

Université de Montréal

Effets de l'angiotensine II sur les réponses visuelles du  
*colliculus* supérieur au cours du développement post-natal  
chez le rat

par  
Annecy Marois

Département de Sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)

Août, 1997

© Annecy Marois, 1997



QH  
302  
U54  
1998  
V.004

Université de Montréal

Effets de l'angiogenèse il sur les réponses visuelles du  
colliculus supérieur au cours du développement post-natal

chez le rat

par  
Anney Marie

Département de Sciences biologiques  
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue du diplôme de maîtrise en  
Maîtrise en sciences (M.Sc.)



1998

© Anney Marie, 1998

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Effets de l'angiotensine II sur les réponses visuelles du *colliculus* supérieur  
au cours du développement post-natal chez le rat

présenté par:  
Anncy Marois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Président-rapporteur:	Jocelyn Faubert (Optométrie)
Directeur de recherche:	Christian Casanova (Optométrie)
Co-directeur de recherche:	Stéphane Molotchnikoff
Membre du jury:	F. Jolicoeur (Université de Sherbrooke)

Mémoire accepté le:.....27..janvier..1998.....

## RÉSUMÉ

Le système rénine-angiotensine est bien caractérisé au niveau périphérique et il est connu depuis longtemps que l'angiotensine II (Ang II) exerce un effet sur l'homéostasie des fluides et sur la pression sanguine. Plus récemment, des récepteurs angiotensinergiques ont été localisés au niveau des structures cérébrales, dont dans le *colliculus* supérieur (CS). Étant donné que cette structure sensorimotrice contient les deux principaux types de récepteurs (AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>) et que le nombre et la localisation de ceux-ci varient au cours du développement post-natal, nous avons voulu déterminer 1) l'effet de l'Ang II sur les potentiels évoqués visuels (PEVs) enregistrés dans cette structure chez le jeune raton en développement et 2) l'implication des différents types de récepteurs dans l'effet observé aux différents stades du développement post-natal du rat. Nos expériences ont été réalisées sur 135 jeunes rats Long Evans, anesthésiés à l'uréthane 25%, âgés entre 15 et 40 jours. Lors de l'analyse des résultats, les animaux ont été séparés en différentes classes selon leur âge (population totale, 15-19 jours, 20-24 jours, 25-29 jours et 30 jours et plus). Une même microélectrode a été utilisée pour l'enregistrement des PEVs au niveau des couches superficielles du CS et pour l'injection par pression de l'Ang II (concentration variant de 10<sup>-3</sup>M à 10<sup>-12</sup>M) et de ses ligands. Nos résultats indiquent que l'Ang II a une action inhibitrice réversible sur l'activité visuelle du CS qui pourrait être reliée à la dose, peu importe l'âge des animaux. Il semble aussi que plus les animaux sont jeunes, plus l'effet provoqué par l'Ang II à une concentration donnée est élevé. Malheureusement, les données résultant de l'injection de ligands spécifiques aux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ne nous ont pas permis de préciser via quels types de récepteurs l'Ang II provoque son action. Nos résultats suggèrent que l'Ang II a une action physiologique chez le jeune rat en développement. Ce peptide neuromodulateur pourrait donc intervenir dans la maturation des fonctions visuelles colliculaires.

## TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	i
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des abréviations	viii
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
1.1 Angiotensine II	2
1.1.1 Historique du système rénine-angiotensine	2
1.1.2 Formation de l'angiotensine II circulante	2
1.1.3 SRA périphérique	6
1.1.4 SRA local au niveau du cerveau	7
1.1.4.1 Rôles physiologiques de l'Ang II au niveau du cerveau	9
1.1.5 Récepteurs angiotensinergiques	10
1.1.5.1 Hétérogénéité des récepteurs angiotensinergiques	10
1.1.5.2 Biologie moléculaire des récepteurs à l'Ang II	12
1.1.5.3 Distribution et rôles physiologiques généraux des différents types de récepteurs au niveau du cerveau	13
1.1.5.4 Développement post-natal	17
1.2 Le <i>colliculus</i> supérieur	18
1.2.1 Observations générales	18
1.2.2 Organisation laminaire	19
1.2.3 Organisation topographique	20
1.2.4 Afférents du <i>colliculus</i> supérieur	21
1.2.5 Efférents du <i>colliculus</i> supérieur	22

1.2.6 Rôles du <i>colliculus</i> supérieur	22
1.2.7 Développement post-natal du CS	24
1.3 Le CS et l'Ang II	25
1.4 Objectifs	27
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>28</b>
2.1 Préparation animale	29
2.2 Enregistrement et stimulation visuelle	32
2.3 Localisation des champs récepteurs	33
2.4 Administration des drogues	34
2.4.1 Méthode	34
2.4.2 Agent de coloration	34
2.4.3 Drogues utilisées	35
2.4.3.1 Angiotensine II	35
2.4.3.2 Ligands	35
2.4.4 Injections contrôles	36
2.5 Protocole expérimental	37
2.6 Analyse	38
2.6.1 Regroupement des animaux	38
2.6.2 Paramètres étudiés	38
2.6.3 Critères de sélection des injections	39
2.6.4 Statistiques	39
2.7 Histologie	40
2.8 Autre approche expérimentale	40
<b>3. RÉSULTATS</b>	<b>42</b>
3.1 Angiotensine II	43
3.1.1 Observations générales	43
3.1.2 Localisation des sites d'injections	43

3.1.3 Effet sur l'amplitude des PEVs	46
3.1.4 Effet de dosage	54
3.1.4.1 Population totale	54
3.1.4.2 Ratons classés en groupes distincts selon leur âge	62
3.1.5 Effet de l'Ang II à une concentration donnée en fonction de l'âge des animaux	68
3.1.6 Effet de l'Ang II sur la latence des PEVs	68
3.2 Localisation des récepteurs	71
3.3 Ligands	74
3.3.1 Antagoniste des récepteurs AT <sub>1</sub>	74
3.3.2 Antagoniste des récepteurs AT <sub>2</sub>	77
3.3.3 Antagonistes des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub>	80
3.3.4 Agoniste des récepteurs AT <sub>2</sub>	85
3.4 Injections contrôles	86
3.5 Injections colorées	90
3.6 Autre approche expérimentale: ablation du cortex recouvrant le CS	93
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>101</b>
4.1 Sommaire des résultats	102
4.2 Considérations méthodologiques	102
4.2.1 Agent de coloration	102
4.2.2 Système d'injection et d'enregistrement	104
4.2.3 Véhicule utilisé	107
4.3 Distribution des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> dans le CS	110
4.4 Effet physiologique de l'Ang II	112
4.5 Implication des récepteurs AT <sub>1</sub> et AT <sub>2</sub> dans l'effet observé sur la réponse visuelle du CS	113

	iv
4.6 Comparaison avec d'autres études	116
4.7 Effets fonctionnels de l'Ang II sur les neurones du SNC	118
4.8 Conclusions	120
<b>5. RÉFÉRENCES</b>	121
<b>6. REMERCIEMENTS</b>	ix
<b>7. ANNEXE</b>	x



## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b>	Effet du NaCl "normal", du NaCl isotonique, du LCRA et du DPC sur l'amplitude des PEVs	89
------------------	--	----

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Composantes du système rénine-angiotensine	3
<b>Figure 2</b>	Distribution des récepteurs angiotensinergiques au niveau du SNC	14
<b>Figure 3</b>	Température corporelle optimale selon l'âge des animaux	30
<b>Figure 4</b>	Localisation des champs récepteurs	44
<b>Figure 5</b>	Photographie de la préparation histologique et de deux sites d'injections	47
<b>Figure 6</b>	Effet de l'Ang II sur une moyenne de PEVs et sur un enregistrement en continu	50
<b>Figure 7</b>	Effet de l'Ang II sur un PEV unitaire	52
<b>Figure 8</b>	Profils d'action de l'Ang II à deux concentrations	55
<b>Figure 9</b>	Effet de l'Ang II en fonction de la dose (population totale)	57
<b>Figure 10</b>	Temps de récupération en fonction de la dose (population totale)	60
<b>Figure 11</b>	Effet de l'Ang II en fonction de la dose et de l'âge des animaux	64
<b>Figure 12</b>	Temps de récupération en fonction de la dose et de l'âge des animaux	66
<b>Figure 13</b>	Effet de l'Ang II à une concentration donnée en fonction de l'âge	69
<b>Figure 14</b>	Effet de l'Ang II selon la profondeur dans le CS	72
<b>Figure 15</b>	Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec le DUP 753 en fonction de la dose et de l'âge des animaux	75
<b>Figure 16</b>	Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec le PD 123319 en fonction de la dose et de l'âge des animaux	78

<b>Figure 17</b>	Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec le DUP 753 ou le PD 123319 en fonction de la dose (population totale)	81
<b>Figure 18</b>	Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec le DUP 753 et le PD 123319 en fonction de l'âge des animaux	83
<b>Figure 19</b>	Injections contrôles de NaCl	87
<b>Figure 20</b>	Comparaison de la proportion d'injections d'Ang II coloré et non-coloré qui récupère en fonction de l'âge des animaux	91
<b>Figure 21</b>	Comparaison de l'effet de l'Ang II coloré et non-coloré selon l'âge des animaux	94
<b>Figure 22</b>	Exemple de PEVs chez deux rats dont le cortex a été retiré	97
<b>Figure 23</b>	Effet de l'Ang II et de la xylocaïne chez des animaux dont le cortex a été retiré	99

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ACHÉ	Acétylcholinestérase
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
Ang III	Angiotensine III
Ang IV	Angiotensine IV
CGL	Corps genouillé latéral
CS	<i>Colliculus</i> supérieur
DPC	Acide N-phenylanthranilique
DS	Déviatiion standard
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ES	Erreur standard
ICV	Intracérébroventriculaire
i.p.	Intrapéritonéal
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LCRa	Liquide céphalo-rachidien artificiel
M	Concentration molaire
nl	Nanolitres
PEV	Potentiel évoqué visuel
SBI	Strate blanche intermédiaire
SBP	Strate blanche profonde
SGI	Strate grise intermédiaire
SGP	Strate grise profonde
SGS	Strate grise superficielle
SNC	Système nerveux central
SO	Strate optique
SRA	Système rénine-angiotensine
SZ	Strate zonale

# INTRODUCTION

## CHAPITRE 1

## 1.1 Angiotensine II

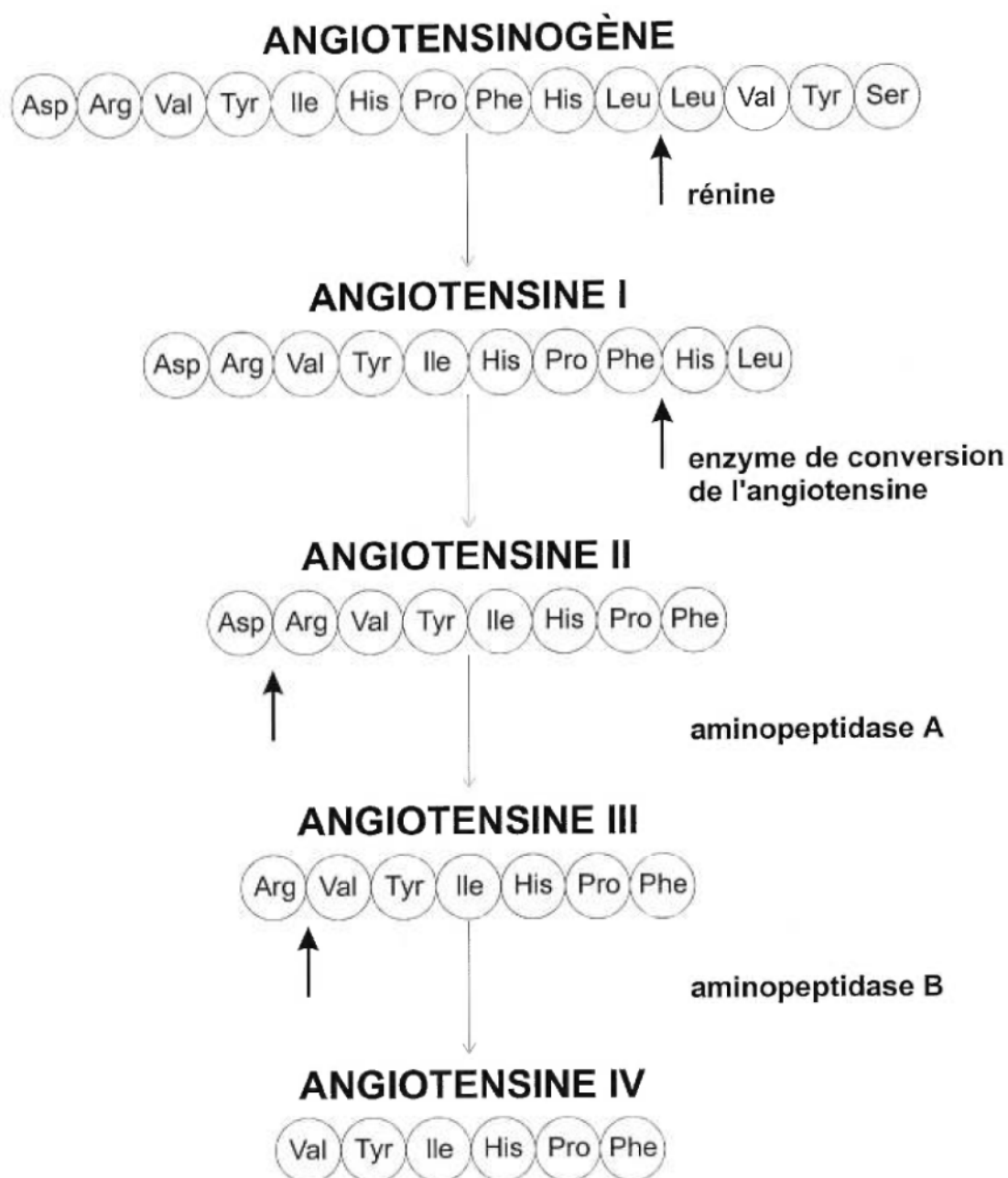
### 1.1.1 Historique du système rénine-angiotensine

La découverte du système rénine-angiotensine (SRA) remonte à il y a longtemps, lorsque Tigerstedt et Bergman (1898) ont extrait une substance des reins du lapin impliquée dans la régulation de la pression sanguine ("pressor substance"). Il fut par la suite démontré que cette substance, nommée rénine, était en fait une enzyme qui agissait sur un facteur quelconque localisé dans le sang pour former une hormone vasoconstrictrice (Braun-Menéndez *et al.*, 1940; Page et Helmer, 1940), que l'on appellera par la suite angiotensine. Dans les années qui suivirent, de nombreux travaux de recherche ont été effectués sur le SRA et plusieurs autres de ses composantes ont été découvertes (voir section suivante).

### 1.1.2 Formation de l'angiotensine II circulante

Le précurseur du SRA, l'angiotensinogène, est coupé par la rénine pour former le décapeptide angiotensine I (Ang I) dans la circulation sanguine. L'action hydrolytique de la rénine permet la relâche des dix premiers acides aminés de l'angiotensinogène, qui constituent en fait l'Ang I (Fig.1). Plus précisément, la rénine est une enzyme aspartique protéinase synthétisée à partir d'un

**Figure 1:** Illustration des différentes composantes du SRA ainsi que des enzymes responsables de leur formation. Les petites flèches en gras illustrent l'endroit où l'enzyme coupe le peptide.





précurseur (la prépro-rénine) au niveau des cellules musculaires lisses des artérioles rénales afférentes. Elle est emmagasinée sous forme granulaire avant d'être relâchée dans la circulation sanguine, directement ou via la lymphe ou les interstices rénaux. Plusieurs facteurs stimulent la relâche de la rénine rénale, dont une diminution de la pression sanguine, une augmentation de l'activité nerveuse sympathique et une diminution du volume des fluides extracellulaires (Bottari *et al.*, 1993; Näveri, 1995; Sernia, 1995; Wright et Harding, 1992). Notez que l'angiotensine II (Ang II), peptide formé par le SRA, a un effet inhibiteur sur la sécrétion de rénine (rétroaction négative). Suite à la transformation de l'angiotensinogène par la rénine, l'Ang I est convertie dans la circulation sanguine des poumons via l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) en l'octapeptide angiotensine II (Ang II), première molécule biologiquement active de la cascade (Fig.1) (Bottari *et al.*, 1993; Johnston, 1990; Näveri, 1995; Sernia, 1995; Timmermans *et al.*, 1993; Wright et Harding, 1992; Wright et Harding, 1995). Pour ce faire, l'ECA coupe tout simplement les deux acides aminés His-Leu de l'extrémité C-terminale de l'Ang I. Quant à l'Ang II, elle est à son tour transformée en l'heptapeptide Ang III à l'aide de l'aminopeptidase A, qui coupe l'acide aspartique de la terminaison N-terminale de l'Ang II (Fig.1) (Bottari *et al.*, 1993; Näveri, 1995; Sernia, 1995; Timmermans *et al.*, 1993; Wright et Harding, 1992; Wright et Harding, 1995). L'aminopeptidase B s'occupe de convertir l'Ang III en Ang IV en coupant l'arginine de la terminaison N-terminale (Näveri, 1995; Wright et Harding, 1995).

Notez que la cascade décrite précédemment est la plus connue et la plus fréquente, mais que ces conversions peuvent parfois se faire via d'autres mécanismes ou avec l'aide d'autres enzymes (Näveri, 1995; Wright et Harding, 1995). De toutes les molécules formées dans le SRA, l'Ang II est la plus active (Bunnenmann *et al.*, 1993) et jusque dans les années 60, les scientifiques croyaient que sa localisation et ses actions se limitaient au système périphérique. C'est seulement par la suite que les différents constituants du SRA ont été identifiés dans certains tissus, suggérant ainsi l'existence de SRA locaux ayant la capacité de produire de l'Ang II. Ces systèmes locaux ont été identifiés, entre autres, dans le cerveau, les reins, le cœur, les vaisseaux sanguins et les tissus reproducteurs (Bottari *et al.*, 1993; Phillips, 1987; Saavedra, 1992).

### 1.1.3 SRA périphérique

La fonction première de l'Ang II périphérique est de modifier la résistance vasculaire, le sodium rénal et le volume d'excrétion rénale, en réponse aux modifications du volume des fluides extracellulaires (Bottari *et al.*, 1993; Timmermans *et al.*, 1993). Plus précisément, l'Ang II a un effet constricteur sur les muscles lisses vasculaires (vaisseaux sanguins), ayant ainsi un rôle de régulateur de la pression sanguine (Bottari *et al.*, 1993; Phillips, 1987; Sernia, 1995; Timmermans *et al.*, 1993; Wright et Harding, 1992). En fait, l'implication

de l'Ang II dans l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque et vasculaire est aujourd'hui bien établie (Näveri, 1995). L'Ang II agit aussi sur le système nerveux autonome en augmentant la relâche de norépinéphrine (NE) au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques (Bottari *et al.*, 1993) et est également impliqué dans l'équilibre des électrolytes et des fluides extracellulaires via des actions variées sur, entre autres, le cortex adrénalien et les reins (Bottari *et al.*, 1993; Phillips, 1987; Sernia, 1995; Timmermans *et al.*, 1993; Wright et Harding, 1992). Il a aussi été démontré *in vitro* que l'Ang II a des propriétés mitogéniques périphériques au niveau de certaines cellules, dont les fibroblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires du rat et de l'Homme (Bottari *et al.*, 1993; Viswanathan *et al.*, 1994).

#### 1.1.4 SRA local au niveau du cerveau

Le SRA étant bien caractérisé en périphérie, certains chercheurs ont voulu déterminer si l'Ang II avait un effet physiologique lorsque injectée dans le cerveau. Bickerton et Buckley (1961) ont été les premiers à observer que l'Ang II administrée de façon intracérébroventriculaire (ICV) cause une augmentation de la pression sanguine, alors que Epstein et ses collaborateurs (1970) ont découvert qu'une injection ICV d'Ang II stimule la consommation de liquides. Ils en sont donc venus à la conclusion que l'Ang II périphérique pouvait agir sur le système nerveux central (SNC). Par la suite, il a été démontré que la majorité

des composantes du SRA ne peuvent pas traverser la barrière hémato-encéphalique (Ganten et Speck, 1978; Harding *et al.*, 1988; Moffett *et al.*, 1987; Phillips, 1987). Cette découverte vint donc suggérer l'existence d'un SRA local au niveau du cerveau comprenant toute la machinerie nécessaire à la production d'Ang II. De fait, toutes les composantes du SRA ont été localisées dans le cerveau (Bunnemann *et al.*, 1992; Fisher-Ferraro *et al.*, 1971; Ganong, 1984; Ganten et Speck, 1978; Phillips, 1987; Sernia, 1995). Une étude a entre autres conclu que l'Ang II retrouvée dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ne vient pas du plasma mais bien du tissu cérébral (Schelling *et al.*, 1980). Suite à ces découvertes, plusieurs groupes de chercheurs ont voulu déterminer la localisation précise des récepteurs angiotensinergiques au niveau du SNC en utilisant des techniques d'autoradiographie (Gehlert *et al.*, 1986; Mendelsohn *et al.*, 1984; Saavedra *et al.*, 1986) et de chromatographie (Harding *et al.*, 1981). Plus récemment, les ARNm de certaines molécules du SRA (entre autres la rénine et l'angiotensinogène) ont été détectés dans le SNC des mammifères (Bunnemann *et al.*, 1993). Même si le SRA central semble être contrôlé indépendamment du SRA périphérique (compte tenu de la présence de la barrière hémato-encéphalique), il a été démontré que l'Ang II circulante exerce une partie de ses actions en stimulant non seulement les récepteurs situés en périphérie, mais aussi des récepteurs localisés au niveau du cerveau, principalement au niveau des organes circonventriculaires (Wright et Harding, 1992). À cet endroit, la barrière hémato-encéphalique est réduite et permet

donc à l'Ang II périphérique d'avoir accès aux récepteurs situés dans cette région du cerveau (Steckelings *et al.*, 1992). D'ailleurs, il est connu que l'administration en périphérie de l'Ang II induit la consommation d'eau chez l'animal (Wayner *et al.*, 1976; Wayner *et al.*, 1977).

#### 1.1.4.1 Rôles physiologiques de l'Ang II au niveau du cerveau

Il y a plusieurs évidences qui suggèrent que l'Ang II agit comme neurotransmetteur ou comme neuromodulateur au niveau du cerveau (Fisher-Ferraro *et al.*, 1971; Ganten et Speck, 1978; Moffett *et al.*, 1987). En effet, Li et Ferguson (1993a) ont démontré que les projections efferentes de l'organe sousfornical vers le noyau paraventriculaire utilisent l'Ang II comme un neurotransmetteur. De plus, certaines études ont mis en évidence que l'Ang II pourrait agir comme neurotransmetteur au niveau du noyau paraventriculaire (Bains et Ferguson, 1994) et de la rétine (Jurklics *et al.*, 1995). Une autre étude effectuée par Culman et ses collaborateurs (1995) implique l'Ang II comme neuromodulateur/neurotransmetteur dans le contrôle central des fluides corporels et dans l'homéostasie des électrolytes. Les actions les plus connues de l'Ang II au niveau du SNC sont une augmentation de la pression sanguine, une relâche de vasopressine, une influence sur la régulation du bilan du sodium, sur la cyclicité des hormones reproductives et sur les comportements sexuels (Andersson *et al.*, 1995; Phillips, 1987; Wright et Harding, 1995).

Plusieurs études électrophysiologiques ont aussi démontré que l'Ang II a un effet sur le taux de décharge des neurones de différentes structures cérébrales (voir discussion pour plus de détails) (Wright et Harding, 1995). Il semble finalement que l'Ang II soit impliquée dans l'intégration sensorielle et motrice, dans les processus cognitifs et dans la mémoire (Köller *et al.*, 1975; Wright et Harding, 1995).

