marqué.

2.2. Purification de l'ARN transcrit

Cette étape consiste à éliminer les enzymes (ARN polymérase, ADNase) nécessaires à la synthèse de l'ARN de l'étape précédente, pour ne récupérer que l'ARN marqué. On ajoute 6 µl d'une solution d'ARNt (20 µg/ml), 200 µl de SDS 2% et le volume est ajusté à 400 µl avec de l'eau stérile. L'ARN est purifié par une extraction au phénol-chloroforme, puis au chloroforme et enfin précipité par de l'éthanol (0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol) pendant 1 h à - 80°C. Le culot obtenu après centrifugation (30 min, 12000 x g, 4°C) est constitué d'ARN purifié.

2.3. Hydrolyse alcaline partielle et obtention de la ribosonde

La ribosonde est réduite à une taille moyenne de 300 paires de base (pb) par une hydrolyse alcaline afin de pouvoir pénétrer plus facilement dans les tissus. Pour ce faire, le culot est incubé en présence de NaOH 0,1 M sur de la glace pendant un temps t (min) défini de la manière suivante: $t = (l_0 - l_t) / (l_0 \times l_t \times 0,11)$

avec l_0 = longueur de l'ARN transcrit

et l_t = longueur souhaitée des fragments d'ARN (300 pb).

Ce temps est de 23 min pour la ribosonde *egr-1* et de 12 min pour *NAB1* et *NAB2*. Les fragments d'ARN sont ensuite précipités par l'éthanol (0,1 volume d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 et 2 volumes d'éthanol) pendant une nuit à - 20°C. Le culot obtenu

après centrifugation (30 min, 12000 x g, 4°C) est lavé avec de l'éthanol 75%, séché et repris dans 100 µl de DTT 10 mM.

3. Hybridation in situ proprement dite

3.1. Pré-hybridation

Les coupes sont délipidées dans de l'acétone pendant 3 à 5 min et séchées à l'air. Elles sont alors post-fixées avec du formaldéhyde 4%-tampon PBS ("phosphate buffer saline") 1X pendant 15 min à 4°C, puis rincées dans du PBS 1X. Suit une phase d'acétylation qui permet de limiter les interactions électrostatiques de l'ARN α -[³⁵S] avec le tissu, et donc d'éviter un marquage non spécifique. Pour ce faire, les lames sont incubées pendant 10 min dans une solution de triéthanolamine 0,1 M (pH 8) contenant 0,25% (v/v) d'anhydride acétique. Après deux rinçages de 2 min dans du SSC (sodium saline citrate) 2X, les coupes sont pré-hybridées dans une solution de formamide 50%-SSC 1X pendant 10 min à 60 °C. Elles sont alors déshydratées par passages successifs dans des solutions de concentration croissante d'éthanol: 50%, 75%, puis 100%, et enfin séchées à l'air.

3.2. Hybridation

Par lame, on dépose 30 µl de la sonde marquée, diluée dans le tampon d'hybridation (formamide 50%, SSC 4X, sulfate de dextran 10%, DTT 10 mM) de façon à obtenir une activité de 60 000 dpm/µl. Après avoir recouvert les coupes d'une lamelle de verre, les lames sont incubées en chambre humide (formamide 50%, SSC 4X) pendant une nuit à 52°C.

3.3. Lavages

Les étapes de lavage ont pour but d'éliminer la sonde en excès et d'en réduire les liaisons non spécifiques. Les lames sont d'abord lavées dans une solution de formamide 50%-SSC 1X (2 fois 1 h à 55°C, le premier lavage permettant de décoller les lamelles), puis avec une solution de SSC 2X (2 fois 5 min à 55°C). L'ARN non hybridé est hydrolysé à l'aide de RNase A (6×10^{-3} U/ml) pendant 30 min à 37°C, dans un tampon NTE (NaCl-Tris-EDTA) 1X. Les coupes sont ensuite soumises à deux rinçages de 1 h à 55°C

avec une solution formamide 50%-SSC 2X, à un rinçage dans du SSC 2X pendant 15 min, et finalement déshydratées dans des bains d'éthanol de concentration croissante (50, 75 et 100%) et séchées à l'air.

3.4. Exposition autoradiographique et quantification

Les lames sont ensuite autoradiographiées (film Kodak BIOMAX-MR) pendant 6 jours à température ambiante. Une étude quantitative est réalisée à partir des films autoradiographiques, au moyen d'un analyseur d'images et d'un logiciel Samba (Alcatel TITN, France). La densité optique (DO) est mesurée bilatéralement sur une surface identique des 4 coupes d'une lame dans les structures suivantes: le shell du noyau accumbens (NAc), la partie dorsale du noyau caudé-putamen (CPu), le striatum latéral (SL) et le cortex cingulaire antérieur (CgCx). La figure 28 précise les zones de quantification. Les DO mesurées sont converties en kBq/g de tissu à l'aide d'une gamme étalon marquée au ^{14}C (Amersham).

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne \pm écart-type à partir de 4 coupes adjacentes présentes sur chaque lame. Au moins 3 lames provenant de 3 rats différents sont utilisées. Les différences significatives sont déterminées par une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes (test de Student-Newman-Keuls).

C. Etudes immunologiques

1. Origine des anticorps

Les caractéristiques des anticorps utilisés sont résumées dans les tableaux 5 et 6.

Nom	Origine	Espèce	Type	Dilution
Anti-Egr-1	Santa Cruz, USA	Lapin	Polyclonal	1/200
Anti-Egr-2	Santa Cruz, USA	Lapin	Polyclonal	1/200
Anti-Egr-3	Santa Cruz, USA	Lapin	Polyclonal	1/200
Anti-GC-B	Dr. Olga Solov'eva	Lapin	Polyclonal	1/500
Anti-PKG	Calbiochem, USA	Lapin	Polyclonal	1/500
Anti-TH	Sigma, USA	Souris	Monoclonal	1/1000
Anti-PA	Sigma, USA	Souris	Monoclonal	1/400
Anti-GFAP	Sigma, USA	Souris	Monoclonal	1/1000
Anti-ChAT	Jackson, USA	Chèvre	Polyclonal	1/200

Tableau 5: Anticorps primaires utilisés dans les études immunologiques.

Egr: "early growth response"; GC-B: guanylyl cyclase de type B; PKG: protéine kinase dépendant du GMPc; TH: tyrosine hydroxylase; PA: parvalbumine; GFAP: "Glial fibrillary acidic protein"; ChAT: choline acétyl transférase.

Nom	Origine	Espèce	Type	Dilution	Emission Absorption du fluorochrome	
Anti-lapin biotinylé	Amersham, USA	Ane	Polyclonal	1/200	X	
Anti-souris biotinylé	Amersham, USA	Ane	Polyclonal	1/200	X	
Anti-lapin Alexa 488	Molecular Probes, USA	Chèvre	Polyclonal	1/1000	519 nm	495 nm
Anti-souris Cy3	Jackson, USA	Ane	Polyclonal	1/1000	570 nm	550 nm
Anti-chèvre 568	Molecular Probes, USA	Ane	Polyclonal	1/800	603 nm	578 nm

Tableau 6: Anticorps secondaires correspondants.

2. "Western Blot"

2.1. Préparation des protéines cytosoliques

A la suite des expériences de transfection du gène de la PKG, les striata de rat sont homogénéisés dans 500 µl de tampon de lyse à l'aide d'un Potter-Elvehjem pendant 30 secondes (1000 tours/min). L'homogénat est alors centrifugé ($10^5 g$, 20 min, 4°C). Les protéines du surnageant sont quantifiées en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme protéine de référence. Cette méthode utilise la propriété d'un colorant, le bleu de Coomassie, à se lier aux protéines (Bradford, 1976). Les protéines synaptosomales (paragraphe A. 6.) sont quantifiées selon cette même technique.

2.2. Electrophorèse en condition dénaturante et immunoréplique

Vingt μg de protéines sont séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide en condition dénaturante (1% de SDS). L'électrophorèse est réalisée dans un système discontinu comprenant un gel de concentration à 4% d'acrylamide et un gel de séparation à 10% d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide 29/1). Les protéines dans le tampon de charge 2X sont chauffées (95°C, 5 min), puis déposées sur le gel de concentration et séparées pendant 45 min à 200 V dans le tampon d'électrophorèse.

Après l'électrophorèse, le gel de polyacrylamide est équilibré pendant 15 min dans le tampon de transfert. Les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide sur une membrane de nitrocellulose par application d'un champ électrique de 100 V pendant 1 h dans le tampon de transfert.

2.3. Révélation

Toutes les opérations sont réalisées à température ambiante sous agitation. Après transfert des protéines, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1 h dans du PBS 1X contenant 0,2% de caséine (v/v) et 0,1% de Tween-20 (v/v), afin de réduire les liaisons non spécifiques. Puis, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 2 h avec l'anticorps primaire anti-PKG-I dilué dans du PBS 1X. La membrane est ensuite lavée 3 fois pendant 15 min dans du PBS 1X-Tween 0,1%, et incubée pendant 1 h avec le deuxième anticorps biotinylé dilué 20 000 fois. La membrane est de nouveau lavée 3 fois pendant 15 min dans du PBS-Tween 0,1%, puis incubée avec le complexe streptavidine-phosphatase alcaline. L'activité de la phosphatase alcaline, qui reflète la quantité d'antigène présent sur la membrane, est révélée par chimioluminescence (Tropix, USA). Cette révélation est réalisée par l'exposition de la membrane à un film Kodak Biomax MS pendant 10 à 30 min.

3. Marquage immunohistochimique

Toutes les incubations sont réalisées sous agitation à température ambiante. Les coupes sont délipidées dans de l'acétone pendant 3 à 5 min, puis séchées à l'air. Elles sont alors post-fixées avec du formaldéhyde 4%-PBS pendant 15 min, rincées dans du PBS 1X, puis incubées pendant 30 min dans une solution de BSA 0,5% préparée dans du PBS. Les dilutions des anticorps sont préparées dans la même solution. Après une nuit

d'incubation en présence de l'anticorps primaire, les coupes sont rincées 3 x 10 min dans du PBS, puis incubées avec l'anticorps secondaire biotinylé pendant 1 h à l'obscurité. Elles sont alors rincées dans du PBS, et incubées en présence du complexe peroxydase-avidine-biotine (Vectastain ABC Kit Elite, Vector, USA) pendant 1 h à l'obscurité. La révélation de l'activité peroxydasique se fait en présence d'une solution de diaminobenzidine (DAB) et d'eau oxygénée (Peroxydase Substrate Kit, Vector, USA), qui donne un précipité brun. Cette révélation dure environ 7 min. La réaction est arrêtée par rinçage dans du PBS quand le rapport signal sur bruit de fond semble optimal. Des coupes, incubées uniquement avec l'anticorps secondaire biotinylé, constituent un marquage témoin. L'incubation dans 15 µM de bisbenzimidazole Hoescht 33258 (Sigma, USA) pendant 15 min permet de visualiser les noyaux cellulaires. Le marquage nucléaire permet de compter et donc d'estimer le pourcentage de cellules immunoréactives. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle dans une solution de Mowiol. Les lames sont séchées à température ambiante et observées sous microscope photonique. Au moins 400 cellules sont comptées par structure dans des coupes provenant de trois rats différents. Les différences sont jugées significatives après une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes (test de Student-Newman-Keuls).

4. Double marquage immunocytochimique

Pour les expériences de co-marquage, les coupes sont incubées pendant une nuit en présence des deux anticorps primaires. Ainsi, l'anticorps polyclonal anti-PKG est co-incubé avec un anticorps polyclonal anti-TH, anti-PA, ou anti-GFAP. Ces mêmes anticorps sont co-incubés chacun avec l'anticorps polyclonal anti-GC-B. Les coupes sont alors rincées 3 fois 10 min dans du PBS. Ensuite, elles sont incubées pendant 1 h en présence de deux anticorps secondaires correspondants, couplés aux fluorochromes Alexa 488, Cy3, ou Alexa 568. Elles sont montées entre lame et lamelle avec du Mowiol. Certaines coupes sont incubées seulement en présence des anticorps secondaires, et servent d'expériences témoins. Les simples marquages correspondants (c'est-à-dire un anticorps primaire avec l'anticorps secondaire correspondant) sont réalisés en parallèle.

5. Observations en microscopie confocale et électronique

5.1. Microscopie confocale

Le microscope à balayage laser permet d'effectuer des "coupes virtuelles" (0,2 à 0,3 μm) dans l'objet observé et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans un plan. Cette technique limite la fluorescence parasite émise dans les plans focaux inférieur et supérieur constatés en microscopie conventionnelle. Nous avons utilisé un microscope Zeiss (LSM 410 invert), muni de deux lasers :

- un laser hélium/néon excitateur de la rhodamine (longueur d'onde de 543 nm) qui émet dans le rouge. Le filtre d'émission est un filtre passe-haut (Long pass) de 595 nm
- un laser argon excitateur de la fluorescéine (longueur d'onde de 488 nm) qui émet dans le vert. Le filtre d'émission est un filtre passe-bande (Band pass) de 515 à 550 nm

Pour l'acquisition des images, chaque champ optique est analysé quatre fois, afin d'obtenir une image fluorescente moyenne. Le bruit de fond déterminé lors de l'observation d'échantillons marqués avec les seconds anticorps seuls, est systématiquement soustrait.

5.2. Microscopie électronique

Des coupes frontales de cerveau (40 μm) sont obtenues à l'aide d'un vibratome (Leica VT 1000S). L'immunomarquage est effectué comme décrit précédemment (voir paragraphe C.3.). Après révélation de l'activité péroxydasique avec la diaminobenzidine et l'eau oxygénée, les coupes sont lavées 6 fois 10 min dans du PBS, puis fixées dans une solution de glutaraldéhyde 1%, préparée dans du tampon cacodylate de sodium (0,1M; pH 7,2) pendant 15 minutes. Après un bref rinçage dans du PBS, les coupes sont fixées pendant 1 h à 4°C dans une solution de tétr oxyde d'osmium 1%, préparée dans le même tampon cacodylate de sodium. Ensuite, les coupes sont déshydratées par passage dans des bains successifs d'éthanol, suivis de deux bains d'éthoxyde de propylène. Après imprégnation dans la résine époxy de Spurr (1969), elles sont incluses à plat dans la même résine entre deux feuillets de polypropylène. Après polymérisation pendant une nuit à 70°C, des coupes ultra-fines, d'une épaisseur d'environ 60 nm, parallèles à la surface des coupes vibratomes, sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica). Les coupes sont finalement observées à 60 kV sans post-coloration à l'aide d'un microscope électronique (Hitachi 7500) équipé d'une caméra digitale (AMT system).

D. Test de mobilité électrophorétique

La technique de mobilité électrophorétique ou "retard sur gel" repose sur la liaison spécifique du facteur de transcription Egr-1 à sa séquence consensus de l'ADN, marquée par un isotope radioactif. Puisque le complexe ADN-protéines migre plus lentement que l'ADN libre dans un gel de polyacrylamide, il peut être aisément détecté par autoradiographie. Cette technique est réalisée suivant le protocole décrit par Sassone-Corsi *et al.* (1988).

1. Extraction des protéines nucléaires

Les protéines nucléaires sont extraites selon la méthode d'Andrews et Faller (1991). Cette technique comporte deux étapes: la lyse des cellules dans un milieu hypotonique, suivie de l'extraction des protéines nucléaires dans un milieu de force ionique élevée. Chaque structure est homogénéisée dans du tampon A (500 µl/mg de tissu) à l'aide d'un Potter-Elvehjem (30 secondes à 3000 tours/min). Les tubes sont déposés dans la glace pendant 15 min, puis agités pendant 10 secondes et centrifugés (2 min, 12000 x g, 4°C). Le surnageant est enlevé et le culot est re-suspendu dans un volume adéquat (200 µl/g de tissu de départ) de tampon C. Les tubes sont ensuite incubés 20 min dans la glace, puis centrifugés (2 min, 12000 x g, 4°C). Le dernier surnageant est stocké à -80°C. Il contient les protéines nucléaires, qui sont quantifiées par la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* (1951). On ajoute à chaque échantillon 150 µl de NaOH 1N, puis 2 ml d'une solution contenant 1 ml de Na₂CO₃ 2%, 10 µl de sulfate de cuivre 1%, 10 µl de tartrate 2%. Après 15 min d'incubation, 100 µl de réactif de Folin sont rajoutés dans chaque tube. Ceux-ci sont alors incubés pendant 30 min à température ambiante et à l'obscurité, et l'absorption à 750 nm est mesurée. Une gamme étalon établie avec différentes concentrations de BSA est utilisée pour déterminer la concentration de protéines dans les échantillons.

2. Détection du complexe ADN-protéines

2.1. Marquage des oligonucléotides

Nous avons utilisé des oligonucléotides synthétiques double-brin, contenant la séquence de liaison d'*Egr-1* (21 pb) contenue dans le promoteur du gène *egr-1* murin lui-même (sonde E). Les caractères soulignés indiquent le site consensus:



Les extrémités 5' des brins sont marquées par incubation avec de l'ATP γ -[^{32}P] et de la T₄ polynucléotide kinase. Le milieu réactionnel (volume final 20 μl) comprend :

- 5 pmoles de chaque brin de l'oligonucléotide
- 2 μl du tampon de la polynucléotide kinase du bactériophage T₄
- 5 μl , soit 50 μCi d'ATP γ -[^{32}P], d'activité spécifique 3000 Ci/mme
- 8 μl d'eau
- 1 μl de polynucléotide kinase T₄ (10 U)

L'incubation s'effectue à 37°C pendant 1 h. Elle est arrêtée par chauffage du tube à 90°C durant 3 min. L'appariement des deux brins est réalisée lors du refroidissement progressif de ce bain jusqu'à température ambiante. Les oligonucléotides double brin marqués sont séparés de l'ATP γ -[^{32}P] libre par filtration sur gel (Séphadex G-50) dans un tampon TE (Tris-EDTA) 1 X, pH 8 (figure 30).

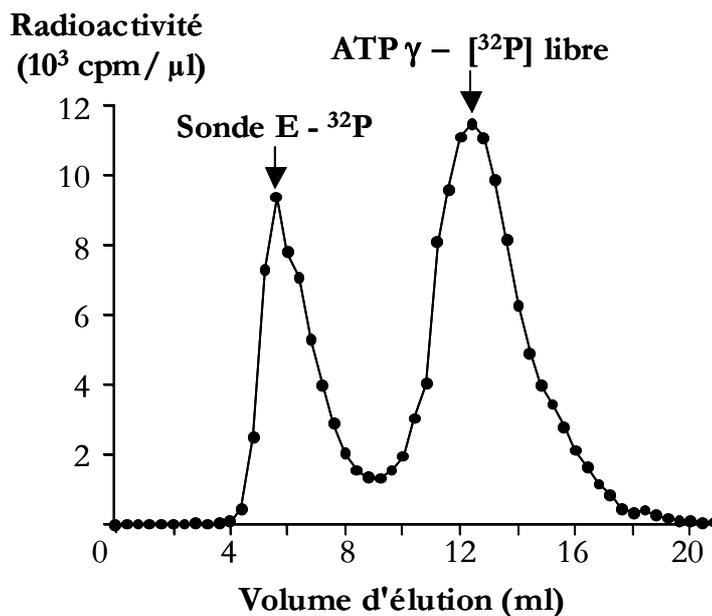


Figure 30: Séparation des oligonucléotides marqués de l'ATP γ -[^{32}P] libre sur une colonne séphadex G50.

Des fractions de 400 µl sont recueillies. Les oligonucléotides marqués élués en premier sont précipités par 2 volumes d'éthanol et 0,1 volume d'acétate de sodium, 3M pH 7,2, à -20°C durant une nuit. Après centrifugation (30 min, 12000 g, 4°C), le culot obtenu est lavé avec de l'éthanol 70%, séché et repris dans 20 µl de tampon TE 1X. L'activité spécifique obtenue est d'environ 2×10^9 cpm/µg d'ADN double brin.

2.2. Test de mobilité électrophorétique proprement dit

La liaison des protéines nucléaires à l'oligonucléotide marqué s'effectue dans un volume final de 20 µl. Trente µg de protéines nucléaires sont incubées en présence de 375 ng d'acide polydésoxyinosinique-désoxycytidilique [poly (dI-dC)] et de la sonde E marquée (environ 10^4 cpm/essai) pendant 20 min à température ambiante dans le tampon TM (Test de Mobilité électrophorétique) d'Egr-1. Les complexes ADN-protéines formés sont séparés par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 4% (rapport acrylamide/bisacrylamide 38/2), pendant 1 h à 150 V dans un tampon TBE (Tris-borate-EDTA) 0,25 X. Les gels sont ensuite séchés et autoradiographiés pendant 2 à 6 jours à -80°C.

E. Mesure de l'activité enzymatique de la PKG

Le peptide synthétique substrat utilisé pour mesurer sélectivement l'activité de la PKG est le suivant : LRKVSKQE. Il correspond au site de phosphorylation de la protéine VASP par la PKG (Butt *et al.*, 1994). Il présente une spécificité de substrat très supérieure pour la PKG par rapport à la PKA. Les protéines des striata de rats et celles de la fraction synaptosomale sont préparées comme décrit plus haut (voir paragraphe C. 2. 2.1.).

L'activité de la protéine kinase est déterminée dans le surnageant obtenu précédemment, dans le milieu réactionnel (80 μ l) suivant :

- Tris-HCl, pH 7,4	20 mM
- MgCl ₂	10 mM
- DTT	0,5 mM
- Peptide substrat LRKVS <u>K</u> QE	100 μ M
- BSA	0,1 mg/ml
- ATP contenant 100 cpm/pmol [γ - ³² P]ATP	15,6 μ M
- GMPc	10 μ M
- Extrait cellulaire	20 μ l

La réaction est déclenchée par l'addition de l'extrait cellulaire. Au bout de 10 minutes d'incubation à 30°C, le milieu réactionnel est déposé sur un papier de phosphate de cellulose P81 (2 cm x 2 cm). Les papiers sont lavés 5 fois 10 min avec de l'acide phosphorique (75 mM, 300 ml), puis avec de l'éthanol et de l'éther. Ils sont ensuite séchés et la radioactivité est déterminée dans un compteur à scintillation liquide (Effet Cerenkov). L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en pmol/min/mg de protéines.

F. Mesure de l'activité locomotrice spontanée

Cette expérience a été réalisée selon un protocole standard au Laboratoire des Neurosciences Comportementales et Cognitives, UMR 7521, Université Louis Pasteur, Strasbourg.

Pour mesurer l'activité locomotrice spontanée, chaque rat est placé dans une cage cubique (46,5 cm de côté). Ses parois latérales, internes et supérieures sont en bois tandis que la paroi externe est en plexiglas transparent. Le plancher de ce compartiment est grillagé. A l'intérieur de la cage, sur la face supérieure, est positionné un détecteur infra-rouge (modèle TALCO). Ce système permet de détecter la présence et les mouvements de l'animal. Le signal ainsi généré est envoyé à une interface électronique connectée à un ordinateur programmé pour piloter l'ensemble de l'expérience et collecter les données.

L'expérience comporte deux phases, une d'habituation et l'autre de test. La phase d'habituation consiste à mesurer l'activité locomotrice spontanée par tranche de 5 min pendant 2 h dans des conditions normales d'éclairage. A l'issue de cette phase d'habituation, les animaux reçoivent le traitement pharmacologique et le test proprement dit débute juste après l'injection i.p. de cocaïne. L'activité locomotrice de chaque rat est de nouveau comptabilisée pendant 2 heures.

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne \pm erreur-standard de chaque groupe de rat pour trois tranches de 5 min, comptabilisées pendant 2 h. Au moins 5 rats sont utilisés par groupe. Les différences significatives sont déterminées par une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes (test de Student-Newman-Keuls).

Préparation des animaux

Tampon phosphate, 0,2 M, pH 7,2 :

Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0,2 M
KH ₂ PO ₄	0,2 M

Tampon SEP, pH 7,5 :

Saccharose	320 mM
EDTA	0,1 mM
EDTA-phosphate	1 mM

Paraformaldéhyde 1%- tampon phosphate, 0,1 M, pH 7,2 :

Paraformaldéhyde	10 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0,1 M
KH ₂ PO ₄	0,1 M

Sucrose 15% - tampon phosphate, 0,1 M, pH 7,2 :

Saccharose	150 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	0,1 M
KH ₂ PO ₄	0,1 M

Hybridation *in situ*

PBS 1 X, pH 7,4:

NaCl	15,5 mM
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	13 mM

NTE 1X, pH 8:

NaCl	100 mM
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

SSC 20X, pH 7:

NaCl	3 M
Citrate de sodium	0,3 M

"Western Blot"

Tampon de lyse, pH 7,5:

Tris-HCl	20 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	0,01 mM

Tampon de transfert, pH 8,3:

Tris-HCl	25 mM
Glycine	200 mM
Méthanol	20%

Tampon d'électrophorèse, pH 8,3:

Tris-HCl	25 mM
Glycine	200 mM
SDS	0,1%

Microscopie Electronique

Résine époxy de Spurr:

vinyl-cyclo-héxène	10 g
polypropylène glycol diglycyl éther	6 g
nonényl-anhydride succinique	26 g
amino-diméthyl éthanol	0,4 g

Test de mobilité électrophorétique

Tampon A, pH 7,9:

HEPES	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
KCl	10 mM
DTT	0,5 mM
PMSF	0,2 mM

TBE 1X, pH 7,9:

Tris-Borate	50 mM
EDTA	1 mM

TE 1 X, pH 8:

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1mM

Tampon de la polynucléotide kinase du bactériophage T4, pH 7,6:

Tris-HCl	0,5 M
MgCl ₂	0,1 M
DTT	50 mM
Spermidine-HCl	1 mM
EDTA	1mM

Tampon C, pH 7,9:

HEPES	10 mM
Glycérol	25%
NaCl	420 mM
MgCl ₂	1,5 mM
EDTA	0,2 mM
DTT	0,5 mM
PMSF	0,2 mM

Tampon TM, pH 7,5 :

Tris-HCl	10 mM
ZnCl ₂	10 µM
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
Glycérol	5%
DTT	1mM

RÉSULTATS

L'expression d'*egr-1* en réponse à la cocaïne représente le fil conducteur de la présente étude. Cette dernière a été entreprise parce que d'une part, l'expression de ce gène à réponse précoce reflète l'activité synaptique (Worley *et al.*, 1991). D'autre part, en codant un facteur de transcription, il joue un rôle d'intermédiaire entre une stimulation brève de la cellule et son adaptation à long terme en réponse à la cocaïne.

Les résultats expérimentaux seront exposés en trois parties distinctes et comportent des brèves conclusions à la fin des paragraphes. Une discussion plus générale est présentée dans les chapitres suivants.

Dans un premier temps, nous avons examiné les interactions entre différentes neurotransmissions impliquées dans l'expression du gène *egr-1* en réponse à la cocaïne. Cette induction prend place principalement dans des structures cérébrales recevant des projections dopaminergiques, notamment le striatum et le cortex pré-frontal. En utilisant des composés anesthésiques, nous avons recherché l'intervention d'autres neurotransmissions, particulièrement les systèmes glutamatergique et GABAergique, dans la mise en place et la régulation de l'expression génique.

La deuxième partie présente la caractérisation d'une régulation de l'induction d'*egr-1* par la cocaïne. Il s'agit de la modulation par la voie de transduction intracellulaire, comprenant le CNP, le GMP cyclique et la PKG.

Enfin, dans la dernière partie, notre étude a été étendue à l'ensemble des membres de la famille *egr* et de leurs co-répresseurs, les gènes *NAB*. Nous avons recherché leur expression suite à l'administration unique ou répétée de cocaïne.

A. Interactions dopamine - glutamate – GABA dans les effets de la cocaïne dans le striatum et le cortex pré-frontal

L'utilisation de deux anesthésiques, la kétamine caractérisée pharmacologiquement comme possédant des propriétés anti-glutamatergiques, et le propofol possédant des propriétés anti-glutamatergiques et/ou pro-GABAergiques, nous a permis de caractériser l'intervention de ces neurotransmissions d'une part, et les structures où elles interviennent d'autre part, en réponse à l'activation du système dopaminergique par la cocaïne.

1. Effet d'une injection unique de cocaïne sur l'expression d'*egr-1*

Le gène à réponse précoce *egr-1* présente une expression constitutive dans les couches IV et VI du cortex cérébral et dans les tubercules olfactifs (figure 31A).

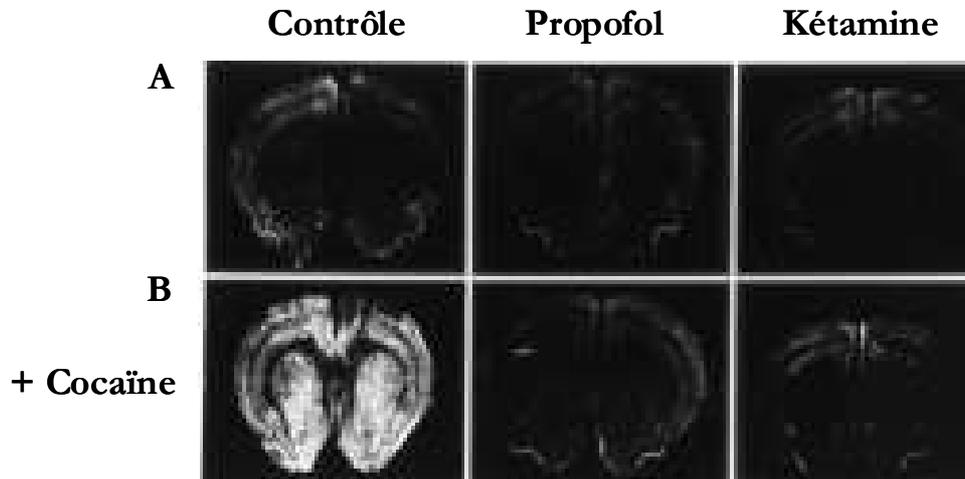


Figure 31 : Les anesthésiques propofol et kétamine modulent l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne.

Expérience d'hybridation *in situ*, réalisée sur des coupes frontales de cerveau de rat (10 μ m), au niveau du striatum antérieur (1,5 mm/bregma), avec l'antisens du gène *egr-1* marqué au 35 S. Les animaux ont été injectés i.p. par une solution saline, de propofol (100 mg/kg) ou de kétamine (100 mg/kg), et 15 min plus tard, par une solution saline (A) ou par une solution de 20 mg/kg de cocaïne (B). Ils ont été sacrifiés 45 min après la dernière injection.

L'administration de cocaïne est connue pour induire rapidement et transitoirement une forte expression de plusieurs gènes à réponse précoce dans des neurones. Les gènes *c-fos*, *junB*, *bVH5* ainsi qu'*egr-1* sont activés (Hope *et al.*, 1992; Moratalla *et al.*, 1992; Thiriet *et al.*, 1998). La figure 31B montre l'expression accrue des ARN messagers d'*egr-1*, mesurée par hybridation *in situ*, 45 minutes après l'injection intra-péritonéale (i.p.) de cocaïne dans le NAc, le CPU, le CgCx et le cortex piriforme. Cette induction d'*egr-1* représente 130%, 140% et 90% de l'expression basale dans le shell du NAc, la partie dorsale du CPU et le CgCx respectivement (figure 32).

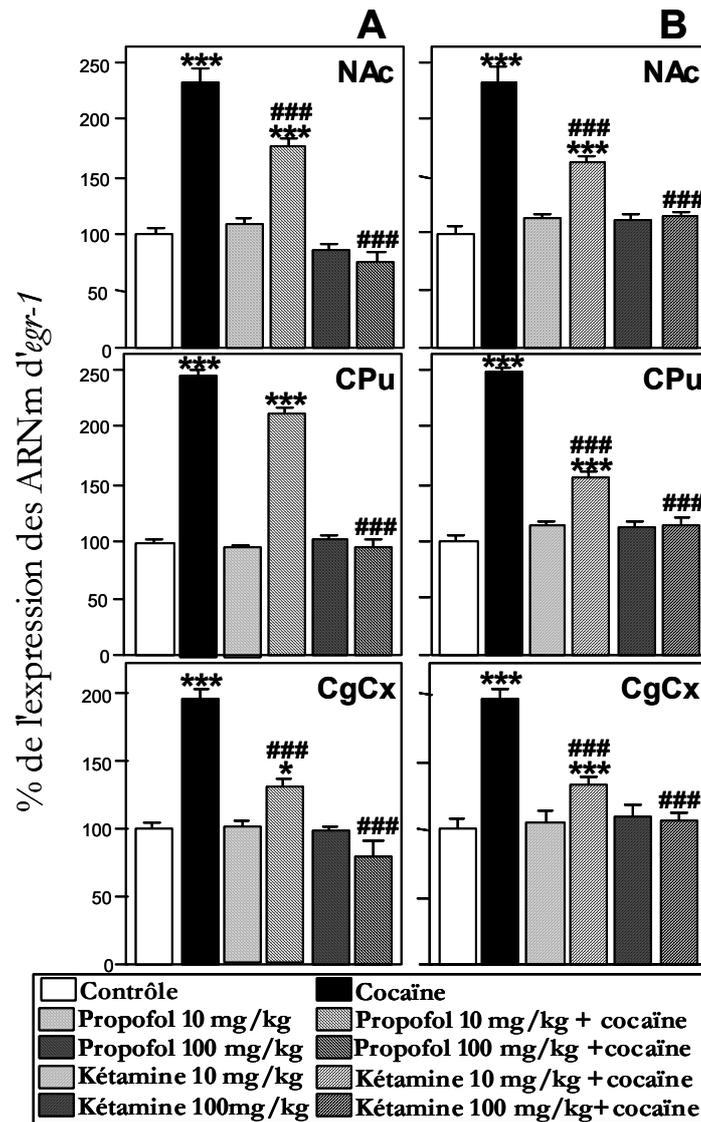


Figure 32 : Analyse densitométrique de l'expression du gène précoce *egr-1* réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation *in situ*.

La densité optique a été mesurée sur une surface identique du noyau caudéputamen (CPu), du shell du noyau accumbens (NAc) et du cortex cingulaire antérieur (CgCx). Les rats ont été injectés par une solution saline (contrôle), de propofol (10 ou 100 mg/kg; A) ou de kétamine (10 ou 100 mg/kg; B) et 15 min plus tard, par une solution saline ou de cocaïne (20 mg/kg), et sacrifiés 45 min après cette dernière injection. Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type obtenue à partir de 4 coupes adjacentes provenant de 3 animaux. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet de la cocaïne au traitement contrôle. ### $P < 0,001$, compare l'effet des traitements par le propofol ou la kétamine au traitement par la cocaïne.

2. Effet d'une injection de kétamine ou de propofol sur l'expression d'egr-1

La kétamine injectée i.p. n'induit pas l'expression des messagers *egr-1*, même à la dose élevée de 100 mg/kg (figure 31A). La même observation est réalisée après

administration i.p. de propofol à des doses de 10 ou 100 mg/kg. Ces observations sont confirmées par l'analyse densitométrique quantitative des autoradiogrammes obtenus après hybridation *in situ* au niveau du striatum antérieur (1,5 mm du bregma) et postérieur (0,3 mm du bregma)(figure 32A et B).

3. Effet modulateur des anesthésiques sur l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne

L'administration i.p. de 10 mg/kg de kétamine 15 min avant celle de cocaïne réduit significativement l'induction d'*egr-1* de 25%, 39% et 25% dans le shell du NAc, la partie dorsale du CPu et le CgCx respectivement (figure 32B). De même, l'administration i.p. de 10 mg/kg de propofol 15 min avant celle de cocaïne réduit, significativement la transcription d'*egr-1* de 18% et 35% dans le shell du NAc et le CgCx respectivement (Figure 32A). Dans la partie dorsale du CPu, la réduction observée (13%) ne se révèle pas significative.

L'administration de 100 mg/kg de kétamine ou de propofol 15 min avant celle de cocaïne abolit totalement l'induction de l'expression d'*egr-1* (Figures 32B et 33A et B) dans les trois structures considérées.

En conclusion, l'expression du gène *egr-1* induite par la cocaïne prend place dans les champs de projection dopaminergique. Cette induction peut être abolie par l'anesthésique, kétamine caractérisée comme possédant des propriétés anti-glutamatergiques, et par l'anesthésique propofol moins bien caractérisé d'un point de vue pharmacologique. Nos résultats suggèrent que la neurotransmission glutamatergique est nécessaire à la transcription d'*egr-1* en réponse à la cocaïne dans les neurones GABAergiques épineux du striatum.

B. Modulation des neurones dopaminergiques par l'activation de la voie de transduction du GMPc

Ces études ont été initiées par le Dr. Nathalie Thiriet au cours de son travail de thèse et par une collaboration avec l'équipe du Dr. Syed Ali (NCTR/FDA, Jefferson, USA).

1. Action du neuropeptide CNP

1.1. Effet du CNP i.c.v. sur l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne

Différentes doses de CNP (0, 5, 10 ou 20 nmoles) ont été injectées par voie i.c.v. et 15 min plus tard, les rats ont reçu une injection i.p. de cocaïne (20 mg/kg). Les animaux ont reçu une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde 45 min après l'administration de cocaïne. Les cerveaux fixés ont été préparés pour une étude d'hybridation *in situ*.

La figure 33 montre la distribution des ARN messagers du gène *egr-1* au niveau du striatum par hybridation *in situ*. Les rats ont été traités par une injection i.c.v. de CNP (20 nmoles) ou de solution saline, et 15 min plus tard par une injection i.p. de cocaïne (20 mg/kg) ou de solution saline (NaCl 0,9%) (figures 33A et B).

Comme décrit précédemment, l'expression basale d'*egr-1* est localisée dans le cortex cérébral et les tubercules olfactifs. L'administration de 20 nmoles de CNP seul ne modifie pas considérablement cette expression, sauf dans le CgCx. Une injection de cocaïne induit la transcription d'*egr-1* dans le CgCx, les tubercules olfactifs et le CPU (figure 33B). L'induction de la synthèse des messagers d'*egr-1* dans le striatum en réponse à la cocaïne, est fortement réduite par l'administration préalable de CNP.

Les résultats de quantification densitométrique de l'expression d'*egr-1* sont présentés dans la figure 34.

Dans le CgCx, 20 nmoles de CNP induisent significativement la transcription d'*egr-1* (augmentation de 35% par rapport au contrôle), alors que le peptide est sans effet dans les autres structures (figure 34A).

Par contre, le CNP (20 nmoles) réduit l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne de 23% dans le NAc et de 35% dans le CPU, tandis que dans le CgCx, il maintient la synthèse des messagers *egr-1* induite par la cocaïne.

