

Le rôle des récepteurs dopaminergiques D2 in vivo

La dopamine est la catécholamine la plus abondante dans le cerveau, synthétisée par les neurones mésencéphaliques de la substance noire (SN) et de l'aire tegmentaire ventrale (VTA).

Les neurones dopaminergiques issus de ces noyaux projettent leurs axones vers le striatum, le cortex, le système limbique et l'hypothalamus. A travers ces voies, la dopamine règle plusieurs fonctions physiologiques telles que les mouvements volontaires, la coordination du mouvement et la sécrétion d'hormones hypophysaires [1]. Parmi les voies dopaminergiques, on distingue la voie nigro-striée composée de neurones issus de la SN et se projetant vers le striatum. Cette voie est spécifiquement impliquée dans le contrôle des mouvements. La dégénérescence de ces neurones est à la base des symptômes de la maladie de Parkinson [2, 3], une des maladies neurodégénératives humaines les plus fréquentes. Cette maladie est caractérisée par une incapacité d'entreprendre des mouvements volontaires, ce qui conduit à une akinésie et une bradykinésie. Les autres voies dopaminergiques comprennent, d'une part, les voies mésolimbiques-mésocorticales, qui influencent les comportements volontaires, l'apprentissage et la mémoire et, d'autre part, la voie hypothalamo-tubéro-infundibulaire, qui participe au contrôle de la synthèse et de la sécrétion des hormones hypophysaires, telles que la prolactine, dont l'inhibition de la sécrétion par cette voie est bien documentée.

L'effet biologique engendré par la dopamine est dû à l'activation de récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs à sept do-

maines transmembranaires qui interagissent avec les protéines liant le GTP (protéines G) [4]. L'activation de ces récepteurs par leur ligand conduit à la formation de seconds messagers et à l'activation ou à l'inhibition de voies de signalisation spécifiques. Cinq récepteurs de la dopamine différents ont été identifiés à ce jour. Ces récepteurs sont divisés en deux sous-groupes: les récepteurs de type D1 (D1-like), comprenant D1 et D5; et les récepteurs de type D2 (D2-like), comprenant les récepteurs D2, D3 et D4 [1, 4]. Cette classification est fondée sur leur séquence en acides aminés, leurs propriétés pharmacologiques, et leur mode de couplage à l'adénylyl cyclase (AC). Les récepteurs du sous-type D1 sont couplés positivement à l'AC tandis que ceux du sous-type D2 le sont négativement. Les récepteurs de type D2 peuvent aussi se lier à d'autres effecteurs cellulaires. L'étude de la distribution anatomique de ces récepteurs a montré un recouvrement des profils d'expression. Les récepteurs D1 et D2 sont les plus nombreux et les plus largement synthétisés, alors que D3, D4 et D5 ont un profil d'expression restreint. Du point de vue pharmacologique, il est possible de distinguer les récepteurs appartenant au type D1 de ceux appartenant au type D2, tandis que la discrimination entre deux récepteurs du même sous-groupe s'avère plus difficile.

Les récepteurs D1 et D2 sont fortement synthétisés par les neurones épineux du striatum, chacun ne synthétisant généralement qu'un seul type de récepteur dopaminergique. Les neurones produisant les récepteurs du type D1 font partie de la voie dite directe ou striato-nigrée,

alors que les neurones produisant les récepteurs du type D2 font partie de la voie indirecte ou striato-pallidale. L'activité coordonnée de ces deux voies est indispensable pour établir et contrôler les mouvements volontaires [5].

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'étude de l'activité physiologique engendrée par l'activation des récepteurs de type D2. Ces récepteurs sont abondants dans le striatum, la SN et l'hypophyse.

Deux isoformes de ce récepteur ont été décrites, D2L et D2S, engendrées par un épissage alternatif du même gène. Ces isoformes sont colocalisées dans les mêmes tissus, et diffèrent selon leur caractéristiques de couplage aux protéines G *in vitro* [6, 7]. Afin d'étudier la physiologie du récepteur D2 *in vivo*, nous avons créé, par recombinaison homologue, des souris mutantes dont les deux allèles du gène du récepteur D2 ont été invalidés [8].