### 1.1.5 Récepteurs angiotensinergiques

#### 1.1.5.1 Hétérogénéité des récepteurs angiotensinergiques

Au niveau périphérique, comme nous venons de le voir, l'Ang II est formée dans le sang et agit comme une hormone circulante. Comme toutes les hormones peptidiques, elle interagit avec des constituants membranaires spécifiques des cellules que l'on nomme *récepteurs* (Hadley, 1992). La découverte d'une nouvelle classe de drogue, les antagonistes non-peptidiques des récepteurs angiotensinergiques, a permis de bloquer spécifiquement certaines actions de l'Ang II et ainsi caractériser différents types de récepteurs à l'Ang II au niveau périphérique (Chiu *et al.*, 1989) et au niveau du cerveau (Chang *et al.*, 1990; Rowe *et al.*, 1991; Tsutsumi et Saavedra, 1991a,b). Deux types distincts de récepteurs à l'Ang II ont été caractérisés et nommés par le comité de la "American Heart Association Council for High Blood Pressure

*Research*" en 1990, soit les récepteurs membranaires AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>. Cette classification est basée sur les caractéristiques de liaison de ces récepteurs avec des ligands peptidiques et non-peptidiques. Les récepteurs ayant une grande affinité avec l'antagoniste Losartan (DUP 753) et ses analogues sont de type AT<sub>1</sub>, tandis que les récepteurs ayant une haute affinité avec les ligands non-peptidiques PD 123177 et PD 123319, ou avec le peptide CGP 42112, se nomment AT<sub>2</sub> (Chang *et al.*, 1990; Chiu *et al.*, 1989; Hodges, 1994; Rowe *et al.*, 1991; Tsutsumi et Saavedra, 1991a,b). Le PD 123177 et le PD 123319 ont un effet antagoniste au niveau des récepteurs AT<sub>2</sub> (De Gasparo *et al.*, 1994) tandis que le DUP 753 a une action antagoniste sur les récepteurs AT<sub>1</sub> (Timmermans *et al.*, 1993). Le CGP 42112 peut quant à lui avoir un effet agoniste ou antagoniste selon la concentration utilisée (Timmermans *et al.*, 1993). Ainsi, ce ligand présente une plus grande affinité pour les récepteurs AT<sub>2</sub> lorsqu'il est utilisé à des concentrations inférieures à 10<sup>-9</sup>M et joue alors un rôle agoniste. Il semble toutefois qu'à des concentrations de l'ordre du micromolaire, le CGP 42112 se lie davantage avec les récepteurs AT<sub>1</sub> où il agit de nouveau comme agoniste (De Gasparo *et al.*, 1994). Chez le rat, deux sous-types de récepteurs AT<sub>1</sub> ont été caractérisés, soit les récepteurs AT<sub>1A</sub> et AT<sub>1B</sub> (Phillips *et al.*, 1993; Tsutsumi et Saavedra, 1992; Zhou *et al.*, 1993). Tsutsumi et Saavedra (1992) ont de plus suggéré l'existence de deux sous-types de récepteurs AT<sub>2</sub> au niveau du cerveau, soit les sous-types AT<sub>2A</sub> et AT<sub>2B</sub>.

Plus récemment, un nouveau site de liaison pour l'Ang II a été identifié, c'est-à-dire les récepteurs AT<sub>4</sub> (Jarvis *et al.*, 1992; Swanson *et al.*, 1992). En effet, les ligands connus pour se lier aux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ne se lient pas aux récepteurs AT<sub>4</sub>, contrairement à l'Ang IV qui le fait de façon réversible, saturable et avec une haute affinité (Harding *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1995). Un autre nouveau type de récepteur angiotensinergique clairement distinct des récepteurs AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> et AT<sub>4</sub> a été découvert dans une lignée de cellules neuroblastes de la souris, soit les récepteurs AT<sub>3</sub> (Chaki et Inagami, 1992).

L'Ang II a aussi un site de liaison dans la cellule, et non seulement sur la membrane plasmique. Le rôle de ces récepteurs intracellulaires n'est pas clair, mais ils sont fort probablement impliqués dans l'expression génétique et la synthèse protéique, dont la synthèse de facteurs de croissance (Bottari *et al.*, 1993; Timmermans *et al.*, 1993). Il est à noter que ces récepteurs n'ont pas d'affinité pour le Losartan, ni pour le PD 123177 (Timmermans *et al.*, 1993).

#### 1.1.5.2 Biologie moléculaire des récepteurs à l'Ang II

Les récepteurs AT<sub>1</sub> comportent 7 régions transmembranaires et sont couplés à une protéine G. Via cette protéine G, l'Ang II stimule une phospholipase C. Il y a par la suite production d'inositol triphosphate et de diacylglycérol ainsi que

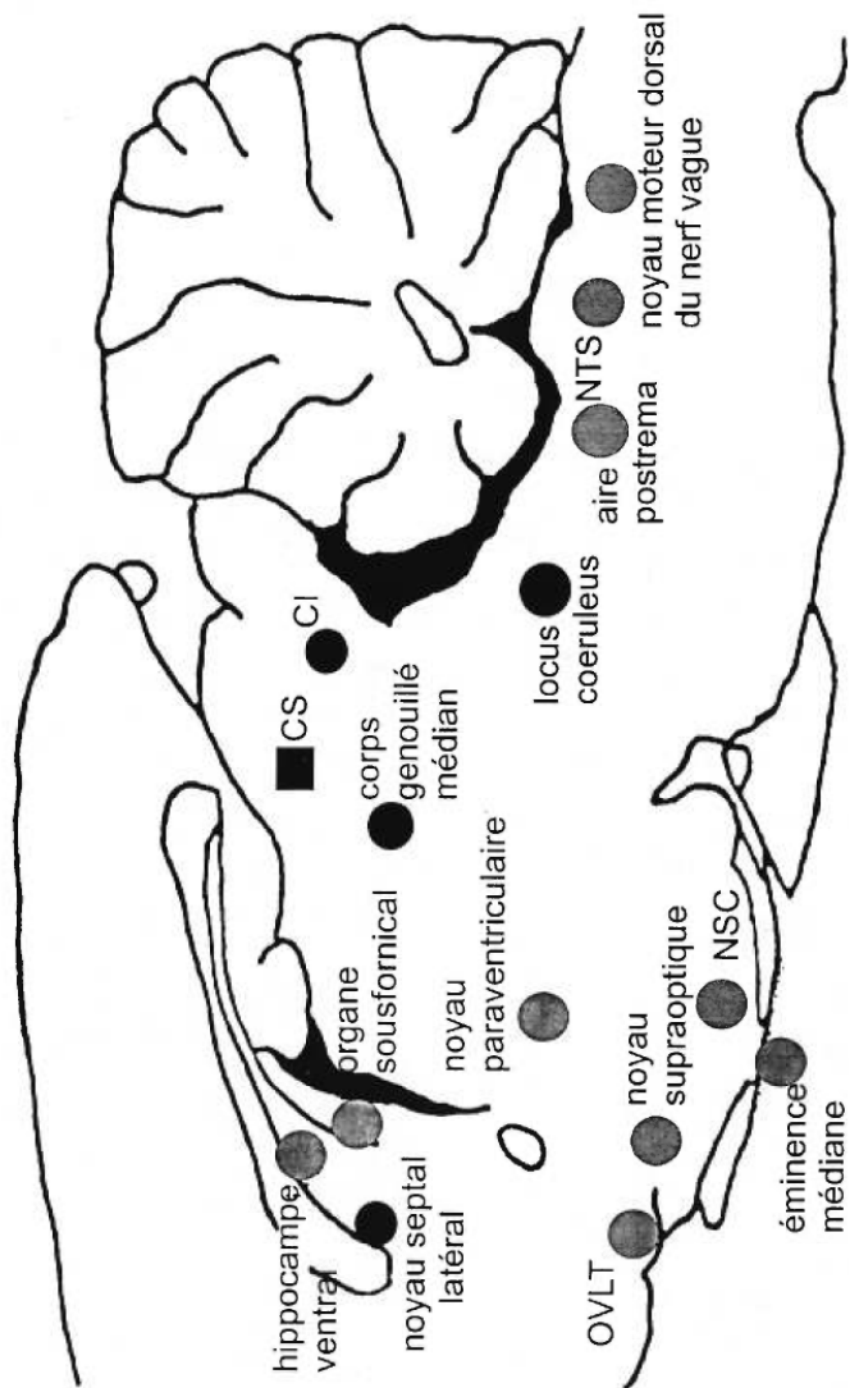


mobilisation du  $\text{Ca}^+$  intracellulaire. Via les récepteurs  $\text{AT}_1$ , l'Ang II entraîne aussi la relâche d'arachidonate et de ses produits métaboliques en stimulant une phospholipase  $\text{A}_2$  ou D (Bottari *et al.*, 1993; Lassègue *et al.*, 1994; Steckelings *et al.*, 1992; Timmermans *et al.*, 1993). Les mécanismes de transduction des récepteurs  $\text{AT}_2$  sont beaucoup moins connus que ceux des récepteurs  $\text{AT}_1$ . Par contre, on sait que le récepteur  $\text{AT}_2$  n'est pas couplé à une protéine G et que sa stimulation entraîne une diminution du GMPc intracellulaire, via l'inhibition d'une guanylate cyclase spécifique, suivie d'une stimulation d'une phosphotyrosine phosphatase (Bottari *et al.*, 1993; Lassègue *et al.*, 1994; Steckelings *et al.*, 1992; Timmermans *et al.*, 1993). Les mécanismes de transduction des récepteurs  $\text{AT}_4$  sont peu connus mais il semble qu'ils ne seraient probablement pas liés à une protéine G (Wright *et al.*, 1995). Quant aux récepteurs  $\text{AT}_3$ , il semble que leur stimulation entraîne la formation de GMPc via l'activation d'une guanylate cyclase par l'oxyde nitrique (Chaki et Inagami, 1993).

#### 1.1.5.3 Distribution et rôles physiologiques généraux des différents types de récepteurs au niveau du cerveau

Les récepteurs  $\text{AT}_1$  sont exprimés principalement dans les structures cérébrales reconnues pour être responsable des actions centrales connues de l'Ang II, c'est-à-dire la régulation de la pression sanguine, de l'équilibre de l'eau, des

**Figure 2:** Diagramme schématique d'une section longitudinale d'un cerveau de rat illustrant la localisation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ■, des récepteurs AT<sub>1</sub> seulement ● et des récepteurs AT<sub>2</sub> seulement ●. **CI**, *colliculus* inférieur; **NTS**, noyau du tractus solitaire; **OVL**, *organum vasculosum laminae terminalis*; **CS**, *colliculus* supérieur; **NSC**, noyau suprachiasmatique (Adapté de Steckelings *et al.*, 1992).



électrolytes et des fonctions reproductives (Bottari *et al.*, 1993; Steckelings *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1992; Wright et Harding, 1995). Ces structures incluent entre autres les organes circonventriculaires et le noyau médian préoptique (Fig.2). Les récepteurs AT<sub>2</sub> sont quant à eux principalement localisés dans des régions d'intégration sensorielle et/ou motrice, comme par exemple le *colliculus* supérieur (CS) et le thalamus, et dans certaines structures du système limbique (Fig.2) (Gehlert *et al.*, 1986; Millan *et al.*, 1991; Steckelings *et al.*, 1992; Tsutsumi et Saavedra, 1991a). Les rôles de ces récepteurs sont beaucoup moins connus mais leur localisation suggère un rôle spécifique pour l'Ang II dans les fonctions visuelles, motrices et émotionnelles (Tsutsumi et Saavedra, 1991a). De plus, les récepteurs AT<sub>2</sub> pourraient aussi intervenir dans la régulation centrale de l'équilibre de l'eau, de la circulation sanguine cérébrale et de la croissance vasculaire (Wright et Harding, 1995). Plus récemment, une étude effectuée par Ge et Barnes (1996) a démontré une altération de la quantité de récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans le cerveau de patients souffrant de troubles neurodégénératifs tels les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Finalement, les structures qui contiennent la plus grande quantité de récepteurs AT<sub>4</sub> sont, entre autres, l'hippocampe, le CS, le thalamus, le corps genouillé latéral (CGL) et le cervelet (Braszko et Wisniewski, 1988; Wright *et al.*, 1995). Ces récepteurs pourraient donc jouer un rôle dans les fonctions classiques associées à ces structures, c'est-à-dire l'intégration sensorielle et motrice, les processus cognitifs et la mémoire (Wright et Harding, 1995).

#### 1.1.5.4 Développement post-natal

La distribution des différents types de récepteurs décrite dans la section précédente est valable pour les animaux adultes. Au cours du développement fœtal et post-natal, la proportion et la distribution des récepteurs varient considérablement. En effet, au niveau du mésencéphale, du thalamus et de l'hypothalamus, Baxter et ses collègues (1980) ont démontré que chez le rat, le nombre maximal de récepteurs angiotensinergiques est observé à la deuxième semaine post-natale, c'est-à-dire environ autour de la période de l'ouverture des yeux chez le rat. Il semble que durant cette période, la quantité de récepteurs soit environ dix fois plus élevée que chez l'adulte, pour ensuite diminuer et atteindre le niveau observé chez les adultes vers la sixième ou la septième semaine post-natale. De façon plus précise, il semble que se soient les récepteurs  $AT_2$  qui varient durant le développement. En effet, la quantité et la localisation des récepteurs  $AT_1$  restent à peu près constantes au cours du développement, tandis que le nombre de récepteurs  $AT_2$  est beaucoup plus élevé chez le rat fœtal et néonatal que chez le rat adulte (Millan *et al.*, 1991; Mungall *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1991; Tsutsumi et Saavedra, 1991a,b; Tsutsumi *et al.*, 1993). La répartition des récepteurs  $AT_2$  varie aussi durant le développement fœtal et post-natal (Millan *et al.*, 1991; Mungall *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1991; Tsutsumi et Saavedra, 1991a,b; Tsutsumi *et al.*, 1993). Par exemple, on observe des récepteurs  $AT_2$  dans le CGL du jeune rat alors que

chez l'adulte, aucun récepteur à l'Ang II n'y est présent (Michels *et al.*, 1994). Les variations dans la quantité et la localisation des récepteurs AT<sub>2</sub> durant le développement suggèrent que ces sites de liaison jouent un rôle dans la maturation des structures ou des voies du SNC (Millan *et al.*, 1991; Mungall *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1991; Shanmugam et Sandberg, 1996; Steckelings *et al.*, 1992; Tsutsumi et Saavedra, 1991a; Tsutsumi *et al.*, 1993; Wright et Harding, 1995). Cette hypothèse est appuyée par la capacité de l'Ang II à promouvoir la croissance cellulaire de certains tissus (Mungall *et al.*, 1995; Rowe *et al.*, 1991; Wright et Harding, 1995).

## **1.2 Le *colliculus* supérieur**

### 1.2.1 Observations générales

Le système visuel peut être différencié en deux grandes voies visuelles distinctes; la voie rétine-corps genouillé latéral-cortex strié et la voie rétine-*colliculus* supérieur ou rétino-tectale. La première permet l'analyse fine de l'image et de ses caractéristiques (vision centrale, voie du "QUOI"?), et la deuxième est responsable de l'attention et de l'orientation visuelle vers un nouveau stimulus (vision périphérique, voie du "OÙ"? (Chalupa et Rhoades, 1977; Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991).

### 1.2.2 Organisation laminaire

Le *colliculus* supérieur (CS) est une structure sensorimotrice laminaire située dans le toit du mésencéphale. Son équivalent chez les animaux inférieurs (oiseaux, amphibiens, reptiles, etc.) est le tectum optique. Chez l'Homme, il est aussi identifié comme les tubercules quadrijumeaux antérieurs. Le CS est constitué d'une alternance de couches fibreuses et cellulaires, pour un total de 7 couches (Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991). On peut diviser le CS en deux parties fonctionnelles distinctes: i) les couches superficielles, composées de la strate zonale (SZ), la strate grise superficielle (SGS) ainsi que la strate optique (SO), ii) les couches profondes, qui contiennent la strate grise intermédiaire (SGI), la strate blanche intermédiaire (SBI), la strate grise profonde (SGP) et la strate blanche profonde (SBP) (Rhoades *et al.*, 1991; Stein, 1981; Stein et Meredith, 1991). Les cellules des couches superficielles sont uniquement visuelles tandis que celles des couches profondes sont soit visuelles, somatosensorielles, auditives, bimodales (ex: visuelle-somatosensorielle), multimodales (visuelle-somatosensorielle-auditive) ou motrices (Chalupa et Rhoades, 1977). Lors de l'enregistrement des potentiels évoqués visuels (PEVs) au niveau des couches superficielles, on remarque une inversion de la polarité (de négative à positive) de la réponse du CS au niveau de la SGS et de la portion dorsale de la SO (Goodale, 1973). De plus, c'est au niveau de la SO que l'amplitude des réponses visuelles est maximale, ce qui

correspond à une profondeur variant entre 3.5 et 4 mm de la surface corticale chez le rat adulte (Goodale, 1973). La forme du PEV ainsi que la stabilité de chacune de ses composantes ont été décrites dans une étude effectuée par Dyer et Annau (1977).

### 1.2.3 Organisation topographique

La représentation des différentes modalités sensorielles au niveau du CS se fait de façon ordonnée, ou topographique (Benedetti et Ferro, 1995; Chalupa et Rhoades, 1977; Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991). Par exemple, les couches superficielles du CS contiennent une organisation topographique du monde visuel, que l'on nomme une carte visuotopique, dans laquelle chaque point du champ visuel est représenté de façon ordonnée. Ainsi, dans le CS du rat, les champs visuels nasal, temporal, supérieur et inférieur sont représentés respectivement dans les parties rostrale, caudale, médiane et latérale du CS (Fig.4, encadré) (Rhoades *et al.*, 1991; Stein, 1981; Stein et Meredith, 1991). Le méridien horizontal du champ visuel est donc représenté dans l'axe rostro-caudal et le méridien vertical dans l'axe médio-latéral du CS. De plus, il y a une surreprésentation du champ visuel central (fovéa) au niveau du CS. Cette surreprésentation est plus importante chez le singe et le chat que chez les rongeurs (Rhoades *et al.*, 1991). Il existe une topographie similaire au niveau des couches profondes pour les autres modalités sensorielles représentées,



c'est-à-dire une carte tonotopique et une carte somatotopique. On observe aussi, dans les couches profondes, une carte motrice qui est en registre avec les cartes sensorielles. Cette correspondance sensorimotrice permet une orientation visuelle adéquate et très précise vers un nouveau stimulus (Chalupa et Rhoades, 1977; Huerta et Harting, 1984; Rhoades *et al.*, 1991; Stein, 1981; Stein et Meredith, 1991).

#### 1.2.4 Afférents du *colliculus* supérieur

Le CS reçoit ses afférents principalement de la rétine et du cortex visuel strié et extrastrié (Harvey et Worthington, 1990; Huerta et Harting, 1984; Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991). Il est à noter que chez les rongeurs, les inputs rétiniens croisent presque complètement. Le CS du rat contient donc une représentation du champ visuel controlatéral entier, une infime partie du champ visuel ipsilatéral, en plus d'une région binoculaire située près du pôle rostral. Ainsi, lors de l'ablation unilatérale du CS, on remarque une négligence visuelle à des stimuli controlatéraux (Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991).

La majorité des inputs rétiniens directs se terminent dans les couches superficielles. Les couches profondes en reçoivent aussi, bien que la majorité de l'activité visuelle de ces couches soit due à des inputs rétiniens indirects, c'est-à-dire via le cortex visuel. Les afférents corticaux du CS seraient quant à eux responsables de la plupart des caractéristiques complexes des champs

récepteurs, comme par exemple la binocularité et la sélectivité à la direction (Chalupa et Rhoades, 1977; Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991). Finalement, il existe des projections tecto-tectales d'un hémisphère à l'autre, et il semble que ces projections soient de nature inhibitrice (Goodale, 1973; Rhoades *et al.*, 1991). L'activité du CS est donc sujette à deux influences toniques opposées: 1) la facilitation cortico-tectale ipsilatérale et 2) l'inhibition tecto-tectale controlatérale via la commissure tectale.

#### 1.2.5 Efférents du *colliculus* supérieur

Les neurones des couches superficielles se projettent principalement vers le CGL et le noyau LP (Huerta et Harting, 1984; Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991), qui se projettent à leur tour vers les aires visuelles corticales. Les neurones des couches profondes projettent majoritairement sur les noyaux moteurs responsables du mouvement des yeux, du cou et de la tête (Edwards, 1980; Huerta et Harting, 1984).

#### 1.2.6 Rôles du *colliculus* supérieur

L'activité du CS est principalement reliée à l'attention et l'orientation visuelle, à l'intégration multisensorielle et au contrôle des mouvements des yeux, du cou et de la tête (Chalupa et Rhoades, 1977). Ces rôles sont surtout attribués aux

couches profondes du CS. Comme mentionné précédemment, il y a une représentation sensorielle et motrice dans les couches profondes du CS. Les axones quittent ces couches pour aller faire synapse avec des aires prémotrices et motrices du tronc cérébral qui contrôlent le mouvement des yeux, du cou et de la tête (Mooney *et al.*, 1994). Cependant, la façon dont le signal sensitif (visuel et/ou somatosensoriel et/ou auditif) est transformé en "output" moteur (orientation du regard) n'est pas encore connue (Rhoades *et al.*, 1991; Stein et Meredith, 1991). Selon le modèle de "fovéation" proposé par Crommelinck et Guitton (1994), l'information visuelle serait transmise dorso-ventralement des couches superficielles vers les couches profondes, où est initiée la commande motrice des mouvements oculaires. Ainsi, les couches superficielles seraient impliquées dans l'orientation du regard vers un nouveau stimulus. Aussi, selon certaines études, il semble que les couches superficielles participeraient à l'analyse en détail d'un stimulus (analyse effectuée principalement par le système géniculostrié) à l'aide des projections qui quittent les couches superficielles du CS vers le thalamus (Stein et Meredith, 1991). De plus, d'autres études ont impliqué les couches superficielles du CS dans l'apprentissage de nouveaux patrons et dans la discrimination du flux visuel (Stein et Meredith, 1991).

### 1.2.7 Développement post-natal du CS

La formation du SNC, dont la voie rétinoectale du rat nouveau-né, est possible grâce à trois grands processus développementaux: 1) la mort cellulaire, 2) la rétraction axonale et 3) la synaptogénèse (Barde, 1989; Purves et Lichtman, 1985). La topographie normale et la distribution laminaire des axones rétinoectaux dépendent du réarrangement axonal durant le développement post-natal (Serfaty et Linden, 1994). Au jour post-natal 3 (P3), le CS du rat est immature et ne présente pas encore d'organisation laminaire. En fait, il est constitué d'une grande quantité de neurones immatures de taille uniforme (Fujita, 1964; Warton et Jones, 1985). Entre P9 et P15, la densité cellulaire diminue et l'épaisseur des couches augmente (Benedetti et Ferro, 1995). À P15, on peut observer les premières fibres myélinisées du CS, mais la lamination, formée entre P9 et P15, n'est toujours pas apparente avec les méthodes histologiques classiques (à cause de la faible myélinisation). Au jour P30, l'organisation laminaire est complète, mais l'épaisseur des couches superficielles continue à augmenter jusqu'au jour P45 (Warton et Jones, 1985). Il est à noter que la densité synaptique est maximale vers P18-19. La première réponse visuelle évoquée par un flash diffus des neurones des couches superficielles a lieu au jour P12-13 chez le rat, alors que l'électrorétinogramme peut être enregistré à partir du jour P12 (Molotchnikoff et Itaya, 1993). L'ouverture des yeux chez le jeune rat se produit au jour P14. L'activité

spontanée, quant à elle, peut être enregistrée dans les cellules ganglionnaires chez le rat fœtal et dans le CS à partir de P6 (Itaya *et al.*, 1995; Molotchnikoff et Itaya, 1993). D'autre part, le développement de l'organisation rétinotopique du CS ne se produit pas directement avec l'arrivée des axones rétiniens. Au contraire, ces axones font synapse dans une région très large du CS qui inclue la zone terminale correcte (Simon et O'Leary, 1992). Par la suite, certains mécanismes contrôlent le retrait des axones dont la cible n'est pas la bonne et augmentent l'arborisation des axones correctement positionnés (Simon et O'Leary, 1992). La topographie finale qui caractérise le CS du rat est observée vers P11-12.

En résumé, le développement de la voie rétinotectale chez le rat nouveau-né peut être caractérisé par trois étapes: 1) apparition de décharges spontanées entre P6 et P8, 2) présence d'une réponse à la stimulation du nerf optique à P10 et 3) apparition d'une réponse visuelle évoquée par un flash à P12-13 (Molotchnikoff et Itaya, 1993).

### **1.3 Le CS et l'Ang II**

Les couches superficielles du CS contiennent une grande densité de récepteurs spécifiques à différents neuropeptides et il semble que l'attention visuelle soit justement influencée par la quantité d'hormones et de peptides

présents dans cette structure (Mooney *et al.*, 1994). Dans le cas qui nous intéresse plus particulièrement, les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> à l'Ang II sont observés en grande quantité dans les couches superficielles du CS (Gehlert *et al.*, 1991; Rowe *et al.*, 1991), plus précisément au niveau de la SZ et de la SGS (Bunnemann *et al.*, 1992; Heemskerk *et al.*, 1993; Michels *et al.*, 1994). Baxter et ses collègues (1980) ont aussi démontré qu'au niveau du mésencéphale, le nombre maximal de récepteurs à l'Ang II est observé à la deuxième semaine post-natale, c'est-à-dire environ autour de la période de l'ouverture des yeux chez le rat. Bien que leur proportion relative soit toujours un sujet controversé (Bottari *et al.*, 1993; Michels *et al.*, 1994; Steckelings *et al.*, 1992), une récente étude autoradiographique suggère qu'il y a une proportion de 75% de récepteurs AT<sub>2</sub> par rapport à 25% d'AT<sub>1</sub> chez le rat adulte (Michels *et al.*, 1994). Mais comme nous l'avons mentionné précédemment, le nombre de récepteurs AT<sub>2</sub> est encore plus important au niveau du CS des jeunes rats. Les résultats de l'étude de Michels *et al.* (1994), dans laquelle les rats ont subi une énucléation uni- ou bilatérale, indiquent que l'expression des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans le CS pourrait être "régulée" par les afférents rétiniens. D'autres études récentes ont démontré que l'injection d'Ang II dans les couches superficielles du CS du rat (Merabet *et al.*, 1994, 1997) et du hamster adultes (Mooney *et al.*, 1994) a pour effet d'inhiber la réponse de ces neurones aux stimulations visuelles. De plus, une de ces études suggère que cet effet soit relié à la dose du peptide (Merabet *et al.*, 1997). Il semble aussi que les effets

de l'Ang II sur les réponses visuelles des neurones des couches superficielles du CS soient principalement dus à un effet postsynaptique de ce peptide (Mooney *et al.*, 1994) sur les récepteurs AT<sub>1</sub> (Merabet *et al.*, 1994, 1997).