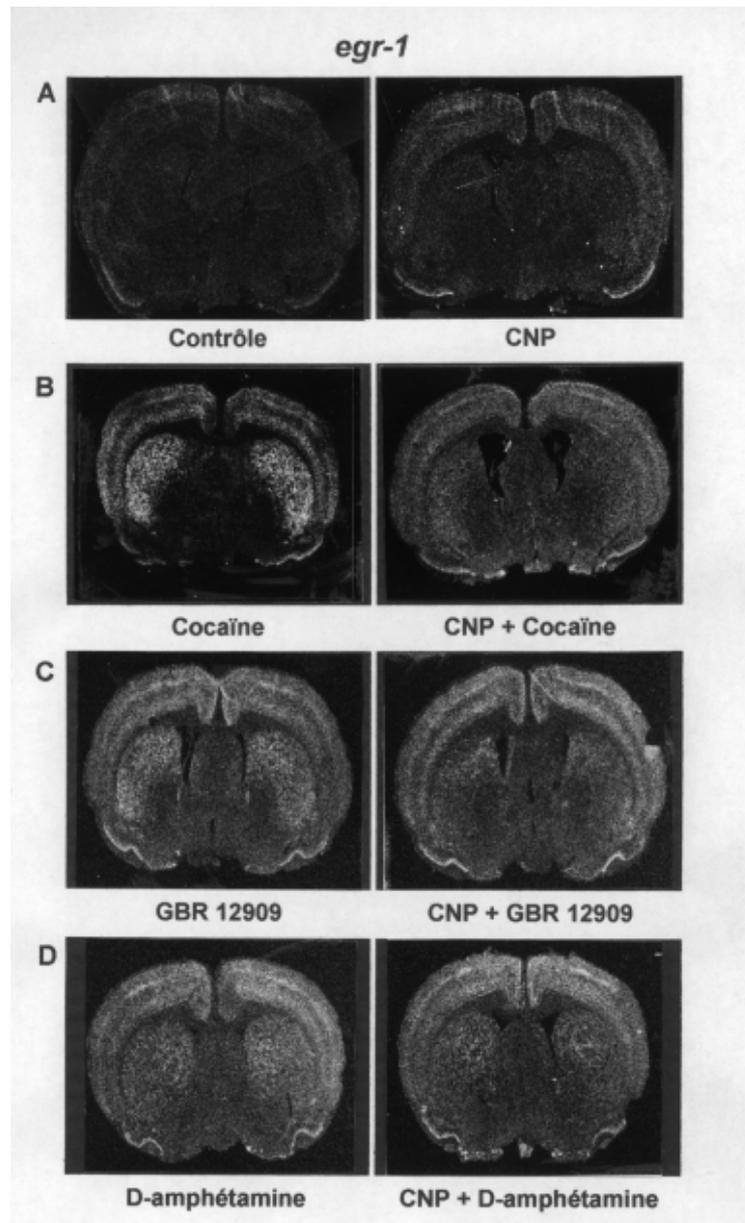


Figure 33 : Modulation de l'expression d'*egr-1* par le CNP.

Expérience d'hybridation *in situ*, réalisée sur des coupes frontales de cerveau de rat au niveau du striatum postérieur, avec la sonde ARN antisens du gène *egr-1* marquée au ^{35}S . Les animaux ont été injectés i.c.v. avec 20 nmoles de CNP ou son contrôle, et 15 min plus tard, en i.p. avec une solution saline (A), de cocaïne (20 mg/kg), de GBR 12909 (20 mg/kg)(C) ou de D-amphétamine (2 mg/kg)(D). Les animaux ont été sacrifiés 45 min après l'injection i.p.

La figure 34B présente l'analyse densitométrique de l'effet dose-réponse du CNP sur la transcription d'*egr-1*. Une dose de 5 nmoles de CNP i.c.v. réduit significativement l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne dans le NAc et le CPu (inhibition de 22% et 25% respectivement). La dose de 10 nmoles de CNP inhibe plus fortement cette expression dans les deux structures observées (43% dans le NAc et 47% dans le CPu). La dose de 20 nmoles réduit de 47% l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne, dans les deux structures considérées.

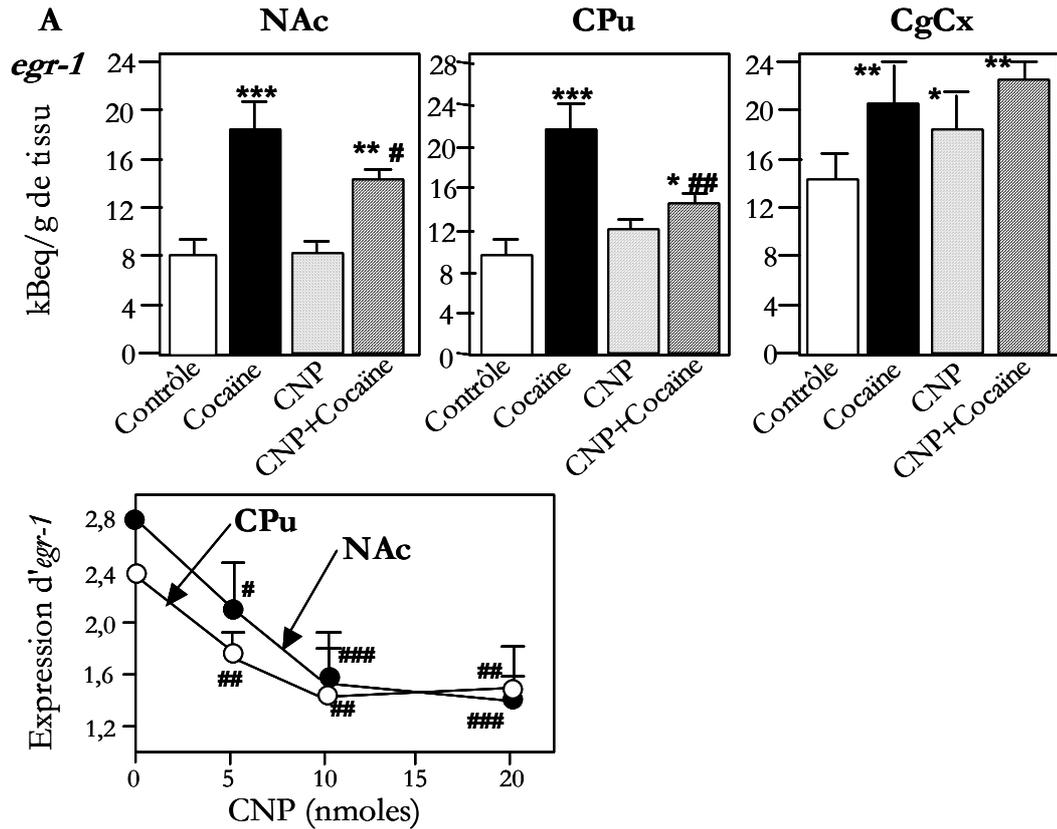


Figure 34 : Analyse densitométrique de l'expression du gène *egr-1* réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation *in situ*.

La densité optique a été mesurée sur une surface identique du CPu dorsal, du shell du NAc et du CgCx antérieur. A, les rats ont été injectés i.c.v. avec 20 nmoles de CNP ou par une solution contrôle, et 15 min plus tard, par une solution saline ou de cocaïne (20 mg/kg). Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type obtenue bilatéralement à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. B, les rats ont été injectés i.c.v. par différentes doses de CNP (0, 5, 10 ou 20 nmoles), et 15 min plus tard, avec une solution de cocaïne (20 mg/kg). Les résultats sont exprimés comme le rapport de l'expression du traitement par rapport au contrôle. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet de la cocaïne au traitement salin. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ et ### $P < 0,001$, compare le traitement [CNP+cocaïne] au traitement [cocaïne].

Le CNP injecté i.c.v. réduit de façon dose-dépendante l'expression des messagers *egr-1* induite par la cocaïne dans le NAc et CPU. Par contre, dans le CgCx, le CNP seul induit la synthèse des ARNm d'*egr-1*.

1.2. Effet du CNP i.c.v. sur l'action de la D-amphétamine et du GBR 12909

Nous avons recherché les effets du CNP sur l'expression d'*egr-1* induite par un inhibiteur sélectif du DAT, le GBR 12909, ainsi que sur celle induite par la D-amphétamine. Les rats ont été injectés par voie i.c.v. avec 20 nmoles de CNP et 15 min plus tard, ils ont reçu une injection i.p. de GBR 12909 (20 mg/kg) ou de D-amphétamine (2 mg/kg). Quarante-cinq min plus tard, les cerveaux ont été fixés en vue de l'analyse par hybridation *in situ*. Sur la figure 33C, nous observons que le GBR 12909 induit la transcription d'*egr-1* dans le CPU et les tubercules olfactifs, tandis que la D-amphétamine induit cette expression dans le CPU, les tubercules olfactifs, le septum et le cortex frontal (figure 33D).

Par contre, l'analyse densitométrique de ces autoradiogrammes révèle que le GBR 12909 n'induit significativement la transcription d'*egr-1* que dans la partie dorsale du CPU.

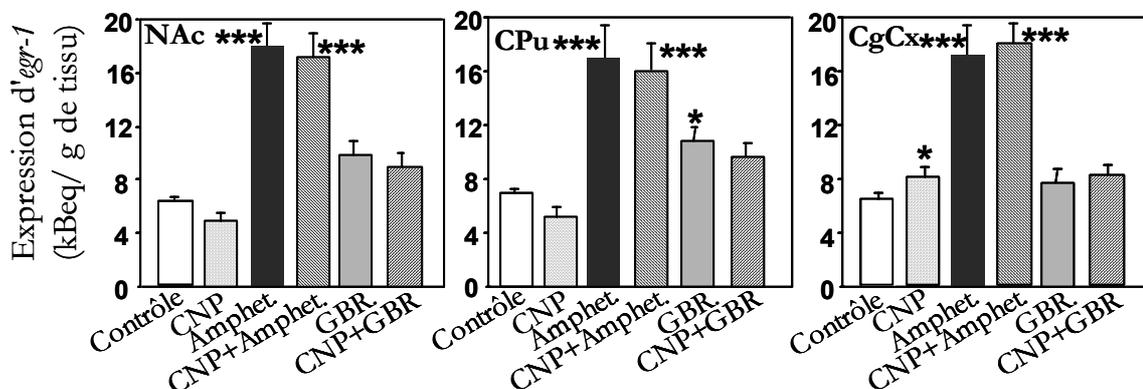


Figure 35 : Analyse densitométrique de l'expression du gène *egr-1* réalisée à partir des films autoradiographiques.

Les densités optiques ont été obtenues comme décrits dans la légende de la figure 34. Les rats ont été injectés i.c.v. avec 20 nmoles de CNP ou une solution contrôle, et 15 min plus tard avec une solution saline, ou de D-amphétamine (2 mg/kg), ou de GBR 12909 (20 mg/kg) par voie i.p. Les animaux ont été sacrifiés 45 min après l'injection i.p. Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type obtenue bilatéralement à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. * $P < 0,05$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet de la D-amphétamine ou du GBR 12909 au traitement contrôle.

En effet, dans le shell du NAc et le CgCx, aucune différence significative n'est observée (figure 35). L'injection i.c.v. de CNP 15 min avant celle de GBR 12909 réduit cette expression dans le CPu. Mais, cette diminution ne se révèle pas statistiquement significative dans nos conditions.

La D-amphétamine induit une forte augmentation de l'expression des ARNm d'*egr-1*, statistiquement significative dans les trois structures examinées. Mais, l'injection i.c.v. de CNP préalable à celle de D-amphétamine ne modifie aucunement cette expression (figure 35).

Il est difficile de conclure quant aux résultats obtenus avec le GBR 12909. En effet, l'induction d'*egr-1* par ce composé est très inférieure à celle provoquée par la cocaïne. Il n'est donc pas aisé de mettre en évidence une diminution significative par le CNP. On ne peut donc, à ce point, attribuer l'effet du CNP à une neurotransmission autre que dopaminergique, vu que la faible augmentation transcriptionnelle provoquée par le GBR 12909 est quand même réduite par le CNP.

Par contre, le fait que le CNP n'affecte en rien l'expression d'*egr-1* induite par la D-amphétamine suggère que le peptide agit sur des composantes régulant l'exocytose de dopamine, puisque la D-amphétamine provoque une libération non vésiculaire de dopamine. Dans cette hypothèse, l'administration préalable de CNP bloquerait l'action de la cocaïne uniquement, puisque cette dernière nécessite la libération préalable de DA pour que l'inhibition du transporteur puisse se concrétiser par une concentration de neurotransmetteur accrue dans la synapse.

1.3. Effet du CNP i.c.v. sur le taux de dopamine extracellulaire

Pour tester l'hypothèse selon laquelle le CNP bloque la libération de dopamine, nous avons réalisé une expérience de microdialyse, sur animal vigile, pour mesurer le taux de DA extracellulaire dans le striatum. Deux protocoles ont été utilisés. Dans le premier, les animaux ont été injectés i.c.v par 20 nmoles de CNP et 15 min plus tard, ils ont reçu une injection i.p., soit de cocaïne (20 mg/kg) (figure 36A), soit de D-amphétamine (2mg/kg) (figure 36C). Dans le deuxième protocole, ils ont reçu une solution soit de cocaïne (10 µg en 10 min)(figure 36B), soit de D-amphétamine (1 µg en 10 min) (figure

36D), dans le CPU via la sonde de dialyse. Les administrations par la sonde de dialyse ont été réalisées à un flux de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant 10 min.

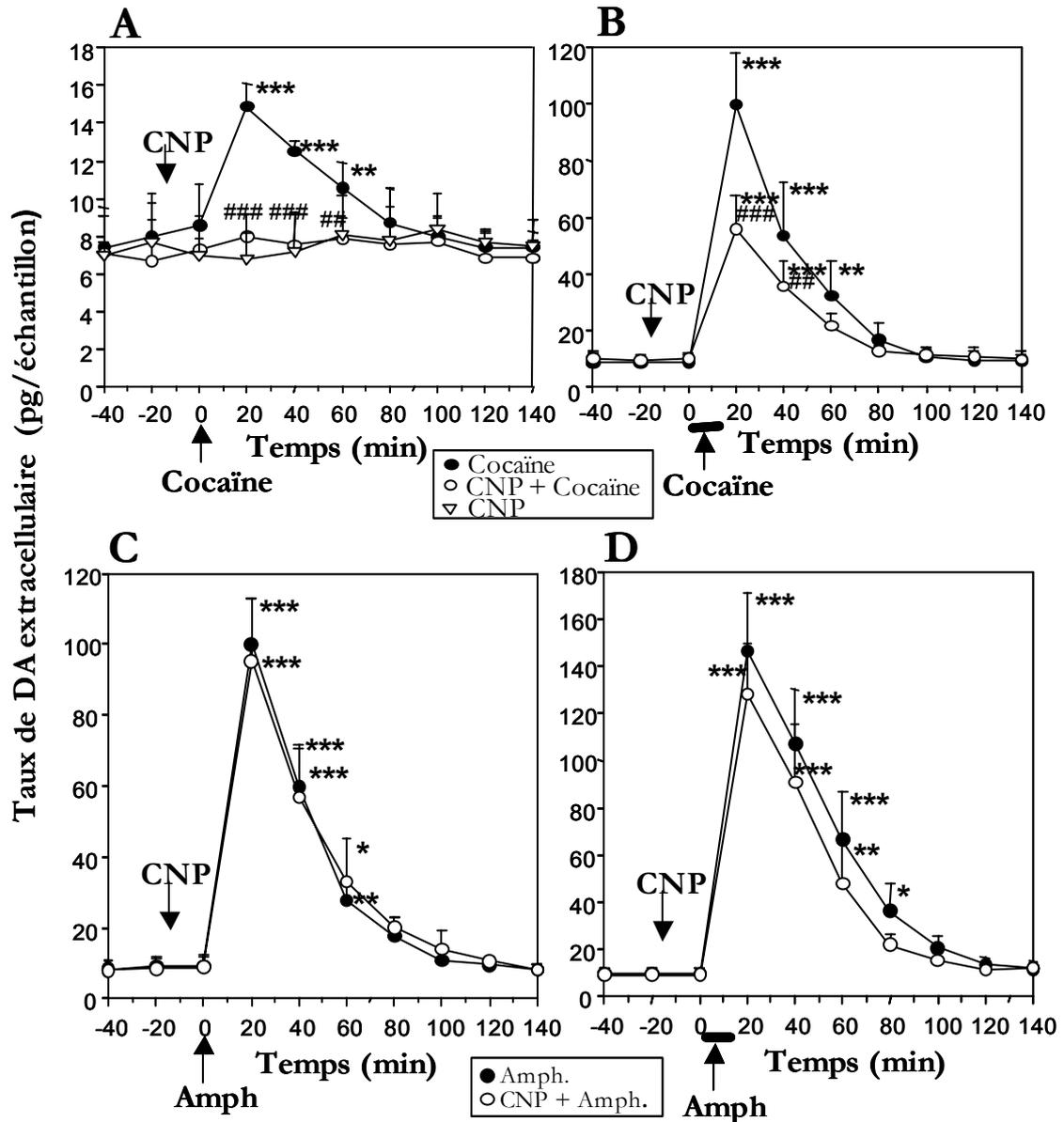


Figure 36: Modulation par le CNP du taux de dopamine extracellulaire.

Les rats ont été injectés i.c.v. par 20 nmoles de CNP ou par une solution contrôle. Ils ont reçu 15 min plus tard, par voie i.p. une injection de solution saline, de cocaïne (20 mg/kg) (A), ou de D-amphétamine (2 mg/kg)(C). En (B), les rats ont reçu une solution de cocaïne par la sonde de dialyse implantée dans le CPU (10 μl d'une solution 1 mg/ml, pendant 10 min avec un flux de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$); en (D) une solution de D-amphétamine (10 μl d'une solution de 0,1 mg/ml, pendant 10 min avec un flux de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$).

Le taux de dopamine extracellulaire a été mesuré par HPLC et exprimé en pg/échantillon de 20 μl collectés toutes les 20 min.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet de la cocaïne ou de la D-amphétamine au traitement contrôle. ## $P < 0,01$ et #### $P < 0,001$, compare le traitement [CNP+cocaïne] à la cocaïne.

Le taux basal de dopamine extracellulaire a été mesuré dans le CPu pendant 60 min avant l'administration i.c.v. de CNP et est similaire entre les différents groupes de rats (figure 36). L'injection i.p. ou dans le CPu de cocaïne provoque une augmentation de 100% de la concentration extracellulaire de DA. Cette augmentation de DA extracellulaire est quasiment abolie par l'administration de 20 nmoles de CNP i.c.v (figure 36 A et B).

Notons que l'administration de CNP seul réduit très légèrement le taux de DA extracellulaire (figure 36A). Cette réduction ne se révèle pas statistiquement significative.

L'injection i.p. ou dans le CPu de D-amphétamine accroît plus fortement le taux de DA extracellulaire que la cocaïne. Dans ce cas, l'administration i.c.v. de CNP ne modifie pas la concentration de DA extracellulaire induite par la D-amphétamine (figure 36 C et D).

Ces résultats sont corrélés avec ceux obtenus précédemment par hybridation *in situ*. Il est plausible en effet, que le CNP, en diminuant le taux de dopamine extracellulaire, réduit l'induction d'*egr-1* dans le neurone cible. Les résultats de microdialyse suggèrent que le CNP bloque la libération de dopamine, donc entrave l'action de la cocaïne. Par contre, il est sans effet sur l'action de la D-amphétamine, puisque celle-ci provoque la libération non-vésiculaire de DA.

1.4. Effet du CNP sur l'activité locomotrice spontanée

Nous avons mesuré l'effet du CNP sur un paramètre comportemental induit par la cocaïne, en l'occurrence l'activité locomotrice spontanée. Après 2 h d'habituation au nouvel environnement, nous avons injecté à des rats 20 nmoles de CNP en i.c.v., puis 15 min plus tard, une solution de cocaïne par voie i.p. La mesure de l'activité locomotrice débute après l'injection i.p. et dure 1 h (tableau 7).

	Nombre de mouvements mesurés en 60 min (n=6)
Contrôle	371 ± 82
CNP (20 nmoles en i.c.v.)	286 ± 80
Cocaïne (20 mg/kg, en i.p.)	1707 ± 154 **
CNP + Cocaïne	1017 ± 204 *#

Tableau 7 : Modulation par le CNP de l'activité locomotrice induite par la cocaïne.

Chaque valeur représente la moyenne ± erreur standard (n=6) de rats injectés comme décrit. *P<0,01, **P<0,001, compare l'effet de la cocaïne au traitement salin. #P<0,01, compare le traitement [CNP+cocaïne] au traitement cocaïne.

Aucune modulation de l'activité n'a été notée au cours de la phase d'habituation parmi les 4 groupes de rats. Par contre, on constate qu'une injection i.p. de cocaïne accroît considérablement l'activité locomotrice spontanée des rats. L'administration préalable de CNP réduit de 43% cette augmentation.

Le CNP inhibe également un paramètre comportemental induit par la cocaïne.

1.5. Localisation du récepteur GC-B

Le CNP active un récepteur membranaire couplé à une guanylyl cyclase appelée GC-B. Pour déterminer le site d'action du CNP, la GC-B a été localisée par immunohistochimie. L'anticorps anti-GC-B a été fourni par le Dr. Olga Solov'eva (Institute of Bioorganic Chemistry, Moscou, Russie). Cet anticorps a été obtenu chez des lapins après immunisation contre un peptide de 18 acides aminés, spécifique de la GC-B.

Il s'avère que la GC-B est présente dans de nombreuses structures cérébrales de l'encéphale de rat (figure 37). Elle est notamment présente au niveau des corps cellulaires des neurones dopaminergiques dans la VTA et la SN, ainsi qu'au niveau des corps cellulaires des neurones qu'ils innervent dans le NAc, le CPu et le CgCx.

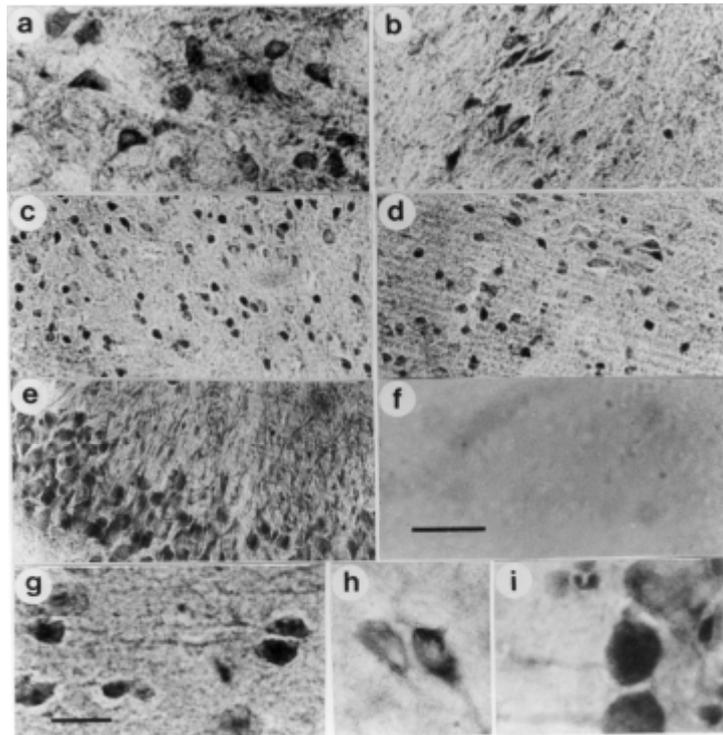


Figure 37 : Expression de la GC-B dans le cerveau de rat.

Des coupes de cerveau ont été incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GC-B. Il a été détecté avec un anticorps secondaire biotinylé, incubé dans un complexe avidine-péroxydase et révélé par ajout de DAB. La figure montre des photomicrographies de cellules GC-B immunoréactives dans la VTA (a et h), la SN (b), le NAc (c), le CPu (d), l'hippocampe (e), le cortex cingulaire (g) et le cervelet (i). Expérience contrôle dans laquelle seul l'anticorps secondaire a été révélé (f). Barres d'échelle : 100 μ m (de a à f) et 40 μ m (de g à i).

Des études immunohistologiques de co-marquage en microscopie confocale avec l'enzyme de synthèse de la dopamine, la TH, montre que la GC-B est localisée dans les neurones dopaminergiques de la VTA (figure 38A). Tous les neurones TH-positifs observés expriment aussi la GC-B.

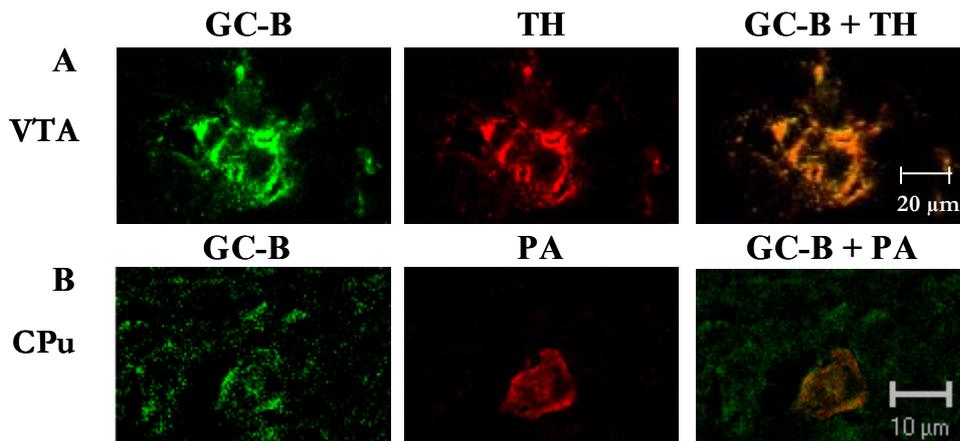


Figure 38 : Localisation de la GC-B dans deux types cellulaires du cerveau de rat.

En A, des coupes de cerveau de rat au niveau de la VTA ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-GC-B et d'un anticorps monoclonal de souris anti-TH. En B, des coupes de cerveau au niveau du CPu ont été incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-GC-B et un anticorps monoclonal de souris anti-parvalbumine (PA). Ils ont été détectés par un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 (vert) et un anticorps anti-souris couplé au fluorochrome Cy3 (rouge). Barre d'échelle en A: 20 µm; en B: 10 µm.

La présence du récepteur du CNP au niveau des neurones dopaminergiques et de leurs aires de projection suggère que le CNP peut agir directement à ces deux niveaux.

1.6. Effet dose-réponse du CNP injecté dans des structures dopaminergiques

Vu la localisation de son récepteur, nous avons injecté le CNP directement dans les structures dopaminergiques, au niveau des corps cellulaires (VTA/SN) et au niveau des terminaisons nerveuses (CPu). Dans l'idée de mieux caractériser son mode d'action, trois doses de CNP (0,02, 0,2 et 2 nmoles) ont été injectées dans le CPu et le mésencéphale de l'encéphale droit des rats. Du côté gauche, les animaux ont reçu une injection de solution contrôle. La cocaïne a été injectée 15 min plus tard en i.p. Dans ce protocole expérimental d'injection intra-cérébrale, chaque animal est son propre contrôle.

La figure 39 illustre, au niveau du CPu, l'hybridation *in situ* réalisée à partir des cerveaux de rat préparés comme décrit plus haut. L'expression d'*egr-1* est induite par la cocaïne dans le noyau caudé-putamen, dans le cortex frontal et dans le septum latéral. Une diminution progressive de l'expression génique est observée dans ces structures après administration de doses croissantes de CNP dans le mésencéphale, mais aussi dans le CPu dorsal.

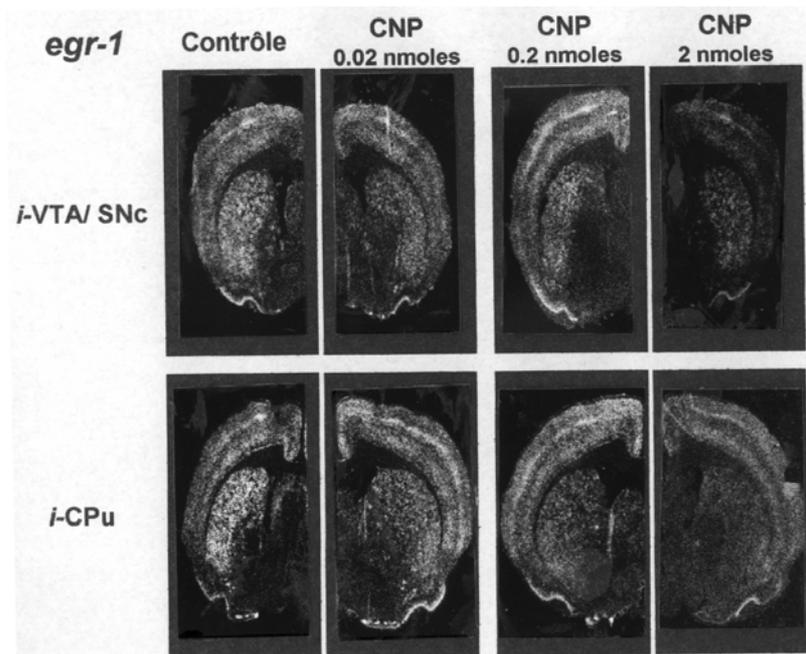


Figure 39 : Modulation de l'expression d'*egr-1* par le CNP injecté dans les structures dopaminergiques.

Expérience d'hybridation *in situ*, réalisée sur des coupes frontales de cerveau de rat au niveau du striatum postérieur, avec la sonde ARN antisens du gène *egr-1* marquée au ^{35}S . Les animaux ont été injectés avec des doses croissantes de CNP dans le mésencéphale (*i*-VTA/SN) ou le CPu (*i*-CPu) droit et avec une solution saline dans les structures correspondantes gauches. La cocaïne (20 mg/kg) a été injectée 15 min plus tard en i.p. Les animaux ont été sacrifiés 45 min après l'injection de cocaïne.

La figure 40 montre les courbes résultant de l'analyse densitométrique des autoradiogrammes obtenus dans le CPu, le NAc et le CgCx, d'après les protocoles décrits. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne. Dans le NAc et le CPu, le CNP réduit significativement l'expression d'*egr-1* de façon dose-dépendante dans les deux types de traitement. Dans le CgCx par contre, les faibles doses (0,02 et 0,2 nmoles) de CNP intra-CPu et intra-VTA/SN ne réduisent que très peu l'expression d'*egr-1* tandis que la dose la plus forte (2 nmoles) l'augmente considérablement. Cette augmentation est significative quand l'injection a lieu dans le CPu. On retrouve donc des résultats similaires à ceux décrits précédemment (paragraphe

B.1.), c'est-à-dire quand le CNP était injecté en i.c.v. L'induction de l'expression d'*egr-1* dans le CgCx était accrue par rapport à l'effet de la cocaïne seule.

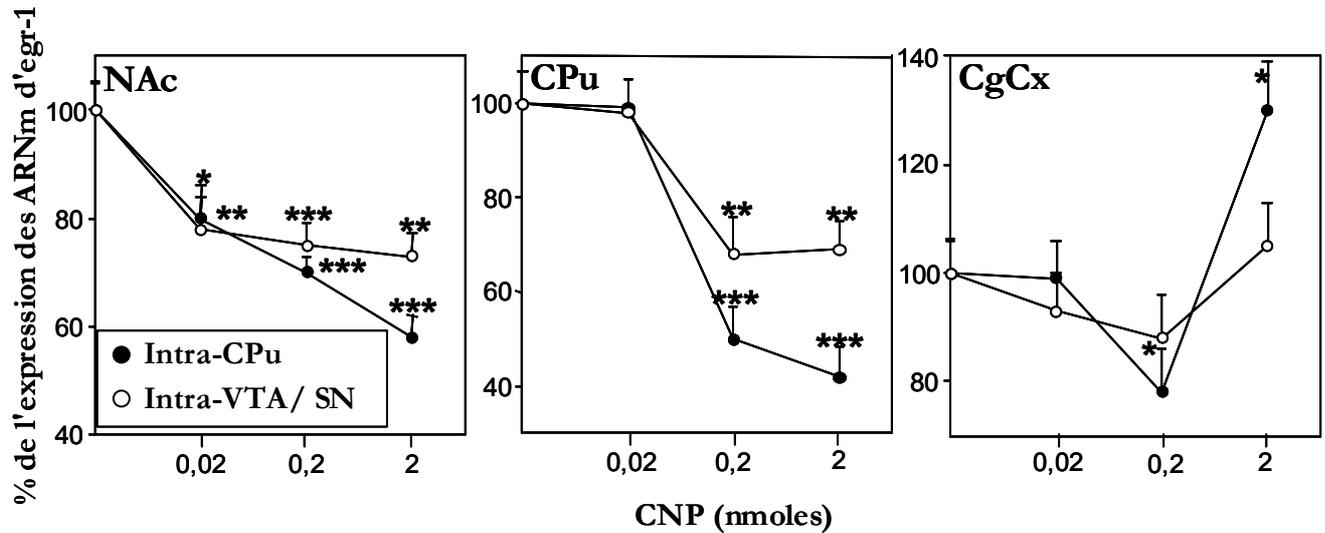


Figure 40 : Analyse densitométrique de l'expression du gène *egr-1* réalisée à partir des films autoradiographiques.

La densité optique a été mesurée sur une surface identique du CPu dorsal, du shell du NAc et du CgCx. Les rats ont été traités comme indiqué dans la figure 39. Chaque point représente la moyenne \pm écart-type obtenue à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet du traitement [CNP+cocaïne] à celui cocaïne.

1.7. Effet du CNP intra-CPu sur l'action de la D-amphétamine et du GBR 12909

Deux nmoles de CNP ont été injectés dans le CPu de rats. Ces animaux ont reçu également une injection i.p., soit de GBR 12909 (20 mg/kg), soit de D-amphétamine (2 mg/kg). Quarante-cinq min plus tard, ils ont été sacrifiés et une étude d'hybridation *in situ* a été réalisée sur des coupes de cerveau.

Sur la figure 41, on peut observer, en comparant les hémisphères droit et gauche sur une coupe obtenue au niveau du CPu, que le GBR 12909 provoque une plus faible transcription d'*egr-1* dans les tubercules olfactifs, le CPu et le cortex frontal que la cocaïne. Notons que le CNP injecté 15 min avant le GBR 12909 ne modifie que très peu l'expression. La D-amphétamine induit très fortement la transcription d'*egr-1* dans les tubercules olfactifs, le septum, le CPu et le cortex cérébral. Là encore, le CNP ne semble pas modifier cette induction.

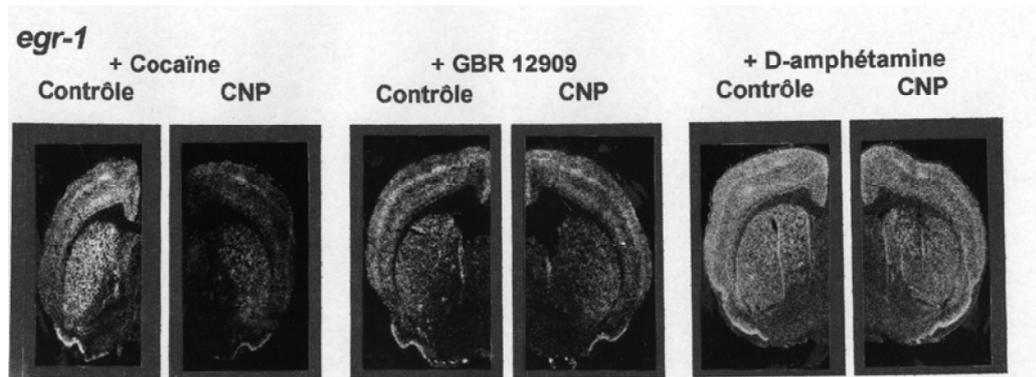


Figure 41 : Expression des messagers *egr-1* après administration intra-CPu de CNP et injection i.p. de cocaïne, de GBR 12909 ou de D-amphétamine.

Expérience d'hybridation *in situ*, réalisée sur des coupes frontales au niveau du striatum postérieur, avec la sonde *egr-1* marquée au ^{35}S . Les animaux ont été injectés avec 2 nmoles de CNP dans le CPu droit et une solution saline dans le CPu gauche. La cocaïne (20 mg/kg), le GBR 12909 (20 mg/kg), ou la D-amphétamine (2 mg/kg) ont été injectés 15 min plus tard en i.p. Les animaux ont été sacrifiés 45 min après l'injection i.p.

Ces résultats ont été confirmés par une analyse densitométrique des autoradiogrammes obtenus par hybridation *in situ* (tableau 8).

	NAc	CPu	CgCx
Cocaïne	16,7 ± 2,07	17,2 ± 1,52	18,30 ± 1,22
CNP + Cocaïne	*** 8,9 ± 1,31	*** 9,10 ± 1,17	* 19,28 ± 2,16
GBR 12909	8,2 ± 1,48	9,80 ± 1,69	10,4 ± 1,80
CNP +GBR 12909	7,8 ± 1,34	9,46 ± 1,53	7,2 ± 1,64
D-Amphétamine	18,32 ± 1,73	18,5 ± 2,07	19,41 ± 2,34
CNP+D-Amphétamine	19,44 ± 2,03	18,6 ± 2,13	20,07 ± 3,78

Tableau 8 : Analyse densitométrique de l'expression du gène précoce *egr-1* réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation *in situ*.

Les rats ont été traités comme indiqué dans la figure 41. Chaque valeur représente la moyenne en kBeq/g de tissu ± erreur-standard obtenue à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. *P<0,05 et ***P<0,001, compare l'effet du traitement [CNP+cocaïne] à celui cocaïne. Pour les traitements par le GBR 12909 et la D-amphétamine, aucune différence statistique n'est observée après une analyse de variance (ANOVA), suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes (test de Student-Newman-Keuls).

Le CNP ne modifie pas significativement l'expression d'*egr-1* induite par le GBR 12909, ni celle induite par la D-amphétamine, que ce soit dans le shell du NAc, dans la partie dorsale du CPU ou dans le CgCx.

Les résultats obtenus quand le CNP est injecté dans les structures dopaminergiques confirment ceux obtenus précédemment par l'injection de CNP i.c.v. Les effets de la cocaïne sur la transcription sont largement inhibés, alors qu'il est difficile de conclure quant aux résultats obtenus avec le GBR 12909. En effet, l'induction d'*egr-1* par ce composé est faible. Il n'est donc pas aisé de mettre en évidence une diminution significative par le CNP. Le fait que le CNP ne provoque aucun effet sur l'expression d'*egr-1* induite par la D-amphétamine conforte notre hypothèse selon laquelle le CNP bloque l'exocytose de dopamine.

2. Activation de la voie du GMPc / PKG

Le CNP en se fixant sur le récepteur GC-B induit la production intracellulaire de GMPc, qui a plusieurs cibles moléculaires, dont la principale est l'activation d'une protéine kinase dépendant du GMPc (PKG).

2.1. Présence de la PKG dans les synaptosomes striataux

Nous avons recherché la présence de la PKG dans des synaptosomes préparés à partir de striata de rats par "western blot".

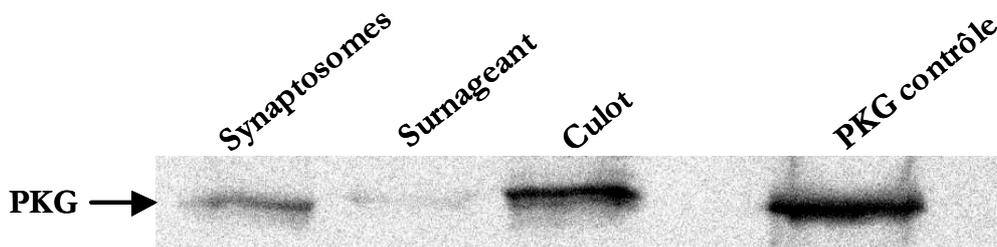


Figure 42 : Analyse par "Western Blot" de l'expression de la PKG dans des synaptosomes de striata de rats.