La mutation du gène a été réalisée en déléant l'exon contenant le site de démarrage de la traduction (exon 2) du récepteur dopaminergique D2, et en le remplaçant par une cassette contenant le gène de résistance à la néomycine sous le contrôle du promoteur du gène de la phosphoglycérate kinase I (*figure 1A*). Un clone ES (cellules souches embryonnaires) contenant cette mutation insérée par recombinaison homologue a été identifié (*figure 1B*) et injecté dans le blastocyste d'une souris porteuse. Des souris chimères ont été obtenues, et certaines ont transmis la mutation à leur progéniture, permettant d'obtenir des souris hétérozygotes dont le croisement a conduit à des animaux homozygotes pour la défi-

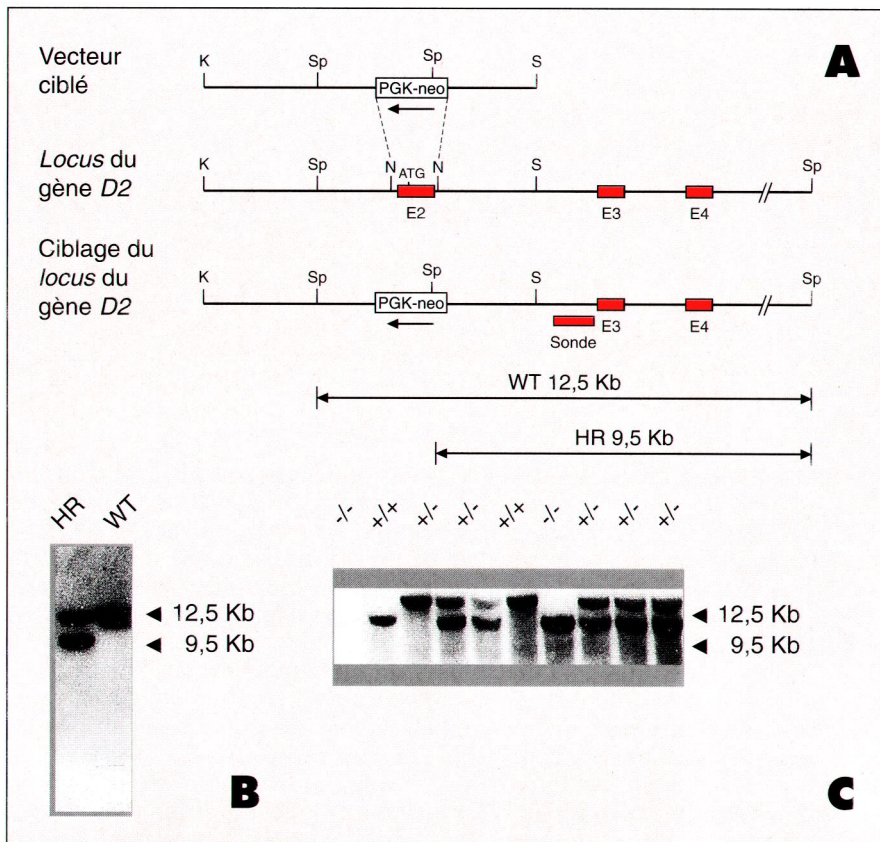


Figure 1. **Recombinaison homologue du gène codant pour le récepteur dopaminergique D2.** A. Représentation schématique de la stratégie utilisée. B. Analyse par la méthode de Southern blot de l'ADN génomique extrait de cellules ES normales (WT, wild type) et d'un clone de cellules ES où la recombinaison du gène D2 a eu lieu (HR). C. Analyse par la méthode de Southern blot de l'ADN génomique extrait de queues de souris normales (+/+), hétérozygotes pour la recombinaison du gène D2 (+/-), ou homozygotes pour la déficience en D2 (-/-).

cience en récepteur dopaminergique de type D2 (figure 1C).