#### 1.4 Objectifs

Une étude précédente faite dans notre laboratoire a déterminé que l'effet de l'Ang II sur la réponse visuelle du CS des rats adultes est de nature inhibitrice et se produit principalement par l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> (Merabet *et al.*, 1994, 1997). Étant donné que le nombre et la localisation des récepteurs angiotensinergiques (principalement de type AT<sub>2</sub>) varient au cours du développement post-natal et que chez le jeune raton, comme chez l'adulte, le CS contient une plus grande proportion de récepteurs AT<sub>2</sub> que de récepteurs AT<sub>1</sub>, nous avons voulu déterminer 1) si l'Ang II est susceptible de modifier l'activité physiologique des neurones du CS, 2) dans l'affirmative, caractériser les effets de l'Ang II et comparer ces effets avec ceux obtenus chez l'animal adulte et 3) déterminer les types de récepteurs impliqués dans les effets observés et vérifier s'ils varient au cours du développement post-natal du rat.

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

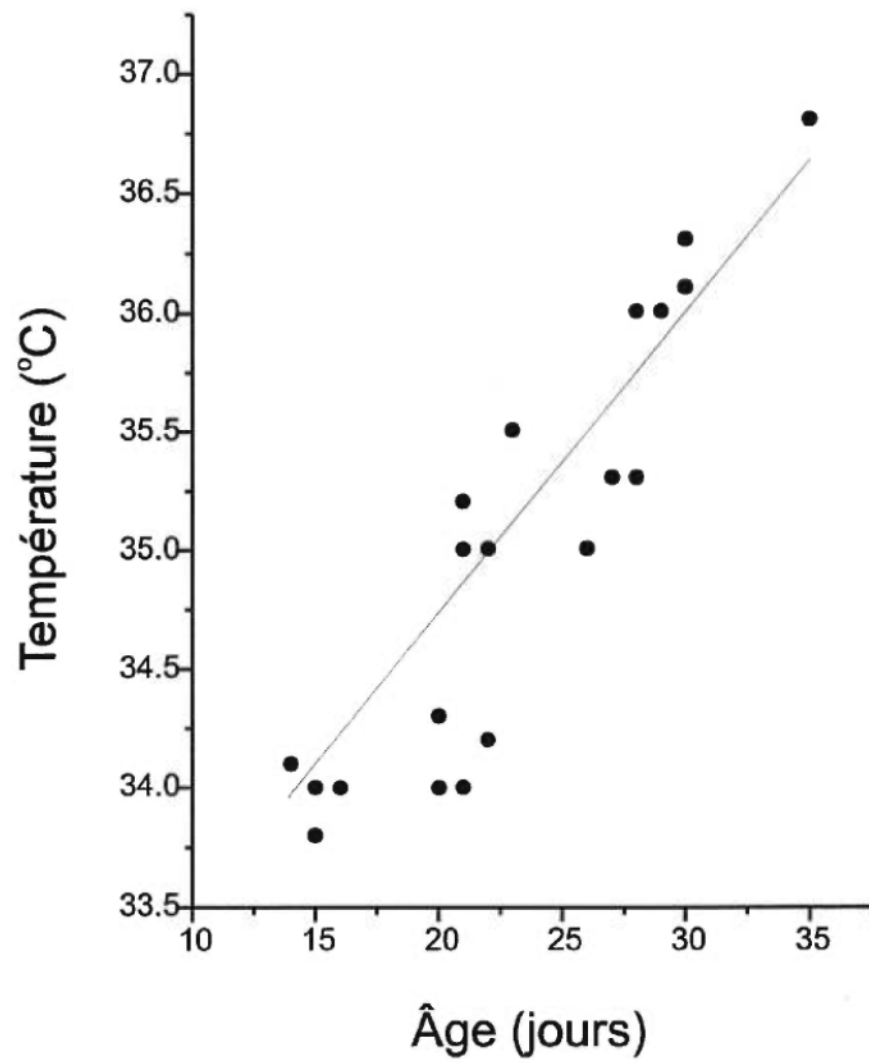
## CHAPITRE 2



## 2.1 Préparation animale

Les expériences sont réalisées sur 135 jeunes rats Long Evans âgés entre 15 et 40 jours [jour de la naissance = jour post-natal 0 (P0)]. Ils sont traités suivant les normes du Conseil Canadien de Protection des Animaux. Les animaux sont anesthésiés à l'uréthane 25% (2.5 g/Kg, i.p.). De l'atropine (0.04 mg/Kg, i.p.) est ajoutée à l'anesthésique chez les rats pesant plus de 50g afin de réduire les sécrétions trachéales. Une fois anesthésié, l'animal est positionné sur un appareil stéréotaxique (Stoelting) adapté aux jeunes rats afin que la tête soit maintenue le plus stable possible. Du chlorhydrate de lidocaïne (2%) est injecté (sous-cutané) à chaque point de pression et d'incision. En se basant proportionnellement sur les coordonnées stéréotaxiques du rat adulte (l'adulte étant plus gros que le jeune) (Paxinos et Watson, 1997), une craniotomie est effectuée exposant ainsi le cortex recouvrant le CS. Il est à noter que dans la majorité des cas, la duremère est conservée intacte. Tout au long de l'expérimentation, la température est maintenue constante à l'aide d'une plaque chauffante reliée à un thermomètre rectal. Il est à noter que la température corporelle à laquelle l'animal est maintenu varie selon l'âge des jeunes rats (Fig.3). Nous avons en effet déterminé la température corporelle optimale permettant de maintenir les fonctions vitales stables sur une période prolongée et ce, selon l'âge des rats. L'électrocardiogramme est continuellement enregistré afin de s'assurer du bon état physiologique interne de l'animal et de

**Figure 3:** Graphique de la température corporelle optimale en fonction de l'âge des jeunes rats. Plus l'animal est âgé, plus la température corporelle à laquelle il doit être maintenu est élevée ( $r=0.94$ ,  $p<0.001$ ).



son niveau d'anesthésie. Les réflexes (ou l'absence de réflexes) suite au pincement d'une patte sont aussi utilisés comme indice du degré d'anesthésie. Au besoin, une dose de rappel d'uréthane est ajoutée (environ 10% de la dose initiale). Si nécessaire, les paupières sont coupées afin de bien exposer l'oeil. De l'atropine sulfate (1%) est utilisé afin de dilater les pupilles et les cornées sont protégées par l'application régulière de larmes artificielles. Une fois la chirurgie complétée, une électrode est positionnée perpendiculairement au cortex, qui est par la suite recouvert d'agar afin de le protéger contre la dessiccation. L'électrode est ensuite descendue et positionnée à l'aide d'un micromanipulateur dans la SGS du CS en se basant sur l'activité multiunitaire enregistrée, sur la forme du potentiel évoqué visuel (PEV) et sur les coordonnées stéréotaxiques du rat adulte (Paxinos et Watson, 1997).

## **2.2 Enregistrement et stimulation visuelle**

L'enregistrement des potentiels évoqués visuels (PEVs) se fait avec un capillaire de verre de 1mm de diamètre étiré à l'aide d'une étireuse de micropipette (Kopf, modèle 720). La pointe est coupée afin d'obtenir une ouverture (idéalement biseautée) d'environ 25 $\mu$ m. La même électrode est utilisée pour l'injection de l'agent pharmacologique (voir section 2.4). Le signal est amplifié mille fois (bandes passantes de 10 à 1000 Hz) et est envoyé à un moniteur audio, à un oscilloscope ainsi qu'à un ordinateur via un interface

analogue/digital (CED 1401). Le signal enregistré par l'ordinateur correspond à la moyenne des potentiels évoqués par 35 présentations du stimulus visuel. L'enregistrement continu des PEVs dans le temps à l'aide d'un physiographe (AstroMed Dash 4) nous permet d'observer l'effet de l'injection en temps réel sur l'activité colliculaire. De plus, au cours de l'expérience, chaque potentiel évoqué par une seule présentation du flash est affiché sur l'écran d'un oscilloscope. Une copie du potentiel avant et après l'injection de l'agent pharmacologique est quelques fois conservée sur papier.

Comme stimulation visuelle, nous utilisons un photostimulateur (Grass, flash de 10 $\mu$ sec) placé à 30 cm en face de l'oeil controlatéral à l'hémisphère dans lequel nous enregistrons. L'intensité du flash est de 4 sur l'échelle de 1 à 16 du photostimulateur et la fréquence de stimulation est de 1Hz. L'oeil est stimulé continuellement durant tout le protocole expérimental (voir section 2.5).

### **2.3 Localisation des champs récepteurs**

Lors de la majorité des enregistrements, le champ récepteur du bassin cellulaire situé sous la pointe de l'électrode est localisé avant l'injection de l'agent pharmacologique en utilisant un ophtalmoscope et un écran translucide positionné à 28 cm de l'animal. Les coordonnées des champs récepteurs sont transposées sur la carte rétinotopique du CS de Siminoff *et al.* (1966) (Fig.4,

encadré) permettant d'estimer avec plus d'exactitude la position médio-latérale et rostro-caudale de notre électrode dans le CS.

## **2.4 Administration des drogues**

### 2.4.1 Méthode

Nous utilisons un système d'injection par pression (nanopompe, WPI A1400) qui a été modifié afin d'enregistrer de façon simultanée l'activité multiunitaire entourant la pointe de l'électrode de verre (Casanova et Molotchnikoff, 1990). La nanopompe permet d'injecter un volume variant de 0 à 100 nl par minute. En se basant sur une étude effectuée dans notre laboratoire (Merabet *et al.*, 1994, 1997), les différentes drogues sont injectées à un taux de 10nl/min, durant 4 minutes.

### 2.4.2 Agent de coloration

Dans un premier temps, toutes les solutions injectées étaient colorées au Chicago Sky Blue (0.2% à 0.5%) pour une vérification histologique ultérieure. Cependant, le colorant semblait avoir un effet toxique sur la réponse cellulaire du CS (voir résultats). Nous avons donc cessé de colorer nos solutions, sauf à quelques reprises, pour confirmer la position de l'électrode dans la SGS du

CS. Chaque injection s'est avérée être dans la bonne structure (c'est-à-dire le CS) ainsi que dans la couche cellulaire visée (c'est-à-dire la SGS). Les sections suivantes traitent des solutions **non-colorées** qui ont été injectées.

### 2.4.3 Drogues utilisées

#### 2.4.3.1 Angiotensine II

Nous utilisons de l'Ang II (Val<sup>5</sup>) diluée dans une solution de NaCl 0.9% (pH=5.8) (Merabet *et al.*, 1994; Merabet *et al.*, 1997). Des concentrations variant de  $10^{-3}$ M à  $10^{-12}$ M sont utilisées afin de vérifier si l'effet de l'Ang II sur la réponse visuelle du CS est relié à la dose (pH à  $10^{-6}$ M=5.8). L'Ang II est aussi injectée en conjonction avec des antagonistes spécifiques des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (voir section 2.4.3.2).

#### 2.4.3.2 Ligands

L'injection d'Ang II en conjonction avec un antagoniste spécifique des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> (DUP 753 et PD 123319 respectivement) est réalisée dans le but de déterminer quels types de récepteurs angiotensinergiques sont impliqués dans l'effet de ce peptide sur la réponse visuelle du CS du jeune rat. Ainsi, le DUP 753 est injecté avec de l'Ang II à une concentration égale ( $10^{-3}$ M

ou  $10^{-6}$ M) et dans une proportion relative de 10 pour 1 en faveur du DUP 753 (Merabet *et al.*, 1997; Meffert *et al.*, 1996; Stoll *et al.*, 1995). La même procédure est suivie lors de l'injection du PD 123319. Finalement, les deux antagonistes sont aussi injectés en conjonction avec l'Ang II, à une même concentration ( $10^{-3}$ M) et dans une proportion relative de 10:10:1. Les effets des injections d'Ang II en conjonction avec le(s) ligand(s) sont comparés avec les effets des injections d'Ang II seule, de même concentration (par exemple, les injections d'Ang II en conjonction avec le DUP 753 à une concentration de  $10^{-3}$ M sont comparées aux injections d'Ang II seule à une concentration de  $10^{-3}$ M). Afin de vérifier l'effet agoniste du CGP 42112, ce ligand spécifique aux récepteurs  $AT_2$  est injecté seul à des concentrations de  $10^{-6}$ M et  $10^{-10}$ M.

#### 2.4.4 Injections contrôles

Premièrement, le véhicule dans lequel l'Ang II est diluée (soit une solution de NaCl 0.9% non-colorée) est injecté seul afin de vérifier son effet sur les PEVs. Étant donné les résultats obtenus suite à ce contrôle (voir résultats), nous avons fait une série d'injections de saline isotonique (pH physiologique de  $7 \pm 0.1$ ; osmolarité: 307mOsm) afin de comparer l'effet physiologique de cette solution avec celui observé après injection de la saline "normale" (osmolarité: 271mOsm), c'est-à-dire celle utilisée pour diluer l'Ang II et ses ligands. Pour fin de comparaison, du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa) [(en mM: 124



NaCl, 3 KCl, 1.25  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5  $\text{MgSO}_4$ , 26  $\text{NaHCO}_3$ , 10 d-glucose, 2 l-ascorbate et 3.4  $\text{CaCl}_2$ ) osmolarité: 297mOsm] a aussi été injecté seul et avec de l'Ang II. Finalement, nous avons injecté de l'acide N-phenylanthranilique (DPC), un bloqueur des canaux chlores dont l'activité est, entre autres, associée aux récepteurs d'étirement membranaires (Craelius *et al.*, 1989; Faller et Ryan, 1992). Le DPC a été injecté seul à une concentration de 100 $\mu\text{M}$  (dilué dans une solution de NaCl 0.9%).

## 2.5 Protocole expérimental

Une fois l'électrode positionnée au niveau de la SGS du CS, le champ récepteur est localisé. Des enregistrements des PEVs sont ensuite effectués chaque minute, jusqu'à ce que trois enregistrements consécutifs stables (enregistrements contrôles) aient été obtenus. Ensuite, l'injection débute (temps 0) et sa durée est de 4 minutes, à un taux de 10nl par minute (pour un total de 40 nl). Le volume et le débit de l'injection sont généralement les mêmes pour toutes les substances injectées afin de pouvoir comparer les effets des différentes drogues. Durant l'injection, des enregistrements sont pris toutes les minutes. Par la suite, le PEV est enregistré une minute, 3 minutes 30 sec et 6 minutes après la fin de l'injection, et finalement toutes les 5 minutes, jusqu'à ce que le signal ait récupéré, c'est-à-dire lorsque la forme et l'amplitude des ondes correspondent à celles des enregistrements contrôles. Finalement, l'électrode

est retirée du cerveau et la pompe est activée de nouveau (toujours à un taux de 10nl/min) afin de vérifier si la solution contenue dans l'électrode coule toujours librement.

## 2.6 Analyse

### 2.6.1 Regroupement des animaux

Pour effectuer l'analyse des résultats, les animaux ont été séparés selon leur âge en 4 groupes distincts; les ratons de 15-19 jours, de 20-24 jours, de 25-29 jours et finalement de 30 jours et plus.

### 2.6.2 Paramètres étudiés

L'effet de l'Ang II sur les PEVs a été quantifié à l'aide de deux paramètres: l'amplitude du signal et sa latence. Premièrement, nous avons mesuré l'amplitude de l'onde principale la plus stable de chaque PEV, avant, pendant et après l'injection des drogues et des contrôles (voir Fig.6). Il est à noter que l'amplitude est un paramètre régulièrement utilisé dans l'analyse des PEVs afin de quantifier l'effet de diverses drogues sur l'activité du SNC (Hetzler *et al.*, 1981; Regan et Spekreijse, 1986). Les mesures d'amplitude ont été normalisées par rapport à l'amplitude moyenne des enregistrements contrôles

selon l'équation suivante:

$$\text{Amplitude normalisée} = \frac{\text{Amplitude des PEVs enregistrés}}{\text{Amplitude moyenne des PEVs des enregistrements contrôles}}$$

Finalement, la latence des PEVs a été mesurée pour les injections d'Ang II à la plus forte concentration, soit à  $10^{-3}\text{M}$ . La latence correspond à l'intervalle entre l'apparition du stimulus et la première déflexion du potentiel.

### 2.6.3 Critères de sélection des injections

Les résultats obtenus suite aux injections ont été gardés pour fin d'analyse selon les critères suivant: a) la stabilité des contrôles, b) la relation étroite entre la modification du signal et la période d'injection, c) les indices relatifs au succès de l'injection, c'est-à-dire la modification caractéristique du bruit créé par la pompe durant l'injection et l'écoulement de la solution lorsque l'électrode est retirée du cerveau (voir fin de la section 2.5) et d) récupération du signal  $\geq$  à 75% de l'amplitude moyenne des signaux contrôles (Merabet *et al.*, 1997).

### 2.6.4 Statistiques

L'action de la substance injectée est considérée comme significative si les

modifications de l'amplitude sont  $\geq$  à 2 fois la déviation standard (DS) obtenue lors de la moyenne des enregistrements contrôles. L'analyse de variance (Anova) et le t-test de Student sont utilisés afin de déterminer si les différents effets sont significativement différents entre eux ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ).

## **2.7 Histologie**

Une analyse histologique est effectuée pour toutes les injections colorées au Chicago Sky Blue afin de vérifier la position exacte et l'étendue de l'injection dans le CS. À la fin de l'expérimentation, l'animal est euthanasié à l'aide d'une surdose d'halothane (par inhalation) et le cerveau est retiré de la boîte crânienne pour être fixé dans une solution de formaline dans un tampon phosphate 10% durant environ 7 jours. Le cerveau est ensuite tranché en coupes coronales de 100  $\mu\text{m}$ , qui seront colorées avec une solution qui révèle l'enzyme acétylcholinestérase (AChE) contenue dans les tissus. La SGS du CS est riche en AChE et apparaît donc plus foncée suite à la coloration que la strate voisine (SO) (voir Fig.5) (Paxinos et Watson, 1986).

## **2.8 Autre approche expérimentale**

Quelques expériences ont été réalisées sur des jeunes rats dont le cortex recouvrant le CS a été retiré par aspiration, exposant ainsi le CS. En plus des

procédures décrites dans la section *Préparation animale*, du lactate Ringer était administré aux animaux durant la chirurgie. Lors de ces expériences, les enregistrements ont été réalisés avec une électrode de tungstène d'une impédance variant de 0.3 à 2.4 M $\Omega$ . L'électrode était insérée dans le CS à quelques reprises pour percer sa surface afin de permettre une bonne diffusion de la solution et enfin descendue de quelques microns pour être positionnée au niveau de la SGS. Le PEV était amplifié et filtré tel que mentionné dans la section 2.2. Une fois l'électrode positionnée et le signal stable, la substance utilisée (Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M, saline et, à des fins de contrôle, le chlorhydrate de lidocaïne 2%) était appliquée directement sur le CS (environ 35  $\mu$ l) à l'aide d'une micropipette (Eppendorf). Ainsi, le CS se trouvait à "baigner" dans la solution utilisée. Des enregistrements ont été pris avant et après l'administration de la drogue, jusqu'à ce que le signal retrouve sa forme et son amplitude initiale.

# RÉSULTATS

## CHAPITRE 3

### 3.1 Angiotensine II

#### 3.1.1 Observations générales

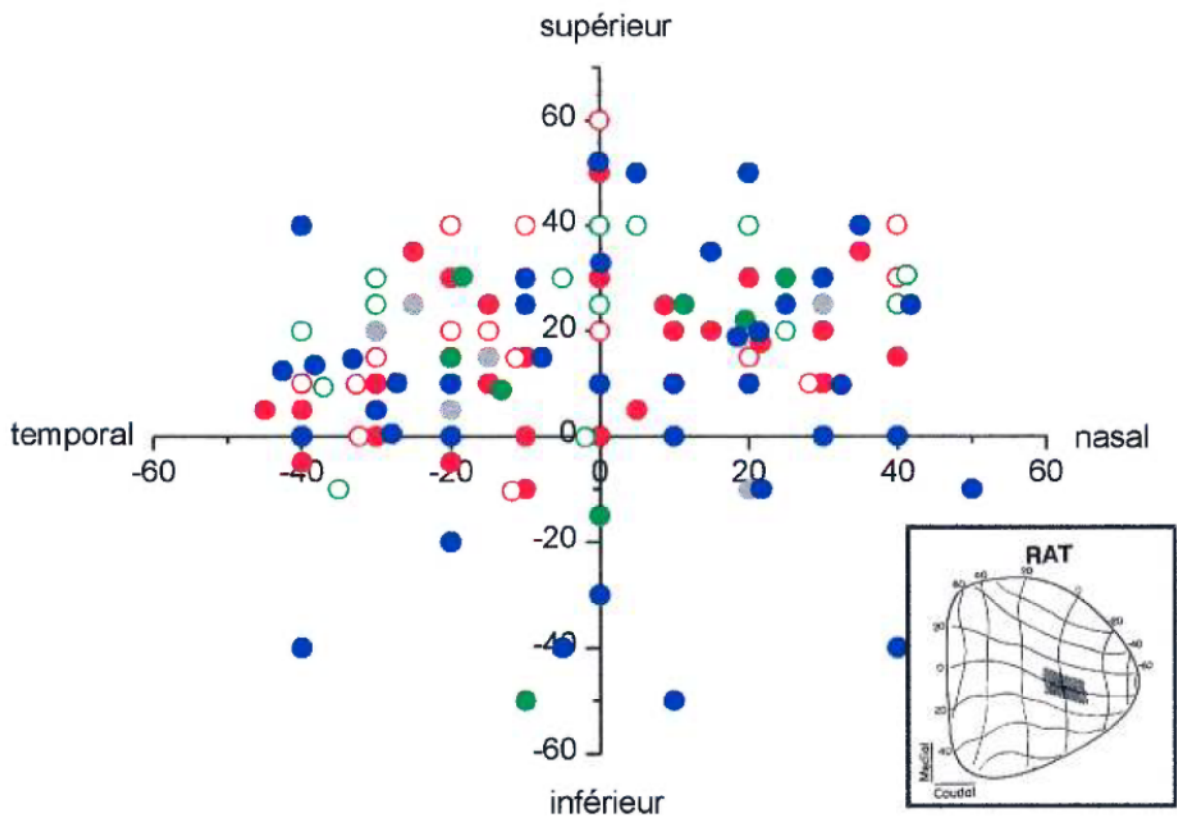
Un total de 95 injections d'Ang II ont été effectuées au niveau de la SGS du CS dans cette étude. De ce nombre, 67 ont été couronnées de succès et sont incluses dans l'analyse. Les 28 autres ont été rejetées pour les raisons suivantes: a) la récupération est  $\leq$  à 75% du signal initial, b) la position exacte de l'électrode dans le CS est incertaine, c) l'état physiologique interne de l'animal n'est pas satisfaisant, provoquant une détérioration ou une instabilité des signaux enregistrés, d) l'injection ne semble pas réussie sur la base des critères décrits dans la section *Matériel et Méthodes* ou e) la morphologie des PEVs varie de façon trop importante d'un enregistrement à l'autre.

#### 3.1.2 Localisation des sites d'injections

Les centres des champs récepteurs ont été localisés à chaque site d'enregistrement et sont dispersés dans tout le champ visuel (Fig.4). Tel qu'illustré à la figure 4, nous avons principalement enregistré au niveau de la partie médiane du CS, qui représente en fait le champ visuel supérieur. Ce biais en faveur des enregistrements faits dans la partie médiane du CS (champ visuel supérieur) peut, en partie, être expliqué par le fait que cette région du CS

**Figure 4:** Localisation du centre des champs récepteurs des populations cellulaires enregistrées aux sites d'injections lors de l'administration d'Ang II (●), d'Ang II:DUP 753 (●), d'Ang II:PD 123319 (○), d'Ang II:DUP 753:PD 123319 (●), de CGP 42112 (○) et de NaCl 0.9% (●). La carte visuotopique du CS (tirée de Siminoff *et al.*, 1966) est représentée dans la partie inférieure droite de la figure.