Les synaptosomes de striata de rats ont été préparés comme indiqué dans Matériel et Méthodes. La préparation synaptosomale a été centrifugée (100 000 g; 20 min). Le surnageant et le culot, contenant les membranes synaptosomales ont été analysés par "Western Blot", à l'aide d'un anticorps anti-PKG-I. La ligne contrôle correspond à un dépôt de PKG-I d'origine commerciale.

A l'aide d'un anticorps anti-PKG, nous observons une bande de masse relative 75 k qui révèle la présence de la PKG dans les extraits synaptosomaux, plus particulièrement dans la fraction membranaire (figure 42). La ligne contrôle représente un dépôt de PKG d'origine commerciale.

Un critère supplémentaire concernant la localisation de la PKG a consisté à déterminer son activité enzymatique dans diverses fractions cellulaires. La mesure de l'activité de la PKG repose sur la phosphorylation d'un peptide substrat sélectif, en présence de GMPc. Nous avons mis en évidence de l'activité PKG dans le striatum, confirmant ainsi son expression dans cette structure. De plus, on retrouve une activité spécifique importante dans les synaptosomes (tableau 9).

	Activité spécifique (pmol/ min/ mg protéine)	
Synaptosomes	10,8	(1)
Surnageant	2,7	(0,25 X)
Culot	26,8	(2,5 X)

Tableau 9 : Mesure de l'activité de la PKG dans des synaptosomes de striata de rats.

Les synaptosomes ont été traités comme indiqué dans la légende de la figure 42. Entre parenthèses, l'enrichissement par rapport à la fraction synaptosomale.

La fraction membranaire des synaptosomes est enrichie 2,5 fois par rapport à la préparation synaptosomale totale.

2.2. Localisation intracellulaire de la protéine PKG

Pour conforter nos résultats, nous avons recherché la localisation sub-cellulaire de la PKG par microscopie électronique dans le striatum de rat dans les conditions basales. Nous observons un marquage révélant la présence de PKG dans des régions discrètes du cytoplasme de neurones du striatum, ou près des membranes mitochondriales (figure 43). Mais de façon importante, nous retrouvons un marquage intense de la PKG dans

certaines synapses striatales, dans les densités post-synaptiques, mais aussi au niveau pré-synaptique.

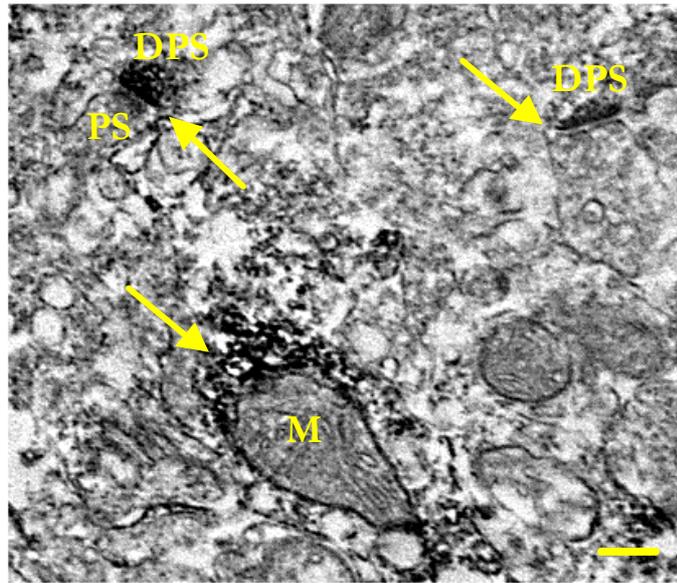


Figure 43 : Localisation sub-cellulaire de la PKG dans le striatum de rat.

Des coupes de cerveau de rat ont été incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-PKG, lui-même détecté par un anticorps secondaire anti-lapin biotinylé, puis après incubation dans un complexe avidine-péroxydase, révélé par ajout de DAB. L'observation d'ultra-coupes a été réalisée en microscopie électronique. Barre d'échelle : 200 nm.

Les flèches indiquent les zones où la PKG est localisée. DPS: densité post-synaptique; M: mitochondrie; PS: zone pré-synaptique.

L'ensemble de ces résultats plaide en faveur de la localisation de la PKG dans les membranes synaptiques de striatum de rat.

2.3 Action d'un analogue du GMPc : le 8-Bromo-GMPc

Pour rechercher l'intervention éventuelle de la PKG dans les effets du CNP, le 8-Bromo-GMPc (Br-Gc), un analogue perméable aux membranes du GMPc, a été micro-injecté dans la VTA, la SNc ou le CPu dorsal de cerveau droit de rat. L'encéphale gauche a été injecté par une solution saline. La cocaïne a été injectée i.p. 15 min plus tard.

La figure 44 montre l'autoradiogramme de l'hybridation *in situ* au niveau du CPu de rats traités comme décrits plus haut et sacrifiés 45 min après l'injection de cocaïne. On observe que le Br-Gc injecté dans ces structures cérébrales réduit l'expression des messagers d'*egr-1* induite par la cocaïne dans le CPu.

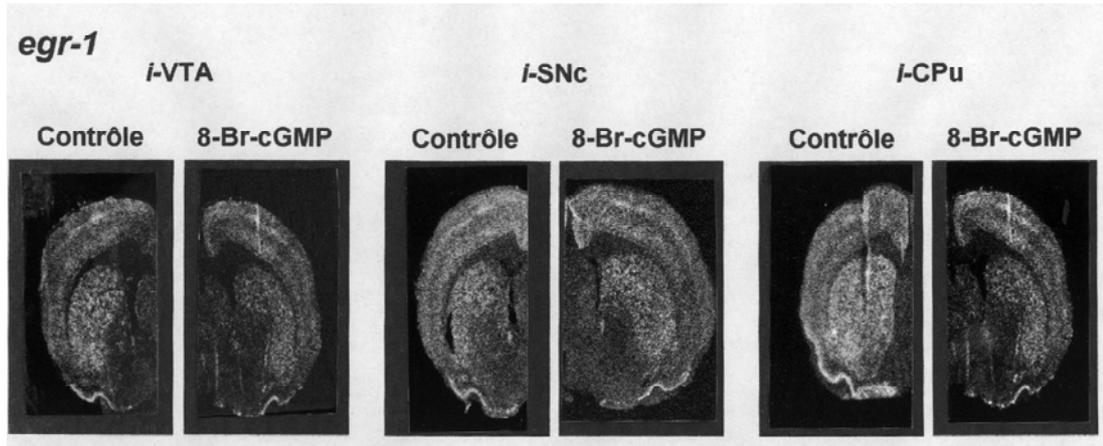


Figure 44 : Le 8-Bromo-GMPc module l'expression des messagers *egr-1* induite par la cocaïne.

Expérience d'hybridation *in situ*, réalisée sur des coupes frontales au niveau du striatum postérieur, avec la sonde *egr-1* marquée au ^{35}S . Les animaux ont été injectés avec du 8-Bromo-GMPc (Br-Gc) (20 nmoles) dans l'hémisphère droit de l'encéphale au niveau de la VTA, de la SNc, ou du CPu. Le côté gauche a été injecté avec une solution contrôle. Quinze min plus tard, les animaux ont été injectés i.p. par de la cocaïne (20 mg/kg) et ont été sacrifiés 45 min après cette dernière injection.

L'analyse densitométrique correspondante est présentée dans la figure 45. Le Br-Gc injecté dans la VTA réduit significativement la synthèse des messagers d'*egr-1* induite par la cocaïne dans le CPu (40%), le striatum latéral (SL) (15%) et le NAc (20%). L'analogue du GMPc, administré dans la SNc, inhibe l'induction des ARNm d'*egr-1* dans le CgCx (20%) et le SL (15%), alors qu'injecté dans la partie dorsale du CPu, il réduit cette induction uniquement dans la zone environnante (25%).

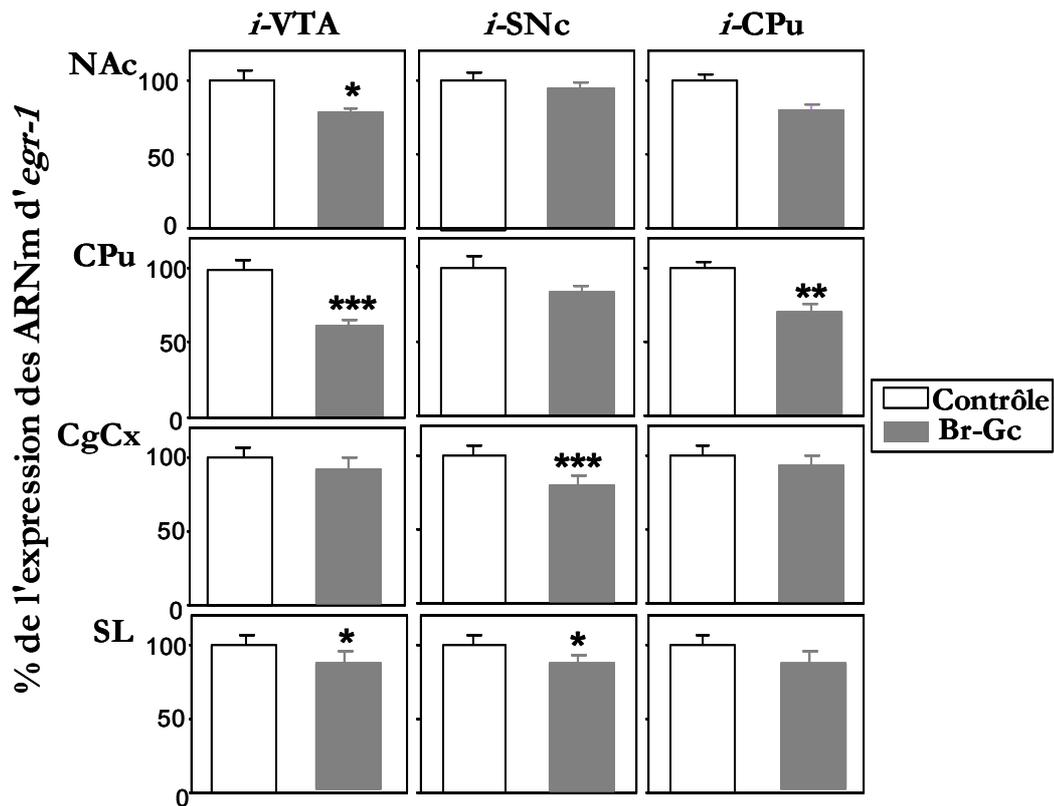


Figure 45 : Analyse densitométrique de l'expression du gène *egr-1*, réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation *in situ*.

La densité optique a été mesurée sur une surface identique du noyau caudéputamen (CPu), du shell du noyau accumbens (NAc), du striatum latéral (SL) et du cortex cingulaire antérieur (CgCx). Les rats ont été traités comme indiqué dans la légende de la figure 44.

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet du traitement [cocaïne] au traitement [Br-Gc+cocaïne].

Ces expériences montrent par trois approches différentes qu'une PKG de type I était exprimée dans le striatum de rat, et plus précisément dans la partie synaptique. Cette protéine kinase est enzymatiquement active au niveau des terminaisons synaptiques. Son activation par le 8-Bromo-GMPc semble mimer les effets du CNP sur l'expression du gène précoce *egr-1* induite par la cocaïne. Ensemble, ces expériences suggèrent très fortement que la PKG est impliquée dans le mode d'action du CNP.

3. Sur-expression de la protéine kinase dépendant du GMPc

Pour démontrer le rôle de la PKG dans la régulation de l'activité des neurones dopaminergiques, nous avons cherché à moduler son activité. L'expérience a consisté à la sur-exprimer dans des structures cérébrales, par micro-injection d'un plasmide contenant le gène humain codant la PKG-I α , après complexation à un polymère cationique, le polyéthylèneimine ou PEI.

3.1. Caractérisation de la sur-expression

Nous avons bien sûr, dans un premier temps, vérifié que la sur-expression était efficace. Nous avons injecté le complexe PEI-plasmide contenant le gène de la PKG-I α dans le CPu droit du rat, le côté gauche étant injecté avec un complexe PEI-plasmide vide, constituant ainsi l'expérience contrôle. Les animaux ont été sacrifiés 12, 24 ou 48 h après la micro-injection.

Par la technique de "western blot", la présence de la protéine PKG sur-exprimée a bien été détectée (figure 46). Nous observons une bande de masse relative 75 k correspondant à la taille de la PKG, et qui migre comme la PKG d'origine commerciale. En comparant les extraits cytoplasmiques de CPu droit et gauche, on constate que la sur-expression est maximale 24 h après la micro-injection.

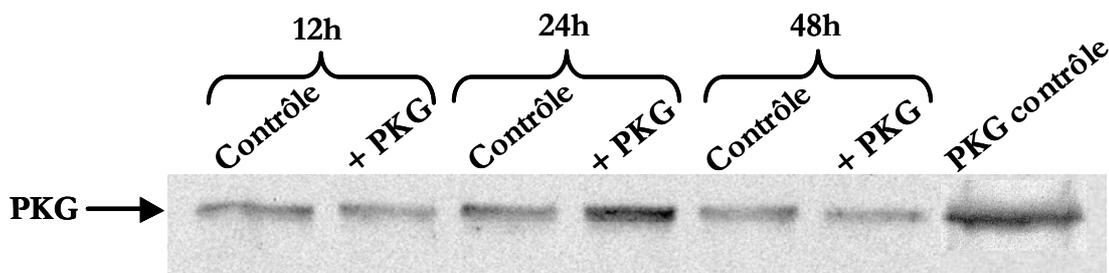


Figure 46 : Analyse par "Western Blot" de l'expression de la PKG transfectée dans des striata de rats.

Les rats ont été injectés par un complexe PEI/plasmide p513 contenant le gène de la PKG-I α (0,5 μ g) du côté droit du CPu et par la même quantité de complexe PEI/plasmide vide du côté gauche. Les animaux ont été sacrifiés 12, 24 ou 48 h après ces injections. Les striata ont été prélevés et les protéines en ont été extraites comme indiqué dans le paragraphe C.2.1. de Matériel et Méthodes. La ligne contrôle correspond à un dépôt de PKG d'origine commerciale.

Ce résultat est confirmé par la mesure de l'activité enzymatique de la PKG. Dans le tableau 10, on observe que l'activité kinasique de la PKG dans des fractions cytosoliques du striatum, est elle aussi maximale 24 h après la micro-injection. Ces expériences montrent que la technique d'injection d'un complexe PEI/ADNc conduit à l'expression de PKG enzymatiquement active 24 h après l'injection.

Activité enzymatique de la PKG
(pmol/min /mg de protéine)

	Contrôle (gauche)	Transfecté (droit)
12 h	25,8	26,4
24 h	24,7	51,0
48 h	23,9	40,7

Tableau 10 : Mesure de l'activité enzymatique de la PKG dans des striata de rats.

Les striata de rats (n=3) ont été obtenus comme décrit dans la légende de la figure 46. L'activité enzymatique de la PKG a été mesurée comme indiqué dans le paragraphe A.7. de Matériel et Méthodes, dans les extraits cytosoliques obtenus en centrifugeant les homogénats (100 000 g, 1 h).

3.2. Localisation de la PKG exogène

Nous avons recherché dans quels types cellulaires la protéine PKG était sur-exprimée. Dans un premier temps, nous avons cherché à évaluer le nombre et la densité de cellules PKG-positives après sa sur-expression dans le CPu par une étude immunohistologique. La figure 47 montre qu'autour du site d'injection du complexe PEI/plasmide p513 contenant le gène de la PKG (figure 47B), un très grand nombre de cellules expriment la PKG ; le nombre de cellules PKG-positives décroît quand on s'éloigne du site d'injection. Ainsi, dans les zones distantes de la micro-injection, on retrouve un marquage de la PKG similaire à celui observé dans les conditions contrôles (figure 47A). Au vu de cette observation, toutes les expériences de localisation qui suivent ont été réalisées dans la zone de forte densité de sur-expression autour du point d'injection.

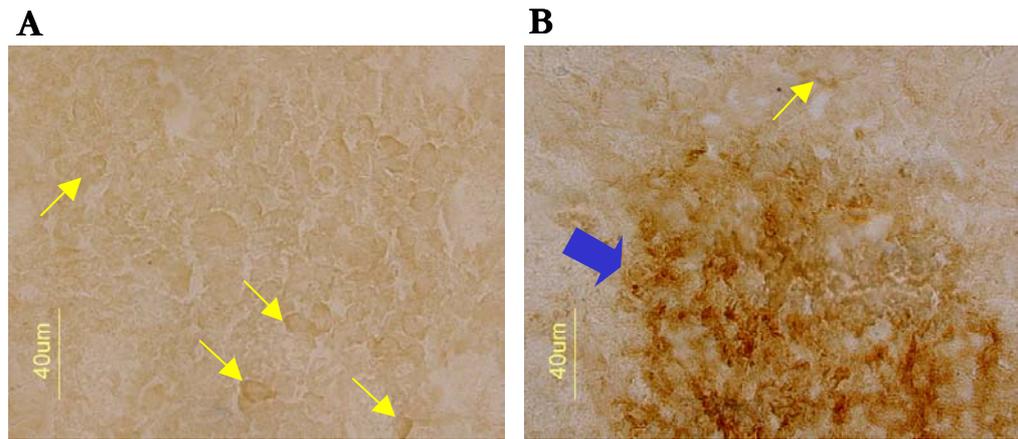


Figure 47 : Sur-expression de la PKG dans le CPu de rat.

Le rat a été micro-injecté dans le CPu droit par un complexe PEI/plasmide p513 vide (0,5 µg) (A) ou dans le CPu gauche par un complexe PEI/plasmide p513 (0,5 µg) contenant le gène de la PKG-I α (B). Des coupes de cerveau ont été incubées avec un anticorps polyclonal de lapin anti-PKG. Il a été détecté avec un anticorps secondaire biotinylé, incubé dans un complexe avidine-péroxydase et révélé par l'addition de DAB, donnant la coloration brune. Barre d'échelle : 40 µm.

Les flèches jaunes indiquent des cellules exprimant la PKG de façon "endogène". La flèche bleue indique la zone de forte densité entourant le point d'injection de la PKG. Cette zone comprend de très nombreuses cellules exprimant fortement la PKG.

Des expériences de co-marquage immunocytologique ont été réalisées sur des coupes de cerveaux de rats après micro-injection de PEI/PKG dans le CPu, la VTA ou la SNc. L'observation a été faite en microscopie confocale. Dans un premier temps, nous avons détecté simultanément la PKG et la GFAP ("glial fibrillary acidic protein"), un marqueur spécifique des astrocytes, à l'aide d'anticorps anti-PKG et anti-GFAP. La figure 48 montre que la PKG n'est localisée dans aucune des cellules GFAP-immunoréactives au niveau de la VTA (A) ou du CPu (B), zones où la PKG a été sur-exprimée. La PKG n'apparaît pas exprimée dans les astrocytes.

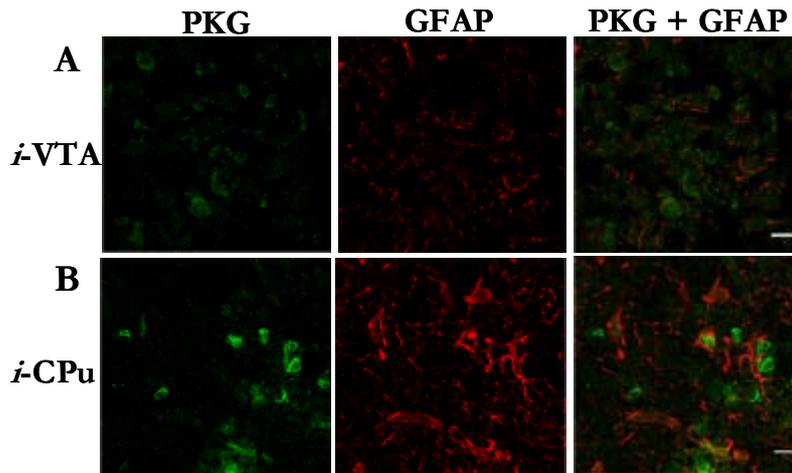


Figure 48 : Localisation de la PKG sur-exprimée dans le cerveau de rat.

Les rats ont été injectés dans la VTA ou le CPu par un complexe PEI/plasmide p513 (0,5 μ g) contenant le gène de la PKG-I α et 24 h après, les cerveaux ont été préparés pour une étude immunohistologique.

Des coupes de cerveau de rat, préparées au niveau de la VTA (A) et du CPu (B) ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-PKG et d'un anticorps monoclonal de souris anti-GFAP. Ils ont été détectés par un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 (vert) et un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Cy3 (rouge). Barres d'échelle : 50 μ m.

Les photomicrographies ont été obtenues après observation au microscope confocal.

Nous avons ensuite réalisé une expérience de co-marquage à l'aide d'anticorps anti-PKG et anti-tyrosine hydroxylase (TH), un marqueur des neurones catécholaminergiques. Nous observons dans la figure 49A que la PKG est présente dans des neurones TH-positifs lorsque son plasmide est injecté dans la VTA. Cela montre que la PKG est sur-exprimée dans les corps cellulaires dopaminergiques de la VTA.

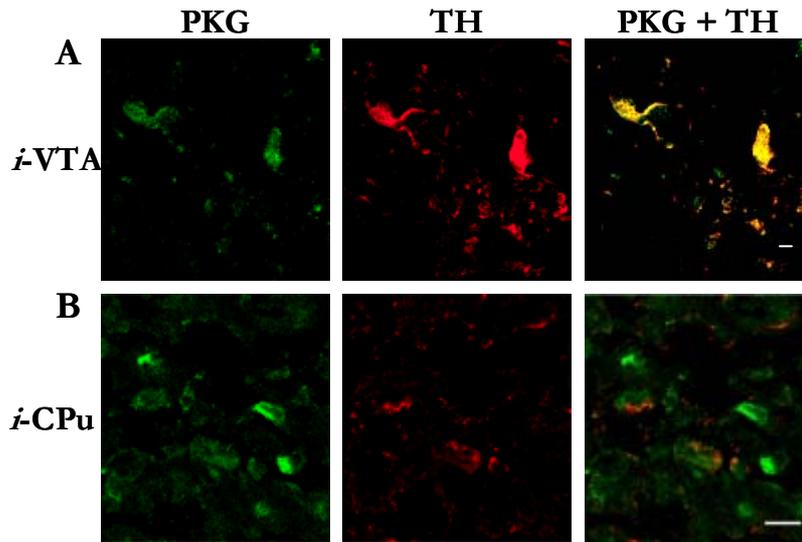


Figure 49 : Localisation de la PKG sur-exprimée dans le cerveau de rat.

Les rats ont été injectés dans la VTA (*i*-VTA) ou le CPu (*i*-CPu), par un complexe PEI/plasmide p513 (0,5 µg) contenant le gène de la PKG-Iα et 24 h après, les cerveaux ont été préparés pour une étude immunohistologique.

Des coupes de cerveau de rat, préparées au niveau de la VTA (A) et du CPu (B), ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-PKG et d'un anticorps monoclonal de souris anti-tyrosine hydroxylase (TH). Ils ont été détectés par un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 (vert) et un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Cy3 (rouge). Barre d'échelle en A : 20 µm. Barre d'échelle en B : 50 µm. Les photomicrographies ont été obtenues après observation au microscope confocal.

Par contre, comme on pouvait le soupçonner, la PKG n'est pas localisée dans les projections dopaminergiques du CPu, quand la PKG est sur-exprimée dans cette structure (figure 49B). Ceci montre que les corps cellulaires sont indispensables à la synthèse de la protéine, et que les plasmides sont transportés de manière rétrograde vers les corps cellulaires.

Pour déterminer quels neurones sur-exprimaient la PKG dans le CPu, nous avons procédé à des expériences de co-marquage de la PKG soit avec la parvalbumine (PA), un marqueur des neurones GABAergiques, soit avec la choline acétyl transférase (ChAT), un marqueur des inter-neurons cholinergiques.

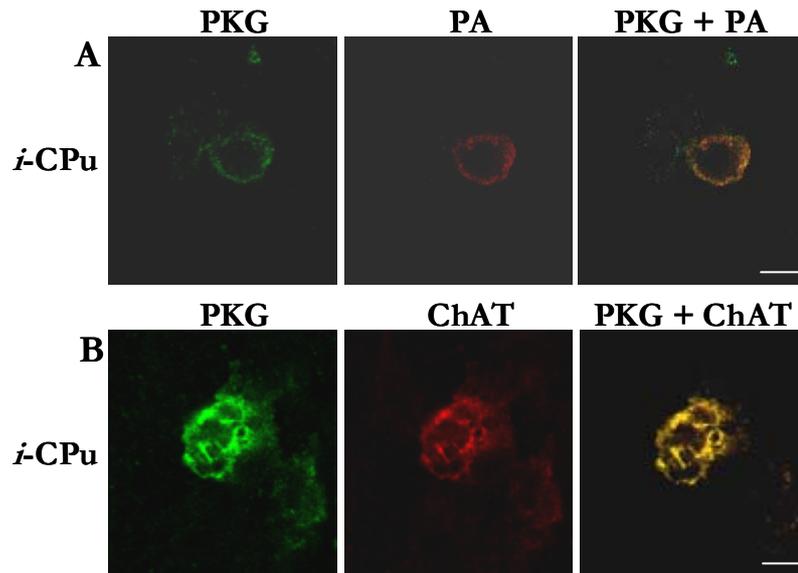


Figure 50 : Localisation de la PKG dans le CPu de rat.

Les rats ont été micro-injectés dans le CPu (*i*-CPu) par un complexe PEI/plasmide p513 (0,5 µg) contenant le gène de la PKG-Iα et 24 h après, les cerveaux ont été préparés pour une étude immunohistologique.

En A, des coupes de cerveau de rat ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-PKG et un anticorps monoclonal de souris anti-parvalbumine (PA). En B, des coupes de cerveau ont été incubées en présence d'un anticorps polyclonal de lapin anti-PKG et un anticorps polyclonal de chèvre anti-choline acétyl transférase (ChAT).

Ils ont été détectés par un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa 488 (vert) et un anticorps secondaire anti-chèvre couplé au fluorochrome Alexa 568 (rouge). Barres d'échelle: 5 µm.

Les photomicrographies ont été obtenues après observation au microscope confocal.

Il s'avère que la PKG est sur-exprimée à la fois dans des neurones GABAergiques (figure 50A), et dans des inter-neurones cholinergiques du striatum (figure 50B).

Ces résultats nous ont permis de caractériser la sur-expression de la PKG au niveau des structures dopaminergiques, soit au niveau des corps cellulaires, soit dans les aires de projection. Injectés dans la VTA, le plasmide PKG-Iα conduit 24 h plus tard, à l'expression de la protéine dans les corps cellulaires des neurones dopaminergiques. Après injection dans le CPu, on la retrouve dans des cellules GABAergiques, sans doute dans les neurones épineux, mais également dans les inter-neurones cholinergiques.

3.3. Effet de la PKG sur-exprimée dans les structures dopaminergiques

La sur-expression de la PKG étant clairement caractérisée, nous avons recherché l'expression d'*egr-1* sur des coupes de cerveau de rats traités selon le protocole indiqué sur la figure 51.

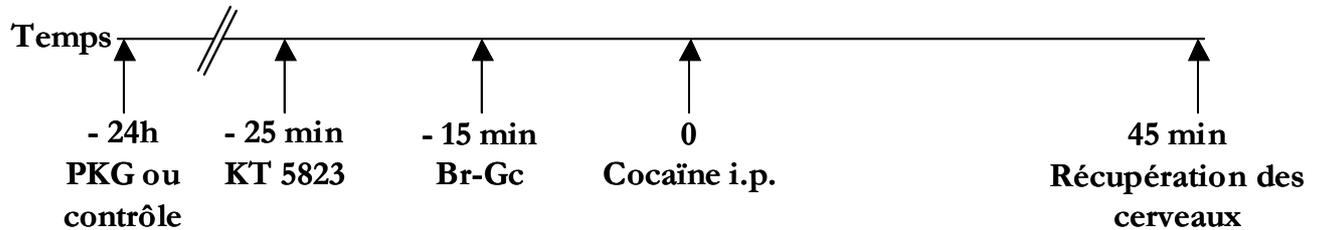


Figure 51 : Protocole d'injection des rats en vue de l'étude par hybridation *in situ*.

Les rats ont été injectés soit dans la VTA, la SNc ou le CPu droit avec le complexe PEI/plasmide p513 (0,5 µg) contenant le gène de la PKG-I α , ou avec le complexe PEI/plasmide p513 (0,5 µg) "vide" du côté gauche. Ils ont reçu ensuite une micro-injection de 2 nmoles de KT 5823 ou le contrôle correspondant. Dix min après, 20 nmoles de 8-Bromo-GMPc (Br-Gc) ou le contrôle correspondant. Enfin, 15 min plus tard, ils ont reçu de la cocaïne (20 mg/kg) en i.p. Les animaux ont été euthanasiés 45 min après cette dernière injection.

La figure 52 représente un autoradiogramme de l'expérience d'hybridation *in situ* réalisée au niveau du CPu. On peut observer l'induction de l'expression d'*egr-1* dans le CPu, le cortex frontal, le striatum latéral en réponse à l'injection de cocaïne. Cette expression est légèrement réduite suite à la sur-expression de la PKG-I dans la VTA, la SNc ou le CPu. Cette réduction est beaucoup plus importante quand la PKG est au préalable activée par le Br-Gc. A noter que l'effet est inhibé par l'injection de KT 5823, un inhibiteur sélectif de la PKG (figure 52).

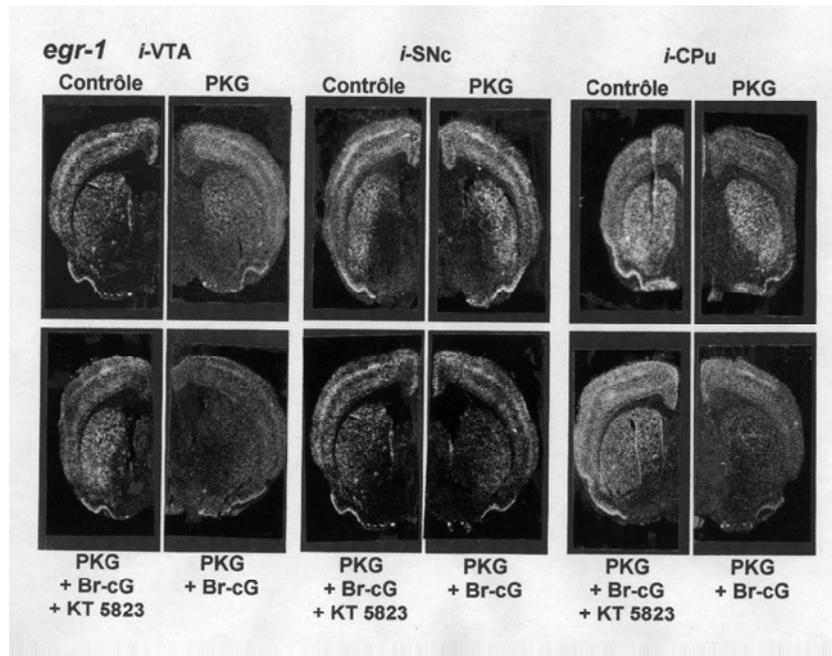


Figure 52: L'activation de la PKG module l'expression des messagers *egr-1* induite par la cocaïne.

Expérience d'hybridation *in situ*, réalisée sur des coupes frontales au niveau du striatum postérieur, avec la sonde *egr-1* marquée au ^{35}S . Les animaux ont été injectés selon le protocole indiqué sur la figure 51.

Br-Gc: 8-Bromo-GMPc; *i*-VTA: injection dans l'aire tegmentale ventrale (VTA); *i*-SNc: injection dans la substance noire pars compacta (SNc); *i*-CPu: injection dans le noyau caudé-putamen (CPu).

La figure 53 correspond à l'analyse densitométrique et statistique du taux de messenger *egr-1* de l'expérience décrite plus haut. Quelle que soit la structure cérébrale dans laquelle la PKG est sur-exprimée (VTA, SNc ou CPu), l'activation de cette kinase par le Br-Gc réduit significativement l'expression des ARNm d'*egr-1* induite par la cocaïne dans le shell du NAc, le CPu dorsal, le CgCx et le SL. L'administration de KT 5823 abolit cette diminution de la transcription d'*egr-1* dans le NAc et le CPu quand la PKG est sur-exprimée dans le mésencéphale ou le CPu, mais aussi dans le SL quand elle est sur-exprimée dans la VTA et la SNc. Par contre, le KT 5823 présente peu d'effet au niveau du CgCx.

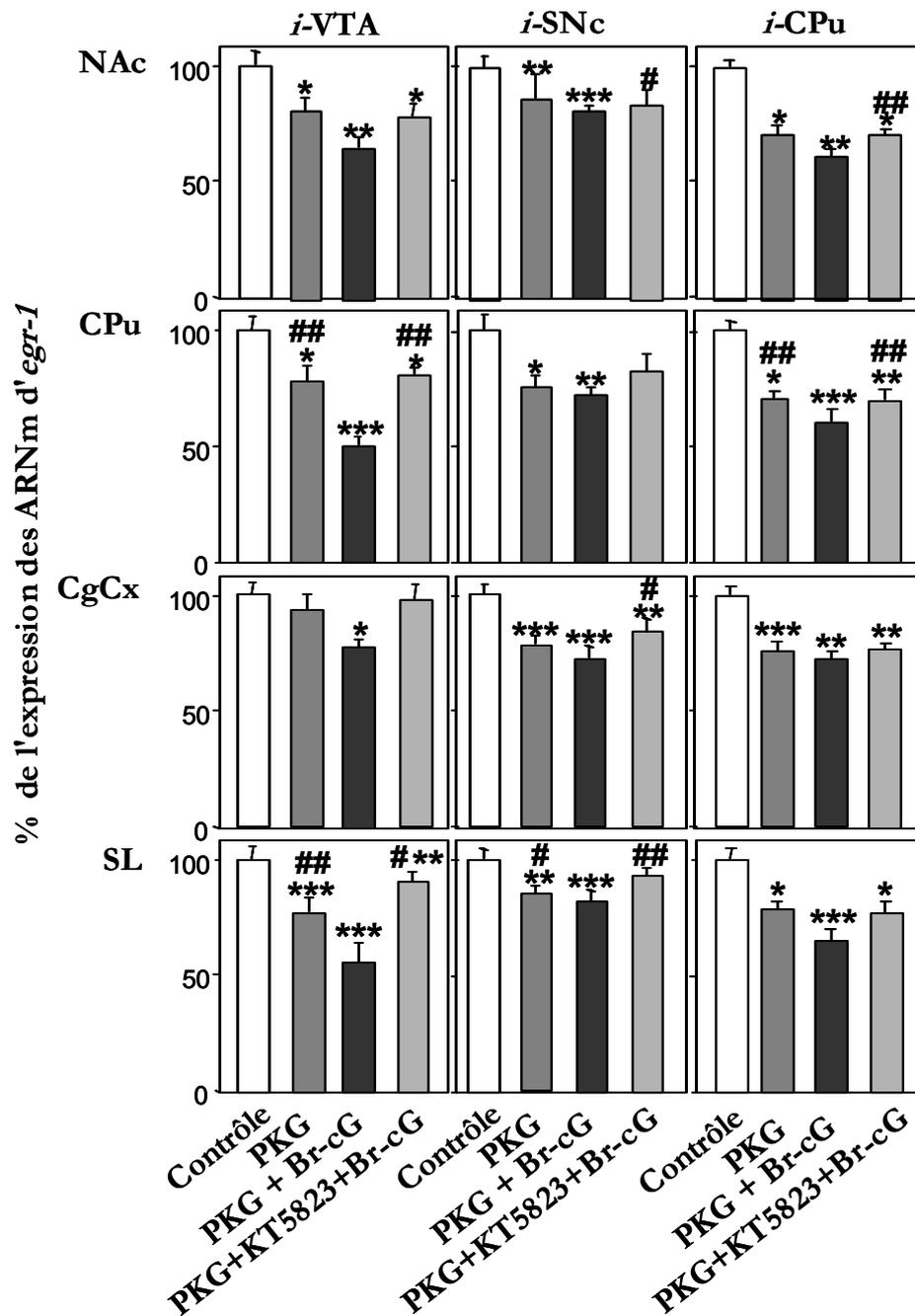


Figure 53 : Analyse densitométrique de l'expression d'*egr-1* réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation *in situ*.

Les rats ont été traités comme indiqué dans la figure 51.

Chaque barre représente la moyenne \pm écart-type obtenue à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet des divers traitements au traitement contrôle. # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ et ### $P < 0,001$, compare l'effet des divers traitements au traitement [PKG + Br-Gc].

Ces résultats montrent clairement que l'activation de la PKG mime complètement les effets du CNP sur l'induction d'*egr-1* induite par la cocaïne. Cette démonstration est renforcée par l'utilisation d'un inhibiteur de la PKG qui abolit la modulation de l'expression génique.

3.4. Mesure de l'activité locomotrice spontanée

Rappelons que la transcription d'*egr-1* représente un excellent moyen pour mesurer l'activation des neurones du striatum. Afin de corrélérer l'effet de la sur-expression de la PKG avec un paramètre comportemental, nous avons mesuré l'activité locomotrice spontanée de rats traités comme indiqué sur la figure 51. Les micro-injections ont été réalisées bilatéralement après 2 h d'habituation et la cocaïne a été injectée par voie i.p. comme décrit plus haut. Le test proprement dit débute immédiatement après cette injection et dure 2 h (figure 54).

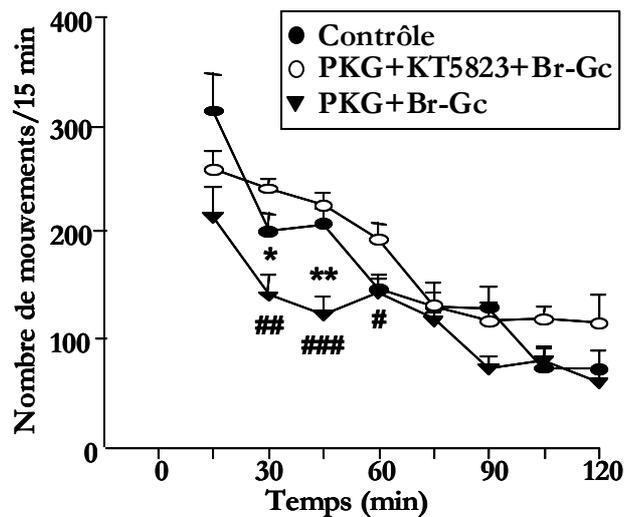


Figure 54 : La sur-expression de la PKG réduit l'activité locomotrice induite par la cocaïne.