Il faut noter que les souris mutantes homozygotes ont un poids inférieur (15%) à celui des souris de phénotype sauvage appartenant à la même portée. La consommation d'eau et de nourriture chez les mutantes homozygotes décroît aussi de 10% à 15%, et enfin la température corporelle de ces dernières est réduite de 0,7 °C.

Conséquences fonctionnelles de l'absence du récepteur D2

L'absence d'expression du gène codant pour le récepteur D2 n'engendre pas de modification de l'expression des autres récepteurs dopaminergiques, ce qui indique que l'absence du récepteur D2 chez l'animal n'est compensée par aucun des autres récepteurs du type D2 ou du type D1.

L'étude de l'expression de certains peptides synthétisés par les neurones épineux du striatum a permis d'ana-

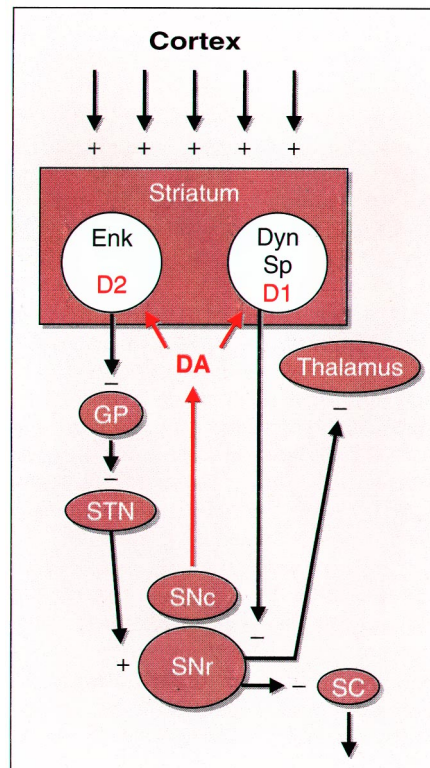


Figure 2. **Représentation schématique de la voie dopaminergique nigrostriée.** DA: dopamine; SNr: substantia nigra pars reticulata; SNc: substantia nigra pars compacta; Enk: enképhaline; D2 et D1: récepteurs dopaminergiques D2 et D1; Dyn: dynorphine; Sp: substance P; GP: globus pallidus; STN: noyaux sous-thalamiques; SC: colliculus supérieur.

lyser les retombées physiologiques de l'absence de récepteurs D2.

En particulier, nous avons analysé, par la technique d'hybridation *in situ*, l'expression de la proenképhaline, marqueur des neurones contenant le récepteur D2 et donc de la voie striato-nigrée indirecte; mais aussi de la substance P et de la dynorphine, marqueurs des neurones contenant le récepteur D1 et appartenant à la voie striato-nigrée directe (figure 2). Ces expériences nous ont permis d'observer une augmentation de 40 % du niveau du messenger codant pour la proenképhaline et une diminution de 15 % du niveau du messenger codant pour la substance P. L'altération de l'expression de ces peptides chez les souris D2-/- ressemble fortement aux modifications observées dans le modèle expérimental de la maladie de Parkinson, obtenu par lésion des fibres dopaminergiques nigro-striées sous l'effet d'une injection de 6-hydroxydopamine (6-OHDA) [9].

De façon très intéressante, nous avons détecté une élévation du niveau d'expression de l'enzyme glutamate décarboxylase (GAD), participant à la synthèse de l'acide γ -aminobutyrique (GABA), dans le cortex et de façon plus réduite dans le striatum. Cette augmentation pourrait représenter un mécanisme compensatoire dans le cerveau des souris mutantes. Si l'on suppose que l'absence des récepteurs D2 conduit à un mauvais fonctionnement de la voie indirecte avec une désinhibition des neurones pallidiaux et sous-thalamiques, entraînant une stimulation accrue des neurones nigres, l'activité de ceux-ci ne serait plus suffisamment équilibrée par l'action de la voie directe. Cela pourrait provoquer une distorsion du signal en retour vers le cortex et vers les autres constituants de la voie motrice. Ces fonctions altérées pourraient être compensées, par exemple, par une augmentation du taux du GABA cortical, conduisant à l'inhibition des neurones du striatum exprimant normalement le récepteur D2.