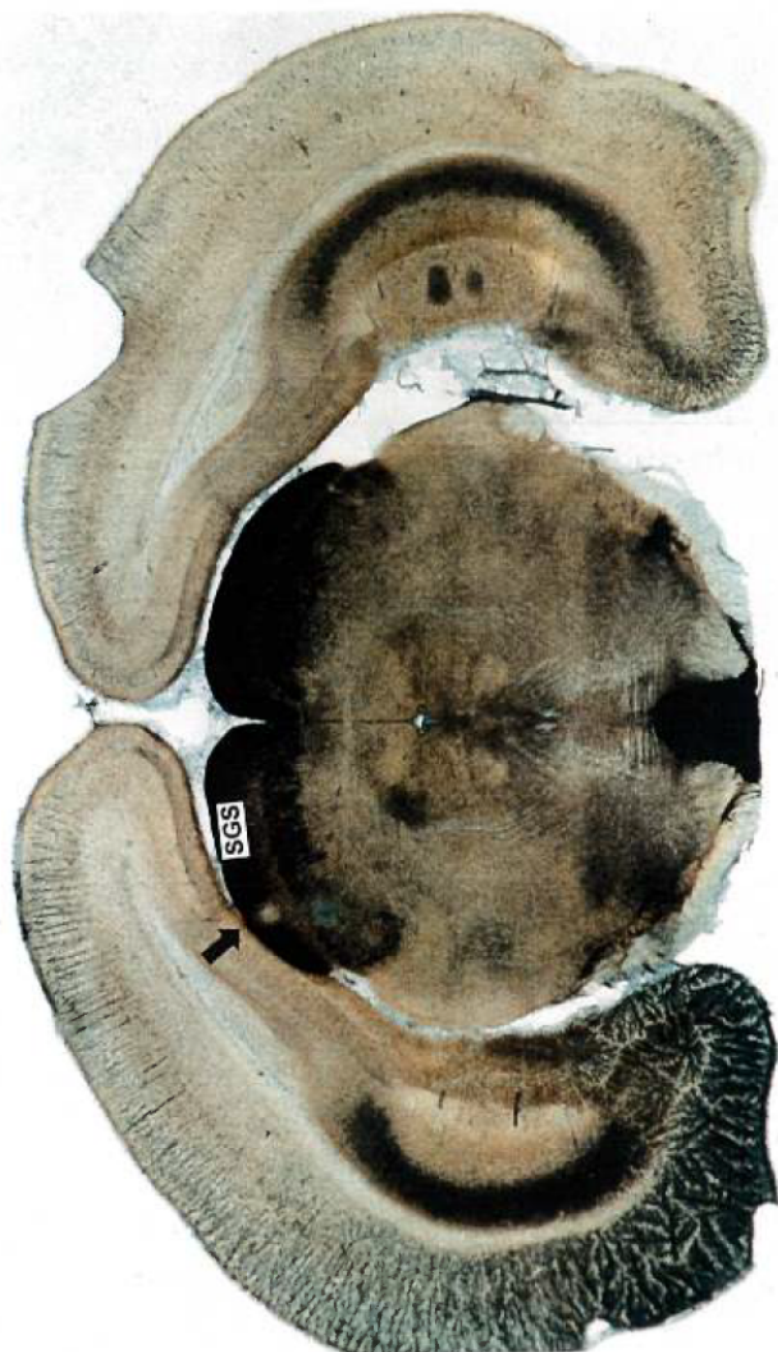
est surreprésentée en surface par rapport à la région du CS représentant le champ visuel inférieur. L'encadré situé dans la partie inférieure droite de la figure 4 montre la carte visuotopique du CS sur laquelle nous avons transposé les coordonnées relatives à la position du centre des champs récepteurs (Siminoff *et al.*, 1966).

La figure 5 montre l'exemple de deux injections dont la position laminaire diffère. Notez que la majorité des injections effectuées au cours de cette étude ont été faites au niveau de la SGS, la couche la plus dorsale et la plus foncée (car riche en AChE) de la figure 5. Quelques injections ont été réalisées dans des couches plus ventrales afin de vérifier la position laminaire des récepteurs angiotensinergiques.


### 3.1.3 Effet sur l'amplitude des PEVs

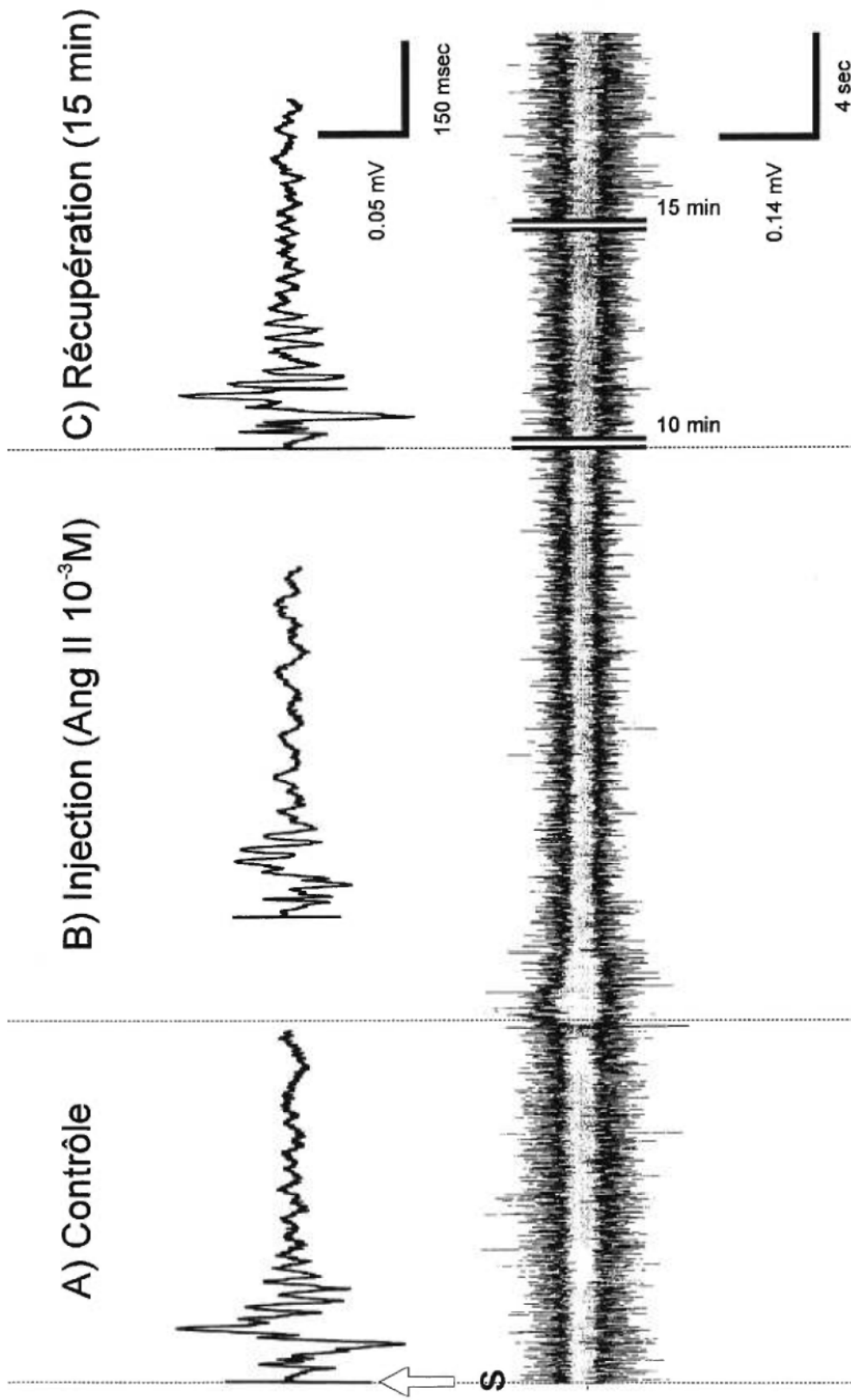
Nos résultats indiquent que l'Ang II a un effet inhibiteur sur l'amplitude des PEVs enregistrés. L'inhibition est considérée comme significative par rapport aux enregistrements contrôles dans 95.5% des cas (voir *Matériel et Méthodes*, section 2.6.4) et est maximale, en moyenne, 2 min 36 sec après la fin de l'injection. Il est à noter que les pourcentages d'inhibition n'ont jamais été calculés à partir des PEVs enregistrés durant la période d'injection afin d'éviter de tenir compte de la perturbation mécanique transitoire causée par l'injection

**Figure 5:** Photographie d'une section coronale d'un cerveau de rat colorée afin de révéler la présence de l'acétylcholinestérase (AChE). La flèche indique un site d'injection et d'enregistrement situé dans la SGS. Un autre site est situé plus ventralement à la jonction de la SGI et de la SBI. Échelle: 1mm.



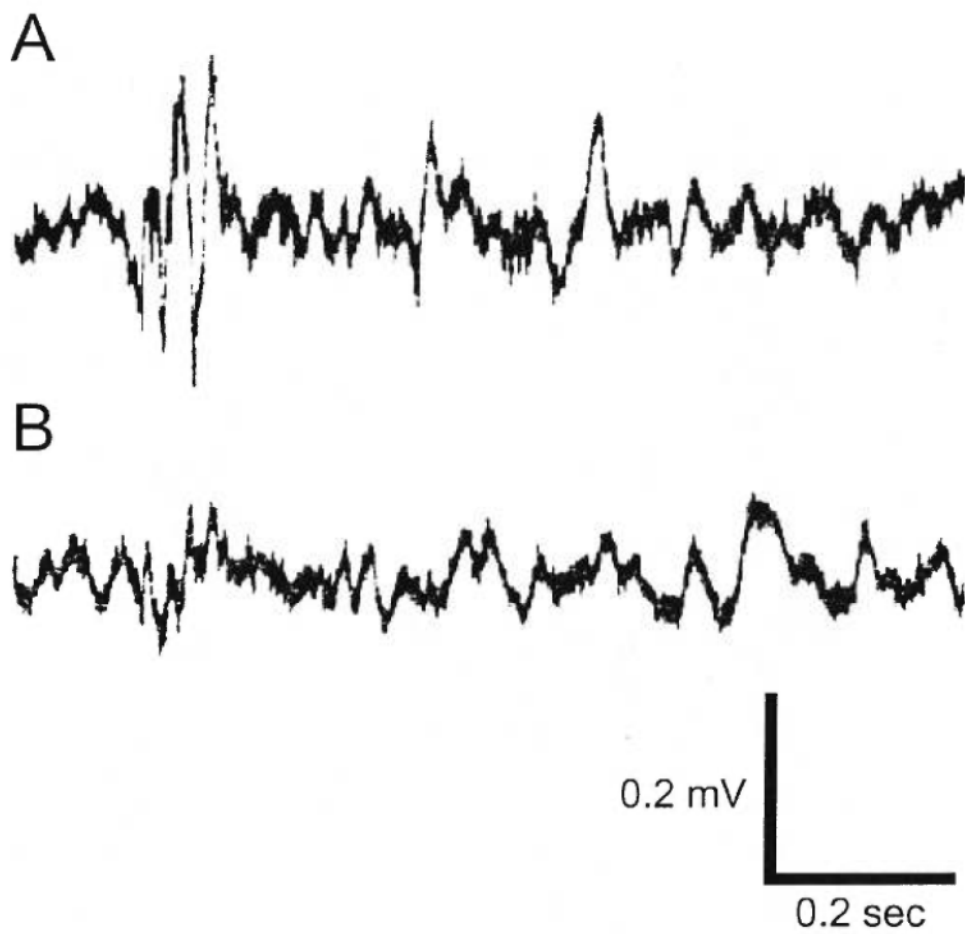
*per se*. La figure 6 illustre un exemple de l'effet inhibiteur réversible causé par l'Ang II à une concentration de  $10^{-3}M$  sur la réponse visuelle du CS. Les signaux de la partie supérieure de la figure illustrent la moyenne des potentiels évoqués par 35 présentations du stimulus avant (A), pendant (B) et après (C) l'injection du peptide. Il peut être noté que l'amplitude de l'onde principale du signal a diminué durant l'injection (baisse de 49%) pour finalement récupérer complètement après environ 15 minutes (tracé C). Dans cet exemple, l'effet maximal a été observé 1 min après la fin de l'injection. Le tracé du bas illustre en parallèle l'effet du peptide en temps réel sur l'activité colliculaire lors de la même injection. On peut y observer que l'effet du peptide est apparent environ 2 sec après le début de l'injection et que l'inhibition persiste durant toute la période d'injection. Notez que la récupération est progressive, c'est-à-dire qu'elle est intermédiaire à 10 min et maximale à 15 min. La figure 7 montre un second exemple de l'effet inhibiteur de l'Ang II sur l'amplitude de la réponse visuelle. Dans le cas présent, des PEVs unitaires (c'est-à-dire un potentiel évoqué par une seule présentation du stimulus) ont été enregistrés avant (signal du haut) et après (signal du bas) l'injection d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}M$ .

**Figure 6:** Exemple de PEVs enregistrés dans la SGS du CS d'un jeune rat âgé de 25 jours. Les signaux du haut représentent la moyenne des potentiels évoqués par 35 présentations du stimulus et le tracé du bas illustre l'enregistrement des PEVs en continu. Les PEVs sont enregistrés avant (A), pendant (B) et après (C) l'injection d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M. Notez que le peptide a un effet inhibiteur global sur la réponse visuelle et que le signal récupère environ 15 min après l'injection. L'apparition du stimulus (S) est indiquée à l'aide de la flèche en bas à gauche. Notez que l'enregistrement de part et d'autres du symbole  dans le tracé du bas n'est pas en continu et représente l'activité enregistrée durant l'injection et environ 10 et 15 min après le début de l'injection.



**Figure 7:** Exemple de l'effet de l'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M sur le PEV unitaire (réponse à une seule présentation du stimulus) enregistré avant (A) et après (B) l'injection chez un rat de 23 jours. Notez l'effet inhibiteur du peptide sur l'amplitude de la réponse visuelle.



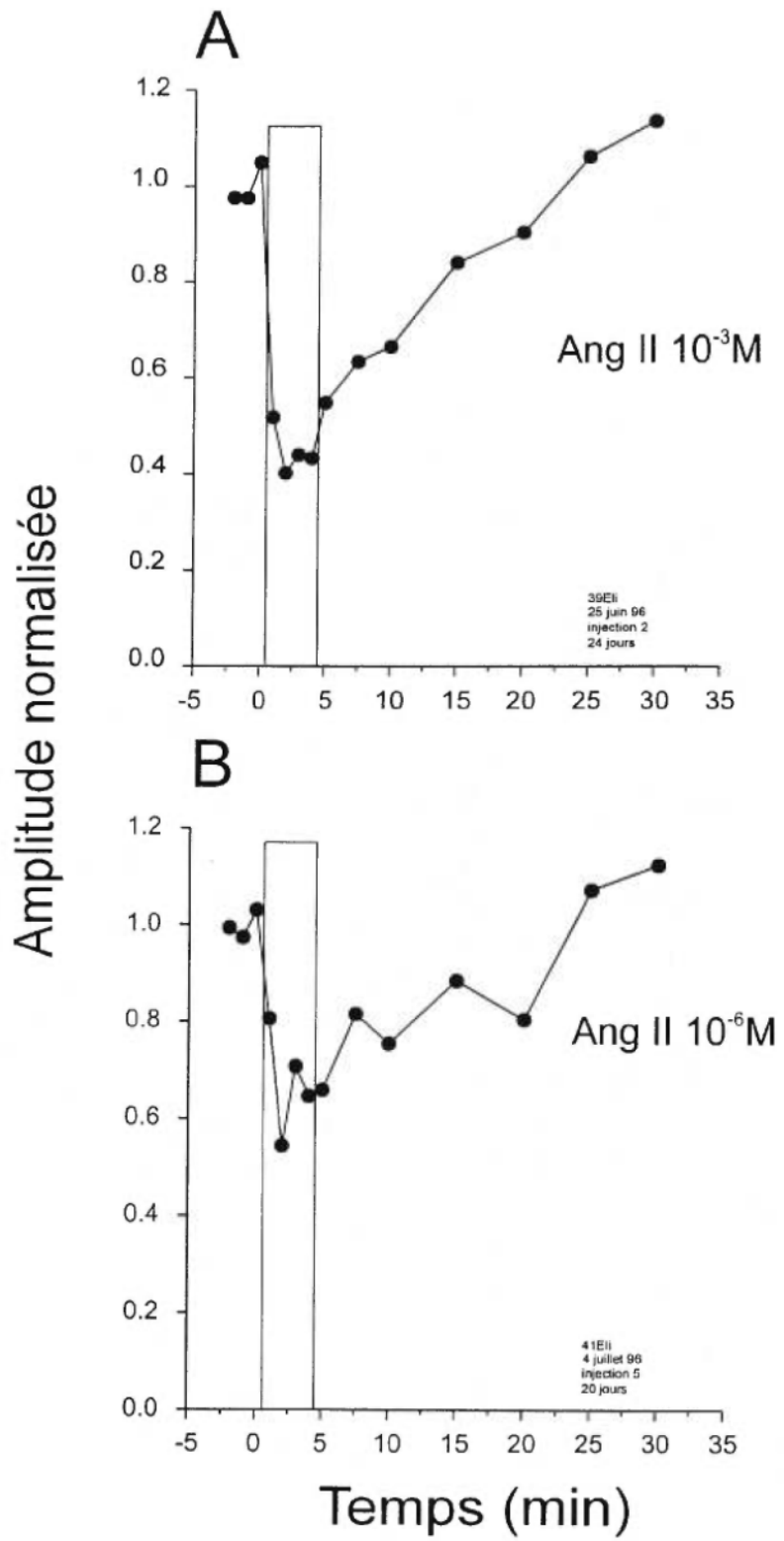


### 3.1.4 Effet de dosage

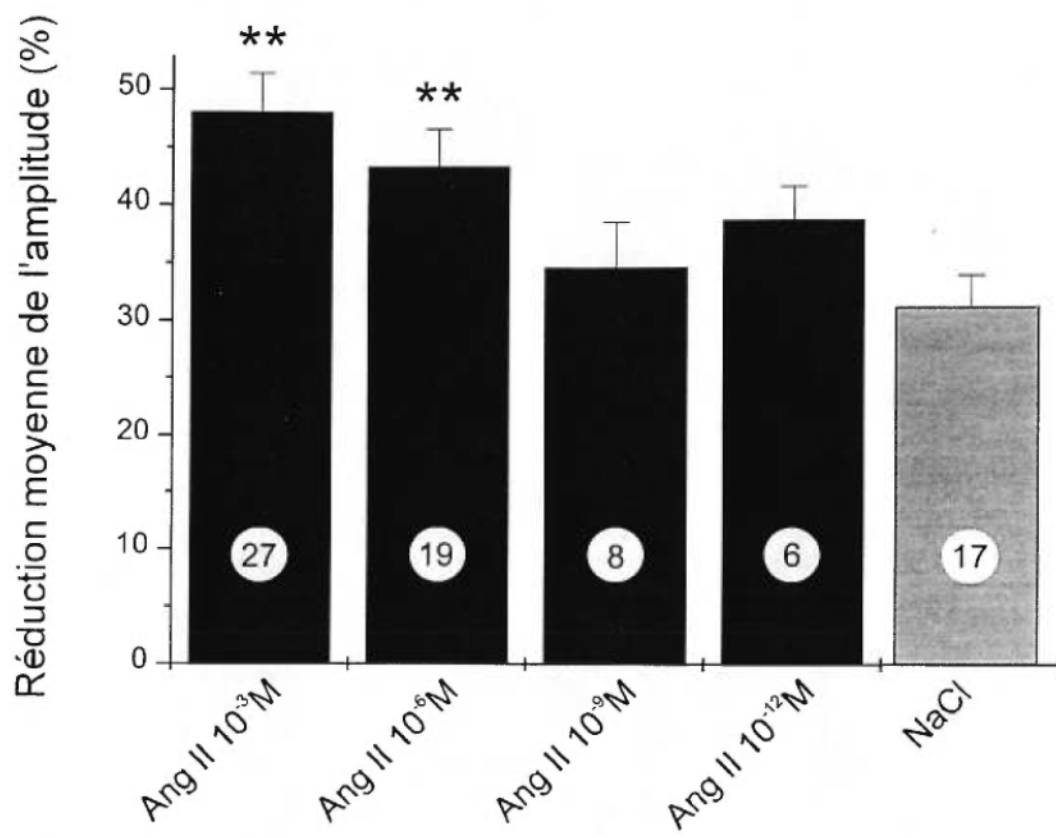
#### 3.1.4.1 Population totale

Les résultats décrits dans cette section ont été analysés en regroupant tous les animaux, quelque soit leur âge, afin de former une seule population. Ce regroupement est justifié par le fait que les rats âgés de moins de 35 jours environ sont considérés comme juvéniles (par opposition à l'adulte) (Lund et Lund, 1972; Serfaty et Linden, 1994). Tel que mentionné dans la section *Matériel et Méthodes*, l'Ang II a été injectée à différentes concentrations afin de vérifier si la force de son action sur les PEVs du CS des jeunes rats varie en fonction de la dose injectée. La figure 8 illustre des exemples du profil d'action de l'Ang II, dans le temps, sur l'amplitude des PEVs lors de l'injection du peptide à deux concentrations différentes, soit  $10^{-3}M$  (A) et  $10^{-6}M$  (B). Ces exemples suggèrent que l'importance de l'effet de l'Ang II dépend de la concentration injectée. En effet, l'inhibition est plus marquée à  $10^{-3}M$  qu'à  $10^{-6}M$  (45% et 34% respectivement). Notez que dans les deux cas, la récupération du signal est complète. L'histogramme de la figure 9 illustre la réduction moyenne de l'amplitude des PEVs pour toutes les injections effectuées à chaque concentration d'Ang II utilisée, et ce quelque soit l'âge des rats. Nous pouvons observer qu'il semble y avoir une tendance suggérant que plus la concentration est élevée, plus l'effet du peptide sur l'amplitude des PEVs est

**Figure 8:** Effet de l'Ang II à des concentrations de  $10^{-3}\text{M}$  (A) et  $10^{-6}\text{M}$  (B) sur l'amplitude des PEVs, montrant le profil d'action du peptide dans le temps. Le rectangle correspond à la période d'injection et le temps "0" au dernier enregistrement contrôlé et au début de l'injection. Les résultats suggèrent que l'effet inhibiteur de l'Ang II pourrait possiblement être relié à la dose.



**Figure 9:** Réduction moyenne de l'amplitude des PEVs ( $\pm$ ES) en fonction de la concentration d'Ang II (barres noires) et suite aux injections contrôles de NaCl (barre grise). Tous les animaux ont été groupés quelque soit leur âge. Les chiffres inscrits dans les cercles blancs indiquent le nombre total d'injections analysées pour chaque solution utilisée. Il en sera de même pour toutes les figures suivantes. Notez que la réduction moyenne de l'amplitude à des concentrations de  $10^{-3}$ M et  $10^{-5}$ M est significativement plus élevée que la réduction observée suite aux injections contrôles de NaCl (t-test,  $**p<0.01$ ).