Les rats ont été injectés bilatéralement dans le CPu par le complexe PEI/plasmide p513 contenant le gène de la PKG-I α ou par le complexe PEI/p513 vide. La phase d'habituation a duré 2 h et a commencé 21 h après cette injection. A la fin de cette phase, les animaux ont reçu une injection de KT 5823 (2 nmoles) ou de son contrôle et 10 min après, 20 nmoles de 8-Bromo-GMPc (Br-Gc) ou de son contrôle. Quinze min plus tard, tous les animaux ont reçu de la cocaïne (20 mg/kg) par voie i.p., puis ont été soumis au test proprement dit. Chaque point représente la moyenne \pm erreur-standard d'un groupe de rats dont l'activité a été mesurée pendant trois tranches de 5 min (n=5). *P<0,05, **P<0,01 et ***P<0,001, compare l'effet des divers traitements au traitement contrôle. #P<0,05, ##P<0,01 et ###P<0,001, compare l'effet des divers traitements au traitement [PKG + Br-Gc].

Les trois groupes de rats présentent un profil d'activité similaire pendant l'habituation. Par contre, on constate une activité locomotrice significativement plus faible chez les rats injectés par la PKG, activée par le Br-Gc (groupe [PKG+Br-Gc]) par rapport aux rats [contrôle] entre 30 et 45 min après l'injection de cocaïne. Là aussi, l'effet est partiellement supprimé par le KT 5823, ce qui indique que la PKG est clairement impliquée dans la modulation de l'effet locomoteur induit en réponse à la cocaïne.

Le CNP injecté dans l'encéphale est capable d'inhiber différents paramètres induits par la cocaïne, en l'occurrence, l'expression du gène à réponse précoce *egr-1*, le taux de dopamine extracellulaire et l'activité locomotrice. Par contre, le CNP ne modifie pas ces mêmes paramètres quand ils sont induits par la D-amphétamine. Etant donné les modes d'action distincts de ces psychostimulants, nos observations suggèrent fortement que le CNP module l'activité des neurones dopaminergiques en inhibant leur libération.

Nous avons démontré que cet effet passait par la voie GMPc/PKG. D'abord la PKG est bien présente dans les synaptosomes du striatum. Ensuite, au vu des résultats d'expression génique et de mesure de l'activité locomotrice, nous avons montré que la sur-expression de la PKG reproduisait les effets du CNP.

En conclusion, le voie du GMPc et de la PKG, module l'activité des neurones dopaminergiques.

C. Expression différentielle des gènes de la famille *Egr* et de ses co-répresseurs NAB en réponse à des injections répétées de cocaïne

Toutes les expériences décrites précédemment concernaient les effets d'une injection aiguë de cocaïne sur la transcription d'*egr-1* dans les champs de projection dopaminergique. Or l'installation de la dépendance à la cocaïne n'a lieu qu'après un usage répété. Dans cet ordre d'idées, nous avons injecté à des rats la même dose de cocaïne (20 mg/kg) une fois par jour pendant 10 jours, et comparé l'expression de gènes ainsi observée à celle obtenue suite à une injection aiguë. Ce protocole a été mis en place et validé précédemment au laboratoire par le Dr. Nathalie Humblot. Il permet en effet de mettre en évidence l'effet appétitif de la cocaïne, mesuré par le test comportemental de préférence de place, ainsi que la sensibilisation comportementale, un phénomène bien connu se produisant lors d'injections répétées de cocaïne.

1. Cinétique d'expression du messager *egr-1* après l'administration aiguë ou répétée de cocaïne

La figure 55A illustre une expérience d'hybridation *in situ* montrant l'expression des messagers *egr-1* au niveau du NAc sur des coupes de cerveaux de rats traités, soit par une injection aiguë de solution saline ou de cocaïne et sacrifiés 45 min après l'injection, soit par des injections répétées des mêmes solutions pendant 10 jours et sacrifiés 12 h après la dernière injection.

Comme observé précédemment, une expression basale d'*egr-1* après l'administration unique de solution saline est retrouvée dans les couches IV et VI du cortex cérébral et dans les tubercules olfactifs (voir paragraphe A.1). Un marquage similaire est retrouvé après le traitement répété de la solution saline.

L'injection aiguë de cocaïne induit la synthèse 45 min plus tard des messagers *egr-1* dans le NAc, le CPU et les cortex frontal et piriforme. Douze heures après la dernière injection du traitement répété, la synthèse des messagers d'*egr-1* se trouve induite dans les mêmes structures.

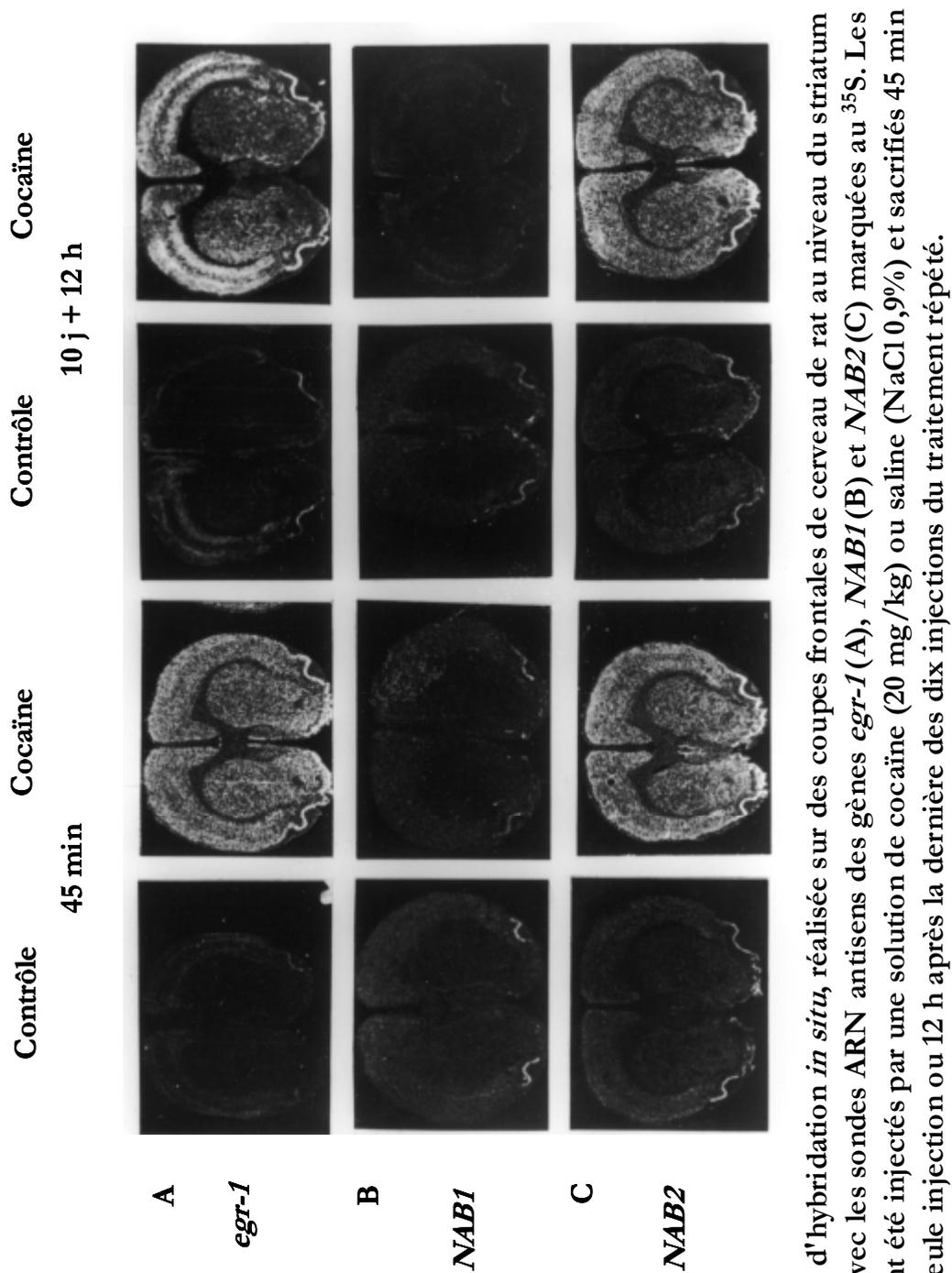


Figure 55: Expression des messagers *egr-1*, *NAB1* et *NAB2* après des traitements aigus ou répétés de cocaïne.

La figure 56 présente l'analyse statistique des autoradiogrammes obtenus après une étude cinétique complète de l'expression des messagers *egr-1* réalisée par hybridation *in situ*. L'induction des ARNm *egr-1* induite 45 min après une injection aiguë est de 1,9 fois

dans le shell du NAc, 2,4 fois dans la partie dorsale du CPU et 1,5 fois dans le CgCx. Ce pic d'expression est observé jusqu'à 4 h et revient à une valeur basale 8 h après l'injection.

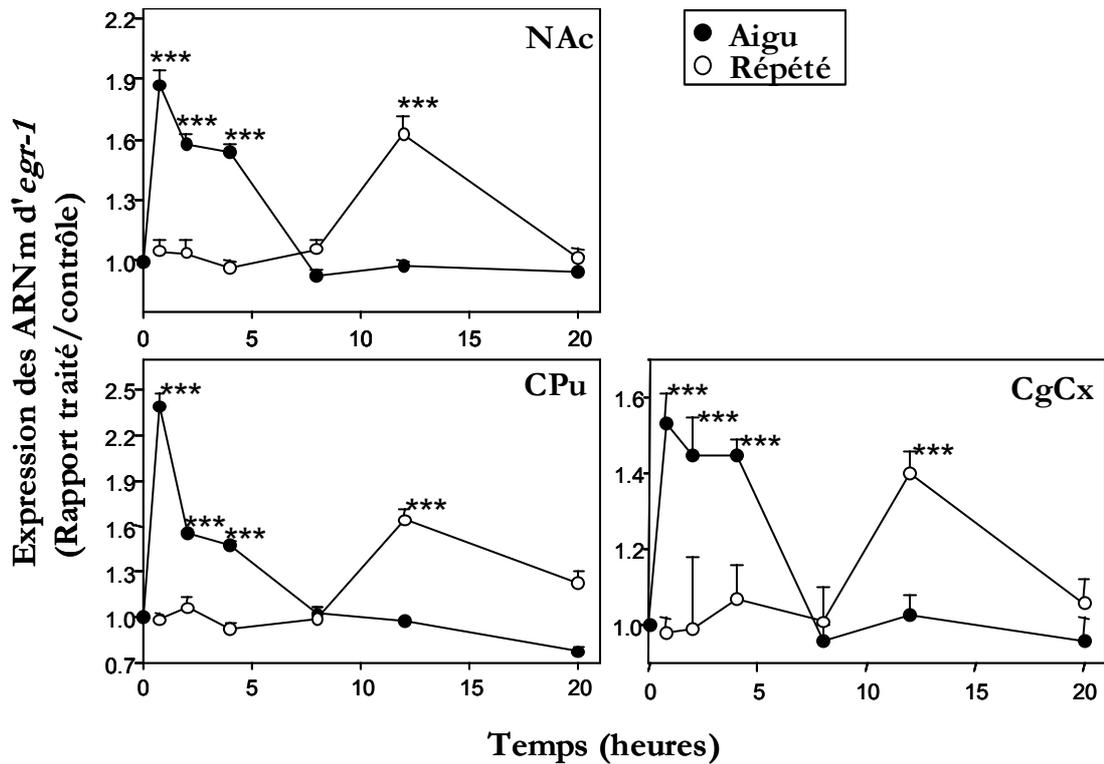


Figure 56 : Cinétique de l'expression du gène *egr-1* suite à une administration unique ou répétée de cocaïne.

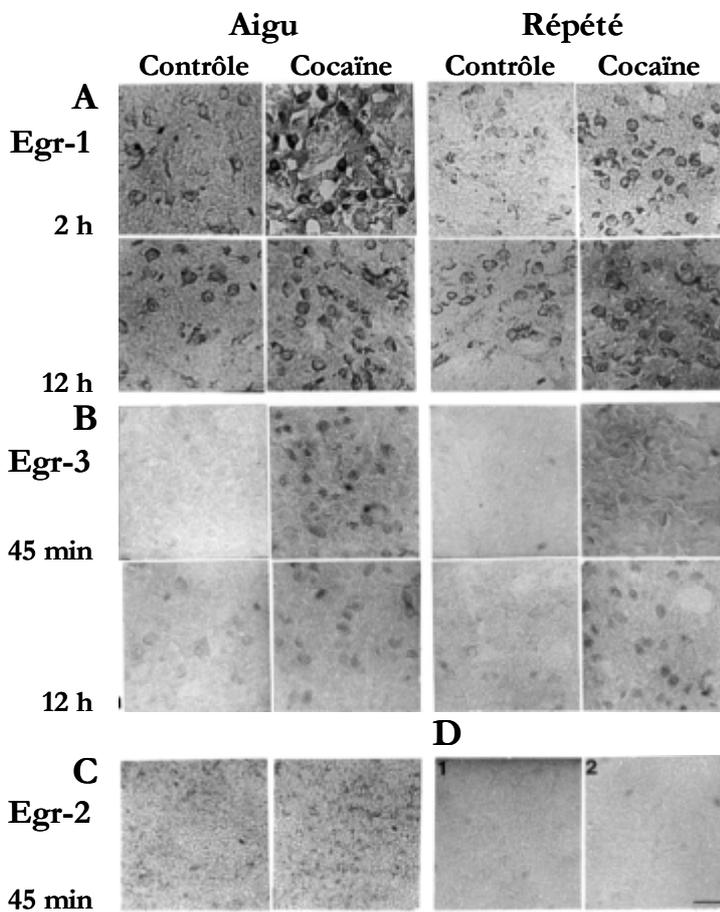
Les rats ont été traités soit par une injection unique de cocaïne (20 mg/kg) ou par une solution saline, et sacrifiés à différents temps après cette injection, soit par dix injections (1 injection/jour pendant 10 jours) de cocaïne (20 mg/kg) ou saline et sacrifiés à différents temps après la dernière injection. L'analyse densitométrique a été réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation *in situ*. Les résultats sont exprimés comme le rapport de l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne sur celle observée après le traitement contrôle. Chaque point représente la moyenne \pm écart-type obtenue à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet de la cocaïne au traitement contrôle correspondant.

De façon surprenante, la transcription d'*egr-1* est régulée différemment par des injections répétées de cocaïne. En effet, aucune expression des ARNm apparaît dans des temps courts (entre 45 min et 4 h) après la dernière injection, mais un pic d'expression est révélé 12 h après cette dernière injection et ceci dans les trois structures examinées.

2. Cinétique d'expression de la protéine Egr-1 après l'administration aiguë ou répétée de cocaïne

Nous avons cherché à savoir si le messager *egr-1* induit par la cocaïne était traduit en protéine. Dans ce but, nous avons réalisé une étude immunohistochimique de l'expression de la protéine Egr-1 sur des coupes de cerveau adjacentes à celles utilisées précédemment pour l'hybridation *in situ*.

Le marquage témoin, réalisé sans l'incubation avec l'anticorps anti-Egr-1 ne révèle aucune immunoréactivité (figure 57 D1). La figure 57A illustre l'étude immunohistochimique au niveau du CPu de rats injectés selon les deux protocoles décrits plus haut.



Expérience d'immunohistologie, réalisée avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-Egr-1 (A), anti-Egr-3 (B) et anti-Egr-2 (C) sur des coupes frontales réalisées au niveau du CPu. Les microphotographies proviennent d'animaux traités, soit par une seule injection, soit par dix injections de cocaïne (20 mg/kg) ou d'une solution saline (NaCl 0,9%). Les rats ont été sacrifiés 2 h ou 12 h après l'injection aiguë, ou la dernière des injections répétées, dans le cas d'Egr-1 (A), 45 min ou 12 h après les mêmes injections dans le cas d'Egr-3 (B), et 45 min après l'injection aiguë dans le cas d'Egr-2 (C). Dans les expériences contrôles, les anticorps primaires anti-Egr-1 (D1) ou anti-Egr-3 (D2) ont été omis. Barre d'échelle : 40 µm.

Figure 57 : Expression des protéines Egr-1, Egr-2 et Egr-3 après un traitement aigu ou répété de cocaïne.

Des observations très comparables ont été faites au niveau du NAc et du CgCx. L'immunoréactivité Egr-1 est beaucoup plus intense 2 h et 12 h après une ou dix injections de cocaïne par rapport aux expériences témoins.

Pour quantifier ces données, nous avons compté les cellules exprimant Egr-1 dans le CPU après l'administration aiguë ou répétée de cocaïne (figure 58). Les mêmes quantifications ont été réalisées dans le NAc et le CgCx.

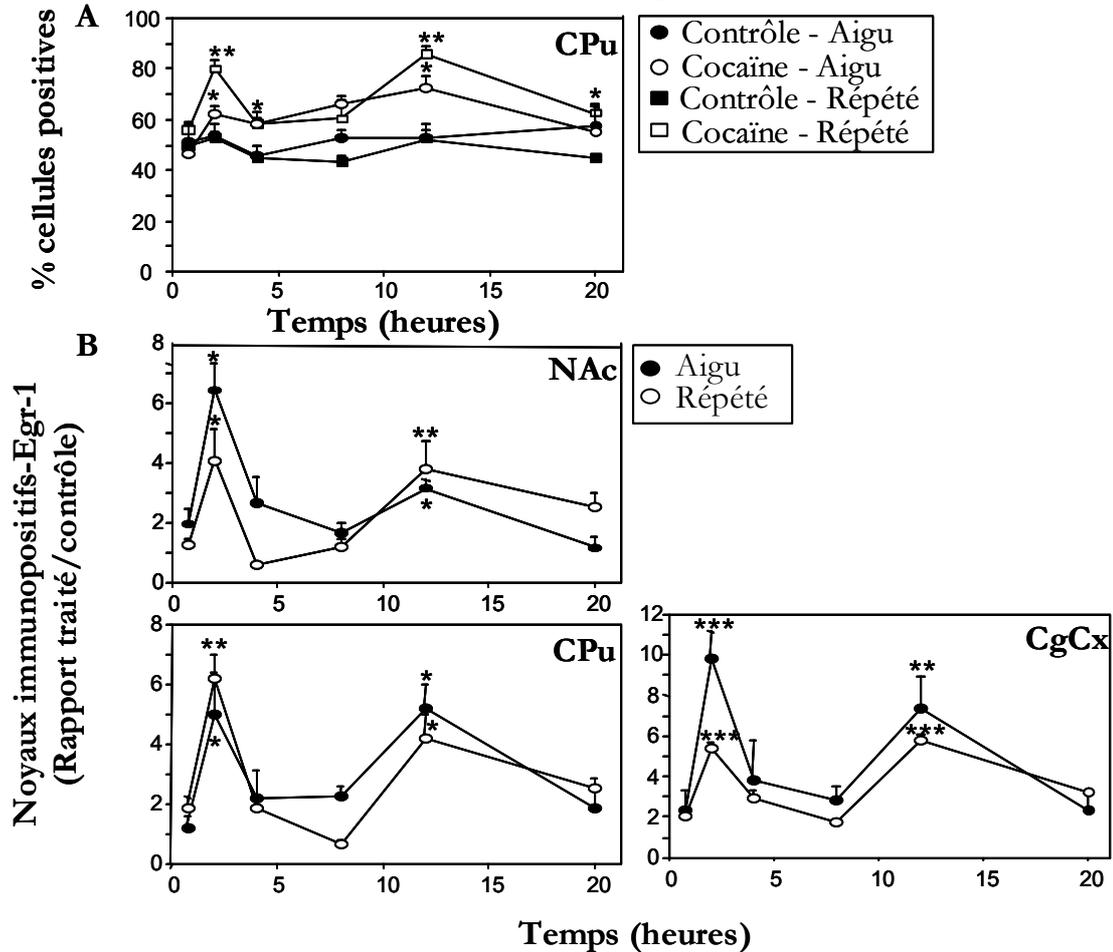


Figure 58 : Cinétique d'expression de la protéine Egr-1 après une administration aiguë ou répétée de cocaïne.

Les rats ont été traités par des injections uniques ou répétées comme indiqué dans la légende de la figure 57. L'expérience d'immunohistochimie a été réalisée comme décrit dans le paragraphe C.3. de Matériel et Méthodes avec l'anticorps polyclonal anti-Egr-1. Les noyaux ont été marqués avec le colorant Hoescht 33258. En A, pourcentage de cellules Egr-1 immunopositives, calculé sur au moins 400 cellules, et exprimé comme la moyenne \pm erreur-standard à partir de 3 expériences (n=3). En B, pourcentage de noyaux immunoréactifs dans le NAc, le CPU ou le CgCx, calculé sur au moins 450 cellules, et exprimé comme le rapport entre les valeurs des animaux traités sur celle des animaux contrôles (moyenne \pm erreur-type, n=3 rats). Les rats ont reçu une seule ou dix injections de cocaïne (20 mg/kg). Pour le traitement répété, le temps indiqué correspond au temps après la dernière injection. *P<0,05, **P<0,01 et ***P<0,001, compare l'effet de la cocaïne au traitement contrôle correspondant.

Notons que près de 50% des cellules du CPU expriment Egr-1 dans les conditions basales (figure 58A). L'expression de la protéine est augmentée significativement 2 h après une injection unique de cocaïne par rapport à l'injection contrôle. On retrouve aussi une expression d'Egr-1 accrue 12 h après la dernière des dix injections du traitement répété de cocaïne. Pour ces deux conditions, le messenger *egr-1* est bien traduit en protéine. En revanche, de façon inattendue, on observe également un marquage accru d'Egr-1 12 h après une seule injection et 2 h après la dernière des dix injections, alors que dans ces conditions, aucune synthèse du messenger *egr-1* n'avait été notée. Dans ces deux cas, il n'y a pas de corrélation entre l'expression du messenger et celle de la protéine.

Comme la protéine Egr-1 code un facteur de transcription, nous avons examiné son expression nucléaire. La figure 58B montre deux pics très distincts de noyaux Egr-1 immunopositifs, suivant les deux protocoles d'administration. On observe un premier pic 2 h après les injections et un deuxième pic 12 h après les injections réalisées selon les deux protocoles. Cette expression biphasique est retrouvée dans les trois structures examinées.

3. Mesure de l'activité de liaison de la protéine Egr-1

Pour mieux caractériser le facteur de transcription qu'est la protéine Egr-1, nous avons mesuré son activité de liaison à sa séquence nucléotidique consensus radiomarquée au ^{32}P (sonde E) par le test de mobilité électrophorétique (figure 59).

En effet, le complexe Egr-1-sonde E migre plus lentement dans un gel de polyacrylamide que la sonde libre. Pour caractériser la bande correspondant au complexe Egr-1-sonde E, nous avons effectué une expérience de "super-shift" sur des extraits nucléaires de CPU de rats traités par une injection unique de cocaïne, et sacrifiés 2 h après cette injection. Les extraits nucléaires ont été incubés avec 0,1 μg d'un anticorps anti-Egr-1 pendant 1 h à 4°C avant d'être soumis au test de mobilité électrophorétique. Sur l'autoradiogramme correspondant (Figure 59A), on observe la disparition d'une bande, et l'apparition d'une bande encore plus retardée, qui correspond au complexe ternaire anticorps-Egr-1-sonde E. Cette expérience indique que la bande sensible à l'anticorps (indiquée par une flèche) correspond au complexe Egr-1-sonde E.

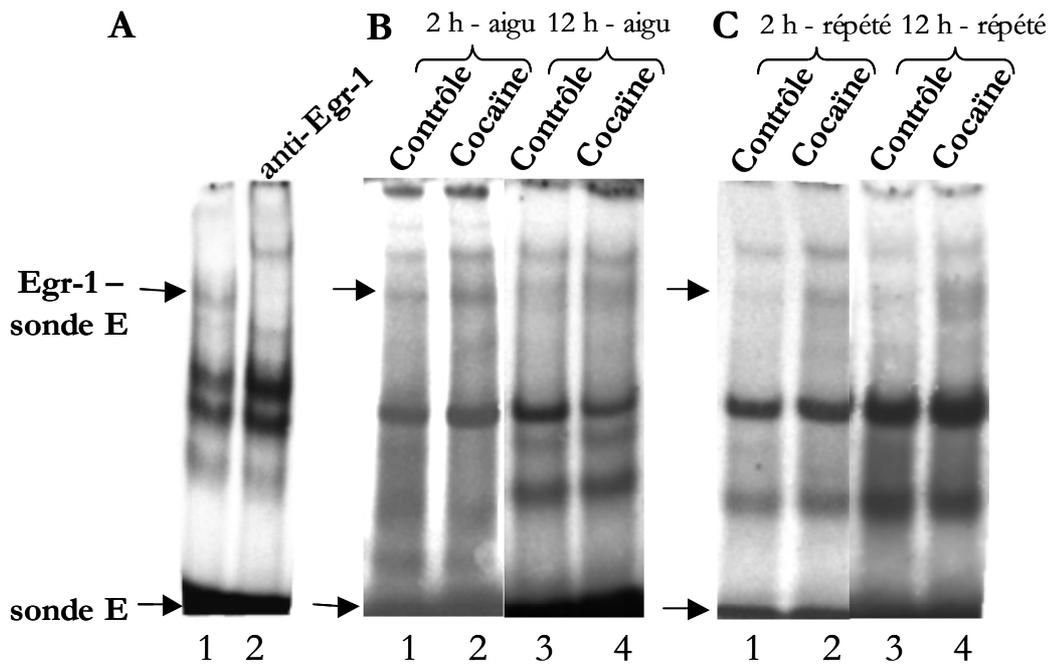


Figure 59: Activité de liaison du facteur de transcription Egr-1 après une administration unique ou répétée de cocaïne.

Les rats ont été traités par des injections uniques ou répétées comme indiqué dans la légende de la figure 57.

En A, les protéines nucléaires ont été extraites du CPU de rats traités par 20 mg/kg de cocaïne, et sacrifiés 2 h plus tard. Les extraits ont été incubés en absence (1) ou en présence (2) de 0,1 µg d'anticorps polyclonal de lapin anti-Egr-1 pendant 1 h avant le test de mobilité électrophorétique.

En B et C, l'activité de liaison d'Egr-1 a été mesurée dans des extraits de CPU de rats injectés par un traitement aigu (B) ou chronique (C) de solution saline (lignes 1 et 3) ou de cocaïne (lignes 2 et 4). Les rats ont été sacrifiés 2 h (lignes 1 et 2) ou 12 h (lignes 3 et 4) après une seule injection ou la dernière des dix injections du traitement chronique. La flèche notée Egr-1 – sonde E indique les complexes formés par le facteur de transcription Egr-1 avec la sonde radiomarquée au ^{32}P , et la flèche notée sonde E indique la migration de la sonde E libre.

Des animaux ont été traités selon les protocoles d'injection aiguë ou chronique et sacrifiés 2 h et 12 h après les injections. Les protéines nucléaires striatales ont été extraites et analysées par le test de mobilité électrophorétique. La figure 59B présente l'autoradiogramme correspondant à cette expérience. Des rats ont été traités par une solution saline ou par la cocaïne et sacrifiés 2 h (lignes 1 et 2) ou 12 h (lignes 3 et 4) après l'injection. On peut constater que le complexe Egr-1-sonde E est augmenté 2 h et, à un degré moindre, 12 h après l'injection de cocaïne. La figure 59C montre que l'activité de liaison d'Egr-1 à sa séquence consensus est aussi augmentée 2 h (lignes 1 et 2) et 12 h (lignes 3 et 4) après dix injections de cocaïne par rapport au contrôle.

Ces résultats de mobilité électrophorétique confirment les observations immunohistochimiques, à savoir que la protéine Egr-1 est non seulement exprimée 2 et 12 h après une administration unique ou répétée de cocaïne, mais qu'elle est en plus douée d'une activité de liaison à l'ADN, ce qui est le propre des facteurs de transcription.

4. Cinétique d'expression des protéines Egr-2 et Egr-3 après l'administration unique ou répétée de cocaïne

Nous avons examiné également la cinétique d'expression d'autres membres de la famille Egr, les protéines Egr-2 et Egr-3 dans les mêmes protocoles d'injection. Des coupes de cerveau de rat adjacentes à celles ayant servies à l'hybridation *in situ* et à l'étude immunohistochimique d'Egr-1 ont été utilisées. Aucune immunoréactivité Egr-2 et Egr-3 n'a été détectée en absence des anticorps primaires (figure 57 D2).

Nous n'avons détecté aucune immunoréactivité significative d'Egr-2 dans l'ensemble des coupes frontales dans les conditions basales. L'expression d'Egr-2 n'est induite, ni par un traitement aigu, ni par un traitement chronique de cocaïne (figure 57C).

Par contre, on peut observer une induction d'Egr-3 dans le CPU 45 min après une injection de cocaïne. Le nombre de cellules Egr-3 positives augmente aussi 12 h après une administration unique de cocaïne par rapport au traitement contrôle. Des injections répétées de cocaïne induisent l'expression d'Egr-3 45 min et 8 h après la dernière injection (figure 57B). Pourtant les cellules exprimant Egr-3 en réponse à la cocaïne semblent moins nombreuses que celles exprimant Egr-1. Il est toutefois difficile de quantifier ces changements car il apparaît que l'expression d'Egr-3 fluctue selon le rythme circadien ; on remarque en effet des fluctuations importantes suite à une administration de solution saline (figure 57B).

Nous avons toutefois estimé le nombre de cellules exprimant Egr-3 dans les différents protocoles décrits. La figure 60 présente ces résultats, exprimés comme la différence de marquage entre le traitement et l'expérience contrôle.

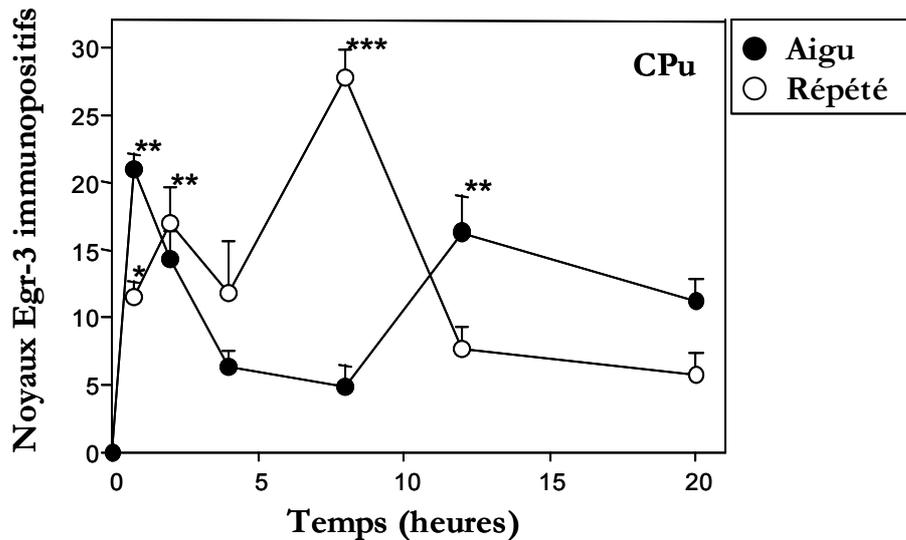


Figure 60 : Cinétique d'expression de la protéine Egr-3 suite à une administration unique ou répétée de cocaïne

Les rats ont été traités par des injections uniques ou répétées comme indiqué dans la légende de la figure 57.

L'expérience d'immunohistochimie a été réalisée comme décrit dans le paragraphe C.3. de Matériel et Méthodes avec l'anticorps polyclonal anti-Egr-3. Les noyaux ont été marqués avec le colorant Hoescht 33258.

Pourcentage de noyaux immunoréactifs dans le CPU, calculé sur au moins 450 cellules, et exprimé comme la différence entre les valeurs des animaux traités moins celles des animaux contrôles (moyenne \pm erreur-type, n=3 rats). Les rats ont reçu une seule ou dix injections de cocaïne (20 mg/kg, 1 injection par jour pendant 10 jours). Pour le traitement répété, le temps indiqué correspond au temps après la dernière injection. *P<0,05, **P<0,01 et ***P<0,001, compare l'effet de la cocaïne au traitement contrôle correspondant.

On constate que l'expression nucléaire d'Egr-3 est induite dans le CPU 45 min, mais aussi 12 h après une injection unique de cocaïne. L'administration répétée de cocaïne conduit à l'expression du facteur Egr-3 à des temps courts (45 min et 2 h), mais aussi à un temps plus long (8 h) après la dernière injection.

Il apparaît qu'Egr-3 présente, comme Egr-1, un profil d'expression nucléaire biphasique après l'administration unique ou répétée de cocaïne ; le pattern d'expression n'est pourtant pas identique.

5. Cinétique d'expression des messagers des co-répresseurs *NAB1* et *NAB2* après l'administration unique ou répétée de cocaïne

Pour compléter le tableau de la régulation des gènes de la famille Egr, nous avons examiné la cinétique d'expression des messagers *NAB1* et *NAB2*, des co-répresseurs

transcriptionnels des facteurs de transcription de la famille Egr. Des coupes de cerveau de rats adjacentes à celles ayant servies précédemment ont été utilisées.

L'expérience d'hybridation *in situ*, représentée dans la figure 55B, montre que les ARNm *NAB1* ne sont pas détectables dans les conditions contrôles dans les structures du cerveau antérieur. La cocaïne n'induit pas davantage la transcription du gène *NAB1*.

Par contre, l'expression des ARNm *NAB2* est induite dans le striatum, le cortex frontal et les tubercules olfactifs à la fois par le traitement aigu et par le traitement répété de cocaïne (figure 55C). Dans les conditions basales, l'expression du co-répresseur *NAB2* semble être quelque peu supérieure à celle observée pour *egr-1* lui-même, surtout dans le cortex piriforme.

La figure 61 présente l'analyse densitométrique et statistique de l'expression des messagers *NAB2* dans le shell du NAc, la partie dorsale du CPU et le CgCx. Dans les trois structures examinées, un pic de synthèse des ARNm *NAB2* est observé entre 45 et 120 min après l'injection aiguë de cocaïne. Ce pic décroît rapidement pour revenir à une expression basale après environ 4 h. Cette expression est similaire à celle d'*egr-1*. On peut observer un deuxième pic d'expression de *NAB2* 12 h après l'injection unique de cocaïne.

La transcription de *NAB2* est aussi régulée de façon différente de celle d'*egr-1* après dix injections de cocaïne. En effet, la synthèse des messagers *NAB2* présente un profil d'expression biphasique, avec un premier pic de synthèse entre 45 et 240 min et un deuxième pic 12 h après la dernière des dix injections. Ce pattern d'expression est observé dans les trois structures examinées.

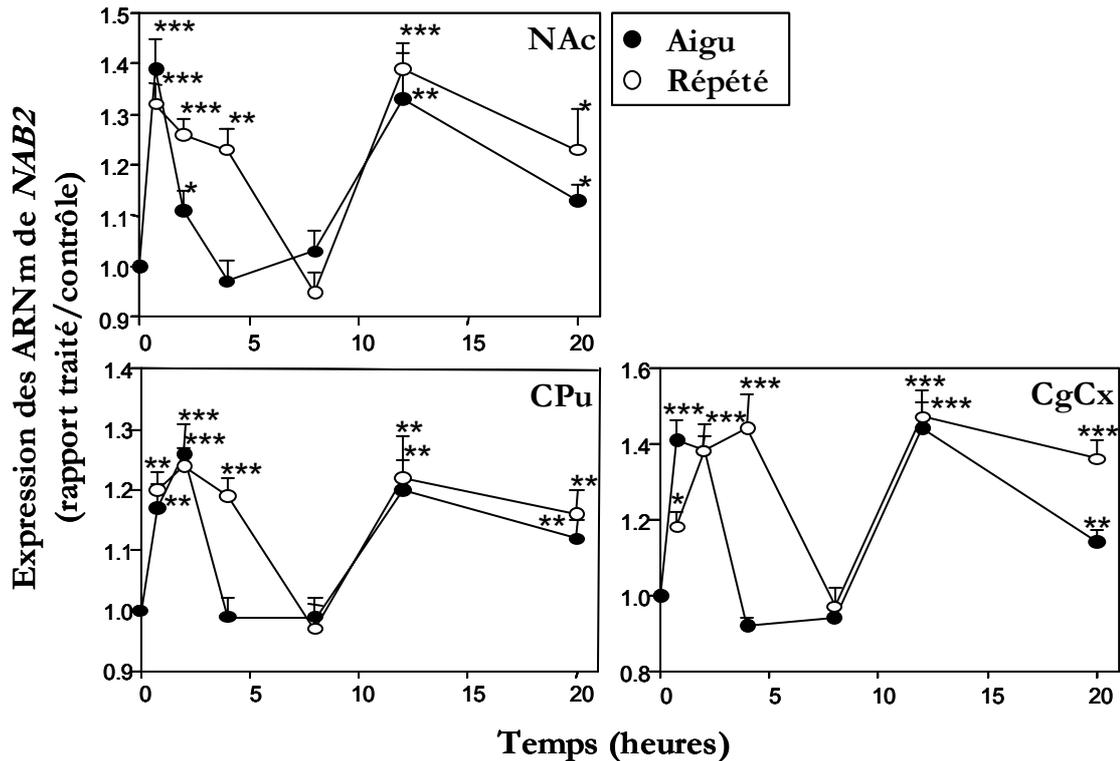


Figure 61 : Cinétique de l'expression du gène *NAB2* suite à une administration aiguë ou répétée de cocaïne.

Les rats ont été traités, soit par une injection unique de cocaïne (20 mg/kg) ou de solution saline, et sacrifiés à différents temps, soit par dix injections (1 injection par jour pendant 10 jours) de la même dose de cocaïne ou de solution saline, et sacrifiés à différents temps après la dernière injection. L'analyse densitométrique a été réalisée à partir des films autoradiographiques obtenus après hybridation in situ.

Les résultats sont exprimés comme le rapport de l'expression de *NAB2* induite par la cocaïne sur celle obtenue après le traitement contrôle.

Chaque point représente la moyenne \pm écart-type obtenue à partir de 4 coupes adjacentes de 3 animaux. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ et *** $P < 0,001$, compare l'effet de la cocaïne au traitement contrôle correspondant.

En résumé, le profil d'expression des messagers *NAB2* est très similaire à celui de la protéine *Egr-1*, et diffère de celui du messenger *egr-1*. On peut constater ce phénomène aussi bien à la suite d'un traitement aigu qu'après un traitement chronique de cocaïne.

En conclusion, nos résultats montrent que les gènes *egr-1* et *egr-3* d'une part, et *NAB2* d'autre part, sont les éléments-clé de leur famille respective. C'est la combinaison de ces trois facteurs qui concourt à réguler l'expression des gènes cibles d'*egr* dans les structures dopaminergiques cérébrales. Ces gènes sont des candidats probables pour participer à la mise en place des adaptations à long-terme en réponse à l'administration répétée de cocaïne.

DISCUSSION

L'essentiel de ce travail a consisté à caractériser l'expression du gène à réponse précoce *egr-1* en réponse à l'administration de cocaïne. Notre approche présente plusieurs avantages ; tout d'abord, l'induction d'un tel gène permet de cartographier les structures activées par les psychostimulants; en effet, l'expression d'*egr-1* reflète l'activité synaptique (Worley *et al.*, 1991). D'autre part, en tant que facteur de transcription, il joue un rôle d'intermédiaire entre une stimulation brève de la cellule et son adaptation à long terme en réponse à la cocaïne, ce qui suggère qu'il pourrait être impliqué dans l'ensemble des effets à long terme causés par ce stimulant, dont la mise en place de la dépendance à la cocaïne.