Au niveau de l'hypophyse, le récepteur dopaminergique D2 participe au contrôle inhibiteur de la synthèse et de la sécrétion d'hormones hypophy-

saies, comme la prolactine. De fait, nous notons que l'absence de récepteur D2 chez les souris mutantes se traduit par une élévation du taux de prolactine et d'autres hormones hypophysaires.

Le comportement locomoteur des souris mutantes

Connaissant le rôle de la voie nigro-striée dans la coordination du mouvement, nous avons étudié la locomotion chez les souris mutantes. Nous avons noté que les mouvements des souris mutantes sont plus lents que ceux des animaux normaux. Ces souris ont une posture qui paraît anormale, affectant les pattes antérieures et postérieures. Des tests comportementaux destinés à l'étude des fonctions motrices nous ont montré que la locomotion des souris D2-/- est réduite de 70 % par rapport aux souris normales; de plus, des fonctions stéréotypées comme l'exploration ou le redressement sont absentes. Une forte réduction de la coordination du mouvement ainsi que des mouvements spontanés a aussi été observée. Nos résultats confirment donc que le récepteur D2 de la dopamine a un rôle très important dans les mouvements volontaires. Ce phénotype contraste avec celui des souris déficientes en récepteur dopaminergique D1, normal ou limité à une faible hyperlocomotion selon les auteurs [10, 11]. Dans le modèle expérimental de la maladie de Parkinson, par lésion des fibres dopaminergiques par la 6-OHDA, la symptomatologie semble être expliquée non pas par un manque d'activation des récepteurs D1, mais surtout par celle des récepteurs D2 dû à l'absence de dopamine. Les récepteurs D2 jouent donc bien le rôle principal dans le contrôle des mouvements coordonnés.

Cela nous amène à suggérer que les souris D2-/- pourraient être utilisées comme modèle particulièrement intéressant de la maladie de Parkinson dans la mesure où ces souris synthétisent de la dopamine mais sont déficientes en l'un des récepteurs. Elles vont nous permettre d'analyser l'effet de substances agonistes ou antagonistes des récepteurs présents dans la

voie dopaminergique indirecte sur les anomalies des mouvements volontaires. Quoiqu'un travail détaillé de caractérisation des animaux mutés nous attende encore, nos résultats nous ont déjà permis de mieux définir la fonction *in vivo* des récepteurs D2 de la dopamine.

T.A.S.
J.-H.B.
R.P.
A.S.
G.T.
E.B.

1. Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther* 1994; 64: 291-369.
2. Hornykiewicz O. Dopamine (3-hydroxytryptamine) and brain function. *Pharmacol Rev* 1966; 18: 925-64.
3. Schiffmann S, Vanderhaeghen J. Implication de l'adénosine dans les noyaux de la base: interactions avec le système dopaminergique. *médecine/sciences* 1995; 11: 169-77.
4. Sokoloff P, Martres MP, Schwartz JC. La famille des récepteurs de la dopamine. *médecine/sciences* 1993; 9: 12-20.
5. Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15: 285-320.
6. Montmayeur JP, Guiramand J, Borrelli E. Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G proteins. *Mol Endocrinol*. 1993; 7: 161-70.
7. Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhatia M, Borrelli E. Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 1995; 270: 7354-8.
8. Baik JH, Picetti R, Saïardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 1995; 377: 424-8.
9. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma Jr FJ, Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 1990; 250: 1429-32.
10. Xu M, Moratalla R, Gold LH, Hiroi N, Koob GF, Graybiel AM, Tonegawa S. Dopamine D1 receptor mutant mice are deficient in striatal expression of dynorphin and in dopamine-mediated behavioral responses. *Cell* 1994; 79: 729-42.
11. Drago J, Gerfen CR, Lachowicz JE, Steiner H, Hollon TR, Love PE, Ooi GT, Grinberg A, Lee EJ, Huang SP, Bartlett P, Jose PA, Sibley DR, Westphal H. Altered striatal function in a mutant mouse lacking D1A dopamine receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12564-8.