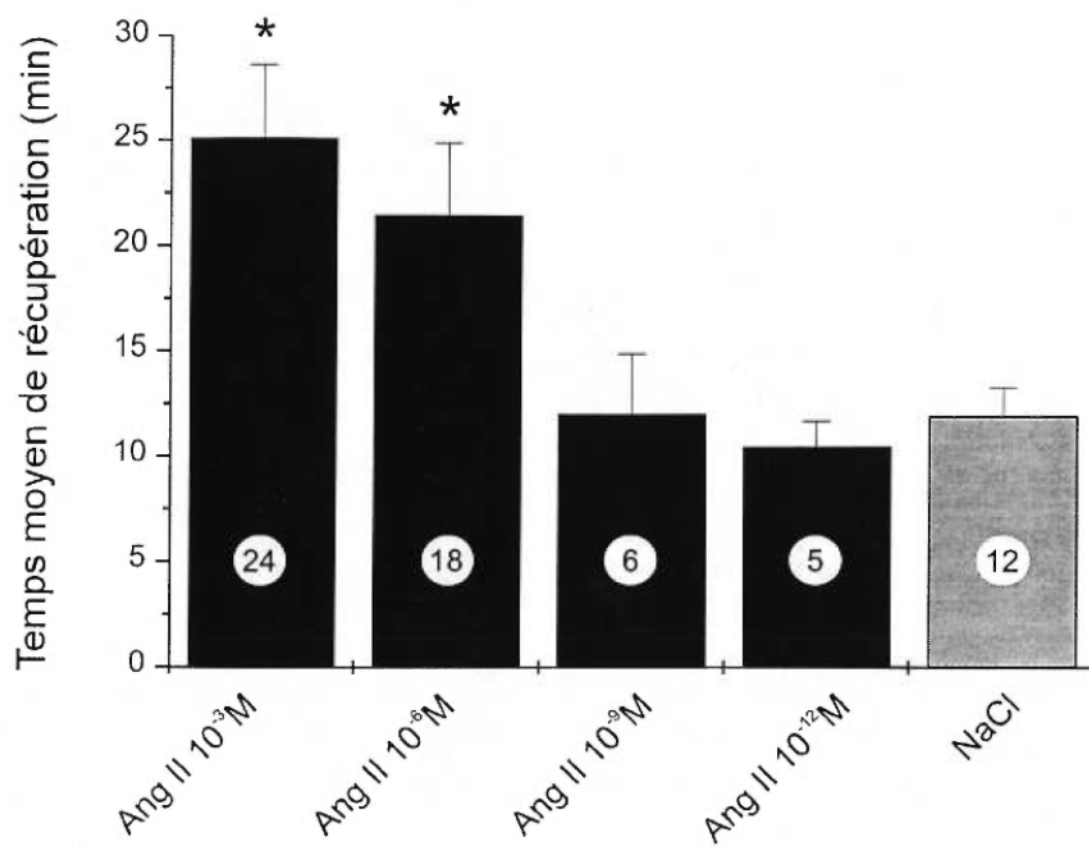


important (tendance à une variation linéaire,  $r=-0.83$ ,  $p=0.171$ ). Ainsi, la réduction moyenne de l'amplitude pour les injections d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}\text{M}$  est de  $48.1\% \pm 3.40$  (moyenne  $\pm$  ES), de  $43.30\% \pm 3.2$  à  $10^{-6}\text{M}$ , de  $34.5\% \pm 4.0$  à  $10^{-9}\text{M}$  et de  $38.7 \pm 2.9$  à  $10^{-12}\text{M}$ . Selon les analyses statistiques réalisées, seul l'effet des injections d'Ang II à des concentrations de  $10^{-3}\text{M}$  et  $10^{-6}\text{M}$  est significativement différent de celui des injections contrôles de NaCl 0.9% (t-test:  $p < 0.01$ ). Notez cependant que la différence d'inhibition entre ces deux concentrations n'est pas significative. Pour ce qui est des autres concentrations injectées ( $10^{-9}\text{M}$  et  $10^{-12}\text{M}$ ), leur effet inhibiteur n'est statistiquement pas différent de l'effet causé par les injections de NaCl. Ces résultats suggèrent que l'effet de l'Ang II pourrait être dépendant de la dose injectée.

Nous avons aussi déterminé le temps moyen requis pour que l'amplitude des PEVs récupère à au moins 75% de l'amplitude moyenne des signaux contrôles (Merabet, 1995) et ce, pour chaque concentration d'Ang II injectée. La figure 10 illustre les moyennes des temps de récupération obtenues pour les injections d'Ang II réalisées à différentes concentrations ainsi que pour les injections contrôles de NaCl, lorsque les rats de tous les âges sont regroupés en une seule classe. Le temps moyen requis pour obtenir une récupération de 75% du signal initial est d'environ 25 min pour une solution d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}\text{M}$  et de 21 min pour une solution d'Ang II à une

**Figure 10:** Temps moyen requis pour que l'amplitude des PEVs récupère à au moins 75% de l'amplitude moyenne des enregistrements contrôles pour les rats de tous les âges. Notez que les temps de récupération pour les injections d'Ang II à des concentrations de  $10^{-3}$ M et  $10^{-6}$ M sont significativement plus longs que ceux observés lors des injections contrôles de NaCl (t-test, \* $p < 0.05$ ).





concentration de  $10^{-6}$ M. Ces valeurs sont significativement différentes du temps moyen de récupération suite à l'injection de NaCl (t-test:  $p < 0.05$ ). En résumé, on peut donc remarquer qu'aux deux concentrations d'Ang II les plus élevées ( $10^{-3}$ M et  $10^{-6}$ M), le pourcentage d'inhibition ainsi que le temps de récupération diffèrent de façon significative par rapport aux injections contrôles de saline. Ce n'est toutefois pas le cas pour les concentrations plus faibles ( $10^{-9}$ M et  $10^{-12}$ M). Ainsi, lorsque les animaux de tous les âges sont regroupés en un seul et même groupe, les résultats démontrent que les effets de l'Ang II sur l'amplitude des PEVs et sur le temps de récupération varient selon la concentration du peptide injecté. Ainsi, plus la concentration est élevée, plus l'inhibition du signal semble importante et plus la récupération est lente.

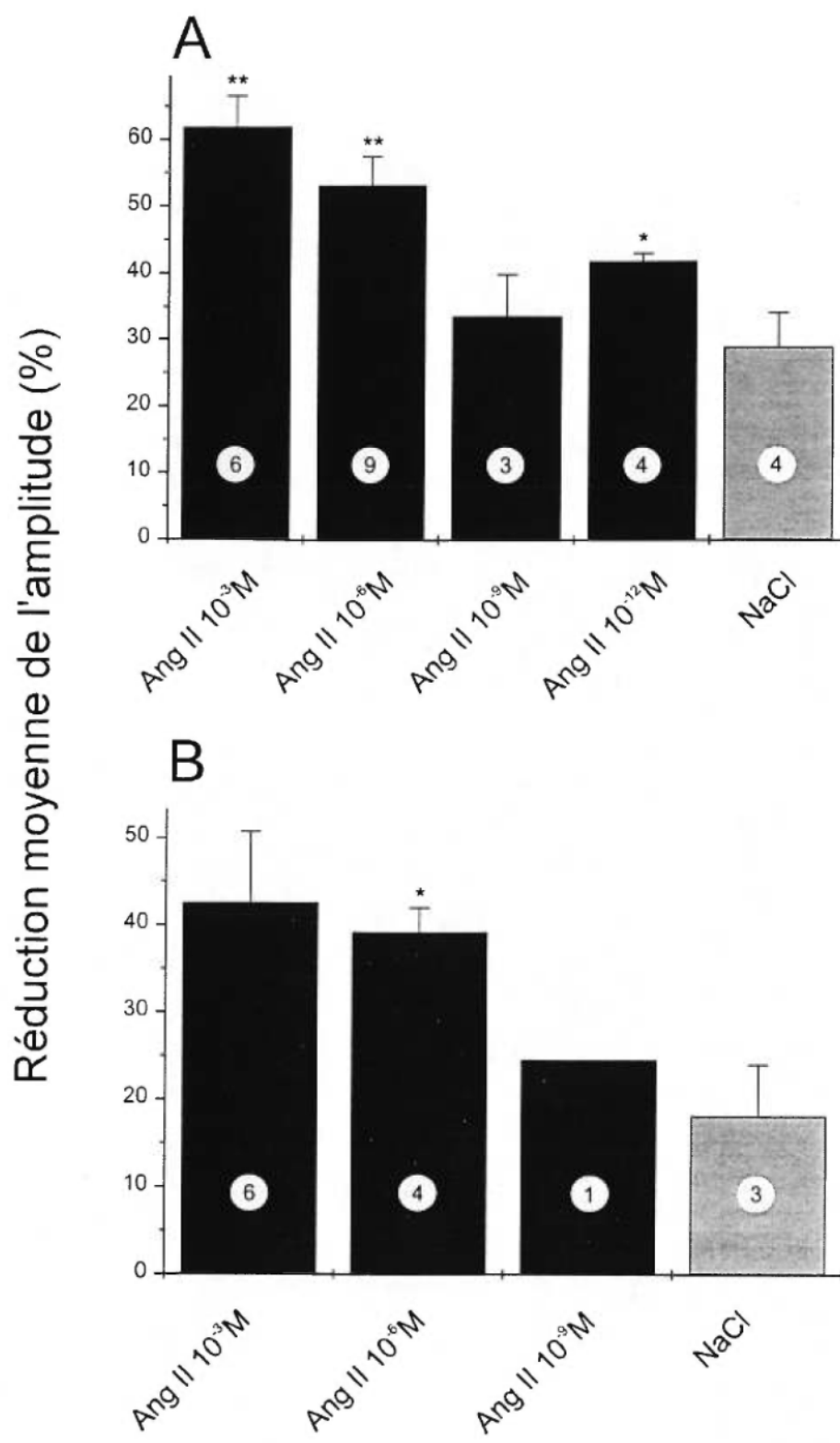
#### 3.1.4.2 Ratons classés en groupes distincts selon leur âge

Nous avons, dans cette section, effectué les mêmes analyses que dans la section précédente, mais pour différents groupes d'âge afin de vérifier si les résultats obtenus lorsque tous les animaux sont regroupés se reflètent dans chaque catégorie d'âge. À cette fin, les animaux ont été classés en 4 groupes distincts selon leur âge, soit 15-19 jours, 20-24 jours, 25-29 jours et 30 jours et plus. La tendance selon laquelle l'effet du peptide sur l'amplitude des PEVs varie selon la concentration injectée persiste grossièrement mais n'est pas toujours significative. Cette dernière observation résulte peut-être de la

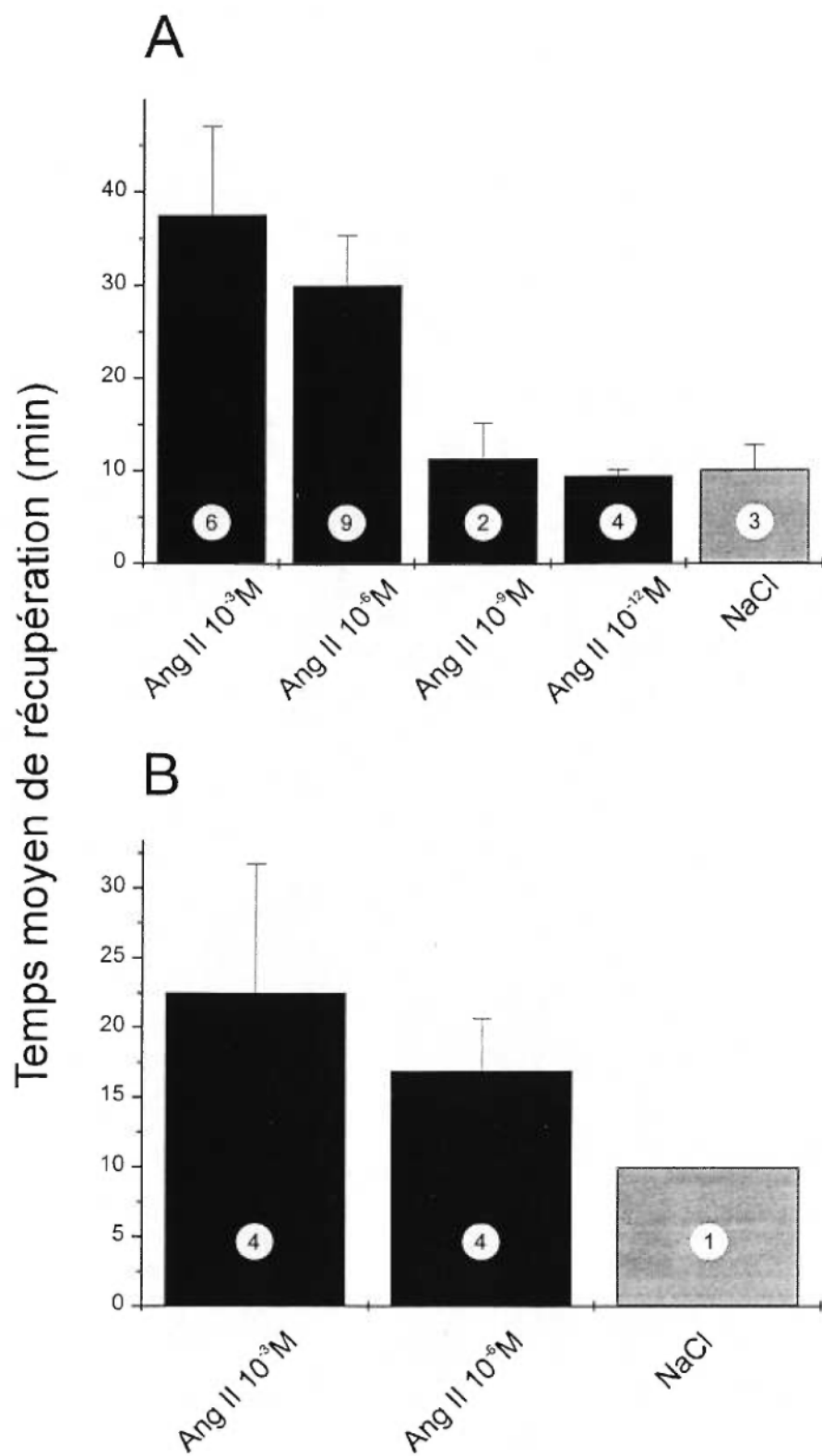
variabilité des effets et du plus petit nombre d'injections. Chez les rats âgés entre 15 et 19 jours, la réduction moyenne de l'amplitude des PEVs aux concentrations de  $10^{-3}M$ ,  $10^{-6}M$  et  $10^{-12}M$  est différente de celle des injections contrôles (t-test:  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$  et  $p < 0.05$  respectivement) (Fig.11A). Pour le groupe 20-24 jours, seul le pourcentage d'inhibition à la concentration de  $10^{-6}M$  est significativement différent de celui issu des injections de NaCl, même si la tendance suggérant que l'effet est dépendant de la dose injectée peut s'observer à toutes les autres concentrations (Fig.11B). Chez les rats âgés de 25 à 29 jours et de 30 jours et plus, aucune tendance significative ne peut être observée (non-illustré) ( $p > 0.05$ ).

Pour ce qui est du temps de récupération (75% du signal initial), il semble que la tendance observée lorsque tous les animaux sont regroupés (e.g. plus la concentration injectée est élevée, plus le temps de récupération est long) se confirme pour les tranches d'âges 15-19 jours et 20-24 jours seulement (Fig.12). Cependant, l'analyse statistique démontre que ces variations ne sont pas significatives pour aucun groupe et à aucune concentration d'Ang II ( $p > 0.05$ ).

**Figure 11:** Réduction moyenne de l'amplitude des PEVs en fonction de la concentration d'Ang II et suite aux injections de NaCl, chez des animaux âgés entre 15 et 19 jours (A) et chez les ratons de 20 à 24 jours (B). Notez qu'en (A), la réduction moyenne aux concentrations de  $10^{-3}$ M,  $10^{-6}$ M et  $10^{-12}$ M est significativement différente de la réduction moyenne des injections contrôles (t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). En (B), la seule différence significative est observée à une concentration d'Ang II de  $10^{-6}$ M (t-test, \* $p < 0.05$ ), même s'il existe une tendance selon laquelle l'effet de l'Ang II est plus important lorsque la concentration augmente à toutes les autres concentrations.



**Figure 12:** Histogramme illustrant la distribution du temps moyen requis pour que l'amplitude du signal récupère d'au moins 75% par rapport à l'amplitude moyenne des PEVs contrôles pour chaque concentration d'Ang II utilisée et pour les injections contrôles de NaCl, chez les rats âgés de 15 à 19 jours (A) et de 20 à 24 jours (B). Dans les deux groupes d'âge, ces résultats suggèrent que plus la concentration est élevée, plus le temps nécessaire pour que le signal récupère est élevé. Cependant, aucune différence observée n'est significative ( $p > 0.05$ ).





### 3.1.5 Effet de l'Ang II à une concentration donnée en fonction de l'âge des animaux

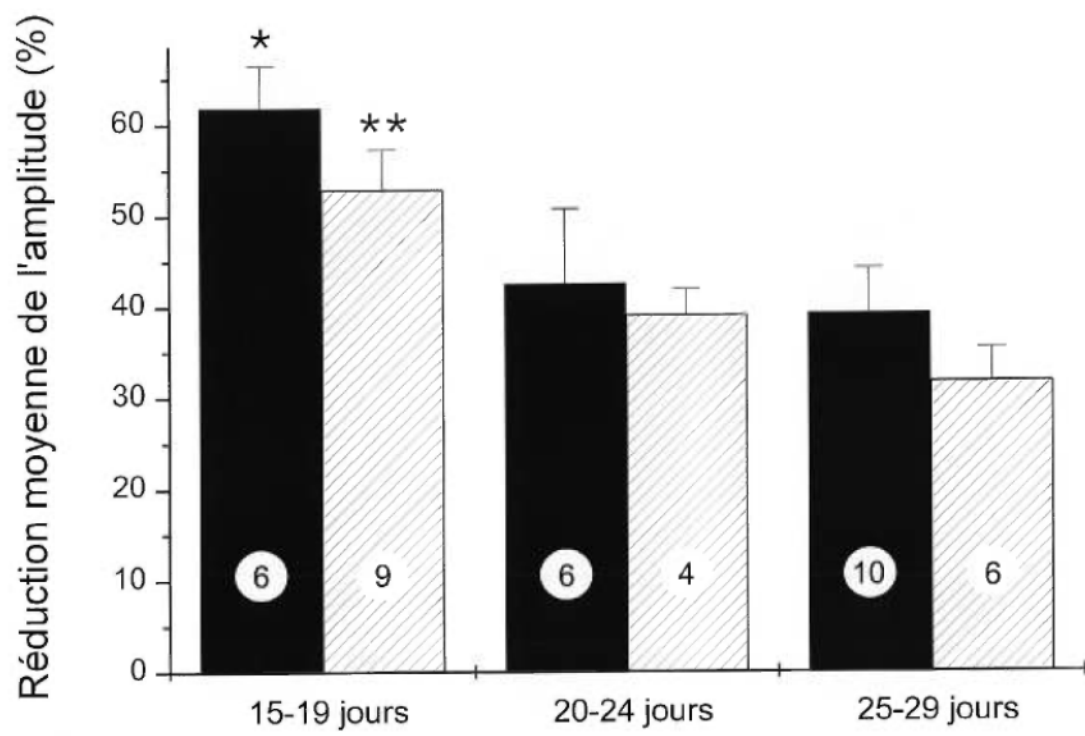
Nous avons aussi vérifié si la réduction de l'amplitude et le temps de récupération suite aux injections d'Ang II à une concentration donnée varient selon l'âge des rats. Chez les rats âgés entre 15-19 jours, 20-24 jours et 25-29 jours, il semble y avoir une tendance qui suggère que plus les rats sont jeunes, plus l'inhibition causée par l'Ang II à une concentration donnée ( $10^{-3}\text{M}$  ou de  $10^{-6}\text{M}$ ) est élevée (Fig.13). L'analyse statistique effectuée indique que la différence dans le degré d'inhibition n'est significative qu'entre les groupes 15-19 jours et 25-29 jours pour les deux concentrations [ $10^{-3}\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ;  $10^{-6}\text{M}$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ; Anova, t-test respectivement). Une tendance similaire peut être observée lorsque l'on considère les temps de récupération. En effet, bien que les différences ne soient pas significatives ( $p > 0.05$ ), il semble que plus les rats sont jeunes, plus le temps que prend le signal pour récupérer est long (non-illustré).

### 3.1.6 Effet de l'Ang II sur la latence des PEVs

Nous avons aussi déterminé si l'Ang II a un effet sur la latence des PEVs. Cette analyse a été effectuée pour des concentrations de  $10^{-3}\text{M}$ . Nos résultats indiquent que l'injection du peptide n'a aucune influence sur le temps entre



**Figure 13:** Réduction moyenne de l'amplitude des PEVs causée par l'Ang II à une concentration de  $10^{-3}\text{M}$   et de  $10^{-6}\text{M}$   selon l'âge des rats. Notez que pour une même concentration d'Ang II ( $10^{-3}\text{M}$  ou  $10^{-6}\text{M}$ ), la réduction moyenne de l'amplitude est significativement plus élevée pour les rats âgés de 15 à 19 jours par rapport à ceux de 25-29 jours (Anova: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

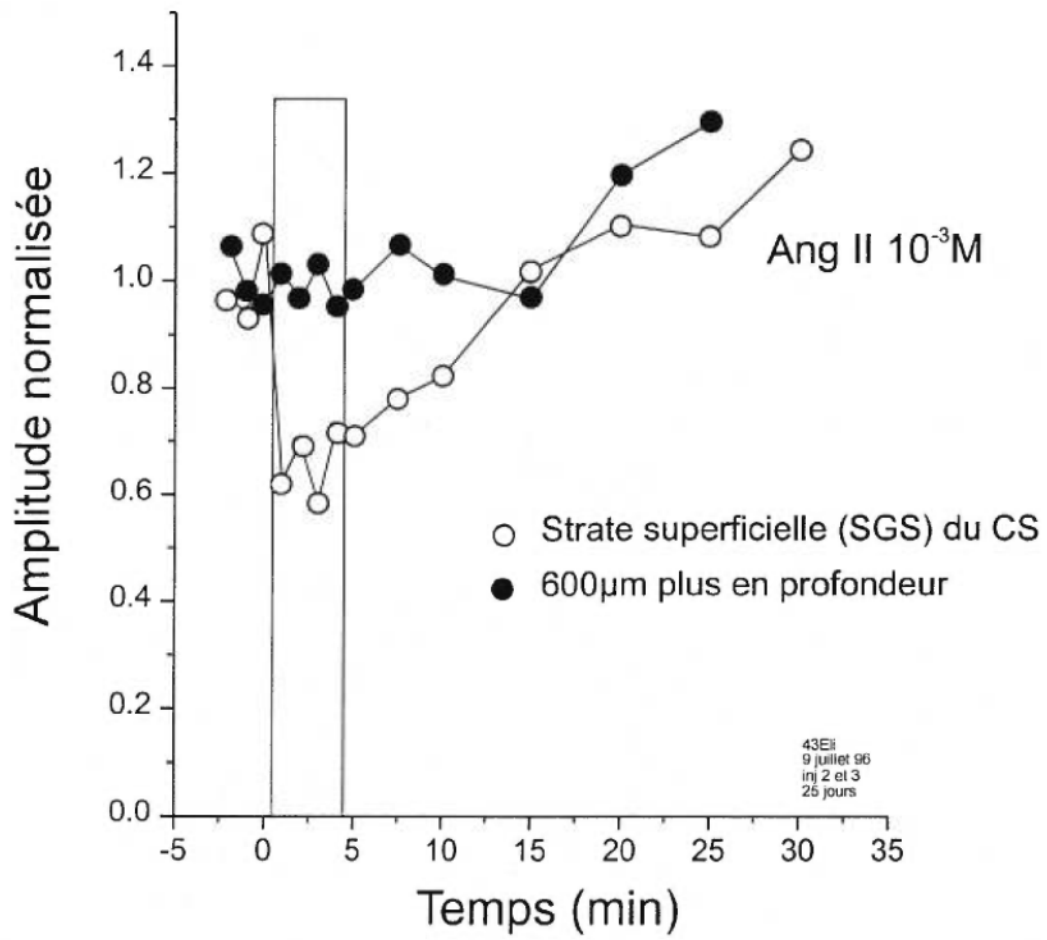


l'apparition du stimulus et la première déflexion du signal ( $p > 0.05$ ). Bien qu'une analyse rigoureuse des temps de latence n'ait pas été effectuée aux concentrations plus faibles, l'observation qualitative des résultats suggère que l'Ang II n'a aucune influence sur ce paramètre.

### 3.2 Localisation des récepteurs

Des injections ont aussi été réalisées dans le but de vérifier la localisation laminaire des récepteurs angiotensinergiques dans le CS des jeunes rats. Nous avons donc injecté de l'Ang II à différentes profondeurs dans le CS, donc dans des couches cellulaires bien distinctes (voir figure 5). De façon globale, les injections d'Ang II effectuées en superficie ont causé une diminution de l'amplitude des réponses enregistrées tandis que les injections effectuées en profondeur n'ont entraîné aucune perturbation du signal. Un exemple représentatif est illustré à la figure 14 dans lequel deux injections d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}M$  ont été effectuées à deux profondeurs différentes séparées d'une distance de  $600\mu m$  chez un raton de 25 jours. L'injection la plus dorsale, réalisée dans la SGS, entraîne une diminution de l'amplitude de la réponse visuelle de 30%, tandis que l'injection effectuée  $600\mu m$  plus bas ne cause aucune perturbation du signal. Ces résultats suggèrent donc que les récepteurs à l'Ang II sont localisés en superficie (SGS), confirmant ainsi les données autoradiographiques de Michels *et al.* (1994).

**Figure 14:** Effet de l'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M en fonction de la profondeur dans le CS. Notez que la modification de la réponse visuelle est limitée à la SGS, et que le peptide n'altère pas l'amplitude du signal enregistré dans les couches plus profondes.