L'expression d'*egr-1* en réponse à l'administration unique de cocaïne a été l'objet de nombreuses études, dont certaines ont été réalisées au laboratoire. En effet, une seule injection de cocaïne induit de façon rapide et transitoire, la synthèse des messagers *egr-1* dans un ensemble de neurones du cerveau antérieur (Hope *et al.*, 1992; Bhat et Baraban, 1993; Daunais et McGinty, 1996; Humblot *et al.*, 1998; Thiriet *et al.*, 1998). Cette induction prend place dans les aires innervées par des projections dopaminergiques : noyau accumbens, noyau caudé-putamen, cortex pré-frontal et tubercules olfactifs. Dans le striatum, le gène *egr-1* est induit dans les neurones épineux de taille moyenne par un mécanisme incluant la stimulation du récepteur dopaminergique D1 (Cole *et al.*, 1992). En effet, cette transcription passe par l'activation de la PKA, via la stimulation du récepteur D1, qui phosphoryle probablement le résidu sérine 133 du facteur de transcription constitutif CREB, se liant au site régulateur CRE présent dans le promoteur d'*egr-1* (Sakamoto *et al.*, 1994). Chez des souris dont le gène codant le récepteur D1 a été invalidé, la cocaïne, même à forte dose, ne peut induire l'expression d'*egr-1* (Drago *et al.*, 1996).

D'autres psychostimulants sont connus pour induire *egr-1* dans ces mêmes structures cibles des projections dopaminergiques. Ce sont essentiellement, les amphétamines substituées, dont la D-amphétamine, la méthamphétamine ou le MDMA (Wang et McGinty, 1996 ; Rodriguez et Gonzalez-Hernandez, 1999; Shirayama *et al.*, 2000; Thiriet *et al.*, 2001; Mao et Wang, 2002). Dans le striatum, cette transcription passe aussi par l'activation des récepteurs D1. La caféine, qui est un psychostimulant, induit également la synthèse d'*egr-1* dans le striatum (Svenningsson *et al.*, 1997). De même, une injection de cocaéthylène, un métabolite actif de la cocaïne produit lors de la consommation concomitante de cocaïne et d'alcool, induit la synthèse d'*egr-1* (Thiriet *et al.*, 2000).

A. Interactions dopamine-glutamate-GABA

Dans la première partie de cette étude, nous nous sommes intéressés aux interactions entre différentes neurotransmissions impliquées dans l'induction de l'expression du gène *egr-1* en réponse à la cocaïne. On sait que la cocaïne induit la synthèse d'*egr-1* en augmentant le taux de DA extracellulaire. Mais cette induction prend place dans des structures où interviennent à l'évidence d'autres neurotransmissions. En utilisant des anesthésiques, nous avons postulé l'intervention des systèmes glutamatergique et GABAergique dans la mise en place et la régulation de cette expression génique.

1. Glutamate et gènes à réponse précoce

Nous avons montré par hybridation *in situ* que la kétamine n'induisait pas l'expression d'*egr-1* dans le cerveau antérieur de rat. Ce résultat est en accord avec des observations décrites dans la littérature. Celles-ci ont montré que la kétamine, antagoniste des récepteurs NMDA, est sans effet, voire supprime l'expression des gènes à réponse précoce (Nakao *et al.*, 1993; Torres et Rivier, 1993; Huang et Simpson, 1999). Néanmoins, une étude récente décrit une induction de la protéine c-Fos par la kétamine dans le cerveau de souris, mais cette induction implique les récepteurs sigma en plus des récepteurs NMDA (Nakao *et al.*, 2002).

On peut noter que l'injection de kétamine ne réduit pas la transcription basale d'*egr-1* dans les couches IV et VI du cortex cérébral. Comme nous l'avons décrit dans le paragraphe C.3.1. des Données Bibliographiques, ce sont les couches corticales étroitement reliées au thalamus, le principal centre nerveux impliqué dans la réception des informations sensorielles (Ebner et Armstrong-James, 1990). Il est intéressant de remarquer que l'anesthésie induite par la kétamine (ou le propofol) ne semble pas réguler les afférences et efférences cortico-thalamiques, puisque l'expression basale d'*egr-1* n'est pas modifiée. Cette observation suggère que ces anesthésiques ne suppriment pas l'activité neuronale dans ces couches corticales.

La stimulation de chacun des sous-types de récepteurs glutamatergiques induit l'expression d'*egr-1*. Par exemple, l'injection de NMDA *in vivo* augmente de façon dose-dépendante le taux de protéine Egr-1 dans le cortex cérébral, l'hippocampe (neurones pyramidaux de l'aire CA3 et gyrus denté), le cervelet et les tubercules olfactifs, mais cette induction du récepteur NMDA nécessite l'implication du récepteur AMPA (Vaccarino *et*

al., 1992). L'activation de ces récepteurs provoque l'expression des gènes précoces dans les neurones corticaux, via l'influx de calcium et l'activation de la voie des MAP kinases (Xia *et al.*, 1996). Dans des neurones corticaux en culture, le kainate induit la synthèse des messagers *egr-1*, par l'activation du canal Ca^{2+} de type L (Murphy *et al.*, 1991). *In vivo*, le kainate induit l'expression de la protéine Egr-1 dans l'hippocampe, le striatum, le néocortex et dans des zones associées au système limbique, comme dans le cortex cingulaire et l'amygdale (Gass *et al.*, 1993).

2. Propofol, gènes précoces et dopamine

Nous avons également montré par hybridation *in situ* que le propofol n'induisait pas l'expression d'*egr-1* dans le cerveau antérieur de rat, même à de fortes doses. Très peu de données sont disponibles quant à l'action du propofol sur l'expression des gènes à réponse précoce dans le cerveau. Toutefois, une étude récente a montré que le propofol induisait transitoirement l'expression de *c-fos*, mais pas de *junB*, dans le cerveau de rat (Hamaya *et al.*, 2000).

On sait que l'expression des gènes précoces est induite par l'activation du système dopaminergique. Mais on trouve, dans la littérature, de nombreuses études contradictoires concernant l'action du propofol sur le système dopaminergique. Notons que certains patients anesthésiés avec ce composé décrivent l'effet du propofol comme plaisant, et que le propofol est décrit parfois comme une substance potentiellement addictive (Zacny *et al.*, 1993a), ce qui suggère qu'il pourrait augmenter la neurotransmission dopaminergique. Dans la même idée, Shyr *et al.* ont montré que le propofol à une dose anesthésique augmentait le taux de DA (et de 5-HT) extracellulaire dans le cortex somatosensoriel de rats (Shyr *et al.*, 1997). Récemment, les mêmes observations ont été réalisées dans le NAc. A une dose sub-anesthésique (60 mg/kg) aussi bien qu'anesthésique (100 mg/kg), le propofol augmente le taux de dopamine extracellulaire, mais, ce taux est réduit après l'administration d'une dose faible (9 mg/kg), suggérant que le mode d'action du propofol est complexe (Pain *et al.*, 2002). De plus, Keita *et al.* ont suggéré que le propofol pouvait inhiber la re-capture de DA en bloquant le DAT, et augmentait ainsi le taux de DA extracellulaire (Keita *et al.*, 1996).

A l'opposé, d'autres études ont montré que le propofol réduisait le niveau de DA extracellulaire. Ainsi, une étude de voltamétrie montre que le propofol réduit la libération stimulée de dopamine dans le NAc (Schulte *et al.*, 2000). De plus, les propriétés

neuroprotectives du propofol pourraient être attribuées à son action sur l'inhibition de la libération de dopamine (Wang *et al.*, 2002).

3. Modulation par un antagoniste des récepteurs glutamatergiques de l'expression d'egr-1 induite par la cocaïne

Dans cette étude, nous avons montré que la kétamine était capable de réduire de façon dose-dépendante l'expression des messagers *egr-1* induite par la cocaïne. Il est tentant d'attribuer l'effet de la kétamine à son action antagoniste sur les récepteurs NMDA. D'ailleurs, d'autres antagonistes de ces récepteurs ont été décrits comme inhibant l'expression des gènes à réponse précoce induite par la cocaïne (Torres et Rivier, 1993). Gass *et al.* ont montré qu'une injection de MK-801, un antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA, abolit l'expression constitutive d'*egr-1* dans des neurones néocorticaux (Gass *et al.*, 1993). Les agents glutamatergiques peuvent donc réguler l'expression des gènes précoces dans le striatum. Cet effet peut provenir des projections glutamatergiques du PFCx qui régulent positivement l'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Karreman et Moghaddam, 1996). Ainsi, l'inhibition de l'activité des neurones glutamatergiques, par un antagoniste des récepteurs NMDA tel que la kétamine, réduirait celle des neurones dopaminergiques, provoquant une baisse de la libération de dopamine au niveau des champs de projection, et en conséquence une baisse de l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne. Au niveau du NAc, des projections glutamatergiques provenant de l'hippocampe et de l'amygdale peuvent contribuer à cet effet (Yim et Mogenson, 1982; Yang et Mogenson, 1984).

4. Modulation par le propofol de l'expression d'egr-1 induite par la cocaïne

Dans notre étude, la kétamine et le propofol provoquent des résultats très similaires, en l'occurrence, une réduction de l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne. Puisque la kétamine est bien caractérisée comme étant un antagoniste NMDA, il est tentant de proposer un rôle analogue pour le propofol. Effectivement, une activité anti-NMDA du propofol a été décrite (Yamakura *et al.*, 1995). Cependant, le propofol a été décrit comme possédant d'autres cibles, notamment le récepteur GABA-A. De faibles concentrations de propofol augmentent les courants chlorures des récepteurs GABA-A. De très fortes concentrations de propofol activent le récepteur GABA-A, même en

l'absence du ligand GABA (Sanna *et al.*, 1995). Dans cette perspective, notons que l'activation du récepteur GABA-A par le propofol inhibe la libération de Glu dans des tranches corticales, montrant un équilibre subtil entre les neurotransmissions glutamatergique et GABAergique dans le mode d'action des anesthésiques (Buggy *et al.*, 2000). Ce mécanisme expliquerait la baisse de libération de dopamine dans le striatum, et donc la diminution de l'expression des messagers *egr-1* induite par la cocaïne.

Mais, le propofol semble avoir des cibles supplémentaires, en plus des récepteurs NMDA ou GABA-A. Il peut inhiber l'activité de canaux dépendant du voltage, d'une part des canaux calciques de type P/Q (Hirota *et al.*, 2000), mais aussi la majorité des canaux sodiques (Ratnakumari et Hemmings, 1996), contribuant ainsi à ses propriétés anesthésiques, amnésiques et anti-convulsives. Nos résultats pourraient s'expliquer par l'inhibition de canaux ioniques, provoquant une inhibition de la libération de dopamine, et ainsi, réduisant la transcription d'*egr-1* dans les champs de projection dopaminergique.

5. Effet permissif de la dopamine dans le striatum

La neurotransmission glutamatergique basale n'est pas suffisante pour induire la transcription d'*egr-1*, dans le striatum, alors que l'activation de la neurotransmission dopaminergique par la cocaïne induit fortement cette expression. On notera toutefois, que la neurotransmission glutamatergique est nécessaire à l'activation des neurones épineux du striatum, puisque son inhibition par la kétamine abolit la transcription d'*egr-1* induite par la cocaïne. La dopamine joue donc un rôle permissif sur la neurotransmission excitatrice glutamatergique dans le striatum.

Le mécanisme par lequel la dopamine exerce son action dans le striatum est en partie élucidé, grâce à des expériences d'électrophysiologie. La DA peut soit augmenter (Cepeda *et al.*, 1993), soit diminuer (Calabresi *et al.*, 1987; Cepeda *et al.*, 1993) l'excitabilité des neurones épineux GABAergiques évoquée par le Glu. L'effet de la DA sur l'excitabilité des neurones épineux de taille moyenne est dépendant de leur potentiel de membrane (Wilson, 1993). Ainsi, les agonistes des récepteurs D1 et D2 ont un rôle inhibiteur sur les neurones épineux quand ceux-ci sont hyperpolarisés; cet effet inhibiteur est probablement dû à la régulation de diverses conductances ioniques, soit par l'inhibition des conductances Ca^{2+} et/ou Na^+ , soit l'activation d'une conductance K^+ . Par contre, les agonistes D1 ont un effet excitateur quand les neurones épineux GABAergiques sont dépolarisés, après activation, soit du récepteur NMDA lui-même,

Ces mécanismes assurent la potentialisation, par la DA, des réponses glutamatergiques provenant du cortex pré-frontal et de l'hippocampe. Ils représentent, au niveau moléculaire, le rôle permissif mais essentiel de la DA sur l'activation de la transcription d'*egr-1* dans les neurones épineux GABAergiques du striatum.

B. Modulation de l'activité des neurones dopaminergiques par l'activation de la voie du GMPc

1. Action du CNP

Le CNP est le principal peptide natriurétique biologiquement actif dans le SNC. Son précurseur est fortement exprimé dans le cerveau, notamment au niveau du mésencéphale (Langub *et al.*, 1995b).

1.1. Modulation différentielle de l'expression d'*egr-1* par le CNP

Nous avons montré que le CNP injecté, soit par voie i.c.v., soit directement dans les structures dopaminergiques, réduisait la transcription d'*egr-1* induite par la cocaïne dans le NAc et le CPu. Par contre, à forte dose, il induit de lui-même la synthèse des messagers *egr-1* dans le CgCx. Dans cette structure, la transcription fait appel à l'évidence à un mécanisme différent de celui observé dans le striatum. Le CNP possède des propriétés anxiolytiques à faibles doses et anxiogènes à fortes doses (Biro *et al.*, 1996; Montkowski *et al.*, 1998). Puisque d'autres composés anxiogènes, comme la picrotoxine ou le pentylénetétrazol, sont connus pour stimuler la libération de DA dans le CgCx, mais pas dans le NAc (Bassareo *et al.*, 1996), le CNP pourrait de la même manière stimuler la libération de DA dans le CgCx, qui serait responsable de la transcription d'*egr-1* observée. Une autre explication réside dans le fait que la DA est re-capturée non seulement par les terminaisons dopaminergiques, mais aussi par les neurones noradrénergiques du CgCx. Or, cette dernière région reçoit une importante innervation noradrénergique (Tanda *et al.*, 1997). Une action du CNP sur les mécanismes de re-capture dans les terminaisons noradrénergiques ne peut être exclue. Celle-ci permettrait d'expliquer les effets du CNP dans le CgCx, différents de ceux observés dans le striatum.

On peut également envisager une induction directe par le CNP de la transcription d'*egr-1* dans le CgCx lors de son administration i.c.v. En effet, une étude au laboratoire a montré un tel effet du CNP, par l'activation de la transduction du GMPc, dans des cellules PC12 et C6 en culture (Thiriet *et al.*, 1997). Une étude précédente du laboratoire, avait montré que la stimulation de cellules PC12 par le NO activait la PKG et induisait la transcription des gènes à réponse précoce, les gènes *c-fos* et *junB*, ainsi que l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN du facteur AP1 (Haby *et al.*, 1994). Cette activation de la

transcription implique le GMPc et la stimulation de la PKG. Les sites SRE et TRE sont impliqués dans la stimulation de la transcription par la PKG (Pilz *et al.*, 1995; Gudi *et al.*, 1996). Lors d'une administration intra-striatale de CNP, la synthèse des messagers *egr-1* observée pour une forte dose, pourrait résulter d'une modulation indirecte du CgCx par la voie de rétro-contrôle striato-thalamo-corticale.

1.2. Le CNP module l'activité des neurones dopaminergiques mésolimbiques

Dans le striatum, le CNP n'a pas d'effet direct sur la synthèse du messager *egr-1*, mais il inhibe celle induite par la cocaïne. Nous avons cherché à comprendre par quels mécanismes le CNP agissait.

Par la technique de microdialyse, nous avons mis en évidence que l'administration i.c.v. de CNP inhibait partiellement l'augmentation de DA extracellulaire induite par la cocaïne dans le CPu. Ce résultat est directement corrélé à la diminution de la synthèse des messagers *egr-1* observée par hybridation *in situ*. Puisqu'*egr-1* est transcrit dans les neurones épineux du striatum suite à l'activation du récepteur D1, il est attendu que la diminution de DA extracellulaire causée par le CNP se traduise par la réduction de la transcription d'*egr-1*. De plus, le CNP réduit l'activité locomotrice spontanée induite par la cocaïne. Ce paramètre comportemental est lui aussi directement relié au système dopaminergique mésolimbique (Mogenson et Nielsen, 1983). On peut donc attribuer la réduction de l'activité par le CNP à la diminution de DA extracellulaire observée.

A l'opposé, nous n'avons mesuré aucun effet du CNP sur le taux de DA extracellulaire induit par la D-amphétamine. Ces résultats divergents entre la cocaïne et la D-amphétamine, après administration de CNP, suggèrent que le CNP agit sur des composantes assurant l'exocytose de DA. En effet, la D-amphétamine provoque essentiellement une libération non vésiculaire de dopamine par le transporteur, alors que la cocaïne inhibe la re-capture de DA (Memo *et al.*, 1981). Notre hypothèse repose sur le fait que l'action de la cocaïne nécessite la libération préalable de DA, pour que l'inhibition du transporteur puisse se concrétiser par une concentration de neurotransmetteurs accrue dans la synapse.

Cette hypothèse est confortée par divers résultats qui décrivent un effet des peptides natriurétiques sur la libération de DA. Dans les cellules chromaffines, par exemple, le CNP co-libéré avec les catécholamines régule leur libération par un

mécanisme de rétro-contrôle, impliquant l'activation de la PKG (Rodriguez-Pascual *et al.*, 1996). Dans les cellules PC12, les peptides natriurétiques réduisent la libération des catécholamines induite par le calcium (Kanwal *et al.*, 1997). Plus récemment, une étude du laboratoire, a montré que le nitroprussiate de sodium (SNP) réduisait également l'expression des gènes précoces *egr-1*, *c-fos* et *jun B* induite par la cocaïne dans le striatum (Thiriet *et al.*, 2002). Comme les peptides natriurétiques, le SNP, libérant spontanément du NO, active la voie de transduction du GMPc.

1.3. Mode d'action du CNP

Afin de préciser le site d'action du CNP, nous avons étudié, dans un premier temps, la localisation de son récepteur, la guanylyl cyclase B. En effet, le CNP pourrait exercer son action directement sur les terminaisons dopaminergiques, mais pourrait aussi contrôler indirectement l'activité des neurones dopaminergiques en agissant sur leurs afférences.

Notre étude représente la première à localiser le récepteur du CNP dans le SNC. Il s'avère que cette protéine est présente dans de nombreuses structures cérébrales, notamment dans les neurones dopaminergiques de la VTA et la SN, et aussi au niveau des neurones épineux GABAergiques du striatum. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment concernant la localisation du messenger de la GC-B (Herman *et al.*, 1996). L'injection de CNP directement dans les structures où la GC-B est exprimée provoque un effet inhibiteur sur l'expression d'*egr-1*, tout à fait similaire à celui obtenu suite à une injection i.c.v. du peptide CNP.

L'activation de la GC-B par le CNP provoque une augmentation intracellulaire de GMPc (Données Bibliographiques, Chapitre III paragraphes A et B). Ce dernier possède plusieurs cibles dans la cellule, dont la principale est l'activation de la PKG.

2. Intervention de la PKG dans la modulation des neurones dopaminergiques

2.1. Localisation de la PKG dans les neurones dopaminergiques

Dans cette étude, nous avons en priorité localisé la protéine PKG dans les compartiments sub-cellulaires du striatum. Nous l'avons détectée au niveau des terminaisons synaptiques aussi bien pré- que post-synaptique, et également accolée aux membranes mitochondriales des neurones épineux du striatum. La PKG-I avait été

détectée auparavant dans les neurones épineux du striatum : une localisation cytoplasmique avait été suggérée (Ariano, 1983; Vaandrager *et al.*, 1996). Par contre, aucune donnée bibliographique ne traite de sa localisation synaptique. Elle a également été localisée dans les corps cellulaires des neurones dopaminergiques du mésencéphale (Walaas *et al.*, 1989). Nous avons vérifié qu'une PKG enzymatiquement active était retrouvée dans la fraction membranaire synaptique du striatum. Ces résultats supportent totalement l'hypothèse selon laquelle le CNP inhiberait l'exocytose de DA.

2.2. Inhibition de la libération de dopamine

L'activation de la PKG *in vivo* par le 8-Bromo-GMPc, autant dans la VTA et la SNc que dans le CPu, mime les effets du CNP sur l'expression d'*egr-1* induite par la cocaïne ; c'est-à-dire une réduction de cette induction dans les champs de projection dopaminergiques. La sur-expression de la PKG dans la VTA, la SNc et le CPu confirment ces observations. La sur-expression de la PKG réduit non seulement l'expression d'*egr-1*, mais diminue en plus l'activité locomotrice spontanée, toutes deux induites par la cocaïne. Ces résultats suggèrent fortement l'implication de la PKG dans le mode d'action du CNP.

Comme décrit plus haut, l'expression d'*egr-1* et l'activité locomotrice spontanée sont toutes deux provoquées par l'augmentation de DA dans la synapse, suite à l'inhibition du DAT par la cocaïne. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le CNP, via l'activation de la PKG, inhibe l'exocytose de DA. Diverses études ont d'ores et déjà montré que l'activation de la voie du GMPc/PKG était impliquée dans la baisse de la libération de neurotransmetteurs. Guevara-Guzman *et al.* (1994) ont montré que, *in vivo*, l'augmentation de GMPc due à la stimulation de la GC soluble par le NO, réduisait la libération de DA dans le striatum (Guevara-Guzman *et al.*, 1994). Cette étude a été confirmée en 1995 par Silva *et al.* qui ont montré par une étude de microdialyse *in vivo*, que la micro-injection d'un inhibiteur de la NO synthétase augmentait l'efflux de dopamine dans le striatum (Silva *et al.*, 1995). Mais, il apparaît que le rôle de la voie du GMPc dans la libération de DA striatale est plus complexe. En effet, dans les conditions basales, le NO agirait en augmentant la neurotransmission dopaminergique (West et Galloway, 1996), alors qu'après une activation neuronale (par exemple dans des conditions de stress oxydatif), la stimulation de la voie du NO réduirait la libération de DA (Trabace et Kendrick, 2000). L'explication généralement avancée quant au mécanisme, est que la

stimulation de la PKG entraîne une diminution de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} , qui serait responsable à son tour de l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs. Divers canaux ioniques sont sous le contrôle de la PKG : les canaux calcium de type L et N sont inactivés par phosphorylation (Hell *et al.*, 1993; Hell *et al.*, 1994). La PKG provoque aussi l'ouverture de canaux K^+ , ce qui entraîne l'hyperpolarisation de la membrane et conduit à l'inactivation des canaux calcium sensibles au potentiel (White *et al.*, 1993).

2.3. Modulation indirecte de l'activité des neurones dopaminergiques

Un autre mécanisme peut être envisagé pour expliquer une baisse de la libération de neurotransmetteurs par la PKG. Celle-ci pourrait contrôler l'activité des neurones post-synaptiques GABAergiques et ainsi, réguler indirectement l'activité des neurones dopaminergiques. Il a été suggéré que l'augmentation de NO/GMPc régulaît l'activité des neurones dopaminergiques de façon indirecte, en modulant l'activité des voies mésostriatales (West et Grace, 2000). Ainsi, en augmentant la libération de GABA des neurones épineux de taille moyenne, soit directement (Guevara-Guzman *et al.*, 1994), soit par l'activation d'interneurones cholinergiques (Centonze *et al.*, 2001), la voie du GMPc inhiberait la neurotransmission dopaminergique dans le striatum.

De plus, comme vu précédemment, la phosphorylation de la protéine DARPP-32, stimule les neurones GABAergiques, en inhibant la protéine phosphatase de type 1 (PP1) (figure 63). Notons qu'en plus de la PKA, la DARPP-32 est un substrat de la PKG (T'sou *et al.*, 1993). Chez des souris dont le gène codant DARPP-32 a été invalidé, l'amphétamine n'induit qu'une faible libération de GABA dans le VTA, alors qu'elle est très forte chez les souris témoins (Fienberg *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent un rôle essentiel de cet inhibiteur de PP1 dans la libération de GABA, qui a pour effet de diminuer l'activité des neurones dopaminergiques du mésencéphale. Ainsi, en provoquant la phosphorylation de DARPP-32 par l'activation de la PKG, le CNP ou le NO, pourrait contrôler de manière négative l'activité des neurones dopaminergiques.

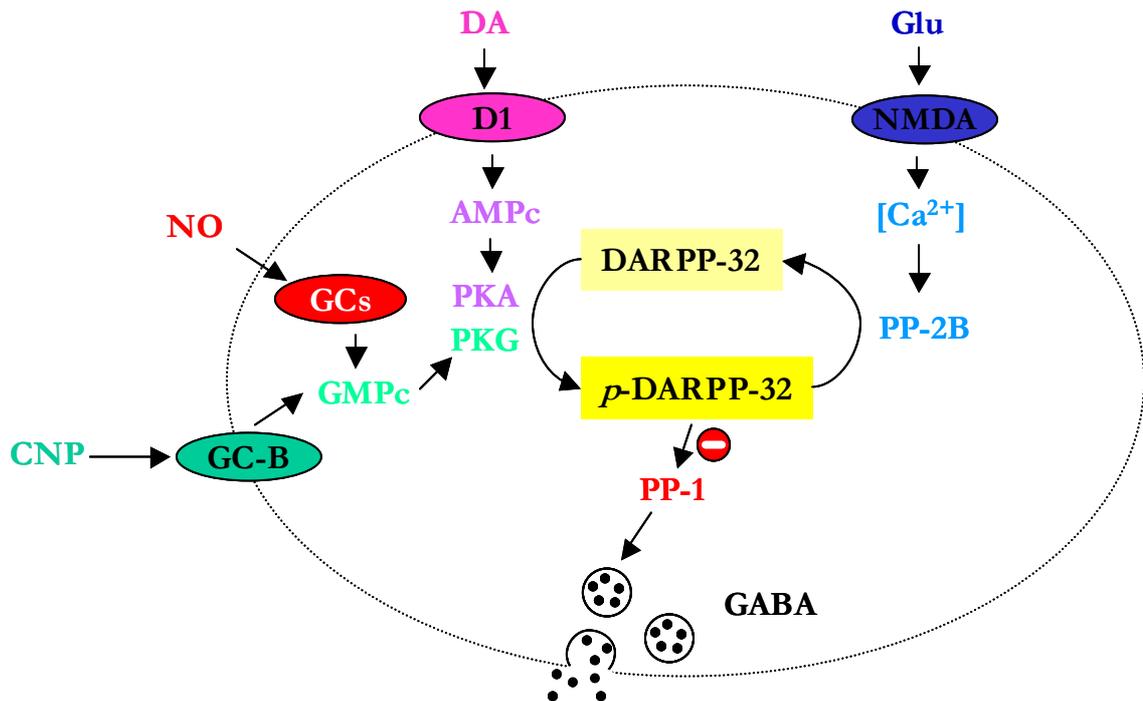


Figure 63 : Régulation de l'activité des neurones épineux GABAergiques du striatum par la phosphoprotéine DARPP-32. D'après Greengard *et al.* (1999), avec modifications.

2.4. Implication du NO dans la régulation des neurones dopaminergiques

Dans cette étude, nous reportons, pour la première fois, la modulation des neurones dopaminergiques par le peptide endogène CNP. Puisque les voies dopaminergiques mésolimbiques sont impliquées dans les processus de renforcement positif et de récompense, on peut raisonnablement postuler que le peptide CNP joue un rôle inhibiteur dans la régulation de ces processus. Il faut considérer que la PKG est activée également par l'augmentation intracellulaire de GMPc produit en réponse à la stimulation de la GCs par le monoxyde d'azote (NO). Ce neurotransmetteur atypique est bien caractérisé comme jouant un rôle fondamental dans certains processus neuronaux.

Vu nos résultats concernant la PKG, il est tout aussi raisonnable de postuler un rôle du NO dans le contrôle de l'activité des voies dopaminergiques mésocorticolimbiques.

A ce sujet, les données bibliographiques actuelles présentent des faits souvent contradictoires. Rappelons que le NO est sans effet sur l'acquisition de l'auto-administration de cocaïne (Orsini *et al.*, 2002), mais il joue sans doute un rôle inhibiteur dans son maintien. Ainsi, l'inhibiteur de la NO synthétase, NG-Nitro-L-Arginine méthyl

ester (L-NAME), prolonge les effets renforçants de la cocaïne au cours des sessions d'auto-administration, ce qui suggère que le NO réduit les effets de la cocaïne (Pudiak et Bozarth, 2002). A l'inverse, deux études récentes présentent un rôle positif du NO sur l'auto-administration de cocaïne. Ainsi, l'injection de L-NAME réduit la recherche de la drogue (Orsini *et al.*, 2002), suggérant que le NO augmente les effets renforçants de la cocaïne. Un autre inhibiteur de la NO synthétase, le 7-nitroindazole (7-NI), produit les mêmes effets (Collins et Kantak, 2002). Mais, il convient de noter que l'auto-administration de drogue fait intervenir des mécanismes cérébraux bien plus complexes que la seule activation des voies dopaminergiques mésolimbiques. De nombreuses études seront sans doute nécessaires en vue de cerner précisément le mode d'action du NO, du CNP ou de la PKG dans ce processus.

3. Perspectives

3.1. Effecteurs de la PKG impliqués dans l'exocytose de dopamine

Nos résultats expérimentaux plaident en faveur de l'intervention de la PKG dans le mode d'action du CNP. Toutefois, il conviendrait de démontrer que le CNP active bien la PKG dans notre modèle. Pour cela, il serait intéressant d'administrer l'inhibiteur de la PKG, le KT5823, avant le CNP, et de mesurer la transcription d'*egr-1* induite par la cocaïne, qui devrait être réduite.

L'hypothèse principale que nous avançons pour expliquer nos résultats concernant la PKG, est l'inhibition de la libération de dopamine par l'activation de la voie du GMPc. Pour conforter cette hypothèse, il serait important dans un premier temps, de mesurer le taux de dopamine extracellulaire dans le striatum de rats, après l'activation de la PKG, par microdialyse ou voltamétrie. Dans un deuxième temps, il conviendrait de rechercher les substrats de la PKG parmi l'ensemble des protéines impliquées dans la machinerie complexe de l'exocytose.

3.2. Action post-synaptique

En considérant l'ensemble de nos résultats, une deuxième hypothèse reste à tester. En effet, l'activation de la voie de transduction du CNP/GMPc/PKG ou NO/GMPc/PKG pourrait moduler indirectement l'activité des neurones dopaminergiques, en régulant leurs afférences. Il conviendrait de préciser si un tel effet

post-synaptique a lieu en recherchant les protéines cibles présentes dans les neurones épineux GABAergiques du striatum. Notons à cet égard que nous avons localisé la PKG dans les densités post-synaptiques. La protéine DARPP-32 est un candidat pour être impliquée dans l'effet modulateur du CNP, mais il conviendrait de caractériser l'ensemble des substrats de la PKG dans ce compartiment.

3.3. Effet du CNP après administration chronique de cocaïne

Enfin, il serait très intéressant de rechercher si l'administration préalable de CNP ou de NO bloque des paramètres comportementaux connus pour être induits par la cocaïne. Il serait intéressant à cet égard de rechercher leurs effets sur l'établissement de la sensibilisation comportementale observée en réponse à la cocaïne. Des expériences d'auto-administration et de préférence de place conduites chez le rat permettraient de déterminer si les propriétés renforçantes de la cocaïne sont perturbées par l'administration de CNP. Les résultats de ces dernières expériences devront être comparés à ceux obtenus en modulant la transmission nitreurgique, par l'injection de donneurs de NO, ou d'inhibiteurs de la NO synthétase neuronale.

C. Expression différentielle des gènes des familles *egr* et *NAB*

Nous avons montré dans cette étude que la cocaïne administrée de façon unique ou répétée à des rats, induisait l'expression du messager et de la protéine *egr-1*, de la protéine Egr-3, ainsi que celle du messager du co-répresseur *NAB2*. Les membres de la famille Egr sont connus pour jouer un rôle important dans les phénomènes de plasticité neuronale. Ils sont donc susceptibles de participer aux adaptations à long terme en réponse à la cocaïne.

1. *egr-1*

1.1. Expression d'*egr-1* après des administration aiguë ou répétée de cocaïne

Comme décrit amplement plus haut, une injection unique de cocaïne augmente de façon rapide et transitoire l'expression des ARNm *egr-1* dans les neurones de rat. Nous avons aussi observé qu'un traitement chronique de cocaïne abolissait cette induction pendant les quelques heures suivant la dernière injection, tandis que l'activité de liaison d'Egr-1 était maintenue 2 h après la dernière injection. Cette étude confirme des résultats qui montraient que les messagers de gènes à réponse précoce, dont *egr-1*, étaient supprimés (Bhat *et al.*, 1992a; Ennulat *et al.*, 1994), ou considérablement réduits (Daunais et McGinty, 1994) pendant les heures suivant la dernière injection du traitement répété de cocaïne. Mais de façon surprenante, nous avons découvert que la transcription d'*egr-1* apparaissait 12 h après la dernière des dix injections. Une augmentation similaire des ARNm *egr-1* est observée dans le NAc, le CPU et le CgCx, suggérant que les différentes voies dopaminergiques sont régulées de façon similaire.

1.2. Expression des autres gènes précoces induite par un traitement chronique de cocaïne

Il apparaît que la régulation du facteur de transcription Egr-1 après une administration répétée de cocaïne diffère de celle d'AP1, un facteur de transcription plus largement étudié. AP1 est un dimère formé d'une protéine Fos et d'une protéine de la famille Jun, assemblées par un motif de dimérisation de type "glissière à leucine" (Sassone-Corsi *et al.*, 1988). Une injection unique de cocaïne induit l'expression très forte

et transitoire des messagers *c-fos*, tandis que l'administration répétée de cocaïne n'induit pas l'expression de *c-fos*, tout en maintenant une activité de liaison d'AP1, pendant plusieurs heures après la dernière des dix injections (Hope *et al.*, 1992; Moratalla *et al.*, 1996a). On sait que le maintien de l'activité de liaison d'AP1 après un traitement chronique de cocaïne résulte de la néo-synthèse d'autres protéines de la famille *fos*, dont deltaFosB (Δ FosB), qui est plus stable que les autres membres de la famille *fos* (Hope *et al.*, 1994). Une étude plus récente utilisant des souris transgéniques chez lesquelles la suppression du gène Δ FosB peut être contrôlée, montre que le facteur Δ FosB augmente la susceptibilité de l'animal aux effets récompensants, ainsi que l'activité locomotrice induites par la cocaïne (Kelz *et al.*, 1999).

1.3. Régulation de l'expression d'*egr-1*

L'expression de la protéine Egr-1 diffère de celle du messenger correspondant. Nous observons une expression cytoplasmique biphasique de la protéine Egr-1, après un traitement aigu ou répété de cocaïne dans les différentes structures examinées, avec deux pics d'expression, 2 h et 12 h après la fin du traitement. Un profil d'expression similaire est observé dans le compartiment nucléaire. Les taux de protéine Egr-1 qui augmentent 12 h après l'injection unique, et 2 h après la dernière des dix injections, ne sont pas précédés d'une synthèse du messenger correspondant. Il est possible que ce phénomène provienne, au moins en partie, de l'inhibition, par le facteur de transcription Egr-1, de sa propre transcription (Cao *et al.*, 1993). Ceci empêcherait la synthèse de messagers *egr-1* pendant ces deux périodes. D'autre part, ces deux pics d'expression de protéines pourraient résulter non pas d'une néo-synthèse, mais de la translocation de la protéine dans le noyau. La translocation nucléaire et/ou l'efficacité de l'activité de liaison à l'ADN sont connues pour être régulées finement par des mécanismes complexes de phosphorylation/déphosphorylation. On sait, par exemple, que l'activité de liaison d'Egr-1 induite par une stimulation cholinergique dans des cellules de neuroblastome requiert l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la MAP kinase ERK (Grimes et Jope, 1999), tandis que l'activité de liaison d'Egr-1 induite par une stimulation sérotoninergique dans des cellules PC12 requiert l'activation de ERK et est potentialisée par la PKG (Esteve *et al.*, 2001).

2. Expression des gènes *NAB*

On sait que la transcription d'*egr-1* est aussi régulée par les protéines *NAB*, qui sont caractérisées comme des co-répresseurs de l'activité transcriptionnelle d'*Egr-1*, par l'intermédiaire de la liaison avec le domaine R1, une région conservée dans les protéines *Egr-1*, *Egr-2* et *Egr-3* (Russo *et al.*, 1995).

2.1. Régulation par la cocaïne

Les messagers *NAB1* n'apparaissent que très faiblement exprimés dans le cerveau antérieur et leur expression n'est pas augmentée dans nos protocoles d'injection de cocaïne. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature qui décrivent l'expression de *NAB1* comme non reliée à l'activation neuronale (Swirnoff *et al.*, 1998). Par contre, la transcription de *NAB2* est induite de façon rapide et transitoire par la cocaïne. Les traitements aigu et répété de cocaïne induisent une expression biphasique des messagers *NAB2* dans les trois structures examinées, avec des pics d'expression apparaissant 2 h et 12 h suivant la fin des traitements. *NAB2* était connu pour être exprimé à de hauts niveaux dans le cerveau et le thymus (Svaren *et al.*, 1996) ; nous montrons ici que *NAB2* est aussi induit par l'activation des neurotransmissions dopaminergique et/ou sérotoninergique dans des cellules post-mitotiques du cerveau de rat. Suite à nos études, il convient de considérer *NAB2* comme un important régulateur inductible de l'expression génique dans le cerveau. Son rôle n'apparaît en aucun cas limité à une intervention dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Notons que l'expression de *NAB2* est rapidement induite dans le protocole d'administration répétée de cocaïne. Ce résultat diffère sensiblement de ceux observés pour d'autres gènes à réponse précoce, qui présentent souvent une expression réduite suite à un traitement chronique de cocaïne.

2.2. Rôles des gènes *NAB*

On a proposé pour les protéines *NAB* un rôle de contrôle négatif des facteurs de transcription *Egr* (Svaren *et al.*, 1996; Mechta-Grigoriou *et al.*, 2000). D'autre part, les protéines *Egr* augmentent l'expression des gènes *NAB1* et *NAB2*, régulant ainsi leur propre activité (Mechta-Grigoriou *et al.*, 2000). La situation est plus complexe, puisqu'il est apparu que *NAB2* agissait comme un co-activateur transcriptionnel, et non comme un répresseur (Sevetson *et al.*, 2000).

Il faut noter que l'expression du messenger *NAB2* est élevée durant les périodes où nous observons l'induction de la protéine Egr-1; en effet, la cinétique d'expression des ARNm *NAB2* présente un profil très similaire à celui de la protéine Egr-1. De telles cinétiques d'expression avaient déjà été décrites dans des études précédentes. Les auteurs avaient conclu que *NAB2* représentait un élément négatif de la régulation des facteurs de transcription Egr (Svaren *et al.*, 1996; Mechta-Grigoriou *et al.*, 2000).