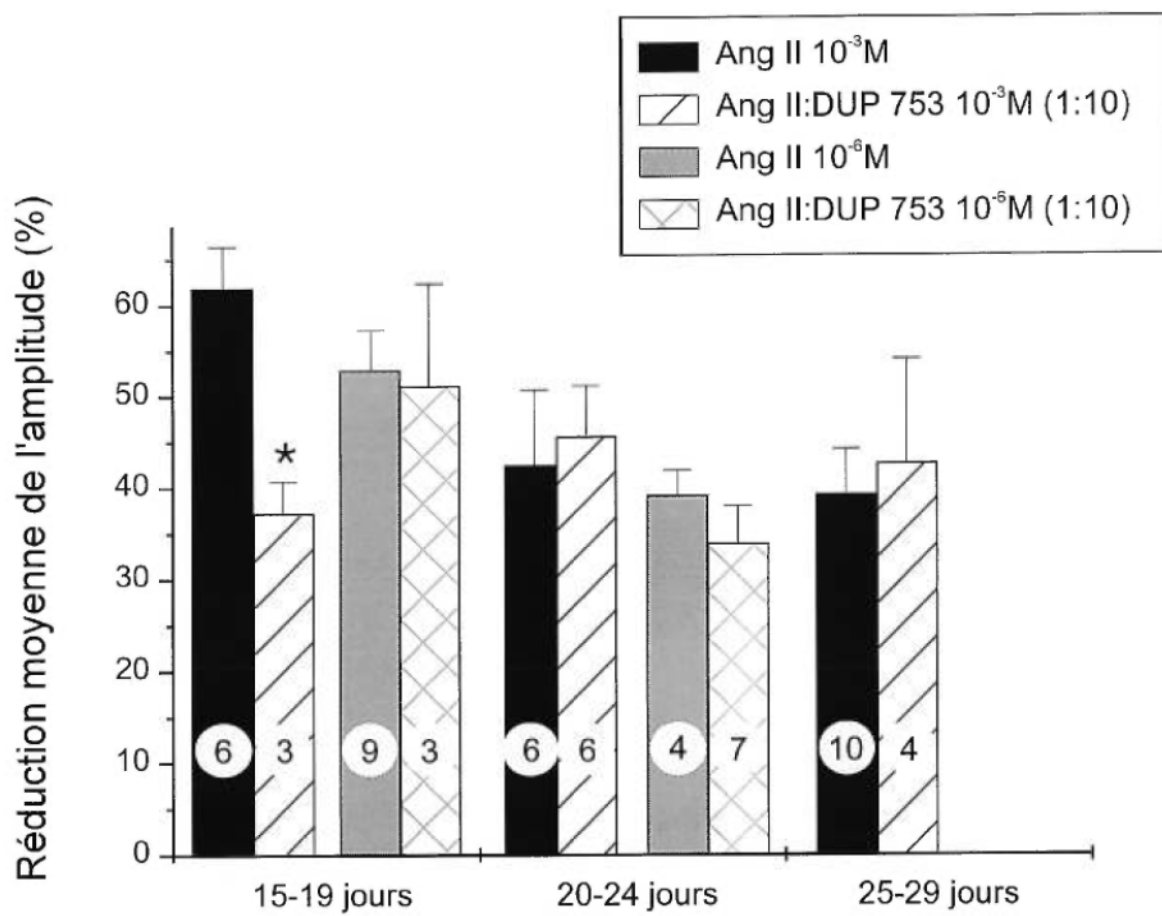
### 3.3 Ligands

#### 3.3.1 Antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>

Afin de vérifier l'implication des récepteurs AT<sub>1</sub> dans les effets de l'Ang II sur la réponse visuelle du CS, nous avons injecté l'Ang II en conjonction avec l'antagoniste DUP 753 (n=23), à une même concentration (10<sup>-3</sup>M ou 10<sup>-6</sup>M) et dans une proportion relative de 1:10 en faveur du ligand. La figure 15 illustre l'effet de l'Ang II injectée en conjonction avec le DUP 753 sur l'amplitude des PEVs en fonction de la concentration utilisée et de l'âge des animaux. Les résultats indiquent que globalement, le DUP 753 n'a pas bloqué les effets de l'Ang II. En effet, il n'y a pas de différences significatives entre l'effet de l'Ang II injectée en conjonction avec le DUP 753 à une concentration donnée (10<sup>-3</sup>M ou 10<sup>-6</sup>M) et l'effet de l'Ang II injectée seule à la concentration correspondante, et ce, peu importe l'âge des animaux (p>0.05). La seule exception se trouve dans le groupe 15-19 jours à une concentration de 10<sup>-3</sup>M, où le DUP 753 a significativement diminué l'effet de l'Ang II (t-test: p<0.05).

Lorsque tous les rats sont réunis en un seul groupe, le DUP 753 ne semble toujours pas bloquer l'effet de l'Ang II (p>0.05) (Fig.17). Nos résultats suggèrent donc qu'en général, l'antagoniste des récepteurs AT<sub>1</sub>, le DUP 753, ne bloque pas de façon significative l'action inhibitrice du peptide sur la réponse visuelle

**Figure 15:** Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec l'antagoniste spécifique aux récepteurs AT<sub>1</sub> (DUP 753) sur l'amplitude moyenne de la réponse visuelle en fonction de l'âge des animaux. Les injections d'Ang II sont montrées pour fins de comparaison. Notez que la seule différence significative entre les injections d'Ang II et d'Ang II:DUP 753 de même concentration a lieu chez les rats de 15 à 19 jours, à une concentration de 10<sup>-3</sup>M (t-test, \*p<0.05).





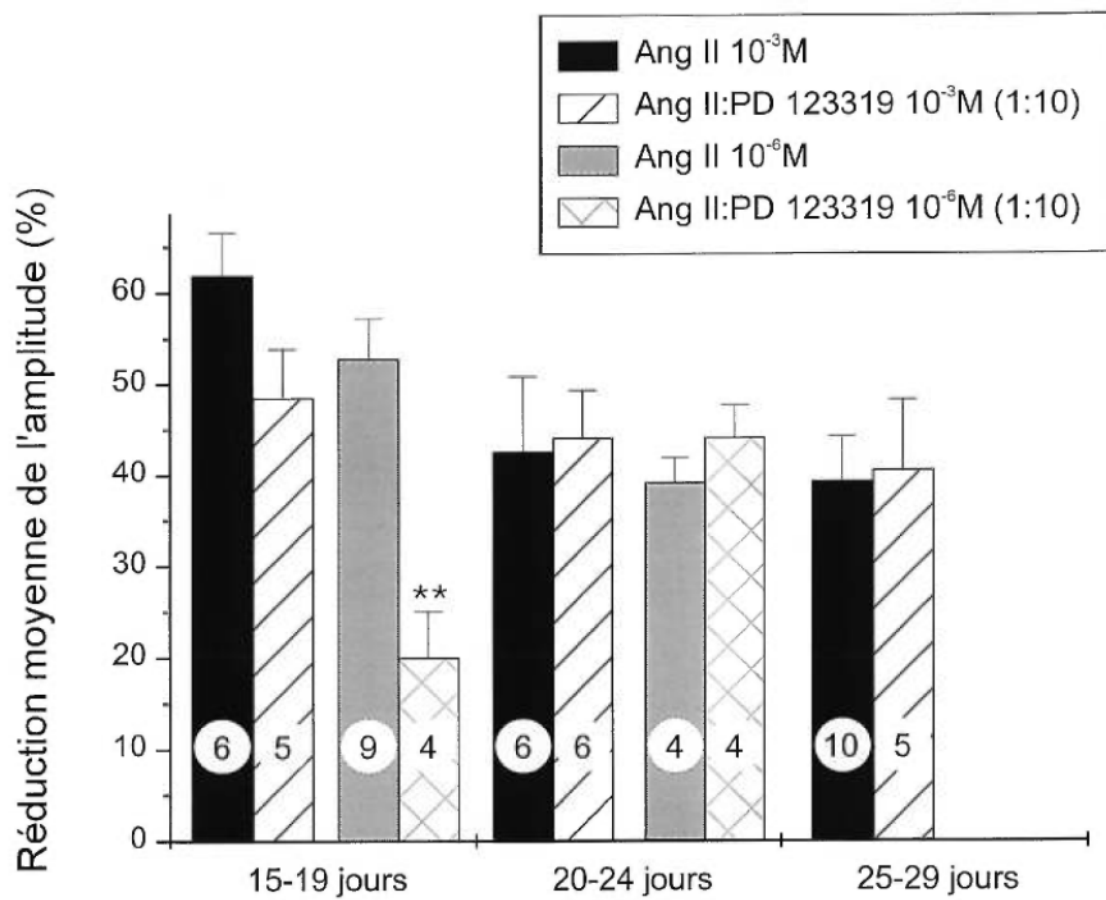
du CS.

Les mêmes analyses ont été effectuées afin de vérifier si le DUP 753 a bloqué les effets de l'Ang II au niveau des temps de récupération du signal. Les résultats (non-illustrés) n'indiquent aucune différence significative entre les temps de récupération obtenus suite aux injections d'Ang II seule et d'Ang II en conjonction avec le DUP 753, peu importe les tranches d'âges analysées ( $p > 0.05$ ).

### 3.3.2 Antagoniste des récepteurs AT<sub>2</sub>

Un total de 24 injections d'Ang II en conjonction avec du PD 123319 ont été réalisées dans le but de déterminer l'apport des récepteurs AT<sub>2</sub> dans l'effet de l'Ang II sur l'amplitude des PEVs. L'antagoniste a été injecté avec l'Ang II à une même concentration ( $10^{-3}$ M ou  $10^{-6}$ M) et dans une proportion relative de 10:1 en faveur de l'antagoniste. L'effet de ces injections sur l'amplitude de la réponse visuelle est illustré à la figure 16 pour chaque tranche d'âge et selon la concentration injectée. Rappelons que les injections d'Ang II en conjonction avec un antagoniste sont comparées aux injections d'Ang II seule à la concentration correspondante. De façon générale, la présence du PD 123319 n'a pas modifié l'effet de l'Ang II sur l'amplitude des réponses visuelles. Une seule exception peut être observée chez les rats âgés de 15 à 19 jours pour

**Figure 16:** Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec l'antagoniste spécifique aux récepteurs AT<sub>2</sub> (PD 123319) sur l'amplitude moyenne des PEVs en fonction de l'âge des rats. Les injections d'Ang II seul sont montrées pour fins de comparaison. Notez que la seule différence significative entre les injections d'Ang II et d'Ang II:PD 123319 de même concentration a lieu chez les rats de 15 à 19 jours, à une concentration de 10<sup>-6</sup>M (t-test, \*\*p<0.01).



les injections effectuées à une concentration de  $10^{-6}$ M. Dans ce cas précis, l'antagoniste semble avoir partiellement bloqué l'effet du peptide sur les PEVs (t-test:  $p < 0.01$ ).

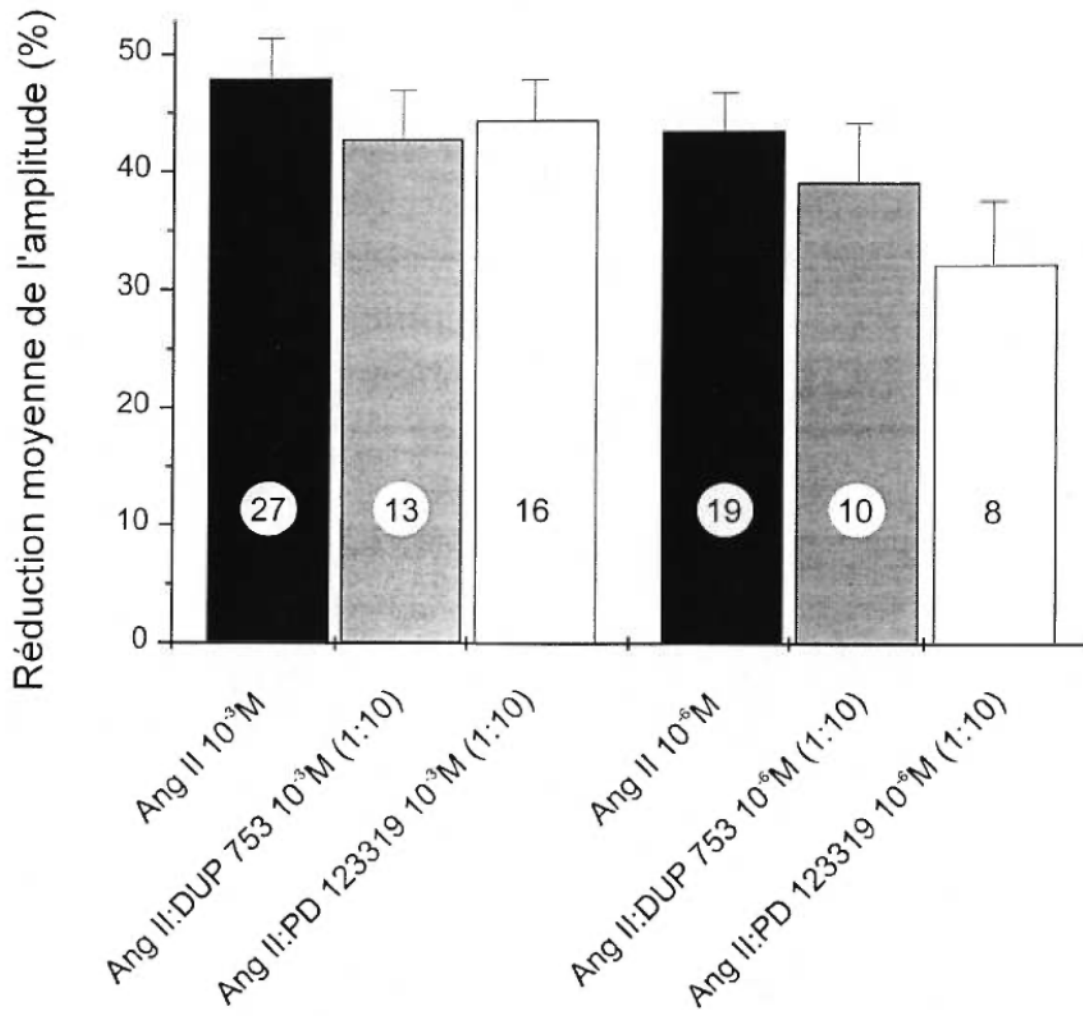
De façon globale, c'est-à-dire lorsque tous les animaux sont regroupés, on peut observer que l'effet du peptide seul ou en présence de l'antagoniste est identique, peu importe la concentration utilisée (Fig.17).





Les mêmes analyses ont été effectuées afin de vérifier si le PD 123319 a bloqué les effets de l'Ang II au niveau des temps de récupération du signal. Les résultats (non-illustrés) n'indiquent aucune différence significative entre les temps de récupération obtenus suite aux injections d'Ang II seule et d'Ang II en conjonction avec le PD 123319, peu importe les tranches d'âges analysées ( $p > 0.05$ ).

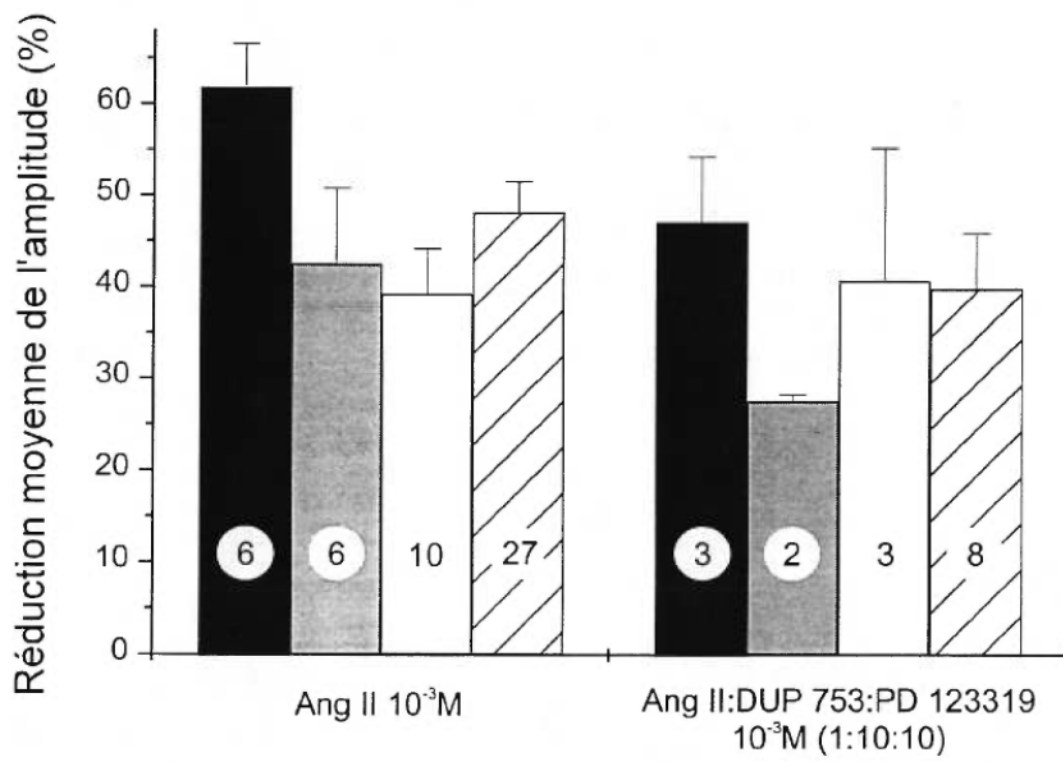
### 3.3.3 Antagonistes des récepteurs $AT_1$ et $AT_2$

Nous avons aussi injecté l'Ang II en conjonction avec les deux antagonistes spécifiques aux récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$  ( $n=8$ ) puisque chacun des antagonistes injecté seul avec l'Ang II n'a pas eu comme effet de bloquer l'action pharmacologique du peptide. Les résultats de ces injections suggèrent que le DUP 753 et le PD 123319 n'ont pas bloqué l'effet causé par l'Ang II (Fig.18). En

**Figure 17:** Effet de l'Ang II injecté en conjonction avec les antagonistes DUP 753 ou PD 123319 à une même concentration ( $10^{-3}M$  et  $10^{-6}M$ ) et dans une proportion relative de 10:1 en faveur de l'antagoniste, pour les rats de tous les âges. Notez qu'aux deux concentrations, les antagonistes ne bloquent pas l'effet inhibiteur de l'Ang II.



**Figure 18:** Histogramme illustrant l'effet des injections d'Ang II en conjonction avec du DUP 753 et du PD 123319  $10^{-3}$ M (1:10:10) pour les groupes d'âge 15-19 jours  , 20-24 jours  , 25-29 jours  et tous les âges réunis  . Les injections d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M sont présentes pour fin de comparaison. Notez que pour tous les groupes d'âge, aucune différence significative ne peut être observée entre l'effet de l'Ang II et celui de l'Ang II injecté en conjonction avec les deux antagonistes.





fait, l'analyse statistique indique que peu importe les tranches d'âges analysées, l'effet de l'Ang II injectée avec les deux antagonistes n'est pas différent de celui de l'Ang II injectée seule ( $p > 0.05$ ).

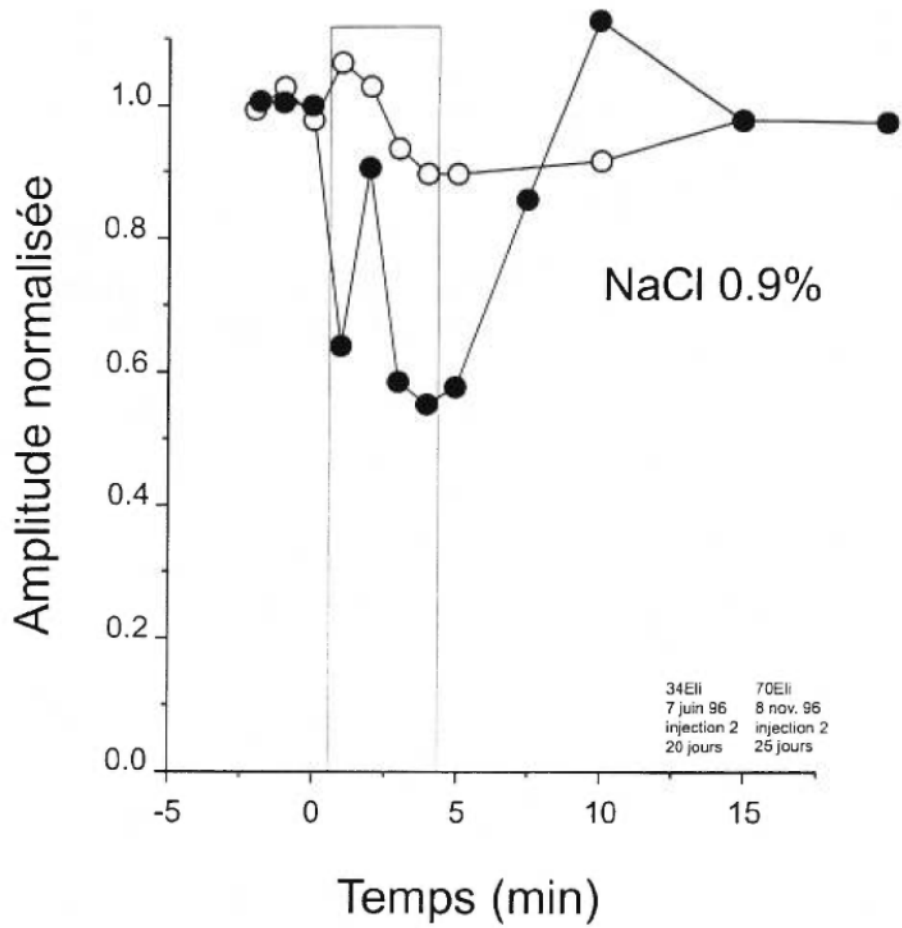
#### 3.3.4 Agoniste des récepteurs AT<sub>2</sub>

Un ligand spécifique aux récepteurs AT<sub>2</sub>, le CGP 42112, a été injecté afin de vérifier s'il exerce, tel que proposé (Brechler *et al.*, 1993; Buisson *et al.*, 1992), un effet agoniste sur la réponse visuelle enregistrée dans le CS. Comme mentionné dans la section *Matériel et Méthodes*, le CGP 42112 a été injecté seul à des concentrations de  $10^{-6}$ M et  $10^{-10}$ M. Nous avons comparé son action avec celle de l'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M et de  $10^{-6}$ M. Le CGP 42112 a provoqué une baisse d'amplitude des réponses visuelles enregistrées dans le CS et son effet semble à priori (voir discussion) similaire à celui de l'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M et de  $10^{-6}$ M, sauf chez les ratons âgés de 15 à 19 jours, où l'effet du CGP 42112  $10^{-10}$ M est plus faible que celui de l'Ang II  $10^{-3}$ M et  $10^{-6}$ M (Anova,  $p < 0.05$ ). En général, l'effet obtenu suite aux injections de cet agoniste n'est donc pas significativement différent des effets observés suite aux injections d'Ang II à une dose de  $10^{-3}$ M et de  $10^{-6}$ M ( $p > 0.05$ ).

### 3.4 Injections contrôles

Afin de s'assurer que les effets observés suite aux injections d'Ang II ne sont pas dus à la perturbation mécanique causée par l'injection *per se*, nous avons injecté le véhicule (NaCl 0.9%, n=17) dans la SGS du CS. Contrairement aux résultats escomptés, la saline cause fréquemment une inhibition importante de l'amplitude de la réponse visuelle (moyenne de  $31.2\% \pm 2.7$ ). La figure 19 illustre le profil d'action de deux injections de NaCl dont l'importance des effets diffère. La première injection (cercles blancs) représente un exemple où l'injection de NaCl ne cause presque pas de modification de l'amplitude du signal (baisse de seulement 10.8%). Par contre, la deuxième injection, représentée par les cercles noirs, illustre un exemple où l'injection de saline entraîne une baisse considérable de l'amplitude de la réponse visuelle (inhibition de 44.0%). Suite à ces résultats non-attendus, nous avons voulu déterminer la nature de cette perturbation. Notre premier postulat fut de suggérer que le pH de la solution de NaCl 0.9% était en cause compte tenu de l'acidité de la dite solution (pH=5.86). Afin d'éliminer l'effet du pH, nous avons injecté une solution de saline isotonique physiologique (pH=7 $\pm$ 0.1, n=10). Son effet sur l'amplitude des PEVs est comparé à celui du NaCl "normal" dans le tableau I. Comme vous pouvez le constater, l'effet causé par les deux solutions est très similaire. En effet, les injections de saline "normale" et de saline isotonique provoquent respectivement des baisses de 31.2% et 30.8%. Les résultats viennent donc

**Figure 19:** Injections contrôles du véhicule (NaCl 0.9%) dans la SGS. Notez que l'effet est très variable car l'amplitude des PEVs est quelques fois affectée par l'injection.



rejeter notre postulat de départ qui suggérait que le pH de la solution de NaCl 0.9% était responsable de l'inhibition observée lors des injections contrôles.

**Tableau I:** Réduction moyenne de l'amplitude des PEVs suite aux injections de NaCl "normal", de NaCl isotonique, de LCRa et de DPC.