L'induction de l'expression du messenger *egr-1* n'est observée, ni 12 h après une injection unique de cocaïne, ni 2 h après la dernière des dix injections, alors que le messenger *NAB2* l'est. Dans ce cas, il paraît très difficile d'attribuer la régulation de la transcription d'*egr-1* à la seule répression de NAB2, suite à la formation de complexes Egr-1-NAB2, qui supprimeraient l'inhibition exercée par Egr-1 sur sa propre transcription.

3. Expression d'*egr-2* et *egr-3*

Nous avons recherché les régulations d'autres membres de la famille Egr dans les protocoles d'administrations aiguë et répétée de cocaïne.

3.1. Aucune induction d'Egr-2 par la cocaïne

Nous montrons dans cette étude qu'Egr-2 présente une expression basale très faible. Celle-ci n'est induite dans aucun de nos protocoles d'injection de cocaïne. Ces observations sont en accord avec une étude montrant que l'expression d'Egr-2 est localisée uniquement dans le cortex cérébral de rongeurs, dans les conditions basales (Herdegen et Leah, 1998). De plus, le gène *egr-2* n'est pas induit dans le cerveau antérieur de rat mature par des stimulations téaniques, un modèle de stimulation neuronale qui entraîne la synthèse d'un grand nombre de messagers de gènes à réponse précoces (Mack *et al.*, 1992). Par contre, *egr-2* est connu pour exercer un rôle important dans le développement du système nerveux, tel que le contrôle de la myélinisation et la formation du cerveau postérieur (Topilko *et al.*, 1994).

3.2. Induction de l'expression d'Egr-3

Nous avons montré que l'expression de la protéine Egr-3 fluctuait selon le rythme circadien, dans le striatum et le cortex des rats contrôles. Un rôle d'Egr-3 a été suggéré

dans le contrôle de l'horloge biologique, qui sous-tend les rythmes comportementaux. En effet, *egr-3* est un des gènes spécifiquement induit par la lumière dans les noyaux suprachiasmatiques (Morris *et al.*, 1998). Les messagers *egr-3* sont aussi induits dans l'hippocampe, par l'activation de récepteurs NMDA, et dans le striatum par des substances qui altèrent la neurotransmission dopaminergique (Yamagata *et al.*, 1994). Une étude portant sur les messagers *egr-1* et *egr-3* a montré qu'ils étaient co-localisés dans des neurones corticaux aussi bien à l'état basal qu'après stimulation. Cependant, nous rapportons ici que Egr-3 est exprimé dans beaucoup moins de neurones qu'Egr-1 en réponse à une injection unique de cocaïne. A ceci s'ajoute le fait que les deux protéines présentent un profil d'expression différent dans le CPU, puisque suite aux injections répétées de cocaïne, le deuxième pic d'expression d'Egr-3 apparaît plus précocement que celui observé pour Egr-1.

L'ensemble de nos résultats indique que la régulation des protéines Egr est différente de celle du facteur de transcription AP1. Il est clair que les protéines Egr-1 et Egr-3 sont toutes deux induites dans les deux protocoles d'injection de cocaïne. En aucun cas, Egr-1 n'est remplacé, ni par Egr-2, ni par Egr-3, suite au traitement chronique de cocaïne, comme cela a été montré pour les protéines de la famille Fos.

4. Conclusion et perspectives

Les gènes *egr-1*, *egr-3* et *NAB2*, induits après les traitements de cocaïne, apparaissent comme les gènes majeurs de leur famille respective, pouvant être impliqués dans les adaptations à long-terme, qui se mettent en place après une administration répétée de cocaïne.

Au vu de nos résultats, il semble intéressant de caractériser les gènes cibles transcrits par le facteur de transcription Egr-1 néo-synthétisé, suite à l'administration de cocaïne. En effet, pour préciser le rôle d'Egr-1, suite à l'administration répétée de cocaïne, il est crucial de caractériser les gènes qui sont sous son contrôle.

Dans notre équipe, nous recherchons actuellement un ensemble de gènes dont l'expression est modulée par la cocaïne 12 h après son injection. A ce jour, plus d'une cinquantaine de gènes ont été identifiés. Certains de ces gènes codent des protéines impliquées dans la croissance neuritique, par exemple la "synaptobrevin-like protein 1" (Syb1), d'autres codent des protéines impliquées dans la synthèse des constituants membranaires, comme la sérine palmitoyl transférase ou la céramide glycosyltransférase,

enfin, d'autres codent des protéines impliquées dans l'exocytose, comme la synapsine. Ces gènes sont des candidats pour intervenir dans les changements phénotypiques des neurones sous-tendant la mise en place de plasticité synaptique observée après la prise de drogues. Il serait intéressant de déterminer lesquels parmi ces gènes sont sous le contrôle du facteur de transcription Egr-1. En effet, en bloquant la synthèse d'*egr-1* dans une structure donnée, on pourra caractériser si un gène donné est effectivement contrôlé par Egr-1.

DISCUSSION GÉNÉRALE

A. *egr-1* et plasticité synaptique

Les changements comportementaux induits par les psychostimulants seraient liés à une plasticité synaptique au sein des circuits de neurones activés par ces stimulants. On entend par plasticité l'ensemble des processus conduisant à un renforcement des connexions synaptiques, soit par l'établissement de nouvelles connexions, soit par des adaptations de l'efficacité d'une synapse pré-existante (Davis et Gillette, 1978). En accord avec cette hypothèse, des changements morphologiques ont été décrits au niveau des synapses (augmentation du nombre et de la longueur des épines dendritiques) dans les neurones épineux du NAc et les neurones du PFCx en réponse à la cocaïne et à l'amphétamine (Robinson et Kolb, 1999). Ce résultat montre donc une adaptation à long terme des connexions synaptiques.

Le protocole d'administration chronique de cocaïne, que nous avons utilisé dans cette étude, constitue un modèle expérimental pour approcher les événements qui ont lieu lors de la mise en place de la dépendance à la cocaïne. Nous avons montré qu'*egr-1* était induit en réponse à un tel traitement. Mais, de nombreux autres gènes, induits par la prise de psychostimulants, sont susceptibles d'être impliqués dans les changements phénotypiques des neurones (paragraphe B). Alors, pourquoi avoir restreint cette étude au seul gène *egr-1* ? La justification d'un tel choix est basée sur le rôle déterminant d'*egr* dans les phénomènes de plasticité synaptique. Comme décrit précédemment, le gène *egr-1* est un des rares gènes précoces associé au phénomène de potentialisation à long terme (LTP) (Worley *et al.*, 1993). La LTP est une consolidation de l'efficacité synaptique, qui dépend de l'activité neuronale, et qui semble impliquée dans le stockage des traces mnésiques dans le cerveau (Bliss et Lomo, 1973; Bliss et Collingridge, 1993). Le processus de mémorisation nécessite la synthèse de protéines *de novo* (Rosenblum *et al.*, 1993) (figure 64).

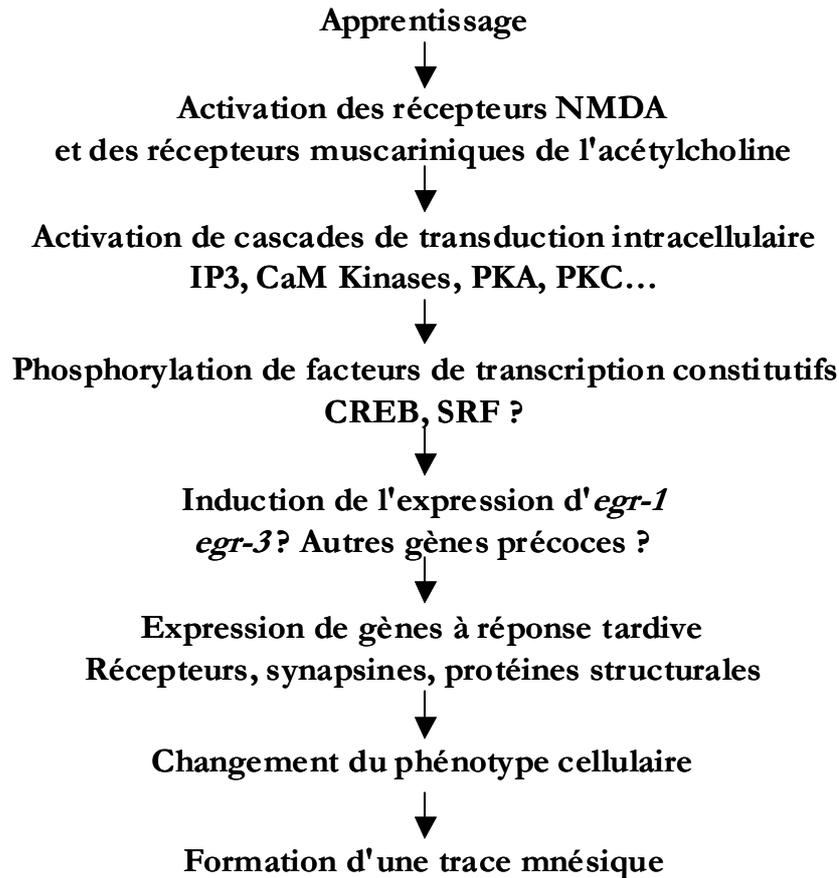


Figure 64 : Schéma résumant les étapes impliquées dans la formation de la mémoire à long terme dans l'hippocampe. D'après Walton *et al.* (1999).

Les nouvelles protéines sont produites soit dans les corps cellulaires et dirigées vers les synapses, soit directement dans la terminaison grâce à une traduction locale (Steward, 1997). Chez des rats, l'expression d'*egr-1* est augmentée entre dix minutes et deux heures suite à une stimulation induisant la LTP dans le gyrus denté et le cortex cérébral, ce qui n'est pas le cas du gène *c-fos* par exemple (Cole *et al.*, 1989; Jones *et al.*, 1999). Sa cinétique d'expression suggère qu'il est impliqué dans les étapes précoces de la LTP (Abraham *et al.*, 1991; Abraham *et al.*, 1993). Des études plus récentes ont montré que le messager *egr-1* était transcrit dans l'hippocampe chez un rat exposé à un nouvel environnement (Hall *et al.*, 2000), et également dans le cortex temporal d'un singe lors d'un apprentissage associatif (Miyashita *et al.*, 1998). De plus, Jones *et al.* ont démontré le rôle essentiel d'*egr-1* dans la transition entre les phases précoce et tardive de la LTP, et aussi dans l'acquisition de la mémoire à long terme (Jones *et al.*, 2001).

Ces propriétés font du gène *egr-1* le gène précoce par excellence illustrant parfaitement ce rôle de "commutateur moléculaire" entre la neurotransmission et l'installation de la trace mnésique.

B. Cocaïne, gènes et dépendance

Au cours de cette étude, nous montrons une expression complexe et originale du facteur de transcription Egr-1 en réponse au traitement unique ou chronique de cocaïne. De plus, nous avons étudié l'expression du facteur de transcription Egr-3 et celle d'un co-répresseur, le gène *NAB2*, durant les mêmes protocoles d'administration de cocaïne. Etant donné que ces gènes sont exprimés de manière différentielle durant ces traitements, ils sont susceptibles d'intervenir dans les phénomènes de mise en place de la dépendance aux drogues. Il est clair, d'autre part, que les événements cellulaires sous-tendant la dépendance aux drogues, ne peuvent se résumer à l'implication de ces seuls gènes. En effet, de nombreux autres gènes sont induits suite à l'administration de cocaïne et peuvent eux aussi, contribuer aux changements phénotypiques ayant lieu dans le cerveau, suite à la prise de psychostimulants. Certains de ces gènes codent des facteurs de transcription, d'autres des enzymes, des protéines du cytosquelette ou encore des peptides biologiquement actifs. Dans les paragraphes qui suivent, sont décrits quelques gènes dont l'importance dans la mise en place de la dépendance nous paraît cruciale. Nous avons décrit précédemment (Discussion C.1.2.), l'expression du facteur de transcription AP1, dont la constitution, varie entre l'administration unique et répétée de cocaïne (Hope *et al.*, 1992; Hope *et al.*, 1994). Or, le facteur de transcription AP-1 est connu pour être responsable de l'expression d'un grand nombre de gènes.

Le gène *bVH-5* code une enzyme de la famille des MAP kinase phosphatases. Les enzymes de cette famille sont transcrites de manière rapide et transitoire et leur expression coïncide avec l'activation transcriptionnelle de *c-fos* et *egr-1*. Ce sont des protéine phosphatases duales, qui déphosphorylent à la fois les résidus thréonine et tyrosine du domaine d'activation des MAP kinases (Keyse, 1995). La transcription de *bVH-5* est induite 40 min après une administration unique ou chronique de cocaïne dans le NAc, le CPU, le cortex frontal et l'hippocampe de rat (Thiriet *et al.*, 1998). Cette étude montre également que le gène *bVH-5* est induit en réponse à l'activation du système sérotoninergique. Or, des données récentes montrent que certaines MAP kinases sont impliquées dans les effets renforçants des psychostimulants (Valjent *et al.*, 2000; Ujike *et al.*, 2002). L'induction de *bVH-5* par la cocaïne suggère donc que ce gène précoce pourrait jouer un rôle régulateur des phénomènes cellulaires sous-tendant la mise en place de la dépendance aux drogues.

Un autre gène à réponse précoce susceptible d'être impliqué dans les changements phénotypiques durables observés après l'administration de cocaïne, est le gène *arc* ("activity-regulated, cytoskeleton-associated"). Il code une protéine associée à l'actine du cytosquelette (Lyford *et al.*, 1995), et est transcrit en réponse à une injection systémique de cocaïne. La protéine Arc est exprimée dans les corps cellulaires des neurones, autant que dans les épines dendritiques en réponse à la cocaïne (Fosnaugh *et al.*, 1995). Le gène *arc* semble impliqué dans les changements morphologiques observés après un traitement chronique de cocaïne.

Enfin, pour illustrer la complexité de l'expression génique sous-tendant les phénomènes adaptatifs prenant place après la prise répétée de psychostimulants, nous pouvons citer l'exemple du peptide CART ("Cocaine- and amphetamine-regulated transcript"). Comme son nom l'indique, CART a été découvert comme induit par une injection d'amphétamine ou de cocaïne (Douglass *et al.*, 1995). Ce peptide a été localisé dans les régions cérébrales connues pour intervenir dans les effets renforçants des psychostimulants (Koylu *et al.*, 1998), c'est-à-dire dans les neurones épineux du shell du NAc et dans les inter-neurones GABAergiques de la VTA, régulant l'activité des neurones dopaminergiques (Dallvechia-Adams *et al.*, 2001) (figure 65).

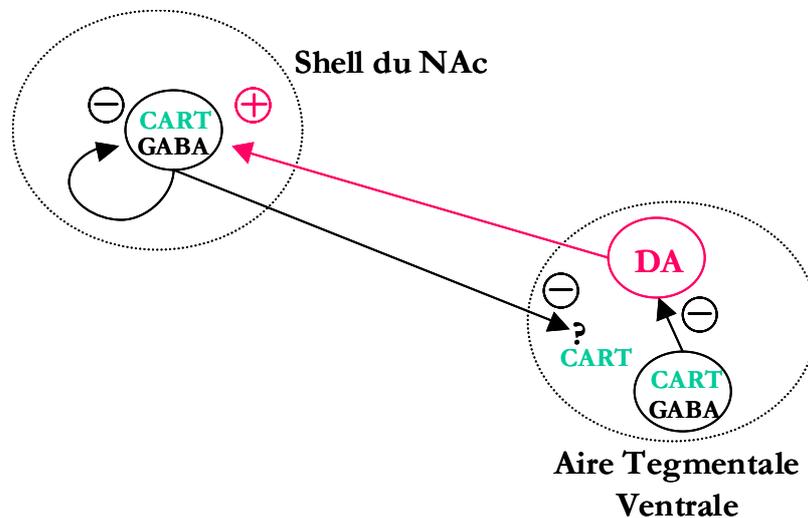


Figure 65 : Régulation de l'activité des neurones dopaminergiques par le peptide CART. D'après Kuhar *et al.* (2002).

En effet, l'injection dans la VTA du peptide CART augmente l'activité locomotrice spontanée et présente un effet appétitif dans le test comportemental de préférence de place, suggérant que CART stimule les neurones dopaminergiques (Kimmel *et al.*, 2000). L'induction de CART dans le NAc suite à l'administration de cocaïne conduit à une

augmentation de la synthèse et de la libération du peptide dans les aires de projection des neurones épineux, notamment dans la VTA et la SN (Smith *et al.*, 1999). Ainsi, CART pourrait potentialiser les effets renforçants des psychostimulants en augmentant l'activité des neurones dopaminergiques, et participer lui aussi aux changements responsables de la dépendance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abraham WC, Dragunow M, Tate WP (1991) The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol Neurobiol* 5:297-314.
- Abraham WC, Mason SE, Demmer J, Williams JM, Richardson CL, Tate WP, Lawlor PA, Dragunow M (1993) Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* 56:717-727.
- Abrahams BS, Rutherford JD, Mallet PE, Beninger RJ (1998) Place conditioning with the dopamine D1-like receptor agonist SKF 82958 but not SKF 81297 or SKF 77434. *Eur J Pharmacol* 343:111-118.
- Aihara T, Tsukada M, Matsuda H (2000) Two dynamic processes for the induction of long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Biol Cybern* 82:189-195.
- Alousi A, Weiner N (1966) The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves: effect of nerve stimulation, cocaine, and catecholamine-releasing agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56:1491-1496.
- Amara SG, Sonders MS (1998) Neurotransmitter transporters as molecular targets for addictive drugs. *Drug Alcohol Depend* 51:87-96.
- Anand-Srivastava MB, Sairam MR, Cantin M (1990) Ring-deleted analogs of atrial natriuretic factor inhibit adenylate cyclase/cAMP system. Possible coupling of clearance atrial natriuretic factor receptors to adenylate cyclase/cAMP signal transduction system. *J Biol Chem* 265:8566-8572.
- Anderson KD, Reiner A (1990) Distribution and relative abundance of neurons in the pigeon forebrain containing somatostatin, neuropeptide Y, or both. *J Comp Neurol* 299:261-282.
- Andrews NC, Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499.
- Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157.
- Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, Silva-Netto CR, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM (1992) Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6828-6831.
- Aramori I, Nakanishi S (1992) Signal transduction and pharmacological characteristics of a metabotropic glutamate receptor, mGluR1, in transfected CHO cells. *Neuron* 8:757-765.
- Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD (1995) Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. *Nature* 376:74-80.
- Ardila A, Rosselli M, Strumwasser S (1991) Neuropsychological deficits in chronic cocaine abusers. *Int J Neurosci* 57:73-79.
- Ariano MA (1983) Distribution of components of the guanosine 3',5'-phosphate system in rat caudate-putamen. *Neuroscience* 10:707-723.
- Ariano MA, Matus AI (1981) Ultrastructural localization of cyclic GMP and cyclic AMP in rat striatum. *J Cell Biol* 91:287-292.
- Ariano MA, Ufkes SK (1983) Cyclic nucleotide distribution within rat striatonigral neurons. *Neuroscience* 9:23-29.
- Arnsten AF, Cai JX, Steere JC, Goldman-Rakic PS (1995) Dopamine D2 receptor mechanisms contribute to age-related cognitive decline: the effects of quinpirole on memory and motor performance in monkeys. *J Neurosci* 15:3429-3439.
- Ascher P, Nowak L (1988) Quisqualate- and kainate-activated channels in mouse central neurones in culture. *J Physiol* 399:227-245.
- Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD (1963) Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochem Biophys Res Commun* 11:330-334.
- Aswad DW, Greengard P (1981) A specific substrate from rabbit cerebellum for guanosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Purification and characterization. *J Biol Chem* 256:3487-3493.

B

- Babinski K, Haddad P, Vallerand D, McNicoll N, de Lean A, Ong H (1995) Natriuretic peptides inhibit nicotine-induced whole-cell currents and catecholamine secretion in bovine chromaffin cells: evidence for the involvement of the atrial natriuretic factor R2 receptors. *J Neurochem* 64:1080-1087.
- Bai D, Pennefather PS, MacDonald JF, Orser BA (1999) The general anesthetic propofol slows deactivation and desensitization of GABA(A) receptors. *J Neurosci* 19:10635-10646.

- Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ (1998) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev* 50:291-313.
- Bassareo V, Tanda G, Petromilli P, Giua C, Di Chiara G (1996) Non-psychostimulant drugs of abuse and anxiogenic drugs activate with differential selectivity dopamine transmission in the nucleus accumbens and in the medial prefrontal cortex of the rat. *Psychopharmacology* 124:293-299.
- Batchelor M, Schenk JO (1998) Protein kinase A activity may kinetically upregulate the striatal transporter for dopamine. *J Neurosci* 18:10304-10309.
- Baumann MH, Raley TJ, Partilla JS, Rothman RB (1993) Biosynthesis of dopamine and serotonin in the rat brain after repeated cocaine injections: a microdissection mapping study. *Synapse* 14:40-50.
- Beckmann AM, Wilce PA (1997) Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem Int* 31:477-510; discussion 517-476.
- Beckmann AM, Davidson MS, Goodenough S, Wilce PA (1997) Differential expression of Egr-1-like DNA-binding activities in the naive rat brain and after excitatory stimulation. *J Neurochem* 69:2227-2237.
- Belelli D, Pistis M, Peters JA, Lambert JJ (1999) The interaction of general anaesthetics and neurosteroids with GABA(A) and glycine receptors. *Neurochem Int* 34:447-452.
- Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 18:8648-8659.
- Bellone E, Di Maria E, Soriani S, Varese A, Doria LL, Ajmar F, Mandich P (1999) A novel mutation (D305V) in the early growth response 2 gene is associated with severe Charcot-Marie-Tooth type 1 disease. *Hum Mutat* 14:353-354.
- Ben-Ari Y, Zigmond RE, Moore KE (1975) Regional distribution of tyrosine hydroxylase, norepinephrine and dopamine within the amygdaloid complex of the rat. *Brain Res* 87:96-101.
- Bergson C, Mrzljak L, Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Levenson R (1995a) Characterization of subtype-specific antibodies to the human D5 dopamine receptor: studies in primate brain and transfected mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3468-3472.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995b) Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15:7821-7836.
- Bernabeu R, Schroder N, Quevedo J, Cammarota M, Izquierdo I, Medina JH (1997) Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport* 8:2221-2224.
- Besson MJ, Graybiel AM, Quinn B (1990) Co-expression of neuropeptides in the cat's striatum: an immunohistochemical study of substance P, dynorphin B and enkephalin. *Neuroscience* 39:33-58.
- Best JA, Chen Y, Piech KM, Tank AW (1995) The response of the tyrosine hydroxylase gene to cyclic AMP is mediated by two cyclic AMP-response elements. *J Neurochem* 65:1934-1943.
- Bhat RV, Baraban JM (1993) Activation of transcription factor genes in striatum by cocaine: role of both serotonin and dopamine systems. *J Pharmacol Exp Ther* 267:496-505.
- Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1992a) Chronic cocaine treatment suppresses basal expression of zif268 in rat forebrain: in situ hybridization studies. *J Pharmacol Exp Ther* 263:343-349.
- Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1992b) Role of monoamine systems in activation of zif268 by cocaine. *J Psychiatry Neurosci* 17:94-102.
- Bidzseranova A, Toth G, Telegdy G (1991) The effects of atrial natriuretic peptide on the open-field activity of rats. The role of neurotransmitters. *Neuropeptides* 20:163-167.
- Biro E, Toth G, Telegdy G (1996) Effect of receptor blockers on brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide caused anxiolytic state in rats. *Neuropeptides* 30:59-65.
- Blanpied TA, Boeckman FA, Aizenman E, Johnson JW (1997) Trapping channel block of NMDA-activated responses by amantadine and memantine. *J Neurophysiol* 77:309-323.
- Bliss TV, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39.
- Bolam JP, Somogyi P, Takagi H, Fodor I, Smith AD (1983) Localization of substance P-like immunoreactivity in neurons and nerve terminals in the neostriatum of the rat: a correlated light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 12:325-344.

- Borden LA, Smith KE, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1992) Molecular heterogeneity of the gamma-aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *J Biol Chem* 267:21098-21104.
- Borden LA, Smith KE, Gustafson EL, Branchek TA, Weinshank RL (1995) Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J Neurochem* 64:977-984.
- Borden LA, Dhar TG, Smith KE, Branchek TA, Gluchowski C, Weinshank RL (1994) Cloning of the human homologue of the GABA transporter GAT-3 and identification of a novel inhibitor with selectivity for this site. *Receptors Channels* 2:207-213.
- Boussaoud D, Kermadi I (1997) The primate striatum: neuronal activity in relation to spatial attention versus motor preparation. *Eur J Neurosci* 9:2152-2168.
- Bouthenet ML, Souil E, Martres MP, Sokoloff P, Giros B, Schwartz JC (1991) Localization of dopamine D3 receptor mRNA in the rat brain using in situ hybridization histochemistry: comparison with dopamine D2 receptor mRNA. *Brain Res* 564:203-219.
- Bowery NG, Brown DA (1997) The cloning of GABA(B) receptors. *Nature* 386:223-224.
- Bracci E, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine excites fast-spiking interneurons in the striatum. *J Neurophysiol* 87:2190-2194.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Breese GR, Duncan GE, Napier TC, Bondy SC, Iorio LC, Mueller RA (1987) 6-hydroxydopamine treatments enhance behavioral responses to intracerebral microinjection of D1- and D2-dopamine agonists into nucleus accumbens and striatum without changing dopamine antagonist binding. *J Pharmacol Exp Ther* 240:167-176.
- Buck KJ, Amara SG (1994) Chimeric dopamine-norepinephrine transporters delineate structural domains influencing selectivity for catecholamines and 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12584-12588.
- Buggy DJ, Nicol B, Rowbotham DJ, Lambert DG (2000) Effects of intravenous anesthetic agents on glutamate release: a role for GABAA receptor-mediated inhibition. *Anesthesiology* 92:1067-1073.
- Buncher PC (1996) Attention-deficit/hyperactivity disorder: a diagnosis for the '90s. *Nurse Pract* 21:43-46, 52, 54 passim; quiz 63-45.
- Bunzow JR, Van Tol HH, Grandy DK, Albert P, Salon J, Christie M, Machida CA, Neve KA, Civelli O (1988) Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336:783-787.
- Butt E, Eigenthaler M, Genieser HG (1994a) (Rp)-8-pCPT-cGMPS, a novel cGMP-dependent protein kinase inhibitor. *Eur J Pharmacol* 269:265-268.
- Butt E, Nolte C, Schulz S, Beltman J, Beavo JA, Jastorff B, Walter U (1992) Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol* 43:2591-2600.
- Butt E, Abel K, Krieger M, Palm D, Hoppe V, Hoppe J, Walter U (1994b) cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 269:14509-14517.

C

- Caine SB, Koob GF (1993) Modulation of cocaine self-administration in the rat through D-3 dopamine receptors. *Science* 260:1814-1816.
- Caine SB, Negus SS, Mello NK, Patel S, Bristow L, Kulagowski J, Vallone D, Saiardi A, Borrelli E (2002) Role of dopamine D2-like receptors in cocaine self-administration: studies with D2 receptor mutant mice and novel D2 receptor antagonists. *J Neurosci* 22:2977-2988.
- Calabresi P, Mercuri N, Stanzione P, Stefani A, Bernardi G (1987) Intracellular studies on the dopamine-induced firing inhibition of neostriatal neurons in vitro: evidence for D1 receptor involvement. *Neuroscience* 20:757-771.
- Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH (1992) Protein phosphatase inhibitors induce the sustained expression of the Egr-1 gene and the hyperphosphorylation of its gene product. *J Biol Chem* 267:12991-12997.
- Cao X, Mahendran R, Guy GR, Tan YH (1993) Detection and characterization of cellular EGR-1 binding to its recognition site. *J Biol Chem* 268:16949-16957.
- Cao XM, Koski RA, Gashler A, McKiernan M, Morris CF, Gaffney R, Hay RV, Sukhatme VP (1990) Identification and characterization of the Egr-1 gene product, a DNA-binding zinc finger protein induced by differentiation and growth signals. *Mol Cell Biol* 10:1931-1939.

- Carlsson A (1958) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11:490-493.
- Carroll ME, Lac ST, Asencio M, Kragh R (1990a) Intravenous cocaine self-administration in rats is reduced by dietary L-tryptophan. *Psychopharmacology (Berl)* 100:293-300.
- Carroll ME, Lac ST, Asencio M, Kragh R (1990b) Fluoxetine reduces intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 35:237-244.
- Centonze D, Picconi B, Gubellini P, Bernardi G, Calabresi P (2001) Dopaminergic control of synaptic plasticity in the dorsal striatum. *Eur J Neurosci* 13:1071-1077.
- Cepeda C, Buchwald NA, Levine MS (1993) Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9576-9580.
- Charara A, Heilman TC, Levey AI, Smith Y (2000) Pre- and postsynaptic localization of GABA(B) receptors in the basal ganglia in monkeys. *Neuroscience* 95:127-140.
- Charles CJ, Richards AM, Espiner EA (1992) Central C-type natriuretic peptide but not atrial natriuretic factor lowers blood pressure and adrenocortical secretion in normal conscious sheep. *Endocrinology* 131:1721-6.
- Chavier P, Zerial M, Lemaire P, Almendral J, Bravo R, Charnay P (1988) A gene encoding a protein with zinc fingers is activated during G0/G1 transition in cultured cells. *Embo J* 7:29-35.
- Chavier P, Janssen-Timmen U, Mattei MG, Zerial M, Bravo R, Charnay P (1989) Structure, chromosome location, and expression of the mouse zinc finger gene Krox-20: multiple gene products and coregulation with the proto-oncogene c-fos. *Mol Cell Biol* 9:787-797.
- Chen J (1993) Dopaminergic mechanisms and brain reward. *Seminars in the Neurosciences* 5:315-320.
- Chergui K, Lacey MG (1999) Modulation by dopamine D1-like receptors of synaptic transmission and NMDA receptors in rat nucleus accumbens is attenuated by the protein kinase C inhibitor Ro 32-0432. *Neuropharmacology* 38:223-231.
- Chevalier G, Deniau JM (1990) Disinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. *Trends Neurosci* 13:277-280.
- Chinkers M, Garbers DL (1989) The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* 245:1392-1394.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.
- Choi WS, Machida CA, Ronnekleiv OK (1995) Distribution of dopamine D1, D2 and D5 receptor mRNAs in the monkey brain: ribonuclease protection assay analysis. *Brain Res Mol Brain Res* 31:86-94.
- Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S (1970) Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. *Arch Biochem Biophys* 141:356-367.
- Christy B, Nathans D (1989a) Functional serum response elements upstream of the growth factor-inducible gene zif268. *Mol Cell Biol* 9:4889-4895.
- Christy B, Nathans D (1989b) DNA binding site of the growth factor-inducible protein Zif268. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8737-8741.
- Christy BA, Lau LF, Nathans D (1988) A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7857-7861.
- Church WH, Justice JB, Jr., Byrd LD (1987) Extracellular dopamine in rat striatum following uptake inhibition by cocaine, nomifensine and bsztropine. *Eur J Pharmacol* 139:345-348.
- Churchill L, Dilts RP, Kalivas PW (1992) Autoradiographic localization of gamma-aminobutyric acidA receptors within the ventral tegmental area. *Neurochem Res* 17:101-106.
- Cohen AM (1993) Acute circulatory support. Dopamine's renal effects are complex. *Bmj* 307:506.
- Colbran JL, Francis SH, Leach AB, Thomas MK, Jiang H, McAllister LM, Corbin JD (1992) A phenylalanine in peptide substrates provides for selectivity between cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 267:9589-9594.
- Cole AJ, Saffen DW, Baraban JM, Worley PF (1989) Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340:474-476.
- Cole AJ, Bhat RV, Patt C, Worley PF, Baraban JM (1992) D1 dopamine receptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. *J Neurochem* 58:1420-1426.
- Collins SL, Kantak KM (2002) Neuronal nitric oxide synthase inhibition decreases cocaine self-administration behavior in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 159:361-369.
- Corbin JD, OGREID D, Miller JP, Suva RH, Jastorff B, Doskeland SO (1986) Studies of cGMP analog specificity and function of the two intrasubunit binding sites of cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 261:1208-1214.

- Cowan RL, Wilson CJ, Emson PC, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 302:197-205.
- Crosby SD, Puetz JJ, Simburger KS, Fahrner TJ, Milbrandt J (1991) The early response gene NGFI-C encodes a zinc finger transcriptional activator and is a member of the GCGGGGGCG (GSG) element-binding protein family. *Mol Cell Biol* 11:3835-3841.
- Cunningham KA, Lakoski JM (1988) Electrophysiological effects of cocaine and procaine on dorsal raphe serotonin neurons. *Eur J Pharmacol* 148:457-462.

D

- Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brainstem neurons. *Acta Physiol Scand* 62:1-55.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *Embo J* 8:4025-4034.
- Dallvechia-Adams S, Smith Y, Kuhar MJ (2001) CART peptide-immunoreactive projection from the nucleus accumbens targets substantia nigra pars reticulata neurons in the rat. *J Comp Neurol* 434:29-39.
- Dalton S, Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* 68:597-612.
- Daly SA, Waddington JL (1993) Behavioural effects of the putative D-3 dopamine receptor agonist 7-OH-DPAT in relation to other "D-2-like" agonists. *Neuropharmacology* 32:509-510.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Daunais JB, McGinty JF (1994) Acute and chronic cocaine administration differentially alters striatal opioid and nuclear transcription factor mRNAs. *Synapse* 18:35-45.
- Daunais JB, McGinty JF (1996) The effects of D1 or D2 dopamine receptor blockade on zif/268 and preprodynorphin gene expression in rat forebrain following a short-term cocaine binge. *Brain Res Mol Brain Res* 35:237-248.
- Davis WJ, Gillette R (1978) Neural correlate of behavioral plasticity in command neurons of Pleurobranchaea. *Science* 199:801-804.
- de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H (1981) A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28:89-94.
- De Camilli P, Miller PE, Levitt P, Walter U, Greengard P (1984) Anatomy of cerebellar Purkinje cells in the rat determined by a specific immunohistochemical marker. *Neuroscience* 11:761-817.
- de Jonge HR (1981) Cyclic GMP-dependent protein kinase in intestinal brushborders. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14:315-333.
- de Vente J, Asan E, Gambaryan S, Markerink-van Ittersum M, Axer H, Gallatz K, Lohmann SM, Palkovits M (2001) Localization of cGMP-dependent protein kinase type II in rat brain. *Neuroscience* 108:27-49.
- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- DeFrance JF, Sikes RW, Chronister RB (1985) Dopamine action in the nucleus accumbens. *J Neurophysiol* 54:1568-1577.
- Deisz RA, Billard JM, Zieglgansberger W (1993) Pre- and postsynaptic GABAB receptors of rat neocortical neurons differ in their pharmacological properties. *Neurosci Lett* 154:209-212.
- Desce JM, Godeheu G, Galli T, Artaud F, Cheramy A, Glowinski J (1992) L-glutamate-evoked release of dopamine from synaptosomes of the rat striatum: involvement of AMPA and N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 47:333-339.
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Di Chiara G, Acquas E, Carboni E (1992) Drug motivation and abuse: a neurobiological perspective. *Ann N Y Acad Sci* 654:207-219.
- Diaz J, Levesque D, Griffon N, Lammers CH, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC (1994) Opposing roles for dopamine D2 and D3 receptors on neurotensin mRNA expression in nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* 6:1384-1387.
- Diaz J, Levesque D, Lammers CH, Griffon N, Martres MP, Schwartz JC, Sokoloff P (1995) Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65:731-745.
- Douglass J, McKinzie AA, Couceyro P (1995) PCR differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. *J Neurosci* 15:2471-2481.

- Drago J, Gerfen CR, Westphal H, Steiner H (1996) D1 dopamine receptor-deficient mouse: cocaine-induced regulation of immediate-early gene and substance P expression in the striatum. *Neuroscience* 74:813-823.
- Dragunow M (1996) A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet* 26:293-299.
- Dragunow M, Tse C, Glass M, Lawlor P (1994) c-fos antisense reduces expression of Krox 24 in rat caudate and neocortex. *Cell Mol Neurobiol* 14:395-405.
- Dreher JK, Jackson DM (1988) Role of D1 and D2 dopamine receptors in mediating locomotor activity elicited from the nucleus accumbens of rats. *Brain Res* 487:267-277.
- Dulawa SC, Grandy DK, Low MJ, Paulus MP, Geyer MA (1999) Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J Neurosci* 19:9550-9556.
- Duvoisin RM, Zhang C, Ramonell K (1995) A novel metabotropic glutamate receptor expressed in the retina and olfactory bulb. *J Neurosci* 15:3075-3083.

E-F

- Ebner FF, Armstrong-James MA (1990) Intracortical processes regulating the integration of sensory information. *Prog Brain Res* 86:129-141.
- Einhorn LC, Johansen PA, White FJ (1988) Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: studies in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 8:100-112.
- El-Ghundi M, Fletcher PJ, Drago J, Sibley DR, O'Dowd BF, George SR (1999) Spatial learning deficit in dopamine D(1) receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol* 383:95-106.
- El-Husseini AE, Williams J, Reiner PB, Pelech S, Vincent SR (1999) Localization of the cGMP-dependent protein kinases in relation to nitric oxide synthase in the brain. *J Chem Neuroanat* 17:45-55.
- Ennulat DJ, Babb S, Cohen BM (1994) Persistent reduction of immediate early gene mRNA in rat forebrain following single or multiple doses of cocaine. *Brain Res Mol Brain Res* 26:106-112.
- Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E (1996) Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5166-5171.
- Esteve L, Haby C, Rodeau JL, Humblot N, Aunis D, Zwiller J (1995) Induction of c-fos, jun B and egr-1 expression by haloperidol in PC12 cells: involvement of calcium. *Neuropharmacology* 34:439-448.
- Esteve L, Lutz P, Thiriet N, Revel M, Aunis D, Zwiller J (2001) Cyclic GMP-dependent protein kinase potentiates serotonin-induced Egr-1 binding activity in PC12 cells. *Cell Signal* 13:425-432.
- Falck VT (1972) The role and function of university training programs. *Asha* 14:307-310.
- Felder CC, Campbell T, Albrecht F, Jose PA (1990) Dopamine inhibits Na(+)-H+ exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylate cyclase. *Am J Physiol* 259:F297-303.
- Ferrari E, Drai E, Jourdan J, Sanchez B, Baudouy M, Morand P (1994) [Severe pulmonary hypertension complicating a long treatment with dexfenfluramine]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 87:285-286.
- Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL (1985) Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* 313:310-313.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, Song W, Snyder GL, Nishi A, Cheryn A, O'Callaghan JP, Miller DB, Cole DG, Corbett R, Haile CN, Cooper DC, Onn SP, Grace AA, Ouimet CC, White FJ, Hyman SE, Surmeier DJ, Girault J, Nestler EJ, Greengard P (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281:838-842.
- Finn JT, Grunwald ME, Yau KW (1996) Cyclic nucleotide-gated ion channels: an extended family with diverse functions. *Annu Rev Physiol* 58:395-426.
- Fletcher P, Grottick A, Higgins G (2002) Differential Effects of the 5-HT(2A) Receptor Antagonist M100,907 and the 5-HT(2C) Receptor Antagonist SB242,084 on Cocaine-induced Locomotor Activity, Cocaine Self-administration and Cocaine-induced Reinstatement of Responding. *Neuropsychopharmacology* 27:576.
- Floresco SB, Phillips AG (2001) Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 115:934-939.
- Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* 21:4915-4922.
- Fosnaugh JS, Bhat RV, Yamagata K, Worley PF, Baraban JM (1995) Activation of arc, a putative "effector" immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J Neurochem* 64:2377-2380.
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64:739-749.