	Réduction moyenne de l'amplitude (%)	ES	n
NaCl "normal"	31.2	2.7	17
NaCl isotonique	30.8	4.2	10
LCRa	24.6	2.6	16
DPC	27.2	8.5	5

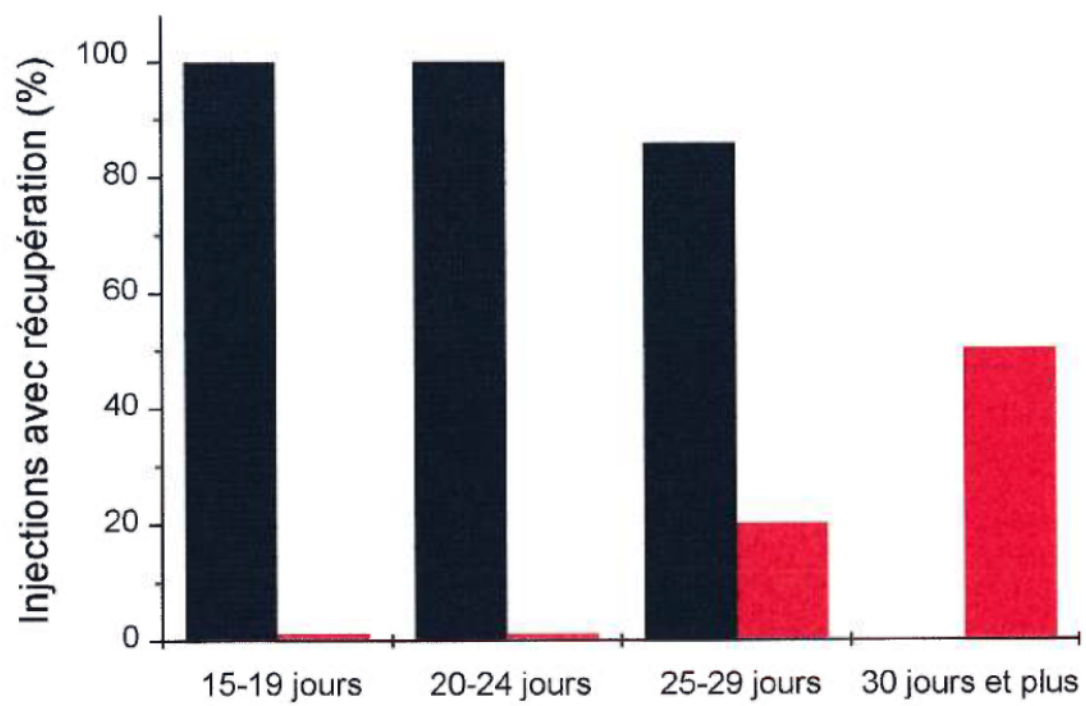
Notre deuxième hypothèse fut que l'osmolarité de la solution de NaCl ne correspondait pas à celle du milieu cérébral, causant ainsi un changement important de la pression osmotique dans le bassin cellulaire entourant la pointe de l'électrode. Nous avons donc injecté du liquide céphalo-rachidien artificiel (LCRa, n=16), dont la composition se rapproche beaucoup plus du milieu cérébral que la solution saline. Les résultats de ces injections sont présents au tableau I et suggèrent que l'effet du LCRa sur l'amplitude des PEVs est légèrement moins important que l'effet observé lors des injections de NaCl, bien

que cette différence ne soit pas statistiquement significative ( $p > 0.05$ ). Il semble donc que l'osmolarité de la solution ne soit pas le seul facteur expliquant les effets observés suite aux injections de NaCl 0.9%. Nous avons donc finalement injecté de l'acide N-phenylanthranilique (DPC), un bloqueur des canaux  $Cl^-$ , afin de vérifier notre troisième hypothèse stipulant que la pression mécanique de l'injection activerait des récepteurs d'étirement et aurait ainsi causé une variation de la réponse visuelle enregistrée. Cette dernière hypothèse a aussi été rejetée car les résultats indiquent que les injections de NaCl en présence de DPC entraînent une réduction de l'amplitude des PEVs comparable à celle observée suite aux injections de NaCl seul (tableau I).

### 3.5 Injections colorées

Comme mentionné dans la section *Matériel et Méthodes*, les premières solutions administrées dans cette étude étaient toutes colorées au Chicago Sky Blue 0.2% tel que réalisé chez le rat adulte (Merabet *et al.*, 1994, 1997). Cependant, tel que décrit dans les lignes suivantes, la coloration de nos solutions semblait avoir un effet toxique sur la réponse visuelle du CS des jeunes rats. Premièrement, pour la majorité des injections, presque aucune récupération n'était apparente. La figure 20 illustre le pourcentage d'injections dont le signal a récupéré à au moins 75% du signal initial pour chaque tranche d'âge. Les injections d'Ang II non-colorées à une concentration de  $10^{-6}M$  y sont

**Figure 20:** Pourcentages d'injections d'Ang II  $10^{-6}M$  colorée  et non-colorée  qui récupèrent selon l'âge des rats. Notez que les injections non-colorées ont beaucoup plus tendance à récupérer, et que plus les animaux sont âgés, plus les injections colorées ont tendance à récupérer. Aucune injection d'Ang II non-colorée n'a été effectuée chez les rats de 30 jours et plus.





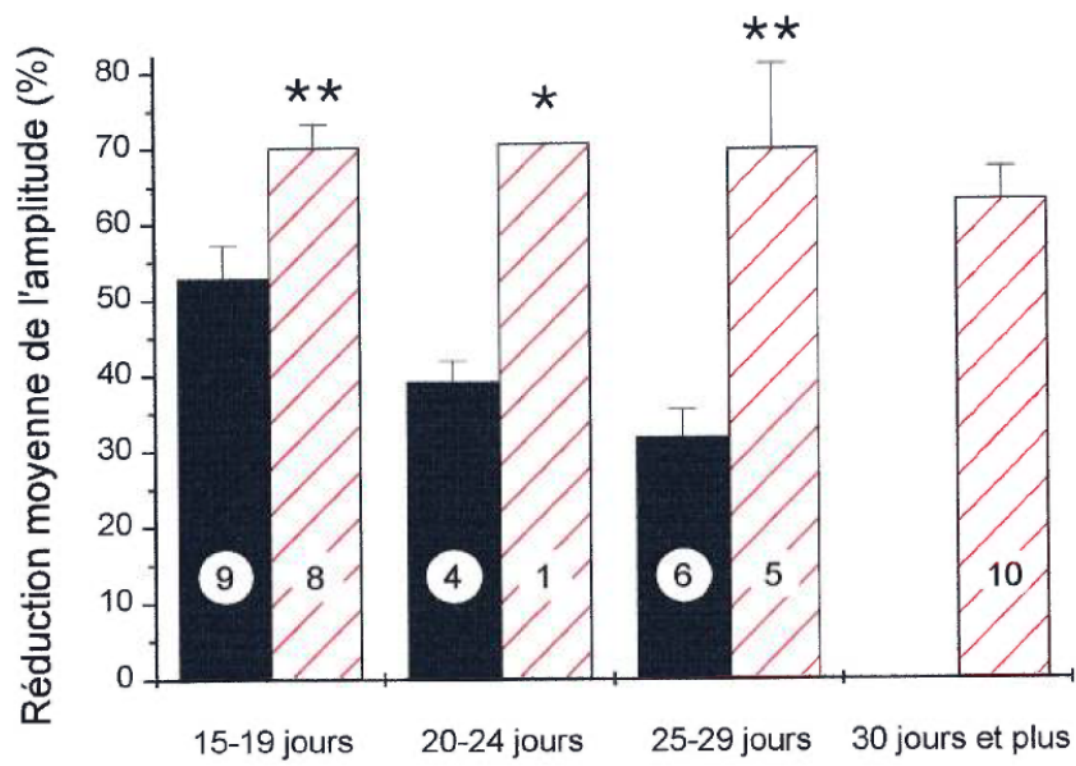


aussi représentées afin de permettre la comparaison avec les injections colorées. Notez (i) la faible proportion d'injections colorées qui récupèrent par rapport aux injections non-colorées et (ii) que plus les rats sont âgés, plus le nombre d'injections colorées qui récupèrent est élevé. En plus d'avoir un effet sur la récupération de l'amplitude des PEVs, le Chicago Sky Blue semble aussi avoir une action importante sur l'amplitude des réponses visuelles puisque les effets observés suite à l'injection de l'Ang II étaient plus marqués lorsque la solution était colorée. La figure 21 illustre clairement l'importance de l'inhibition causée par les injections d'Ang II colorées à une dose de  $10^{-6}$ M par rapport aux injections d'Ang II de même concentration mais non-colorées. On peut remarquer que dans toutes les tranches d'âges, l'effet des solutions colorées est significativement plus important que l'effet des solutions non-colorées. Notez que chez les animaux âgés de 30 jours et plus, aucune injection non-colorée n'a été réalisée, mais il est important de souligner à nouveau que la coloration a un effet moins marqué chez ce groupe que chez les rats de plus bas âge.

### **3.6 Autre approche expérimentale: ablation du cortex recouvrant le CS**

Dans le contexte des problèmes reliés à l'injection par pression, une autre approche expérimentale a été utilisée afin d'administrer de façon différente l'Ang II au niveau du CS des jeunes rats. Ces expériences ont été réalisées sur

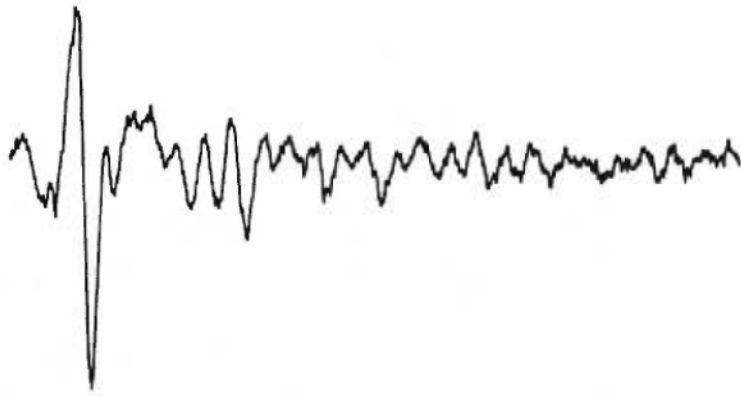
**Figure 21:** Effet de l'Ang II  $10^{-6}$ M colorée au Chicago Sky Blue 0.2%  et non-colorée  sur l'amplitude des PEVs. Notez qu'à toutes les tranches d'âge, la réduction moyenne de l'amplitude est beaucoup plus importante lorsque la solution est colorée (t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). Chez les rats âgés de 30 jours et plus, aucune injection d'Ang II non-colorée n'a été effectuée.



13 rats et consistaient à enregistrer directement dans le CS suite à l'ablation du cortex par aspiration. Malgré la délicatesse des chirurgies et le jeune âge des animaux, les interventions ont été un succès et les PEVs obtenus comparables à ceux enregistrés chez les animaux intacts (Fig.22). Les résultats obtenus suite à l'application de l'Ang II sur le CS n'ont pas été concluants. Les effets observés étaient très variables et difficilement interprétables. Deux exemples sont illustrés dans la partie A de la figure 23. Dans un premier cas (carrés noirs), l'administration d'Ang II ne provoque aucune inhibition de l'amplitude de la réponse, mais plutôt une légère augmentation. Dans le deuxième cas (cercles blancs), l'Ang II a causé une réduction d'amplitude de presque 100% dans la minute suivant l'administration du peptide. L'inhibition est suivie d'une récupération complète du signal après 20 min. Notez que le mode d'administration semblait toutefois efficace puisque l'utilisation de la xylocaïne a provoqué la baisse attendue du signal (Fig.23B). Étant donné que ces expériences n'ont pas fourni de données supplémentaires valables permettant de mieux définir l'action physiologique de l'Ang II, elles ont été interrompues.

**Figure 22:** Exemples de PEVs enregistrés chez un raton de 24 jours (A) et un de 17 jours (B) chez qui on a retiré, par aspiration, le cortex recouvrant le CS. Notez que dans les deux cas, les PEVs sont comparables à ceux enregistrés chez les animaux intacts (c'est-à-dire dont le cortex n'a pas été retiré), malgré la chirurgie effectuée et le jeune âge des animaux. La flèche indique le moment d'apparition du stimulus (S).

A



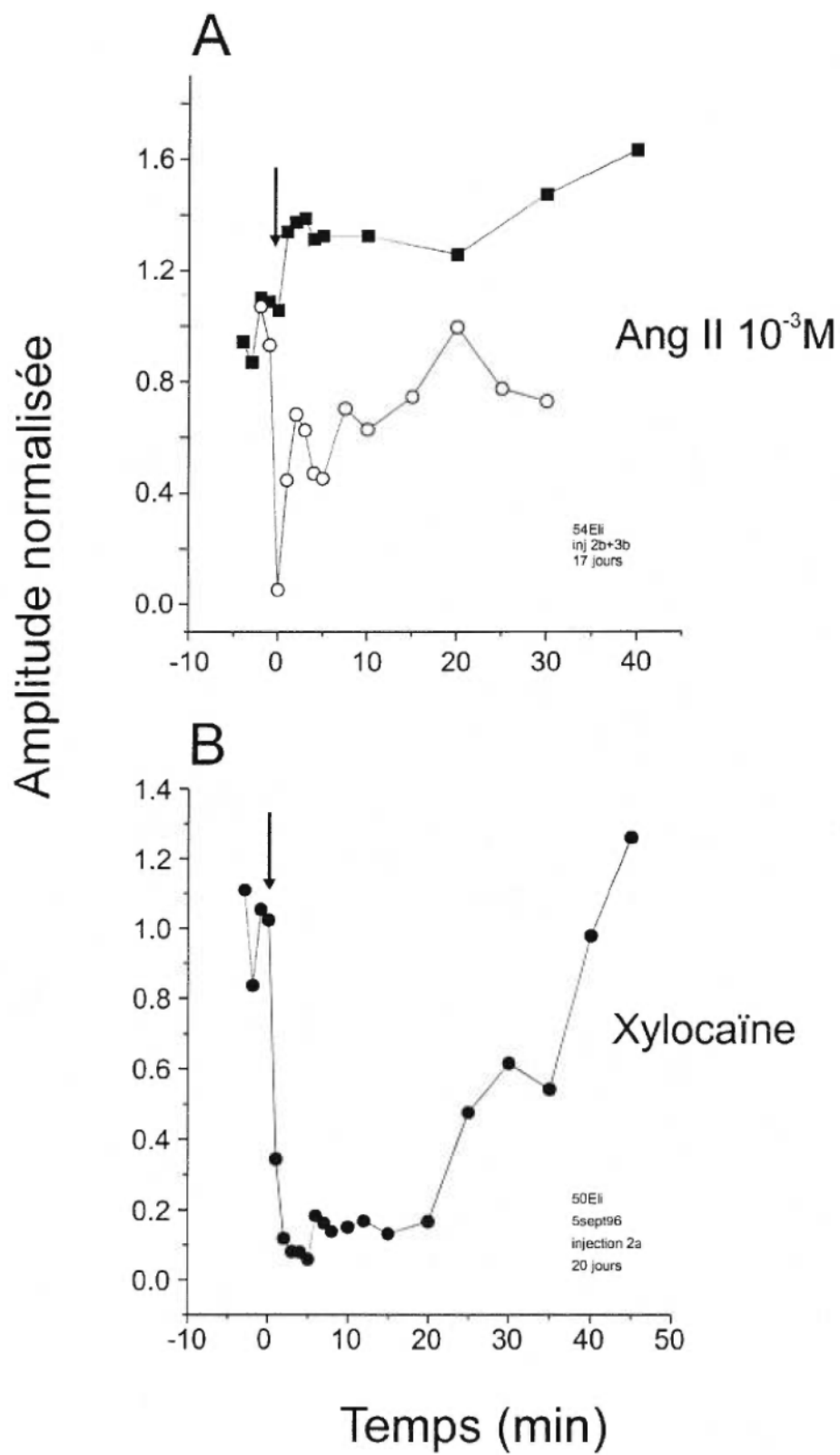
B



↑  
S

0.05 mV  
└──  
100 msec

**Figure 23:** Effet de l'application d'Ang II à une concentration de  $10^{-3}$ M (A) et de xylocaïne (B) sur l'amplitude des PEVs enregistrés chez des rats dont le cortex a été retiré par aspiration. Notez que les effets de l'Ang II peuvent varier de façon considérable. Les flèches indiquent le moment où les substances sont déposées sur le CS.





# DISCUSSION

## CHAPITRE 4

## 4.1 Sommaire des résultats

Les résultats de la présente étude indiquent que l'Ang II a un effet inhibiteur sur l'activité visuelle (PEVs) enregistrée dans le CS qui pourrait être dépendant de la dose injectée, et ce, peu importe l'âge des rats. Il semble aussi que plus la concentration injectée est élevée, plus le temps que prends le signal pour récupérer est long. De plus, les résultats suggèrent que pour une même concentration d'Ang II, plus l'animal est jeune, plus la réduction causée par le peptide est importante. Finalement, les données de cette étude ne nous permettent pas de déterminer quels types de récepteurs angiotensinergiques sont impliqués dans les effets observés.

## 4.2 Considérations méthodologiques

### 4.2.1 Agent de coloration

Les premières injections effectuées dans cette étude étaient toutes colorées au Chicago Sky Blue, mais tel que décrit dans la section *Résultats*, il nous semblait que le colorant avait un effet toxique sur l'amplitude des PEVs enregistrés dans le CS des jeunes rats durant leur développement postnatal. Plus les animaux étaient jeunes, plus cette toxicité semblait importante. Pourtant, ce colorant dit "physiologique" est régulièrement utilisé en neurophysiologie afin de colorer un

site d'enregistrement ou d'inactivation chez diverses espèces [chez le rat (Merabet *et al.*, 1994, 1997) chez le chat (Molotchnikoff et Shumikhina, 1996) et chez le primate (Nealey et Maunsell, 1994)]. Par exemple, selon une autre étude effectuée dans notre laboratoire, il semble que le Chicago Sky Blue n'ait pas d'effet toxique sur l'amplitude des PEVs enregistrés au niveau du CS des rats adultes (Merabet, 1995). Nous ne pouvons cependant pas en être certain car toutes les injections effectuées dans cette étude ont été colorées au Chicago Sky Blue et aucune comparaison rigoureuse n'a été effectuée avec des injections non-colorées. L'auteur a donc présumé qu'étant physiologique, le colorant ne perturbait pas la réponse visuelle du CS chez l'adulte. De fait, les résultats obtenus dans cette étude semblent aller en ce sens. En effet, les PEVs enregistrés dans cette étude récupèrent dans plus de 86% des cas et l'effet de l'Ang II varie clairement selon la dose injectée. On peut donc supposer que le Chicago Sky Blue n'est toxique que chez les jeunes ratons, et non chez les rats adultes. Cette hypothèse est appuyée par le fait que les neurones immatures qui composent le cerveau sont plus fragiles et plus susceptibles aux variations du milieu dans lequel ils se trouvent que les neurones matures de l'adulte (Kamino *et al.*, 1993). De plus, cette hypothèse concorde bien avec les résultats que nous avons obtenus qui suggèrent que plus les ratons sont jeunes, plus la toxicité du Chicago Sky Blue est importante.

D'autres études effectuées récemment supportent nos données qui suggèrent

que le Chicago Sky Blue peut être toxique. En effet, Durmuller *et al.* (1997) indiquent que l'administration intracérébroventriculaire d'Evans Blue provoque un bris cellulaire important similaire à ceux induits par les analogues du glutamate. Les auteurs précisent que le Chicago Sky Blue produit des effets similaires. Ainsi, ils proposent que ce colorant serait un nouveau modèle très utile afin d'étudier certains mécanismes reliés à l'épilepsie. Finalement, les résultats de Roseth et ses collaborateurs (1995) suggèrent que le Chicago Sky Blue ainsi que le Evans Blue inhibent la prise de glutamate au niveau des vésicules synaptiques. Il est donc possible que ces colorant entraînent une variation du glutamate extracellulaire qui pourrait être à la base des effets toxiques que nous avons observés suite à l'utilisation du Chicago Sky Blue. En effet, une trop grande quantité de glutamate provoque une neurotoxicité (Abe et Saito, 1992; Ghribi *et al.*, 1994; Ikeda *et al.*, 1996; Stephans et Yamamoto, 1994).

#### 4.2.2 Système d'injection et d'enregistrement

La technique de microinjection par pression a fait ses preuves comme outil expérimental efficace pour étudier les effets de substances neuroactives dans différentes régions du cerveau (Akaoka *et al.*, 1992; Nicholson, 1985). Le système d'injection par pression que nous utilisons nous permet, à l'aide d'un seul capillaire de verre, d'enregistrer un potentiel et d'injecter une drogue de

façon simultanée à un même site. Ainsi, l'agent pharmacologique est injecté directement dans l'environnement extracellulaire des neurones enregistrés (Nicholson, 1985). Contrairement à la technique de micro-iontophorèse, la concentration de la drogue peut être contrôlée de façon très précise et la solution injectée n'est pas traitée par ionisation (Akaoka *et al.*, 1992).

Un des inconvénient de l'injection par pression est que l'injection *per se* peut causer une perturbation mécanique du tissu (déplacement ou bris du tissu par exemple) entraînant ainsi une inhibition de la réponse enregistrée (Akaoka *et al.*, 1992). Cette possibilité est d'autant plus importante lorsque l'effet causé par la drogue est inhibiteur, comme c'est le cas dans notre étude. Afin de vérifier que l'effet inhibiteur observé suite aux injections d'Ang II était bien du à l'action pharmacologique du peptide et non à l'action mécanique de l'injection, nous avons effectué des injections contrôles du véhicule dans lequel nos drogues ont été diluées, c'est-à-dire une solution de NaCl 0.9%. Malheureusement, nous avons remarqué que les injections de saline ont causé une inhibition relativement importante de l'amplitude des PEVs. Nous avons donc diminué le taux et la durée de l'injection afin de diminuer l'impact mécanique de l'injection sur la population de neurones entourant la pointe de l'électrode. Cette alternative n'a pas eu le succès escompté et les injections contrôles de NaCl ont de nouveau causé une diminution de l'amplitude des PEVs. Ne pouvant éliminer l'aspect mécanique possiblement responsable de l'effet inhibiteur

observé suite aux injections contrôles de NaCl, nous avons vérifié du côté du véhicule utilisé (voir section suivante), sans pour autant réussir à éliminer l'action inhibitrice des injections contrôles. Nous avons donc, lors de l'analyse statistique des résultats, comparé les effets de l'Ang II avec ceux de la saline, éliminant ainsi l'action inhibitrice non spécifique (mécanique ou autre), c'est-à-dire non attribuable à l'Ang II. Ainsi, aux deux concentrations d'Ang II les plus élevées, la réduction moyenne de l'amplitude est significativement différente de la réduction moyenne causée par les injections contrôles de NaCl. Ces résultats indiquent donc que la différence d'inhibition observée entre les injections d'Ang II à de fortes concentrations et les injections de NaCl est de nature pharmacologique et non mécanique ou autres.

Pour ce qui est des quantités injectées, il semble, en se basant sur la grosseur et l'étendue des injections colorées observées lors de l'analyse histologique, que la précision du volume injecté soit relativement constante et uniforme (Merabet, 1995), bien qu'il soit très difficile, voir même impossible de la quantifier de façon précise lors d'injections *in vivo* (Akaoka *et al.*, 1992; Martin, 1991).

Finalement, lors de l'utilisation d'une technique d'injection par pression, il peut être difficile de différencier une injection non-réussie d'une injection réussie dont l'effet biologique sur les cellules enregistrées est absent ou nul (Akaoka

*et al.*, 1992). Étant donné que nous avons cessé de colorer les solutions que nous injectons, nous avons dû nous baser sur d'autres critères que l'observation histologique afin de déterminer le succès des injections. Ces critères sont décrits dans la section *Matériel et Méthodes* et nous croyons qu'ils sont relativement fiables car rares sont les injections qui ont été éliminées pour cette raison. Cependant, nous ne pouvons affirmer avec certitude que toutes les injections réussies ont été sélectionnées. Nous admettons donc qu'il est possible qu'un petit nombre d'injections a pu être éliminé alors qu'elles étaient réussies mais qu'elles ne causaient aucune perturbation de l'amplitude du signal. Si tel est le cas, notez que la quantité d'injections rejetées est minime et que cela a pu se produire autant pour les injections contrôles de NaCl que pour les injections tests d'Ang II et de ligands.