- Frail DE, Manelli AM, Witte DG, Lin CW, Steffey ME, Mackenzie RG (1993) Cloning and characterization of a truncated dopamine D1 receptor from goldfish retina: stimulation of cyclic AMP production and calcium mobilization. *Mol Pharmacol* 44:1113-1118.
- Francis SH, Corbin JD (1994) Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56:237-272.
- Francis SH, Woodford TA, Wolfe L, Corbin JD (1988) Types I alpha and I beta isozymes of cGMP-dependent protein kinase: alternative mRNA splicing may produce different inhibitory domains. *Second Messengers Phosphoproteins* 12:301-310.
- Freneau RT, Jr., Duncan GE, Fornaretto MG, Dearry A, Gingrich JA, Breese GR, Caron MG (1991) Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3772-3776.
- Fujiyama F, Stephenson FA, Bolam JP (2002) Synaptic localization of GABA(A) receptor subunits in the substantia nigra of the rat: effects of quinolinic acid lesions of the striatum. *Eur J Neurosci* 15:1961-1975.
- Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y, Shigekawa M (1991) Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* 266:12337-12341.

G

- Galloway MP (1990) Regulation of dopamine and serotonin synthesis by acute administration of cocaine. *Synapse* 6:63-72.
- Galloway MP, Wolf ME, Roth RH (1986) Regulation of dopamine synthesis in the medial prefrontal cortex is mediated by release modulating autoreceptors: studies in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 236:689-698.
- Garbers DL (1992) Guanylyl cyclase receptors and their endocrine, paracrine, and autocrine ligands. *Cell* 71:1-4.
- Garbers DL, Lowe DG (1994) Guanylyl cyclase receptors. *J Biol Chem* 269:30741-30744.
- Gashler AL, Swaminathan S, Sukhatme VP (1993) A novel repression module, an extensive activation domain, and a bipartite nuclear localization signal defined in the immediate-early transcription factor Egr-1. *Mol Cell Biol* 13:4556-4571.
- Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M (1993) Induction and suppression of immediate early genes in specific rat brain regions by the non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Neuroscience* 53:749-758.
- Gass P, Herdegen T, Bravo R, Kiessling M (1994) High induction threshold for transcription factor KROX-20 in the rat brain: partial co-expression with heat shock protein 70 following limbic seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 23:292-298.
- Gerfen CR, Baimbridge KG, Miller JJ (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:8780-8784.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ, Jr., Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432.
- Gershanik O, Heikkila RE, Duvoisin RC (1983) Behavioral correlations of dopamine receptor activation. *Neurology* 33:1489-1492.
- Gille H, Sharrocks AD, Shaw PE (1992) Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358:414-417.
- Giros B, Caron MG (1993) Molecular characterization of the dopamine transporter. *Trends Pharmacol Sci* 14:43-49.
- Giros B, el Mestikawy S, Bertrand L, Caron MG (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett* 295:149-154.
- Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC (1989) Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* 342:923-926.
- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, Pifl C, Caron MG (1994) Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J Biol Chem* 269:15985-15988.
- Glickstein SB, Schmauss C (2001) Dopamine receptor functions: lessons from knockout mice. *Pharmacol Ther* 91:63-83.
- Goeders NE, Smith JE (1986) Reinforcing properties of cocaine in the medial prefrontal cortex: primary action on presynaptic dopaminergic terminals. *Pharmacol Biochem Behav* 25:191-199.

- Gold LH, Balster RL (1992) Effects of buspirone and gepirone on i.v. cocaine self-administration in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* 108:289-294.
- Goldman-Rakic PS, Lidow MS, Gallager DW (1990) Overlap of dopaminergic, adrenergic, and serotonergic receptors and complementarity of their subtypes in primate prefrontal cortex. *J Neurosci* 10:2125-2138.
- Gonchar Y, Pang L, Malitschek B, Bettler B, Burkhalter A (2001) Subcellular localization of GABA(B) receptor subunits in rat visual cortex. *J Comp Neurol* 431:182-197.
- Gong W, Neill D, Justice JB, Jr. (1996) Conditioned place preference and locomotor activation produced by injection of psychostimulants into ventral pallidum. *Brain Res* 707:64-74.
- Gorelova NA, Yang CR (2000) Dopamine D1/D5 receptor activation modulates a persistent sodium current in rat prefrontal cortical neurons in vitro. *J Neurophysiol* 84:75-87.
- Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O (1989) The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 45:778-785.
- Graybiel AM, Hirsch EC, Agid Y (1990) The nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Adv Neurol* 53:17-29.
- Greengard P, Allen PB, Nairn AC (1999) Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* 23:435-447.
- Grimes CA, Jope RS (1999) Cholinergic stimulation of early growth response-1 DNA binding activity requires protein kinase C and mitogen-activated protein kinase activation and is inhibited by sodium valproate in SH-SY5Y cells. *J Neurochem* 73:1384-1392.
- Grobin AC, Deutch AY (1998) Dopaminergic regulation of extracellular gamma-aminobutyric acid levels in the prefrontal cortex of the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 285:350-357.
- Gudi T, Huvar I, Meinecke M, Lohmann SM, Boss GR, Pilz RB (1996) Regulation of gene expression by cGMP-dependent protein kinase. Transactivation of the c-fos promoter. *J Biol Chem* 271:4597-4600.
- Gudi T, Lohmann SM, Pilz RB (1997) Regulation of gene expression by cyclic GMP-dependent protein kinase requires nuclear translocation of the kinase: identification of a nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 17:5244-5254.
- Guevara-Guzman R, Emson PC, Kendrick KM (1994) Modulation of in vivo striatal transmitter release by nitric oxide and cyclic GMP. *J Neurochem* 62:807-810.
- Gulledge AT, Jaffe DB (2001) Multiple effects of dopamine on layer V pyramidal cell excitability in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 86:586-595.

H

- Haby C, Lisovoski F, Aunis D, Zwiller J (1994) Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells. *J Neurochem* 62:496-501.
- Hales TG, Lambert JJ (1991) The actions of propofol on inhibitory amino acid receptors of bovine adrenomedullary chromaffin cells and rodent central neurones. *Br J Pharmacol* 104:619-628.
- Hall J, Thomas KL, Everitt BJ (2000) Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat Neurosci* 3:533-535.
- Hamaya Y, Takeda T, Dohi S, Nakashima S, Nozawa Y (2000) The effects of pentobarbital, isoflurane, and propofol on immediate-early gene expression in the vital organs of the rat. *Anesth Analg* 90:1177-1183.
- Hara M, Kai Y, Ikemoto Y (1993) Propofol activates GABAA receptor-chloride ionophore complex in dissociated hippocampal pyramidal neurons of the rat. *Anesthesiology* 79:781-788.
- Hardman JG, Sutherland EW (1969) Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. *J Biol Chem* 244:6363-6370.
- Harvey J, Lacey MG (1996) Endogenous and exogenous dopamine depress EPSCs in rat nucleus accumbens in vitro via D1 receptors activation. *J Physiol* 492 (Pt 1):143-154.
- Hell JW, Appleyard SM, Yokoyama CT, Warner C, Catterall WA (1994) Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel alpha 1 subunit which have different COOH termini. *J Biol Chem* 269:7390-7396.
- Hell JW, Yokoyama CT, Wong ST, Warner C, Snutch TP, Catterall WA (1993) Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit. *J Biol Chem* 268:19451-19457.
- Henze DA, Gonzalez-Burgos GR, Urban NN, Lewis DA, Barrionuevo G (2000) Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 84:2799-2809.

- Herdegen T, Leah JD (1998) Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28:370-490.
- Herdegen T, Walker T, Leah JD, Bravo R, Zimmermann M (1990) The KROX-24 protein, a new transcription regulating factor: expression in the rat central nervous system following afferent somatosensory stimulation. *Neurosci Lett* 120:21-24.
- Herdegen T, Kiessling M, Bele S, Bravo R, Zimmermann M, Gass P (1993) The KROX-20 transcription factor in the rat central and peripheral nervous systems: novel expression pattern of an immediate early gene-encoded protein. *Neuroscience* 57:41-52.
- Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC, Jr. (1996) Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 369:165-187.
- Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E (1997) D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca²⁺ conductance. *J Neurosci* 17:3334-3342.
- Hersch SM, Yi H, Heilman CJ, Edwards RH, Levey AI (1997) Subcellular localization and molecular topology of the dopamine transporter in the striatum and substantia nigra. *J Comp Neurol* 388:211-227.
- Hersch SM, Ciliax BJ, Gutekunst CA, Rees HD, Heilman CJ, Yung KK, Bolam JP, Ince E, Yi H, Levey AI (1995) Electron microscopic analysis of D1 and D2 dopamine receptor proteins in the dorsal striatum and their synaptic relationships with motor corticostriatal afferents. *J Neurosci* 15:5222-5237.
- Hiroi N, Fienberg AA, Haile CN, Alburges M, Hanson GR, Greengard P, Nestler EJ (1999) Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur J Neurosci* 11:1114-1118.
- Hirota K, Kudo M, Kudo T, Matsuki A, Lambert DG (2000) Inhibitory effects of intravenous anaesthetic agents on K⁺-evoked norepinephrine and dopamine release from rat striatal slices: possible involvement of P/Q-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Br J Anaesth* 85:874-880.
- Honkaniemi J, Sharp FR (1999) Prolonged expression of zinc finger immediate-early gene mRNAs and decreased protein synthesis following kainic acid induced seizures. *Eur J Neurosci* 11:10-17.
- Hope B, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ (1992) Regulation of immediate early gene expression and AP-1 binding in the rat nucleus accumbens by chronic cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5764-5768.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ (1994) Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* 13:1235-1244.
- Horiuchi A, Takeyasu K, Mouradian MM, Jose PA, Felder RA (1993) D1A dopamine receptor stimulation inhibits Na⁺/K⁺-ATPase activity through protein kinase A. *Mol Pharmacol* 43:281-285.
- Howe JR, Sutor B, Zieglansberger W (1987) Baclofen reduces post-synaptic potentials of rat cortical neurones by an action other than its hyperpolarizing action. *J Physiol* 384:539-569.
- Howland JG, Taepavarapruk P, Phillips AG (2002) Glutamate receptor-dependent modulation of dopamine efflux in the nucleus accumbens by basolateral, but not central, nucleus of the amygdala in rats. *J Neurosci* 22:1137-1145.
- Huang Q, Zhou D, Chase K, Gusella JF, Aronin N, DiFiglia M (1992a) Immunohistochemical localization of the D1 dopamine receptor in rat brain reveals its axonal transport, pre- and postsynaptic localization, and prevalence in the basal ganglia, limbic system, and thalamic reticular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11988-11992.
- Huang RP, Adamson ED (1993) Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism. *DNA Cell Biol* 12:265-273.
- Huang RP, Adamson ED (1994) The phosphorylated forms of the transcription factor, Egr-1, bind to DNA more efficiently than non-phosphorylated. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1271-1276.
- Huang W, Simpson RK, Jr. (1999) Ketamine suppresses c-fos expression in dorsal horn neurons after acute constrictive sciatic nerve injury in the rat. *Neurosci Lett* 269:165-168.
- Huang W, Lee D, Yang Z, Copolov DL, Lim AT (1992b) Plasticity of adrenoceptor responsiveness on irANP secretion and pro-ANP mRNA expression in hypothalamic neuron cultures: modulation by dexamethasone. *Endocrinology* 131:1562-1564.
- Humblot N, Thiriet N, Gobaille S, Aunis D, Zwiller J (1998) The serotonergic system modulates the cocaine-induced expression of the immediate early genes egr-1 and c-fos in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 844:7-20.
- Huntley GW, Morrison Jh, Prikhovzhan A, Sealfon SC (1992) Localization of multiple dopamine receptor subtype mRNAs in human and monkey motor cortex and striatum. *Brain Res Mol Brain Res*. 15 : 181-188.

I-J

- Imperato A, Mele A, Scrocco MG, Puglisi-Allegra S (1992) Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. Neurochemical basis for addiction. *Eur J Pharmacol* 212:299-300.
- Ishikawa E, Ishikawa S, Davis JW, Sutherland EW (1969) Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanylyl cyclase in intestine. *J Biol Chem* 244:6371-6376.
- Isomoto S, Kaibara M, Sakurai-Yamashita Y, Nagayama Y, Uezono Y, Yano K, Taniyama K (1998) Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABAB receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 253:10-15.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994) Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64:291-370.
- Jackson ME, Moghaddam B (2001) Amygdala regulation of nucleus accumbens dopamine output is governed by the prefrontal cortex. *J Neurosci* 21:676-681.
- Jackson ME, Frost AS, Moghaddam B (2001) Stimulation of prefrontal cortex at physiologically relevant frequencies inhibits dopamine release in the nucleus accumbens. *J Neurochem* 78:920-923.
- Jarchau T, Hausler C, Markert T, Pohler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, Lohmann SM, Walter U (1994) Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9426-9430.
- Javitt DC, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148:1301-1308.
- Jedynak JP, Ali SF, Haycock JW, Hope BT (2002) Acute administration of cocaine regulates the phosphorylation of serine-19, -31 and -40 in tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 82:382-388.
- Jewett JR, Koller KJ, Goeddel DV, Lowe DG (1993) Hormonal induction of low affinity receptor guanylyl cyclase. *Embo J* 12:769-777.
- Johanson CE, Fischman MW (1989) The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol Rev* 41:3-52.
- Jones DL, Mogenson GJ (1980) Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection subserving ambulatory activity. *Am J Physiol* 238:R65-69.
- Jones GH, Robbins TW (1992) Differential effects of mesocortical, mesolimbic, and mesostriatal dopamine depletion on spontaneous, conditioned, and drug-induced locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav* 43:887-895.
- Jones MW, French PJ, Bliss TV, Rosenblum K (1999) Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J Neurosci* 19:RC36.
- Jones MW, Errington ML, French PJ, Fine A, Bliss TV, Garel S, Charnay P, Bozon B, Laroche S, Davis S (2001) A requirement for the immediate early gene *Zif268* in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci* 4:289-296.
- Joseph LJ, Le Beau MM, Jamieson GA, Jr., Acharya S, Shows TB, Rowley JD, Sukhatme VP (1988) Molecular cloning, sequencing, and mapping of *EGR2*, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7164-7168.

K

- Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R (1988) Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science* 242:1566-1570.
- Kadowaki K, Hirota K, Koike K, Ohmichi M, Miyake A, Tanizawa O (1992) Atrial and brain natriuretic peptides enhance dopamine accumulation in cultured rat hypothalamic cells including dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology* 56:11-17.
- Kalivas PW, Duffy P, Eberhardt H (1990) Modulation of A10 dopamine neurons by gamma-aminobutyric acid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* 253:858-866.
- Kaltenbach K (2000) The effects of maternal cocaine abuse on mothers and newborns. *Curr Psychiatry Rep* 2:514-518.
- Kanai Y, Stelzner M, Nussberger S, Khawaja S, Hebert SC, Smith CP, Hediger MA (1994) The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. *J Biol Chem* 269:20599-20606.
- Kanazawa I, Emson PC, Cuello AC (1977) Evidence for the existence of substance P-containing fibres in striato-nigral and pallido-nigral pathways in rat brain. *Brain Res* 119:447-453.
- Kandel ER, Schwartz JH (1987) Principles of neural science. In: (Elsevier, ed), pp 558-559. New York City.
- Kaneko T, Mizuno N (1994) Glutamate-synthesizing enzymes in GABAergic neurons of the neocortex: a double immunofluorescence study in the rat. *Neuroscience* 61:839-849.

- Kanwal S, Elmquist BJ, Trachte GJ (1997) Atrial natriuretic peptide inhibits evoked catecholamine release by altering sensitivity to calcium. *J Pharmacol Exp Ther* 283:426-433.
- Kanwal S, Lowe DG, Trachte GJ (1999) Intracellular fragments of the natriuretic peptide receptor-C (NPR-C) attenuate dopamine efflux. *Endocrinology* 140:1118-1124.
- Karoum F, Cattabeni F, Costa E, Ruthven CR, Sandler M (1972) Gas chromatographic assay of picomole concentrations of biogenic amines. *Anal Biochem* 47:550-561.
- Karreman M, Moghaddam B (1996) The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem* 66:589-598.
- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A, Kaneko M (1987) K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 142:436-440.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B (1997) Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386:239-246.
- Kaupmann K, Schuler V, Mosbacher J, Bischoff S, Bittiger H, Heid J, Froestl W, Leonhard S, Pfaff T, Karschin A, Bettler B (1998) Human gamma-aminobutyric acid type B receptors are differentially expressed and regulate inwardly rectifying K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14991-14996.
- Kawata M, Nakao K, Morii N, Kiso Y, Yamashita H, Imura H, Sano Y (1985) Atrial natriuretic polypeptide: topographical distribution in the rat brain by radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Neuroscience* 16:521-546.
- Kebabian JW, Calne DB (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.
- Keefe KA, Gerfen CR (1995) D1-D2 dopamine receptor synergy in striatum: effects of intrastriatal infusions of dopamine agonists and antagonists on immediate early gene expression. *Neuroscience* 66:903-913.
- Keita H, Lechary JB, Henzel D, Desmonts JM, Mantz J (1996) Is inhibition of dopamine uptake relevant to the hypnotic action of i.v. anaesthetics? *Br J Anaesth* 77:254-256.
- Kelly PH (1975) Unilateral 6-hydroxydopamine lesions of nigrostriatal or mesolimbic dopamine-containing terminals and the drug-induced rotation of rats. *Brain Res* 100:163-169.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Jr., Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, Steffen C, Zhang YJ, Marotti L, Self DW, Tkatch T, Baranaukas G, Surmeier DJ, Neve RL, Duman RS, Picciotto MR, Nestler EJ (1999) Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* 401:272-276.
- Kemp JM, Powell TP (1971a) The site of termination of afferent fibres in the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:413-427.
- Kemp JM, Powell TP (1971b) The synaptic organization of the caudate nucleus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 262:403-412.
- Keyse SM (1995) An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 16:2-3.
- Killam KF, Olds J, Sinclair J (1957) Further studies on the effects of centrally acting drugs on self-stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1:119-157.
- Kimmel HL, Gong W, Vechia SD, Hunter RG, Kuhar MJ (2000) Intra-ventral tegmental area injection of rat cocaine and amphetamine-regulated transcript peptide 55-102 induces locomotor activity and promotes conditioned place preference. *J Pharmacol Exp Ther* 294:784-792.
- Kimura H, Murad F (1974) Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. *J Biol Chem* 249:6910-6916.
- King GR, Joyner CM, Ellinwood EH, Jr. (1994) 5-HT₃ receptor modulation of behavior during withdrawal from continuous or intermittent cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* 47:399-407.
- Kita H, Kosaka T, Heizmann CW (1990) Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res* 536:1-15.
- Kita K, Shiratani T, Takenouchi K, Fukuzako H, Takigawa M (1999) Effects of D1 and D2 dopamine receptor antagonists on cocaine-induced self-stimulation and locomotor activity in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 9:1-7.
- Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992) Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7782-7785.
- Kneussel M (2002) Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain Res Brain Res Rev* 39:74-83.

- Koe BK (1976) Molecular geometry of inhibitors of the uptake of catecholamines and serotonin in synaptosomal preparations of rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 199:649-661.
- Kojima M, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1989) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for rat brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 159:1420-1426.
- Kombian SB, Malenka RC (1994) Simultaneous LTP of non-NMDA- and LTD of NMDA-receptor-mediated responses in the nucleus accumbens. *Nature* 368:242-246.
- Koob GF (1992) Neural mechanisms of drug reinforcement. *Ann N Y Acad Sci* 654:171-191.
- Koob GF (1996) Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16:893-896.
- Koylu EO, Couceyro PR, Lambert PD, Kuhar MJ (1998) Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. *J Comp Neurol* 391:115-132.
- Krasowski MD, Harrison NL (1999) General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels. *Cell Mol Life Sci* 55:1278-1303.
- Kraus MM, Prast H (2002) Involvement of nitric oxide, cyclic GMP and phosphodiesterase 5 in excitatory amino acid and GABA release in the nucleus accumbens evoked by activation of the hippocampal fimbria. *Neuroscience* 112:331-343.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51:199-214.
- Kuhar MJ, Adams S, Dominguez G, Jaworski J, Balkan B (2002) CART peptides. *Neuropeptides* 36:1-8.
- Kuhar MJ, Vaughan R, Uhl G, Cerruti C, Revay R, Freed C, Nirenburg M, Pickel V (1998) Localization of dopamine transporter protein by microscopic histochemistry. *Adv Pharmacol* 42:168-170.
- Kulik A, Nakadate K, Nyiri G, Notomi T, Malitschek B, Bettler B, Shigemoto R (2002) Distinct localization of GABA(B) receptors relative to synaptic sites in the rat cerebellum and ventrobasal thalamus. *Eur J Neurosci* 15:291-307.
- Kumor KM, O'Brien PO (1994) Substance Abuse In Biological Bases of Brain Function and Disease. In: Raven Press, LTD Edition. New-York: Molinoff et Winokur.
- Kuo JF, Greengard P (1970) Isolation and partial purification of a protein kinase activated by cGMP. *J Biol Chem* 245:2493-2498.

L

- Laitinen JT (1993) Dopamine stimulates K⁺ efflux in the chick retina via D1 receptors independently of adenylyl cyclase activation. *J Neurochem* 61:1461-1469.
- Lamb RJ, Griffiths RR (1990) Self-administration in baboons and the discriminative stimulus effects in rats of bupropion, nomifensine, diclofensine and imipramine. *Psychopharmacology (Berl)* 102:183-190.
- Lanca AJ, De Cabo C, Arifuzzaman AI, Vaccarino FJ (1998) Cholecystokinergic innervation of nucleus accumbens subregions. *Peptides* 19: 859-868.
- Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM (1993a) Dopamine D3 receptor mRNA and binding sites in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 18:187-192.
- Landwehrmeyer B, Mengod G, Palacios JM (1993b) Differential visualization of dopamine D2 and D3 receptor sites in rat brain. A comparative study using in situ hybridization histochemistry and ligand binding autoradiography. *Eur J Neurosci* 5:145-153.
- Lang RE, Tholken H, Ganten D, Luft FC, Ruskoaho H, Unger T (1985) Atrial natriuretic factor--a circulating hormone stimulated by volume loading. *Nature* 314:264-266.
- Langub MC, Jr., Watson RE, Jr., Herman JP (1995a) Distribution of natriuretic peptide precursor mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 356:183-199.
- Langub MC, Jr., Dolgas CM, Watson RE, Jr., Herman JP (1995b) The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 7:305-309.
- Laroche S, Davis S, Jay TM (2000) Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses: dual roles in working memory and consolidation. *Hippocampus* 10:438-446.
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18:493-503.
- LaVail JH, LaVail MM (1974) The retrograde intraaxonal transport of horseradish peroxidase in the chick visual system: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 157:303-357.
- Le Moal M, Simon H (1991) Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 71:155-234.

- Le Moine C, Bloch B (1995) D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J Comp Neurol* 355:418-426.
- Le Moine C, Normand E, Bloch B (1991) Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4205-4209.
- Le Moine C, Normand E, Guitteny AF, Fouque B, Teoule R, Bloch B (1990) Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:230-234.
- Ledsome JR, King KA (1995) Mechanisms of release of atrial natriuretic factor in vivo. *Adv Exp Med Biol* 381:175-186.
- Lee HJ, Mignacca RC, Sakamoto KM (1995) Transcriptional activation of *egr-1* by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not interleukin 3 requires phosphorylation of cAMP response element-binding protein (CREB) on serine 133. *J Biol Chem* 270:15979-15983.
- Lee SL, Sadovsky Y, Swirnoff AH, Polish JA, Goda P, Gavriline G, Milbrandt J (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (*Egr-1*). *Science* 273:1219-1221.
- Leibowitz SF, Rossakis C (1979) Mapping study of brain dopamine- and epinephrine-sensitive sites which cause feeding suppression in the rat. *Brain Res* 172:101-113.
- Lemaire P, Revelant O, Bravo R, Charnay P (1988) Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4691-4695.
- Lemaire P, Vesque C, Schmitt J, Stunnenberg H, Frank R, Charnay P (1990) The serum-inducible mouse gene *Krox-24* encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 10:3456-3467.
- Lemaire V, Deminiere JM, Mormede P (1994) Chronic social stress conditions differentially modify vulnerability to amphetamine self-administration. *Brain Res* 649:348-352.
- Letchworth SR, Sexton T, Childers SR, Vrana KE, Vaughan RA, Davies HM, Porrino LJ (1999) Regulation of rat dopamine transporter mRNA and protein by chronic cocaine administration. *J Neurochem* 73:1982-1989.
- Levesque D, Martres MP, Diaz J, Griffon N, Lammers CH, Sokoloff P, Schwartz JC (1995) A paradoxical regulation of the dopamine D3 receptor expression suggests the involvement of an anterograde factor from dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1719-1723.
- Levey AI, Hersch SM, Rye DB, Sunahara RK, Niznik HB, Kitt CA, Price DL, Maggio R, Brann MR, Ciliax BJ, *et al.* (1993) Localization of D1 and D2 dopamine receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8861-8865.
- Levine SR, Washington JM, Jefferson MF, Kieran SN, Moen M, Feit H, Welch KM (1987) "Crack" cocaine-associated stroke. *Neurology* 37:1849-1853.
- Lichtenfeld PJ, Rubin DB, Feldman RS (1984) Subarachnoid hemorrhage precipitated by cocaine snorting. *Arch Neurol* 41:223-224.
- Lim RW, Varnum BC, Herschman HR (1987) Cloning of tetradecanoyl phorbol ester-induced 'primary response' sequences and their expression in density-arrested Swiss 3T3 cells and a TPA non-proliferative variant. *Oncogene* 1:263-270.
- Lin CW, Miller TR, Witte DG, Bianchi BR, Stashko M, Manelli AM, Frail DE (1995) Characterization of cloned human dopamine D1 receptor-mediated calcium release in 293 cells. *Mol Pharmacol* 47:131-139.
- Liu Y, Edwards RH (1997) The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci* 20:125-156.
- Loh EA, Roberts DC (1990) Break-points on a progressive ratio schedule reinforced by intravenous cocaine increase following depletion of forebrain serotonin. *Psychopharmacology (Berl)* 101:262-266.
- Lohmann SM, Walter U, Miller PE, Greengard P, De Camilli P (1981) Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:653-657.
- Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR (1997) Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22:307-312.
- Loland CJ, Norregaard L, Litman T, Gether U (2002) Generation of an activating Zn(2+) switch in the dopamine transporter: mutation of an intracellular tyrosine constitutively alters the conformational equilibrium of the transport cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1683-1688.
- Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Pheno Reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Lanahan AA, Worley PF (1995) Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433-445.

M

- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- Mack K, Day M, Milbrandt J, Gottlieb DI (1990) Localization of the NGFI-A protein in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 8:177-180.
- Mack KJ, Cortner J, Mack P, Farnham PJ (1992) krox 20 messenger RNA and protein expression in the adult central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 14:117-123.
- Mages HW, Stamminger T, Rilke O, Bravo R, Kroczeck RA (1993) Expression of PILOT, a putative transcription factor, requires two signals and is cyclosporin A sensitive in T cells. *Int Immunol* 5:63-70.
- Mailleux P, Zhang F, Vanderhaeghen JJ (1992) The dopamine D1 receptor antagonist SCH-23390 decreases the mRNA levels of the transcription factor zif268 (krox-24) in adult rat intact striatum--an in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 147:182-184.
- Maisonneuve IM, Keller RW, Glick SD (1990) Similar effects of D-amphetamine and cocaine on extracellular dopamine levels in medial prefrontal cortex of rats. *Brain Res* 535:221-226.
- Malva JO, Ambrosio AF, Cunha RA, Ribeiro JA, Carvalho AP, Carvalho CM (1995) A functionally active presynaptic high-affinity kainate receptor in the rat hippocampal CA3 subregion. *Neurosci Lett* 185:83-86.
- Mao L, Wang JQ (2002) Activation of metabotropic glutamate receptor mediates upregulation of transcription factor mRNA expression in rat striatum induced by acute administration of amphetamine. *Brain Res* 924:167-175.
- Martin JL, Magistretti PJ (1998) Regulation of gene expression by neurotransmitters in the central nervous system. *Eur Neurol* 39:129-134.
- Martin-Iverson MT, Szostak C, Fibiger HC (1986) 6-Hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex fail to influence intravenous self-administration of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* 88:310-314.
- Masserano JM, Baker I, Natsukari N, Wyatt RJ (1996) Chronic cocaine administration increases tyrosine hydroxylase activity in the ventral tegmental area through glutaminergic- and dopaminergic D2-receptor mechanisms. *Neurosci Lett* 217:73-76.
- Matheny C, Day ML, Milbrandt J (1994) The nuclear localization signal of NGFI-A is located within the zinc finger DNA binding domain. *J Biol Chem* 269:8176-8181.
- Matsuoka I, Giuli G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaen G, Hanoune J (1992) Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by in situ hybridization: comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci* 12:3350-3360.
- McMahon SB, Monroe JG (1995) A ternary complex factor-dependent mechanism mediates induction of *egr-1* through selective serum response elements following antigen receptor cross-linking in B lymphocytes. *Mol Cell Biol* 15:1086-1093.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Bunzow JR, Van Tol HH, Watson SJ, Jr., Civelli O (1989) Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7625-7628.
- Meador-Woodruff JH, Mansour A, Grandy DK, Damask SP, Civelli O, Watson SJ, Jr. (1992) Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci Lett* 145:209-212.
- Mechta-Grigoriou F, Garel S, Charnay P (2000) Nab proteins mediate a negative feedback loop controlling Krox-20 activity in the developing hindbrain. *Development* 127:119-128.
- Mello CV, Vicario DS, Clayton DF (1992) Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6818-6822.
- Memo M, Pradhan S, Hanbauer I (1981) Cocaine-induced supersensitivity of striatal dopamine receptors: role of endogenous calmodulin. *Neuropharmacology* 20:1145-1150.
- Meriney SD, Gray DB, Pilar GR (1994) Somatostatin-induced inhibition of neuronal Ca²⁺ current modulated by cGMP-dependent protein kinase. *Nature* 369:336-339.
- Middendorff R, Maronde E, Paust HJ, Muller D, Davidoff M, Olcese J (1996) Expression of C-type natriuretic peptide in the bovine pineal gland. *J Neurochem* 67:517-524.
- Milbrandt J (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238:797-799.
- Miller J, McLachlan AD, Klug A (1985) Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *Embo J* 4:1609-1614.
- Miralles CP, Li M, Mehta AK, Khan ZU, De Blas AL (1999) Immunocytochemical localization of the beta(3) subunit of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor in the rat brain. *J Comp Neurol* 413:535-548.
- Misgeld U, Bijak M, Jarolimek W (1995) A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:423-462.

- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Miyashita Y, Kameyama M, Hasegawa II, Fukushima T (1998) Consolidation of Visual Associative Long-Term Memory in the Temporal Cortex of Primates. *Neurobiol Learn Mem* 70:197-211.
- Mogenson GJ, Nielsen MA (1983) Evidence that an accumbens to subpallidal GABAergic projection contributes to locomotor activity. *Brain Res Bull* 11:309-314.
- Mogenson GJ, Yang CR, Yim CY (1988) Influence of dopamine on limbic inputs to the nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci* 537:86-100.
- Molinoff PB, Axelrod J (1971) Biochemistry of catecholamines. *Annu Rev Biochem* 40:465-500.
- Monsma FJ, Jr., McVittie LD, Gerfen CR, Mahan LC, Sibley DR (1989) Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* 342:926-929.
- Monsma FJ, Jr., Mahan LC, McVittie LD, Gerfen CR, Sibley DR (1990) Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6723-6727.
- Montkowski A, Jahn H, Strohle A, Poettig M, Holsboer F, Wiedemann K (1998) C-type natriuretic peptide exerts effects opposing those of atrial natriuretic peptide on anxiety-related behaviour in rats. *Brain Res* 792:358-360.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J Neurosci* 12:2609-2622.
- Moratalla R, Xu M, Tonegawa S, Graybiel AM (1996a) Cellular responses to psychomotor stimulant and neuroleptic drugs are abnormal in mice lacking the D1 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14928-14933.
- Moratalla R, Vallejo M, Elibol B, Graybiel AM (1996b) D1-class dopamine receptors influence cocaine-induced persistent expression of Fos-related proteins in striatum. *Neuroreport* 8:1-5.
- Morgan IG, Wolfe LS, Mandel P, Gombos G (1971) Isolation of plasma membranes from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 241:737-751.
- Morinobu S, Strausbaugh H, Terwilliger R, Duman RS (1997) Regulation of c-Fos and NGF1-A by antidepressant treatments. *Synapse* 25:313-320.
- Morris ME, Viswanathan N, Kuhlman S, Davis FC, Weitz CJ (1998) A screen for genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. *Science* 279:1544-1547.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381:245-248.
- Mulder AB, Hodenprijl MG, Lopes da Silva FH (1998) Electrophysiology of the hippocampal and amygdaloid projections to the nucleus accumbens of the rat: convergence, segregation, and interaction of inputs. *J Neurosci* 18:5095-5102.
- Munoz A, DeFelipe J, Jones EG (2001) Patterns of GABA(B)R1a,b receptor gene expression in monkey and human visual cortex. *Cereb Cortex* 11:104-113.
- Murphy TH, Worley PF, Baraban JM (1991) L-type voltage-sensitive calcium channels mediate synaptic activation of immediate early genes. *Neuron* 7:625-635.

N

- Nader MA, Daunais JB, Moore T, Nader SH, Moore RJ, Smith HR, Friedman DP, Porrino LJ (2002) Effects of cocaine self-administration on striatal dopamine systems in rhesus monkeys: initial and chronic exposure. *Neuropsychopharmacology* 27:35-46.
- Nagai T, McGeer PL, McGeer EG (1983) Distribution of GABA-T-intensive neurons in the rat forebrain and midbrain. *J Comp Neurol* 218:220-238.
- Nakao S, Miyamoto E, Masuzawa M, Kambara T, Shingu K (2002) Ketamine-induced c-Fos expression in the mouse posterior cingulate and retrosplenial cortices is mediated not only via NMDA receptors but also via sigma receptors. *Brain Res* 926:191-196.
- Nakao S, Arai T, Mori K, Yasuhara O, Tooyama I, Kimura H (1993) High-dose ketamine does not induce c-Fos protein expression in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 151:33-36.
- Nauta WJ, Smith GP, Faull RL, Domesick VB (1978) Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience* 3:385-401.
- Nei K, Matsuyama S, Shuntoh H, Tanaka C (1996) NMDA receptor activation induces glutamate release through nitric oxide synthesis in guinea pig dentate gyrus. *Brain Res* 728:105-110.
- Neisewander JL, O'Dell LE, Redmond JC (1995) Localization of dopamine receptor subtypes occupied by intra-accumbens antagonists that reverse cocaine-induced locomotion. *Brain Res* 671:201-212.

- Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1990) Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett* 269:181-184.
- Ng TK, Yung KK (2000) Distinct cellular distribution of GABA(B)R1 and GABA(A)alpha1 receptor immunoreactivity in the rat substantia nigra. *Neuroscience* 99:65-76.
- Ng TK, Yung KK (2001) Differential expression of GABA(B)R1 and GABA(B)R2 receptor immunoreactivity in neurochemically identified neurons of the rat neostriatum. *J Comp Neurol* 433:458-470.
- Nicholson LF, Faull RL, Waldvogel HJ, Dragunow M (1992) The regional, cellular and subcellular localization of GABAA/benzodiazepine receptors in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* 50:355-370.
- Nielsen JA, Chapin DS, Moore KE (1983) Differential effects of d-amphetamine, beta-phenylethylamine, cocaine and methylphenidate on the rate of dopamine synthesis in terminals of nigrostriatal and mesolimbic neurons and on the efflux of dopamine metabolites into cerebroventricular perfusates of rats. *Life Sci* 33:1899-1907.
- Nieoullon A (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog Neurobiol* 67:53-83.
- Nieoullon A, Kerkerian-Le Goff L (1992) Cellular interactions in the striatum involving neuronal systems using "classical" neurotransmitters: possible functional implications. *Mov Disord* 7:311-325.

O

- Oades RD, Taghzouti K, Rivet JM, Simon H, Le Moal M (1986) Locomotor activity in relation to dopamine and noradrenaline in the nucleus accumbens, septal and frontal areas: a 6-hydroxydopamine study. *Neuropsychobiology* 16:37-42.
- O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, Baraban JM (1999) The EGR family of transcription-regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci* 22:167-173.
- Oertel WH, Mugnaini E (1984) Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci Lett* 47:233-238.
- Olds J, Milner P (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other region of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47:419-427.
- Olney JW (1994) Neurotoxicity of NMDA receptor antagonists: an overview. *Psychopharmacol Bull* 30:533-540.
- Olsen RW, Szamraj O, Houser CR (1987) [³H]AMPA binding to glutamate receptor subpopulations in rat brain. *Brain Res* 402:243-254.
- O'Malley KL, Harmon S, Tang L, Todd RD (1992) The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene structure, and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol* 4:137-146.
- Onali P, Olanas MC (1989) Involvement of adenylate cyclase inhibition in dopamine autoreceptor regulation of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *Neurosci Lett* 102:91-96.
- Orsini C, Izzo E, Koob GF, Pulvirenti L (2002) Blockade of nitric oxide synthesis reduces responding for cocaine self-administration during extinction and reinstatement. *Brain Res* 925:133-140.
- Otani S, Blond O, Desce JM, Crepel F (1998) Dopamine facilitates long-term depression of glutamatergic transmission in rat prefrontal cortex. *Neuroscience* 85:669-676.
- Otani S, Auclair N, Desce JM, Roisin MP, Crepel F (1999) Dopamine receptors and groups I and II mGluRs cooperate for long-term depression induction in rat prefrontal cortex through converging postsynaptic activation of MAP kinases. *J Neurosci* 19:9788-9802.
- Ozawa S, Iino M (1993) Two distinct types of AMPA responses in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 155:187-190.

P

- Pain L, Gobaille S, Schlee C, Aunis D, Oberling P (2002) In vivo dopamine measurements in the nucleus accumbens after nonanesthetic and anesthetic doses of propofol in rats. *Anesth Analg* 95:915-919.
- Pan WH, Chen NH, Tsai FY, Liao HY (1996) Intrategmental infusion of cocaine decreases dopamine release and enhances norepinephrine release in the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 317:205-213.
- Pascual-Leone A, Dhuna A, Anderson DC (1991) Cerebral atrophy in habitual cocaine abusers: a planimetric CT study. *Neurology* 41:34-38.

- Patwardhan S, Gashler A, Siegel MG, Chang LC, Joseph LJ, Shows TB, Le Beau MM, Sukhatme VP (1991) EGR3, a novel member of the Egr family of genes encoding immediate-early transcription factors. *Oncogene* 6:917-928.
- Paxinos G, Watson C (1997) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 3rd Edn Edition. Orlando: Academic Press.
- Pfaff T, Malitschek B, Kaupmann K, Prezeau L, Pin JP, Bettler B, Karschin A (1999) Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA(B)R1 receptor. *Eur J Neurosci* 11:2874-2882.
- Piazza PV, Maccari S, Deminiere JM, Le Moal M, Mormede P, Simon H (1991) Corticosterone levels determine individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2088-2092.
- Pierce RC, Kalivas PW (1997) Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *J Neurosci* 17:3254-3261.
- Pifl C, Giros B, Caron MG (1993) Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurosci* 13:4246-4253.
- Pifl C, Drobny H, Reither H, Hornykiewicz O, Singer EA (1995) Mechanism of the dopamine-releasing actions of amphetamine and cocaine: plasmalemmal dopamine transporter versus vesicular monoamine transporter. *Mol Pharmacol* 47:368-373.
- Pilla M, Perachon S, Sautel F, Garrido F, Mann A, Wermuth CG, Schwartz JC, Everitt BJ, Sokoloff P (1999) Selective inhibition of cocaine-seeking behaviour by a partial dopamine D3 receptor agonist. *Nature* 400:371-375.
- Pilz RB, Suhasini M, Idriss S, Meinkoth JL, Boss GR (1995) Nitric oxide and cGMP analogs activate transcription from AP-1-responsive promoters in mammalian cells. *Faseb J* 9:552-558.
- Pin JP, Duvoisin R (1995) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Piomelli D, Pilon C, Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JC (1991) Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism. *Nature* 353:164-167.
- Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101:815-850.
- Pitts DK, Marwah J (1987) Neuropharmacology of cocaine: role of monoaminergic systems. *Monogr Neural Sci* 13:34-54.
- Post RM, Weiss SR, Pert A (1987) The role of context and conditioning in behavioral sensitization to cocaine. *Psychopharmacol Bull* 23:425-429.
- Potter LR, Hunter T (1998) Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. *J Biol Chem* 273:15533-15539.
- Potter LR, Hunter T (2000) Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. *J Biol Chem* 275:31099-31106.
- Pouwels HM, Smeets JL, Cheriex EC, Wouters EF (1990) Pulmonary hypertension and fenfluramine. *Eur Respir J* 3:606-607.
- Pudiak CM, Bozarth MA (2002) The effect of nitric oxide synthesis inhibition on intravenous cocaine self-administration. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26: 189-196.
- Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM (1995) Cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase is targeted to intermediate filaments and phosphorylates vimentin in A23187-stimulated human neutrophils. *Blood* 85:222-230.

R

- Raiteri M, Garrone B, Pittaluga A (1992) N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and non-NMDA receptors regulating hippocampal norepinephrine release. II. Evidence for functional cooperation and for coexistence on the same axon terminal. *J Pharmacol Exp Ther* 260:238-242.
- Rappaport MS, Sealson SC, Prikhozhan A, Huntley GW, Morrison JH (1993) Heterogeneous distribution of D1, D2 and D5 receptor mRNAs in monkey striatum. *Brain Res* 616:242-250.
- Ratnakumari L, Hemmings HC, Jr. (1996) Inhibition by propofol of [³H]-batrachotoxinin-A 20-alpha-benzoate binding to voltage-dependent sodium channels in rat cortical synaptosomes. *Br J Pharmacol* 119:1498-1504.
- Reith ME, Sershen H, Allen DL, Lajtha A (1983) A portion of [³H]cocaine binding in brain is associated with serotonergic neurons. *Mol Pharmacol* 23:600-606.

- Reith ME, Meisler BE, Sershen H, Lajtha A (1986) Structural requirements for cocaine congeners to interact with dopamine and serotonin uptake sites in mouse brain and to induce stereotyped behavior. *Biochem Pharmacol* 35:1123-1129.
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237:1219-1223.
- Robbins TW, Everitt BJ (1996) Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Curr Opin Neurobiol* 6:228-236.
- Roberts DC (1993) Self-administration of GBR 12909 on a fixed ratio and progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 111:202-206.
- Roberts DC, Koob GF (1982) Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 17:901-904.
- Roberts DC, Koob GF, Klonoff P, Fibiger HC (1980) Extinction and recovery of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 12:781-787.
- Robertson HA (1992) Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 15:201-206.
- Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11:1598-1604.
- Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, Miller GW, Caron MG (1998) Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci* 1:132-137.
- Rodriguez M, Gonzalez-Hernandez T (1999) Electrophysiological and morphological evidence for a GABAergic nigrostriatal pathway. *J Neurosci* 19:4682-4694.
- Rodriguez-Pallares J, Labandeira-Garcia JL, Munoz A, Caruncho HJ (2000) Morphology and neurochemistry of two striatal neuronal subtypes expressing the GABA(A) receptor alpha3-subunit in the rat. *Brain Res* 876:124-130.
- Rodriguez-Pascual F, Miras-Portugal MT, Torres M (1996) Effect of cyclic GMP-increasing agents nitric oxide and C-type natriuretic peptide on bovine chromaffin cell function: inhibitory role mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Mol Pharmacol* 49:1058-1070.
- Rodriguez-Pascual F, Ferrero R, Miras-Portugal MT, Torres M (1999) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cGMP-dependent protein kinase in intact bovine chromaffin cells. *Arch Biochem Biophys* 366:207-214.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav Neural Biol* 59:49-56.
- Rosenzweig A, Seidman CE (1991) Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem* 60:229-255.
- Roskoski R, Jr., Vulliet PR, Glass DB (1987) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 48:840-845.
- Ross SB, Renyi AL (1969) Inhibition of the uptake of tritiated 5-hydroxytryptamine in brain tissue. *Eur J Pharmacol* 7:270-277.
- Rouse ST, Marino MJ, Bradley SR, Awad H, Wittmann M, Conn PJ (2000) Distribution and roles of metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit: implications for treatment of Parkinson's disease and related disorders. *Pharmacol Ther* 88:427-435.
- Ruberte E, Dolle P, Krust A, Zelent A, Morriss-Kay G, Chambon P (1990) Specific spatial and temporal distribution of retinoic acid receptor gamma transcripts during mouse embryogenesis. *Development* 108:213-222.
- Russo MW, Matheny C, Milbrandt J (1993) Transcriptional activity of the zinc finger protein NGFI-A is influenced by its interaction with a cellular factor. *Mol Cell Biol* 13:6858-6865.
- Russo MW, Severson BR, Milbrandt J (1995) Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6873-6877.

S

- Sakamoto KM, Fraser JK, Lee HJ, Lehman E, Gasson JC (1994) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 signaling pathways converge on the CREB-binding site in the human *egr-1* promoter. *Mol Cell Biol* 14:5975-5985.
- Sakamoto KM, Bardeleben C, Yates KE, Raines MA, Golde DW, Gasson JC (1991) 5' upstream sequence and genomic structure of the human primary response gene, *EGR-1/TIS8*. *Oncogene* 6:867-871.

- Sakamoto KM, Nimer Sd, Rosenblatt JD, Gasson JC (1992) HTLV-I and HTLV-II tax trans-activate the human EGR-1 promoter through different cis-acting sequences. *Oncogene* 7:2125-2130.
- Samson WK, Skala KD, Huang FL (1991) CNP-22 stimulates, rather than inhibits, water drinking in the rat: evidence for a unique biological action of the C-type natriuretic peptides. *Brain Res* 568:285-288.
- Samson WK, Huang FL, Fulton RJ (1993) C-type natriuretic peptide mediates the hypothalamic actions of the natriuretic peptides to inhibit luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 132:504-509.
- Sandberg M, Natarajan V, Ronander I, Kalderon D, Walter U, Lohmann SM, Jahnsen T (1989) Molecular cloning and predicted full-length amino acid sequence of the type I beta isozyme of cGMP-dependent protein kinase from human placenta. Tissue distribution and developmental changes in rat. *FEBS Lett* 255:321-329.
- Sanna E, Mascia MP, Klein RL, Whiting PJ, Biggio G, Harris RA (1995) Actions of the general anesthetic propofol on recombinant human GABAA receptors: influence of receptor subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 274:353-360.
- Saper CB, Standaert DG, Currie MG, Schwartz D, Geller DM, Needleman P (1985) Atriopeptin-immunoreactive neurons in the brain: presence in cardiovascular regulatory areas. *Science* 227:1047-1049.
- Sar M, Stumpf WE, Miller RJ, Chang KJ, Cuatrecasas P (1978) Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J Comp Neurol* 182:17-37.
- Sarcevic B, Brookes V, Martin TJ, Kemp BE, Robinson PJ (1989) Atrial natriuretic peptide-dependent phosphorylation of smooth muscle cell particulate fraction proteins is mediated by cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 264:20648-20654.
- Sassone-Corsi P, Sisson JC, Verma IM (1988) Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene fos. *Nature* 334:314-319.
- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1991) D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251:947-950.
- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1994) The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *J Neurophysiol* 71:515-528.
- Scahill L, Lynch K (1994) The use of methylphenidate in children with attention-deficit hyperactivity disorder. *J Child Adolesc Psychiatr Nurs* 7:44-47.
- Scarponi M, Bernardi G, Mercuri NB (1999) Electrophysiological evidence for a reciprocal interaction between amphetamine and cocaine-related drugs on rat midbrain dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 11:593-598.
- Scheel-Krüger J, Braestrup C, Nielson M, Golembiowska K, Mogilnicka E (1987) Cocaine: Discussion on the role of Dopamine in the biochemical mechanism of action., Plenum Press Edition. New-York: Ed by E.H. Ellinwood, Jr. et M.M. Kilbey.
- Schinelli S, Paolillo M, Corona GL (1994) Opposing actions of D1- and D2-dopamine receptors on arachidonic acid release and cyclic AMP production in striatal neurons. *J Neurochem* 62:944-949.
- Schlingensiepen KH, Luno K, Brysch W (1991) High basal expression of the zif/268 immediate early gene in cortical layers IV and VI, in CA1 and in the corpus striatum--an in situ hybridization study. *Neurosci Lett* 122:67-70.
- Schmidt HH, Lohmann SM, Walter U (1993) The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* 1178:153-175.
- Schneider-Maunoury S, Topilko P, Seitandou T, Levi G, Cohen-Tannoudji M, Pournin S, Babinet C, Charnay P (1993) Disruption of Krox-20 results in alteration of rhombomeres 3 and 5 in the developing hindbrain. *Cell* 75:1199-1214.
- Schulte D, Callado LF, Davidson C, Phillips PE, Roewer N, Schulte am Esch J, Stamford JA (2000) Propofol decreases stimulated dopamine release in the rat nucleus accumbens by a mechanism independent of dopamine D2, GABAA and NMDA receptors. *Br J Anaesth* 84:250-253.
- Schultz G, Bohme E, Munske K (1969) Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sci* 8:1323-1332.
- Schultz W, Apicella P, Ljungberg T (1993) Responses of monkey dopamine neurons to reward and conditioned stimuli during successive steps of learning a delayed response task. *J Neurosci* 13:900-913.
- Schwarz DA, Barry G, Eliasof SD, Petroski RE, Conlon PJ, Maki RA (2000) Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor. *J Biol Chem* 275:32174-32181.

- Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G (2001) Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol* 433:526-549.
- Seabrook GR, Knowles M, Brown N, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman SB, McAllister G (1994a) Pharmacology of high-threshold calcium currents in GH4C1 pituitary cells and their regulation by activation of human D2 and D4 dopamine receptors. *Br J Pharmacol* 112:728-734.
- Seabrook GR, McAllister G, Knowles MR, Myers J, Sinclair H, Patel S, Freedman SB, Kemp JA (1994b) Depression of high-threshold calcium currents by activation of human D2 (short) dopamine receptors expressed in differentiated NG108-15 cells. *Br J Pharmacol* 111:1061-1066.
- Seamans JK, Durstewitz D, Christie BR, Stevens CF, Sejnowski TJ (2001) Dopamine D1/D5 receptor modulation of excitatory synaptic inputs to layer V prefrontal cortex neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:301-306.
- Seiden LS, Commins DL, Vosmer G, Axt K, Marek G (1988) Neurotoxicity in dopamine and 5-hydroxytryptamine terminal fields: a regional analysis in nigrostriatal and mesolimbic projections. *Ann N Y Acad Sci* 537:161-172.
- Seiden LS, Woolverton WL, Lorens SA, Williams JE, Corwin RL, Hata N, Olinski M (1993) Behavioral consequences of partial monoamine depletion in the CNS after methamphetamine-like drugs: the conflict between pharmacology and toxicology. *NIDA Res Monogr* 136:34-46; discussion 46-52.
- Svetsov BR, Svaren J, Milbrandt J (2000) A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* 275:9749-9757.
- Sheng M, McFadden G, Greenberg ME (1990) Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* 4:571-582.
- Sheng ZH, Zhang H, Barchi RL, Kallen RG (1994) Molecular cloning and functional analysis of the promoter of rat skeletal muscle voltage-sensitive sodium channel subtype 2 (rSkM2): evidence for muscle-specific nuclear protein binding to the core promoter. *DNA Cell Biol* 13:9-23.
- Shimada S, Kitayama S, Walther D, Uhl G (1992) Dopamine transporter mRNA: dense expression in ventral midbrain neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 13:359-362.
- Shirayama Y, Hashimoto K, Iyo M, Watanabe K, Higuchi T, Minabe Y (2000) 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy)-induced egr-1 mRNA in rat brain: pharmacological manipulation. *Eur J Pharmacol* 402:215-222.
- Shoib M, Swanner LS, Beyer CE, Goldberg SR, Schindler CW (1998) The GABAB agonist baclofen modifies cocaine self-administration in rats. *Behav Pharmacol* 9:195-206.
- Shyr MH, Tsai TH, Yang CH, Chen HM, Ng HF, Tan PP (1997) Propofol anesthesia increases dopamine and serotonin activities at the somatosensory cortex in rats: a microdialysis study. *Anesth Analg* 84:1344-1348.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoyer H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int* 34:379-385.
- Sills MA, Nguyen KQ, Jacobowitz DM (1985) Increases in heart rate and blood pressure produced by microinjections of atrial natriuretic factor into the AV3V region of rat brain. *Peptides* 6:1037-1042.
- Silva MT, Rose S, Hindmarsh JG, Aislaitner G, Gorrod JW, Moore PK, Jenner P, Marsden CD (1995) Increased striatal dopamine efflux in vivo following inhibition of cerebral nitric oxide synthase by the novel monosodium salt of 7-nitro indazole. *Br J Pharmacol* 114:257-258.
- Simon H, Scatton B, Moal ML (1980) Dopaminergic A10 neurones are involved in cognitive functions. *Nature* 286:150-151.
- Simon H, Taghzouti K, Le Moal M (1986) Deficits in spatial-memory tasks following lesions of septal dopaminergic terminals in the rat. *Behav Brain Res* 19:7-16.
- Simpson CS, Morris BJ (1995) Induction of c-fos and zif/268 gene expression in rat striatal neurons, following stimulation of D1-like dopamine receptors, involves protein kinase A and protein kinase C. *Neuroscience* 68:97-106.
- Sinnott RS, Nader MA (2001) Modulation of cocaine's discriminative stimulus effects by dopamine D(1) agonists in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 68:301-309.
- Smiley JF, Williams SM, Szigeti K, Goldman-Rakic PS (1992) Light and electron microscopic characterization of dopamine-immunoreactive axons in human cerebral cortex. *J Comp Neurol* 321:325-335.
- Smith Y, Parent A (1986) Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res* 372:241-252.

- Smith Y, Bolam JP (1989) Neurons of the substantia nigra reticulata receive a dense GABA-containing input from the globus pallidus in the rat. *Brain Res* 493:160-167.
- Smith Y, Kieval J, Couceyro PR, Kuhar MJ (1999) CART peptide-immunoreactive neurones in the nucleus accumbens in monkeys: ultrastructural analysis, colocalization studies, and synaptic interactions with dopaminergic afferents. *J Comp Neurol* 407:491-511.
- Snyder GL, Fienberg AA, Hagan RL, Greengard P (1998) A dopamine/D1 receptor/protein kinase A/dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein (Mr 32 kDa)/protein phosphatase-1 pathway regulates dephosphorylation of the NMDA receptor. *J Neurosci* 18:10297-10303.
- Snyder GL, Girault JA, Chen JY, Czernik AJ, Keibian JW, Nathanson JA, Greengard P (1992) Phosphorylation of DARPP-32 and protein phosphatase inhibitor-1 in rat choroid plexus: regulation by factors other than dopamine. *J Neurosci* 12:3071-3083.
- Sokoloff P, Schwartz JC (1995) Novel dopamine receptors half a decade later. *Trends Pharmacol Sci* 16:270-275.
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347:146-151.
- Sonders MS, Zhu SJ, Zahniser NR, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Multiple ionic conductances of the human dopamine transporter: the actions of dopamine and psychostimulants. *J Neurosci* 17:960-974.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, Li XF, Wei HB, Wichems C, Lesch KP, Murphy DL, Uhl GR (2001) Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5300-5305.
- Spano PF, Trabucchi M, Di Chiara G (1977) Localization of nigral dopamine-sensitive adenylate cyclase on neurons originating from the corpus striatum. *Science* 196: 1343-1345.
- Spealman RD, Bergman J, Rosenzweig-Lipson S (1997) Differential modulation of behavioral effects of cocaine by low- and high-efficacy D1 agonists. *Psychopharmacology (Berl)* 133:283-292.
- Spurr AR (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res* 26:31-43.
- Standaert DG, Needleman P, Saper CB (1986) Organization of atriopeptin-like immunoreactive neurons in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 253:315-341.
- Standaert DG, Cechetto DF, Needleman P, Saper CB (1987) Inhibition of the firing of vasopressin neurons by atriopeptin. *Nature* 329:151-153.
- Steward O (1997) mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* 18:9-12.
- Sucher NJ, Awobuluyi M, Choi YB, Lipton SA (1996) NMDA receptors: from genes to channels. *Trends Pharmacol Sci* 17:348-355.
- Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H (1988) A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 332:78-81.
- Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H (1990) C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 168:863-870.
- Sukhatme VP, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG, Tsai-Morris CH (1987) A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Res* 1:343-355.
- Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T, *et al.* (1988) A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. *Cell* 53:37-43.
- Sunahara RK, Niznik HB, Weiner DM, Stormann TM, Brann MR, Kennedy JL, Gelernter JE, Rozmahel R, Yang YL, Israel Y, *et al.* (1990) Human dopamine D1 receptor encoded by an intronless gene on chromosome 5. *Nature* 347:80-83.
- Surmeier DJ, Vargas J, Hemmings HC, Jr., Nairn AC, Greengard P (1995) Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron* 14:385-397.
- Svaren J, Sevetson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J (1996) NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 16:3545-3553.
- Svenningsson P, Nomikos GG, Ongini E, Fredholm BB (1997) Antagonism of adenosine A2A receptors underlies the behavioural activating effect of caffeine and is associated with reduced expression of messenger RNA for NGFI-A and NGFI-B in caudate-putamen and nucleus accumbens. *Neuroscience* 79:753-764.

Swirnowoff AH, Apel ED, Svaren J, Sevetson BR, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J (1998) Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* 18:512-524.

T

- Taber MT, Fibiger HC (1995) Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases dopamine release in the nucleus accumbens of the rat: modulation by metabotropic glutamate receptors. *J Neurosci* 15:3896-3904.
- Taepavarapruk P, Floresco SB, Phillips AG (2000) Hyperlocomotion and increased dopamine efflux in the rat nucleus accumbens evoked by electrical stimulation of the ventral subiculum: role of ionotropic glutamate and dopamine D1 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 151:242-251.
- Takekoshi K, Ishii K, Isobe K, Nomura F, Nammoku T, Nakai T (2000) Effects of natriuretic peptides (ANP, BNP, CNP) on catecholamine synthesis and TH mRNA levels in PC12 cells. *Life Sci* 66:PL303-311.
- Tanda G, Pontieri FE, Frau R, Di Chiara G (1997) Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur J Neurosci* 9:2077-2085.
- Tarazi FI, Baldessarini RJ (1999) Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *J Neurosci Res* 55:401-410.
- Tegge W, Frank R, Hofmann F, Dostmann WR (1995) Determination of cyclic nucleotide-dependent protein kinase substrate specificity by the use of peptide libraries on cellulose paper. *Biochemistry* 34:10569-10577.
- Thiriet N, Aunis D, Zwiller J (2000) C-fos and egr-1 immediate-early gene induction by cocaine and cocaethylene in rat brain: a comparative study. *Ann N Y Acad Sci* 914:46-57.
- Thiriet N, Zwiller J, Ali SF (2001) Induction of the immediate early genes egr-1 and c-fos by methamphetamine in mouse brain. *Brain Res* 919:31-40.
- Thiriet N, Aunis D, Zwiller J (2002) The nitric oxide releasing agent sodium nitroprusside modulates cocaine-induced immediate early gene expression in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 965:47-54.
- Thiriet N, Esteve L, Aunis D, Zwiller J (1997) Immediate early gene induction by natriuretic peptides in PC12 pheochromocytoma and C6 glioma cells. *Neuroreport* 8:399-402.
- Thiriet N, Humblot N, Burgun C, Aunis D, Zwiller J (1998) Cocaine and fluoxetine induce the expression of the hVH-5 gene encoding a MAP kinase phosphatase. *Brain Res Mol Brain Res* 62:150-157.
- Tiberi M, Jarvie KR, Silvia C, Falardeau P, Gingrich JA, Godinot N, Bertrand L, Yang-Feng TL, Fremeau RT, Jr., Caron MG (1991) Cloning, molecular characterization, and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7491-7495.
- Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371:796-799.
- Torres G, Rivier C (1993) Cocaine-induced expression of striatal c-fos in the rat is inhibited by NMDA receptor antagonists. *Brain Res Bull* 30:173-176.
- Tourtellotte WG, Milbrandt J (1998) Sensory ataxia and muscle spindle agenesis in mice lacking the transcription factor Egr3. *Nat Genet* 20:87-91.
- Tourtellotte WG, Keller-Peck C, Milbrandt J, Kucera J (2001) The transcription factor Egr3 modulates sensory axon-myotube interactions during muscle spindle morphogenesis. *Dev Biol* 232:388-399.
- Trabace L, Kendrick KM (2000) Nitric oxide can differentially modulate striatal neurotransmitter concentrations via soluble guanylate cyclase and peroxynitrite formation. *J Neurochem* 75:1664-1674.
- Trapani G, Altomare C, Liso G, Sanna E, Biggio G (2000) Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Curr Med Chem* 7:249-271.
- Treisman R (1992) The serum response element. *Trends Biochem Sci* 17:423-426.
- Tsai-Morris CH, Cao XM, Sukhatme VP (1988) 5' flanking sequence and genomic structure of Egr-1, a murine mitogen inducible zinc finger encoding gene. *Nucleic Acids Res* 16:8835-8846.
- Tsou K, Snyder GL, Greengard P (1993) Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3462-3465.
- Tsutsui M, Yanagihara N, Minami K, Kobayashi H, Nakashima Y, Kuroiwa A, Izumi F (1994) C-type natriuretic peptide stimulates catecholamine synthesis through the accumulation of cyclic GMP in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 268:584-589.

U-V

- Uhler MD (1993) Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* 268:13586-13591.
- Ujike H, Takaki M, Kodama M, Kuroda S (2002) Gene expression related to synaptogenesis, neuritogenesis, and MAP kinase in behavioral sensitization to psychostimulants. *Ann N Y Acad Sci* 965:55-67.
- Undie AS, Friedman E (1990) Stimulation of a dopamine D1 receptor enhances inositol phosphates formation in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 253:987-992.
- Undie AS, Weinstock J, Sarau HM, Friedman E (1994) Evidence for a distinct D1-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J Neurochem* 62:2045-2048.
- Unterwald EM, Fillmore J, Kreek MJ (1996) Chronic repeated cocaine administration increases dopamine D1 receptor-mediated signal transduction. *Eur J Pharmacol* 318:31-35.
- Vaandrager AB, de Jonge HR (1996) Signalling by cGMP-dependent protein kinases. *Mol Cell Biochem* 157:23-30.
- Vaandrager AB, Ehlert EM, Jarchau T, Lohmann SM, de Jonge HR (1996) N-terminal myristoylation is required for membrane localization of cGMP-dependent protein kinase type II. *J Biol Chem* 271:7025-7029.
- Vaandrager AB, Edixhoven M, Bot AG, Kroos MA, Jarchau T, Lohmann S, Genieser HG, de Jonge HR (1997) Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms. *J Biol Chem* 272:11816-11823.
- Vaccarino FM, Hayward MD, Nestler EJ, Duman RS, Tallman JF (1992) Differential induction of immediate early genes by excitatory amino acid receptor types in primary cultures of cortical and striatal neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 12:233-241.
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 20:8701-8709.
- Vallar L, Meldolesi J (1989) Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci* 10:74-77.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O (1991) Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350:610-614.
- Vincent S, Hokfelt T, Christensson I, Terenius L (1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striato-nigral pathway. *Eur J Pharmacol* 85:251-252.
- Voiculescu O, Charnay P, Schneider-Maunoury S (2000) Expression pattern of a Krox-20/Cre knock-in allele in the developing hindbrain, bones, and peripheral nervous system. *Genesis* 26:123-126.
- Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Wang GJ, Logan J, MacGregor R, Dewey SL, Schlyer D, Hitzemann R (1992) Distribution and kinetics of carbon-11-cocaine in the human body measured with PET. *J Nucl Med* 33:521-525.
- Vorel SR, Ashby CR Jr, Paul M, Liu X, Hayes R, Hagan JJ, Middlemiss DN, Stemp G, Gardner EL (2002) Dopamine D3 receptor antagonism inhibits cocaine-seeking and cocaine-enhanced brain reward in rats. *J Neurosci* 22:9595-9603.
- Vuillet J, Kerkerian L, Kachidian P, Bosler O, Nieoullon A (1989) Ultrastructural correlates of functional relationships between nigral dopaminergic or cortical afferent fibers and neuropeptide Y-containing neurons in the rat striatum. *Neurosci Lett* 100:99-104.
- Vyklicky L, Jr., Benveniste M, Mayer ML (1990) Modulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor desensitization by glycine in mouse cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 428:313-331.

W

- Wadzinski BE, Wheat WH, Jaspers S, Peruski LF, Jr., Lickteig RL, Johnson GL, Klemm DJ (1993) Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 13:2822-2834.
- Walaas SI, Aswad DW, Greengard P (1983) A dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain regions. *Nature* 301:69-71.
- Walaas SI, Girault JA, Greengard P (1989) Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat basal ganglia neurons. *J Mol Neurosci* 1:243-250.
- Walton M, Henderson C, Mason-Parker S, Lawlor P, Abraham WC, Bilkey D, Dragunow M (1999) Immediate early gene transcription and synaptic modulation. *J Neurosci Res* 58:96-106.

- Wang J, Yang X, Camporesi C, Yang Z, Bosco G, Chen C, Camporesi E (2002) Propofol reduces infarct size and striatal dopamine accumulation following transient middle cerebral artery occlusion: a microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 452:303.
- Wang JQ, McGinty JF (1996) Acute methamphetamine-induced zif/268, preprodynorphin, and preproenkephalin mRNA expression in rat striatum depends on activation of NMDA and kainate/AMPA receptors. *Brain Res Bull* 39:349-357.
- Wang X, Robinson PJ (1995) Cyclic GMP-dependent protein kinase substrates in rat brain. *J Neurochem* 65:595-604.
- Warner LE, Svaren J, Milbrandt J, Lupski JR (1999) Functional consequences of mutations in the early growth response 2 gene (EGR2) correlate with severity of human myelinopathies. *Hum Mol Genet* 8:1245-1251.
- Waters CM, Hancock DC, Evan GI (1990) Identification and characterisation of the egr-1 gene product as an inducible, short-lived, nuclear phosphoprotein. *Oncogene* 5:669-674.
- Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, Carlsson A (1993) The dopamine D3-receptor: a postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* 94:11-19.
- Wedel BJ, Garbers DL (1997) New insights on the functions of the guanylyl cyclase receptors. *FEBS Lett* 410:29-33.
- Weeks JR (1962) Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science* 138:143-144.
- Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR (1991) D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-1863.
- Weiner N, Molinoff PB (1994) Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspect. In, edited by G.J. Siegel *et al.* Edition, pp 261-281. New-York: Raven Press Ltd.
- Wentholt RJ, Trumpy VA, Zhu WS, Petralia RS (1994) Biochemical and assembly properties of GluR6 and KA2, two members of the kainate receptor family, determined with subunit-specific antibodies. *J Biol Chem* 269:1332-1339.
- Wernet W, Flockerzi V, Hofmann F (1989) The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* 251:191-196.
- West AR, Galloway MP (1996) Intra-striatal infusion of (+/-)-S-nitroso-N-acetylpenicillamine releases vesicular dopamine via an ionotropic glutamate receptor-mediated mechanism: an in vivo microdialysis study in chloral hydrate-anesthetized rats. *J Neurochem* 66:1971-1980.
- West AR, Grace AA (2000) Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. *J Neurophysiol* 83:1796-1808.
- White AA, Aurbach GD (1969) Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. *Biochim Biophys Acta* 191:686-697.
- White FJ, Kalivas PW (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* 51:141-153.
- White FJ, Hu XT, Henry DJ (1993) Electrophysiological effects of cocaine in the rat nucleus accumbens: microiontophoretic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 266:1075-1084.
- White JH, Wise A, Main MJ, Green A, Fraser NJ, Disney GH, Barnes AA, Emson P, Foord SM, Marshall FH (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396:679-682.
- Williams J, Dragunow M, Lawlor P, Mason S, Abraham WC, Leah J, Bravo R, Demmer J, Tate W (1995) Krox20 may play a key role in the stabilization of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 28:87-93.
- Wilson CJ (1993) The generation of natural firing patterns in neostriatal neurons. *Prog Brain Res* 99:277-297.
- Wilson CJ, Groves PM (1980) Fine structure and synaptic connections of the common spiny neuron of the rat neostriatum: a study employing intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 194:599-615.
- Wirtshafter D, Sheppard AC (2001) Localization of GABA(B) receptors in midbrain monoamine containing neurons in the rat. *Brain Res Bull* 56:1-5.
- Wise RA (1984) Neural mechanisms of the reinforcing action of cocaine. *NIDA Res Monogr* 50:15-33.
- Wojak JC, Flamm ES (1987) Intracranial hemorrhage and cocaine use. *Stroke* 18:712-715.
- Wolf ME (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54:679-720.

- Woolverton WL, Kleven MS (1988) Multiple dopamine receptors and the behavioral effects of cocaine. *NIDA Res Monogr* 88:160-184.
- Woolverton WL, Johnson KM (1992) Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13:193-200.
- Worley PF, Christy BA, Nakabeppu Y, Bhat RV, Cole AJ, Baraban JM (1991) Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5106-5110.
- Worley PF, Bhat RV, Baraban JM, Erickson CA, McNaughton BL, Barnes CA (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 13:4776-4786.
- Wortwein G, Mogensen J, Divac I (1994) Retention and relearning of spatial delayed alternation in rats after ablation of the prefrontal or total non-prefrontal isocortex. *Behav Brain Res* 63:127-131.

X-Y-Z

- Xia Z, Dudek H, Miranti CK, Greenberg ME (1996) Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism. *J Neurosci* 16:5425-5436.
- Xu M, Guo Y, Vorhees CV, Zhang J (2000) Behavioral responses to cocaine and amphetamine administration in mice lacking the dopamine D1 receptor. *Brain Res* 852:198-207.
- Yamagata K, Kaufmann WE, Lanahan A, Papapavlou M, Barnes CA, Andreasson KI, Worley PF (1994) Egr3/Pilot, a zinc finger transcription factor, is rapidly regulated by activity in brain neurons and colocalizes with Egr1/zif268. *Learn Mem* 1:140-152.
- Yamakura T, Sakimura K, Shimoji K, Mishina M (1995) Effects of propofol on various AMPA-, kainate- and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 188:187-190.
- Yan C, Zhao AZ, Bentley JK, Beavo JA (1996) The calmodulin-dependent phosphodiesterase gene PDE1C encodes several functionally different splice variants in a tissue-specific manner. *J Biol Chem* 271:25699-25706.
- Yang CR, Mogenson GJ (1984) Electrophysiological responses of neurones in the nucleus accumbens to hippocampal stimulation and the attenuation of the excitatory responses by the mesolimbic dopaminergic system. *Brain Res* 324:69-84.
- Yang Q, Paskind M, Bolger G, Thompson WJ, Repaske DR, Cutler LS, Epstein PM (1994) A novel cyclic GMP stimulated phosphodiesterase from rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 205:1850-1858.
- Yim CY, Mogenson GJ (1982) Response of nucleus accumbens neurons to amygdala stimulation and its modification by dopamine. *Brain Res* 239:401-415.
- Yoshida K, Stein RB (1999) Characterization of signals and noise rejection with bipolar longitudinal intrafascicular electrodes. *IEEE Trans Biomed Eng* 46:226-234.
- Yung KK, Ng TK, Wong CK (1999) Subpopulations of neurons in the rat neostriatum display GABABR1 receptor immunoreactivity. *Brain Res* 830:345-352.
- Zacny JP, Lichtor JL, Thompson W, Apfelbaum JL (1993a) Propofol at a subanesthetic dose may have abuse potential in healthy volunteers. *Anesth Analg* 77:544-552.
- Zacny JP, Lichtor JL, Zaragoza JG, Coalson DW, Uitvlugt AM, Flemming DC, Binstock WB, Cutter T, Apfelbaum JL (1993b) Assessing the behavioral effects and abuse potential of propofol bolus injections in healthy volunteers. *Drug Alcohol Depend* 32:45-57.
- Zahm D (2000), An integrative neuroanatomical perspective on some subcortical substrates of adaptive responding with emphasis on the nucleus accumbens. *Neurosci Biobehav rev* 24: 85-105.
- Zhang D, Pan ZH, Zhang X, Brideau AD, Lipton SA (1995) Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxin channel block. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11756-11760.
- Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O (1990) Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347:76-80.
- Zhu SJ, Kavanaugh MP, Sonders MS, Amara SG, Zahniser NR (1997) Activation of protein kinase C inhibits uptake, currents and binding associated with the human dopamine transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1358-1365.
- Zhuo M, Hu Y, Schultz C, Kandel ER, Hawkins RD (1994) Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* 368:635-639.
- Zigmond RE, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* 12:415-461.
- Zipfel PF, Decker EL, Holst C, Skerka C (1997) The human zinc finger protein EGR-4 acts as autoregulatory transcriptional repressor. *Biochim Biophys Acta* 1354:134-144.

Zorad S, Tsutsumi K, Saavedra JM (1992) Selective localization of C atrial natriuretic peptide receptors in the rat brain. *Brain Res* 570:149-153.

RÉSUMÉS

Régulations de l'expression du gène *egr-1* en réponse à des traitements aigu ou répété de cocaïne dans le cerveau de rat.

La stimulation d'une cellule par un neurotransmetteur induit la transcription de gènes à réponse précoce, de manière rapide, transitoire et indépendamment de la synthèse de nouvelles protéines. Les gènes précoces sont impliqués dans la mise en place de changements durables en réponse à une information brève portée par un neurotransmetteur. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'induction de la transcription du gène précoce *egr-1* par la cocaïne, dans le cerveau de rat.

La cocaïne est un psychostimulant possédant la propriété d'inhiber la re-capture des monoamines, ce qui exacerbe leur neurotransmission. L'induction de l'expression d'*egr-1* par la cocaïne prend place principalement dans les structures cérébrales recevant des projections dopaminergiques, notamment le striatum et le cortex pré-frontal. Par l'utilisation des anesthésiques kétamine et propofol, qui possèdent des propriétés anti-glutamatergiques et/ou pro-GABAergiques, nous avons montré que ces neurotransmetteurs intervenaient dans la régulation de l'expression d'*egr-1*.

Nous avons montré que l'activité des neurones dopaminergiques était modulée par la stimulation de la voie de transduction du GMPc. En effet, l'injection du peptide natriurétique CNP, tout comme la stimulation de la protéine kinase dépendant du GMPc, réduit la synthèse des messagers *egr-1*, l'augmentation de dopamine extracellulaire et l'hyperlocomotion, induites par la cocaïne.

Enfin, nous avons montré que l'expression des gènes de la famille *egr* et de celle de leurs co-répresseurs transcriptionnels, les gènes *NABs*, suite à l'administration unique ou répétée de cocaïne. Les gènes *egr-1*, *egr-3* et *NAB2* apparaissent comme les gènes majeurs impliqués dans les adaptations à long-terme se mettant en place suite à l'administration répétée de cocaïne.

Mots-clés : *egr-1* "early growth response"; cocaïne; dopamine; striatum; CNP "C-type natriuretic peptide"; PKG protéine kinase dépendant du GMPc; NAB "NGFI-A binding protein"; glutamate; GABA; hybridation *in situ*; injection stéréotaxique.

***Egr-1* expression in response to acute or chronic cocaine administration in rat brain.**

Immediate early genes are known to be rapidly and transiently induced in response to the stimulation of neurons by various neurotransmitters. By encoding transcription factors, they are responsible for the expression of an array of target genes. Induction of immediate early genes, such as *egr-1* is now considered as a tool to study neuronal activation in various brain systems. Here, we studied the expression of the plasticity-associated immediate early gene *egr-1* following cocaine treatment in rat brain.

Cocaine strongly inhibits the uptake of dopamine, serotonin and noradrenaline into presynaptic neurons, which results in the over-stimulation of the corresponding receptors. The psychostimulant and locomotor effects of cocaine are primarily mediated by the dopaminergic system. Cocaine was found to induce *egr-1* expression mainly in dopaminergic fields, such as the striatum or the frontal cortex. By using the anesthetic agents ketamine and propofol, we show that cocaine-induced *egr-1* expression is regulated by the glutamatergic and GABAergic systems.

We also studied the modulation of dopaminergic neurons by stimulating the cGMP signalling pathway. Injection of the neuropeptide CNP ("C-type natriuretic peptide"), as well as stimulation or over-expression of cGMP-dependent protein kinase, were found to inhibit cocaine-induced *egr-1* transcription, extracellular dopamine increase and hyperlocomotion.

Finally, we measured the expression of the *egr* genes, as well as that of the transcriptional repressor *NABs*, in response to acute or chronic cocaine administration. It appears that *egr-1*, *egr-3* and *NAB2* are the key members of their families that regulate expression of *Egr* target genes in dopaminergic brain areas. These genes might therefore be involved in mediating long-term adaptations following repeated cocaine administration, such as related behavioural effects.

Keywords : *egr-1* : early growth response; cocaine; dopamine; striatum; CNP : C-type natriuretic peptide; PKG : cGMP-dependent protein kinase; NAB : NGFI-A binding protein; glutamate; GABA; *in situ* hybridization; stereotaxic injection.