#### 4.2.3 Véhicule utilisé

Le véhicule que nous avons utilisé pour diluer nos drogues est une solution de NaCl 0.9%. Notre choix s'explique par le fait que les deux seules études qui ont déterminé l'effet de l'Ang II sur la réponse visuelle du CS [chez le rat adulte (Merabet *et al.*, 1994, 1997) et chez le hamster adulte (Mooney *et al.*, 1994)] ont utilisé une solution de saline pour diluer l'Ang II et ses ligands. En utilisant le même véhicule, nous pouvions alors comparer directement nos résultats recueillis chez le jeune raton avec ceux obtenus chez le rat et le hamster

adulte. Par contre, contrairement aux deux études mentionnées précédemment, nos injections contrôles de NaCl 0.9% ont, en moyenne, perturbé de façon relativement importante l'amplitude des PEVs. Comme mentionné dans la section *Résultats*, nous avons vérifié si l'acidité de notre véhicule (pH=5.86) provoquait l'effet inhibiteur observé en comparant l'effet de la saline "normale" avec celui de la saline isotonique dont le pH est neutre. Cependant, nos résultats indiquent que les deux solutions ont le même effet sur la réponse visuelle. Nous avons ensuite vérifié si l'osmolarité de la solution de NaCl (271mOsm) était responsable de l'action inhibitrice observée. Nous avons donc comparé les effets provoqués par la saline avec ceux du LCRa (297mOsm). En effet, le LCRa a une osmolarité qui se rapproche plus de celle du cerveau, qui est de 289mOsm chez l'Homme. Les résultats suggèrent que la substance ayant le moins d'effet sur l'amplitude des PEVs est le LCRa, bien que cette différence par rapport au NaCl ne soit pas statistiquement significative. Notre explication à ce sujet est que les injections de NaCl pourraient entraîner un changement important de la pression osmotique, causant ainsi une inhibition temporaire de la réponse visuelle. Ayant une composition ionique similaire à celle du cerveau, le LCRa semble être une solution moins perturbante pour les neurones immatures. En effet, plusieurs études utilisent cette solution afin de diluer divers agents pharmacologiques (Averill *et al.*, 1994; Toney et Porter, 1993a,b). En résumé, selon les résultats obtenus par Merabet et ses collaborateurs (1994, 1997) ainsi que par Mooney



et ses collaborateurs (1994), il semble que la saline n'a pas d'effet osmotique perturbant sur la réponse visuelle du CS des rongeurs adultes. Par contre, les résultats de la présente étude indiquent que les injections de NaCl provoquent une inhibition relativement importante de la réponse visuelle du CS des jeunes rats. Ceci peut sans doute être expliqué par le fait que les neurones immatures sont plus fragiles aux variations du milieu dans lequel ils se trouvent (Kamino *et al.*, 1993). Finalement, le fait que dans nos résultats, le LCRa cause une perturbation moins importante (mais tout de même présente) du signal visuel nous suggère que l'effet inhibiteur observé suite aux injections de NaCl pourrait être dû à au moins deux facteurs: i) une variation de la pression osmotique causée par l'ajout de NaCl dans le milieu extracellulaire et ii) une perturbation mécanique causée par l'injection *per se*.

Dans cette dernière éventualité, nous avons finalement voulu vérifier si l'effet inhibiteur observé suite aux injections contrôles pouvait être dû à la stimulation de mécanorécepteurs par l'injection *per se*. Nous avons donc injecté de la saline en conjonction avec du DPC, un bloqueur des canaux Cl<sup>-</sup> (Faller et Ryan, 1992). En effet, certaines études ont démontré que les neurones du cerveau contiennent des récepteurs qui sont sensibles à l'étirement (mécanorécepteurs) (Bedard et Morris, 1992; Bowman *et al.*, 1992; Craelius *et al.*, 1989; Morris et Horn, 1991; Pellegrino *et al.*, 1990). Lorsque activés, ces récepteurs provoquent entre autres une ouverture des canaux Cl<sup>-</sup> (Bedard et Morris, 1992;

Bowman *et al.*, 1992; Craelius *et al.*, 1989; Morris et Horn, 1991). L'injection de DPC devrait donc avoir comme effet d'inhiber l'activité des mécanorécepteurs en bloquant les canaux Cl<sup>-</sup>. Cependant, dans la présente étude, le DPC n'a pas permis d'éliminer l'action inhibitrice provoquée par les injections de NaCl. Nous en concluons donc que l'effet d'étirement des neurones causé par les injections contrôles n'est pas responsable de l'inhibition observée, du moins pas via son action sur les canaux Cl<sup>-</sup>. En effet, nous ne pouvons éliminer complètement cette thèse car d'autres types de canaux (K<sup>+</sup> par exemple) sont activés lors de la stimulation des mécanorécepteurs (Bowman *et al.*, 1992; Craelius *et al.*, 1989; Islas *et al.*, 1993; Pellegrino *et al.*, 1990).

#### **4.3 Distribution des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans le CS**

Nos résultats semblent consistants avec la distribution déjà établie des récepteurs angiotensinergiques dans le CS chez le rat. Des études autoradiographiques ont montré que les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> sont présents en grande densité dans le CS (Gehlert *et al.*, 1991; Rowe *et al.*, 1991), plus précisément au niveau des deux couches les plus superficielles, soit la SZ et la SGS (Bunnemann *et al.*, 1992; Heemskerk *et al.*, 1993; Michels *et al.*, 1994). Une de ces études suggère aussi que les récepteurs angiotensinergiques AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> ont une distribution laminaire différente, c'est-à-dire que la localisation des récepteurs AT<sub>1</sub> serait limitée à la moitié supérieure de la SGS, tandis que

la localisation des récepteurs  $AT_2$  serait limitée à la partie inférieure de cette même couche (Gehlert *et al.*, 1991). De plus, une étude effectuée par Sirett *et al.* (1979) suggère que la distribution rostro-caudale des récepteurs angiotensinergiques varie dans le CS en faveur de la région caudale. Selon Michels et ses collaborateurs (1994), il semble que la proportion relative des deux types de récepteurs soit de 75% pour les récepteurs  $AT_2$  et de 25% pour les récepteurs  $AT_1$ . Plus récemment, il a été démontré que le CS contient une forte densité de récepteurs  $AT_4$  (Wright et Harding, 1995).

Les résultats que nous avons obtenu suite aux injections d'Ang II à différentes profondeurs (profil de profondeur) sont en accord avec la distribution laminaire des récepteurs à l'Ang II mentionnée précédemment (au niveau de la SZ et de la SGS). En effet, lorsque l'Ang II est injectée dans les couches plus ventrales à la SGS, aucun effet physiologique important n'est observé. Cette observation suggère par le fait même que l'effet inhibiteur de l'Ang II observé au niveau des couches superficielles est dû à l'activation des récepteurs au site d'injection (action centrale directe du peptide) et non pas à une action indirecte provoquée par la vasoconstriction des vaisseaux sanguins environnant (Näveri, 1995).

#### 4.4 Effet physiologique de l'Ang II

Comme mentionné dans les sections précédentes, plusieurs indices nous indiquent que l'effet de l'Ang II sur l'amplitude des PEVs est bien du à l'action pharmacologique directe du peptide via les récepteurs angiotensinergiques localisés sur les neurones entourant la pointe de l'électrode. Premièrement, l'effet de l'Ang II à des concentrations de  $10^{-3}M$  et  $10^{-6}M$  est, de façon significative, différent de l'effet observé suite aux injections contrôles de NaCl. Ainsi, la composante inhibitrice provoquée par le véhicule (saline) a été éliminée en comparant l'effet des injections d'Ang II avec l'effet causé par les injections contrôles. Le surplus d'inhibition résultant de cette comparaison est donc du à l'action pharmacologique du peptide, et non pas à la perturbation mécanique causée par l'injection et/ou à la variation de la pression osmotique possiblement causée par le véhicule utilisé. Deuxièmement, le fait que les injections d'Ang II faites dans les couches ventrales à la SGS n'ont provoqué aucune perturbation majeure du signal indique que l'effet de l'Ang II est bien localisé aux sites où l'on retrouve des récepteurs angiotensinergiques. Ainsi, l'action de l'Ang II sur la réponse visuelle est bel et bien due à l'activation physiologique directe de ces récepteurs, et non à une action indirecte via les vaisseaux sanguins. Troisièmement, les résultats que nous avons obtenus qui suggèrent que les effets de l'Ang II seraient possiblement reliés à la dose injectée supportent la thèse de l'activation physiologique directe des récepteurs

angiotensinergiques. Malheureusement, étant donné que i) seulement quatre concentrations d'Ang II ont été utilisées, ii) que les effets sont en général très variables et iii) que le nombre d'injections par concentration n'est pas toujours très élevé, il n'est pas possible d'affirmer que les effets sont reliés à la dose puisque cette tendance n'est pas significative. Il est vraisemblable qu'avec un échantillonnage plus grand et l'utilisation d'un plus grand nombre de concentrations d'Ang II nous puissions mettre en évidence une relation dose-réponse telle que celle observée chez le rat adulte (Merabet *et al.*, 1997) et dans plusieurs autres études *in vivo* (Denbow, 1985; Lebrun *et al.*, 1995; Muratani *et al.*, 1991).

#### **4.5 Implication des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> dans l'effet observé sur la réponse visuelle du CS**

Un des objectifs de départ de cette étude était de déterminer quels types de récepteurs de l'Ang II sont à la base de son action inhibitrice sur la réponse visuelle enregistrée dans le CS des jeunes rats, et si les types de récepteurs impliqués varient au cours du développement post-natal. Malheureusement, nos résultats ne nous permettent pas de répondre clairement à ces questions puisque les ligands que nous avons utilisés n'ont pas, de façon globale, bloqué l'effet inhibiteur de l'Ang II (sauf chez les animaux âgés de 15 à 19 jours). Plusieurs raisons peuvent expliquer nos résultats. Premièrement, il est

vraisemblable qu'un problème majeur provient du nombre relativement faible d'injections effectuées avec les ligands. Effectivement, les effets obtenus tout au long de cette étude sont très variables (même pour les injections contrôles) et un plus grand nombre d'injections serait probablement nécessaire afin d'observer une tendance claire quant à la contribution des récepteurs. Deuxièmement, il est possible qu'il y ait des interactions mutuelles entre les différents types de récepteurs ("crosstalk") tel proposé par Gelband *et al.* (1997) au niveau des neurones catécholaminergiques. Si tel est le cas, l'utilisation d'un ligand spécifique à un seul type de récepteur devient inadéquate. Cependant, si l'on tient compte de cette hypothèse, l'effet de l'Ang II devrait tout de même être au moins légèrement bloqué lorsque le peptide est injecté en conjonction avec les antagonistes des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Par contre, si les interactions mentionnées précédemment sont négatives ("crosstalk" négatif), cela pourrait peut-être expliquer pourquoi l'administration des deux antagonistes ensemble n'a aucun effet sur l'action de l'Ang II alors que lorsqu'ils sont injectés séparément, ils semblent démontrer des actions antagonistes (chez les animaux âgés de 15 à 19 jours). Troisièmement, il est possible que les effets de l'Ang II sur les PEVs soient "médiés" par les récepteurs AT<sub>4</sub>. En effet, il a été démontré que les récepteurs AT<sub>4</sub> sont plus nombreux que les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> au niveau du CS chez l'adulte (Wright et Harding, 1995). Dans l'hypothèse où le CS des ratons est aussi riche en récepteurs AT<sub>4</sub>, ceci pourrait peut-être expliquer pourquoi les

antagonistes DUP 753 et PD 123319 n'ont pas réussi à bloquer l'effet de l'Ang II. Il s'agirait d'une différence considérable par rapport à chez l'adulte puisque les autres études ayant caractérisé l'effet de l'Ang II sur la réponse visuelle du CS suggèrent que les récepteurs impliqués sont principalement de type AT<sub>1</sub> et possiblement de type AT<sub>2</sub> (Merabet *et al.*, 1997; Mooney *et al.*, 1994). Ainsi, il nous semble peu probable que les effets que nous avons observés aux différents stades du développement post-natal du rat (de l'ouverture des yeux jusqu'au début du stade adulte) soient tous "médiés" par les récepteurs AT<sub>4</sub> et que brusquement, chez l'adulte, les effets soient issus de l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>.

Nous avons aussi injecté du CGP 42112 afin de vérifier si à des concentrations inférieures à 10<sup>-9</sup>M, ce ligand a bel et bien une action agoniste sur les récepteurs AT<sub>2</sub> (Brechler *et al.*, 1993; Buisson *et al.*, 1992). Comme mentionné dans l'introduction, à des concentrations supérieures à 10<sup>-9</sup>M, le CGP 42112 se lie davantage avec les récepteurs AT<sub>1</sub> et agit comme agoniste (De Gasparo *et al.*, 1994). L'analyse statistique de nos résultats indique que le CGP 42112 a un effet similaire à l'Ang II sur les réponses visuelles enregistrées. De façon contradictoire, si l'on compare l'effet du CGP 42112 avec celui de la saline, nos résultats indiquent que les effets sont aussi similaires. Ces résultats indiquent donc que l'effet inhibiteur du CGP 42112 est intermédiaire entre l'effet inhibiteur de l'Ang II et celui du NaCl. Malgré tout, nous croyons que l'action causée par

le ligand sur les PEVs est pharmacologique, mais qu'elle est moins importante que celle de l'Ang II à cause de la plus faible affinité du CGP 42112 par rapport à l'Ang II pour les récepteurs angiotensinergiques (Chiu *et al.*, 1994). Il est probable qu'avec un plus grand échantillonnage, l'effet causé par le CGP 42112 serait différent de celui causé par les injections contrôles. Notez que des résultats contradictoires avec le CGP 42112 ont aussi été obtenus chez le rat adulte (Merabet *et al.*, 1997). En supposant que les effets observés suite aux injections de ce ligand sont bien physiologiques et comparables à ceux de l'Ang II, nos résultats suggèrent qu'à des concentrations de  $10^{-6}$ M et  $10^{-10}$ M, le CGP 42112 a une action inhibitrice semblable à celle de l'Ang II sur les PEVs. Ceci suggère donc que l'Ang II agit sur la réponse visuelle du CS via les récepteurs  $AT_1$  et  $AT_2$ . Cependant, comme nous l'avons mentionné précédemment, ces conclusions sont hypothétiques et afin de les clarifier, une étude plus poussée devrait être effectuée en ce sens.

#### **4.6 Comparaison avec d'autres études**

À part les résultats présentés dans ce mémoire, seulement quelques études ont caractérisé l'action de l'Ang II sur les neurones du CS. Une de ses études a été effectuée dans notre laboratoire et avait pour but de déterminer l'effet de l'Ang II sur les PEVs du CS du rat adulte (Merabet *et al.*, 1994, 1997). La méthode utilisée était la même que celle décrite dans la section *Matériel et Méthodes* de



la présente étude, à la différence près que les injections effectuées étaient toutes colorées au Chicago Sky Blue. Cette étude démontre clairement que l'Ang II a un effet inhibiteur réversible relié à la dose sur la réponse visuelle du CS chez les rats adultes et que cet effet est principalement "médié" par les récepteurs AT<sub>1</sub>, et possiblement en partie par les récepteurs AT<sub>2</sub>. Parallèlement à cette étude, un autre groupe de chercheurs ont étudié l'effet de l'Ang II sur les neurones visuels du CS du hamster adulte (Mooney *et al.*, 1994). Contrairement à la présente étude et à celle de Merabet et ses collaborateurs (1994, 1997), ces auteurs ont caractérisé l'effet du peptide sur l'activité unitaire des neurones. Les drogues ont été injectées par pression dans les couches superficielles du CS. Leurs résultats indiquent aussi que l'Ang II a un effet inhibiteur sur la réponse des neurones aux stimuli visuels ou à la stimulation électrique du chiasma optique et du cortex visuel. Contrairement à l'étude de Merabet et de ses collaborateurs (1997), ces auteurs suggèrent que l'action de l'Ang II est issue de l'activation des récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, et ce de façon égale. De plus, leurs travaux suggèrent que le site d'action de l'Ang II est postsynaptique. L'action inhibitrice que nous avons observée dans la présente étude est donc en accord avec les résultats obtenus dans les deux études précédemment décrites.

#### 4.7 Effets fonctionnels de l'Ang II sur les neurones du SNC

Alors que l'effet de l'Ang II sur les structures visuelles a fait l'objet de peu de travaux [au niveau de la rétine (Jan Danser *et al.*, 1994), du CS (Merabet *et al.*, 1994, 1997; Mooney *et al.*, 1994) et du CGL (Albrecht, 1995)], plusieurs études ont été effectuées dans les structures cérébrales connues pour contrôler les fonctions notoires de l'Ang II. Les rôles bien établis de l'Ang II sont reliés aux fonctions cardiovasculaires, à l'homéostasie des fluides et aux comportements reliés à la soif. Cependant, depuis quelques années, plusieurs chercheurs ont décidé de caractériser les effets de ce peptide dans d'autres régions du cerveau. Brown *et al.* (1996) ont démontré *in vivo* et *in vitro* que l'Ang II, agissant via les récepteurs AT<sub>1</sub>, facilite la relâche de dopamine dans le *striatum* du rat. Li et Ferguson (1993b, 1996) ont démontrés que l'Ang II est un peptide qui module l'activité neuronale au niveau du noyau paraventriculaire et au niveau de l'organe sousfornical et qui a une influence modulatrice sur l'excitabilité de cellules neuroendocrines hypothalamiques. Il a aussi été démontré *in vitro* que l'Ang II influence, principalement de façon excitatrice, les neurones de l'aire *postrema* via les récepteurs AT<sub>1</sub> (Sun et Ferguson, 1996). Dans l'hippocampe, il a été démontré que l'Ang II augmente l'activité neuronale (Haas *et al.*, 1982). Wayner *et al.* (1995) ont démontré que l'Ang II entraîne une inhibition des potentiations à long terme et ce via les récepteurs AT<sub>1</sub>. Tang et Pan (1995) ont démontrés que l'Ang II *in vitro* a un effet neuromodulateur

excitateur ou inhibiteur sur le taux de décharge des neurones du noyau suprachiasmatique et suggèrent que le mode d'action du peptide peut varier selon les neurones. La majorité des actions physiologiques connues de l'Ang II sont donc "médiées" par les récepteurs AT<sub>1</sub>. Très peu d'études ont réussi à démontrer clairement une implication physiologique des récepteurs AT<sub>2</sub>. Ceci peut peut-être être expliqué par le fait que ce type de récepteur a été caractérisé et étudié plus tard que les récepteurs AT<sub>1</sub>, donc que les connaissances à son sujet, concernant ses mécanismes de transduction par exemple, sont incomplètes (De Gasparo *et al.*, 1994). De plus, les ligands sélectifs aux récepteurs AT<sub>2</sub> ne sont pas totalement spécifiques à ce type de récepteur (De Gasparo *et al.*, 1994). Une des rares études qui attribue une action physiologique aux récepteurs AT<sub>2</sub> a été effectuée par Ambühl *et al.* (1992) et suggère que l'Ang II a un effet excitateur sur les neurones de l'olive inférieure via ce type de récepteur. Plus récemment, Xiong et Marshall (1994) ont démontré que l'Ang II avait un effet dépresseur important sur les potentiels postsynaptiques excitateurs au niveau du *locus coeruleus*, et ce en agissant via les récepteurs AT<sub>2</sub>. Finalement, Yamada *et al.*, (1996) suggèrent que l'Ang II, via les récepteurs AT<sub>2</sub>, est impliquée dans l'apoptose de certaines cellules, dont des cellules de la lignée des fibroblastes.

Il est donc clair que l'Ang II exerce une action neuromodulatrice au niveau des neurones du SNC des animaux adultes, incluant les structures sensorielles.

Nos travaux indiquent que cette action est présente chez le jeune raton en développement au niveau du CS.

#### 4.8 Conclusions

Notre étude suggère que l'Ang II a un effet inhibiteur réversible possiblement relié à la dose sur l'activité visuelle du CS des jeunes rats durant leur développement post-natal. De plus, il semble que plus les animaux sont jeunes, plus l'action inhibitrice du peptide est importante. Malgré l'utilisation de ligands spécifiques aux récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub>, nous n'avons pu déterminer via quels types de récepteurs l'Ang II produit son effet. Néanmoins, tel que proposé chez l'adulte (Merabet *et al.*, 1997), nos résultats suggèrent que l'Ang II intervient dans la physiologie des neurones colliculaires associée avec la maturation des fonctions visuelles.

Finalement, il est probable que la technique d'injection que nous avons utilisée n'est pas idéale chez les jeunes ratons, contrairement à l'adulte. Une technique comme la microdialyse serait peut-être plus adéquate dans les circonstances. Pour plus de détails concernant le rôle de l'Ang II dans le CS, il serait aussi intéressant de caractériser *in vitro* l'effet de l'Ang II sur l'activité neuronale au niveau de tranches du CS du jeune rat en développement.

# RÉFÉRENCES

## CHAPITRE 5

Abe, K. et Saito, H. (1992) Protective effect of epidermal growth factor on glutamate neurotoxicity in cultured cerebellar neurons. *Neuroscience Research*. 14:117-123.

Akaoka, H., Saunier, C.F., Chergui, K., Charléty, C., Buda, M., Chouvet, A. (1992) Combining in vivo volume-controlled pressure microinjection with extracellular unit recording. *Journal of Neuroscience Methods*. 42:119-128.

Albrecht, D. (1995) Angiotensin increases the spontaneous activity of dorsal lateral geniculate neurons in urethane anesthetized rats. *Society of Neuroscience Abstract*. 21:12.

Ambühl, P., Felix, D., Imboden, H., Khosla, M.C., Ferrario, C.M. (1992) Effect of angiotensin II and its selective antagonists on inferior olivary neurones. *Regulatory Peptides*. 41:19-26.

Andersson, B., Eriksson, S., Rundgren, M. (1995) Angiotensin and the brain. *Acta Physiologica Scandinavica*. 155:117-125.

Averill, D.B., Tsuchihashi, T., Khosla, M.C., Ferrario, C.M. (1994) Losartan, nonpeptide angiotensin II-type 1 (AT<sub>1</sub>) receptor antagonist, attenuates pressor and sympathoexcitatory responses evoked by angiotensin II and L-glutamate in rostral ventrolateral medulla. *Brain Research*. 665:245-252.

Bains, J.S. et Ferguson, A.V. (1994) Angiotensin II neurotransmitter actions in paraventricular nucleus are potentiated by a nitric oxide synthase inhibitor. *Regulatory Peptides*. 50(1):53-59.

Barde, Y.A. (1989) Trophic factors and neuronal survival. *Neuron*. 2:1525-1534.

Baxter, C.R., Horvath, J.S., Duggin, G.G., Tiller, D.J. (1980) Effect of age on specific angiotensin binding sites in rat brain. *Endocrinology*. 106(3):995-999.

Bedard, E. et Morris, C.E. (1992) Channels activated by stretch in neurons of a helix snail. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 70:207-213.

Benedetti, F. et Ferro, I. (1995) The effects of early postnatal modification of body shape on the somatosensory-visual organization in mouse superior colliculus. *European Journal of Neuroscience*. 7:412-418.

Bickerton, R.K. et Buckley, J.P. (1961) Evidence for a central mechanism in angiotensin-induced hypertension. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 106:834-836

Bottari, S.P., De Gasparo, M., Steckelings, U.M., Levens, N.R. (1993) Angiotensin II receptor subtypes: Characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 14(2):123-171.

Bowman, C.L., Ding, J.P., Sachs, F., Sokabe, M. (1992) Mechanotransducing ion channels in astrocytes. *Brain Research*. 584:272-286.

Braun-Menendez, E., Fasciolo, J.C., Leloir, L.F., Munoz, J.M. (1940) The substance causing renal hypertension. *Journal of Physiology*. 98:283-298.

Braszko, J.J. et Wisniewski, K. (1988) Effect of angiotensin II and saralasin on motor activity and the passive avoidance behavior of rats. *Peptides*. 9:475-479.

Brechler, V., Jones, P.W., Levens, N.R., De Gasparo, M., Bottari, S.P. (1993) Agonistic and antagonistic properties of angiotensin analogs at the AT<sub>2</sub> receptor in PC12W cells. *Regulatory Peptides*. 44:207-213.

Brown, D.C., Steward, L.J., Ge, J., Barnes, N.M. (1996) Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT<sub>1</sub> receptor *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*. 118:414-420.

Buisson, B., Bottari, S.P., De Gasparo, M., Gallo-Payet, N., Payet, M. (1992) The angiotensin AT<sub>2</sub> receptor modulates t-type calcium currents in non-differentiated NG108-15 cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 309:161-164.

Bunnemann, B., Fuxe, K., Ganten, D. (1992) The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 19(Suppl.6):51-62.

Bunnemann, B., Fuxe, K., Ganten, D. (1993) The renin-angiotensin system in the brain: an update 1993. *Regulatory Peptides*. 46:487-509.

Casanova, C. et Molotchnikoff, S. (1990) Influence of the superior colliculus on visual responses of cells in the rabbit's lateral posterior nucleus. *Experimental Brain Research*. 80:387-396.

- Chaki, S. et Inagami, T. (1992) Identification and characterization of a new binding site for angiotensin II in mouse neuroblastoma Neuro-2A cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 182:388-394.
- Chaki, S. et Inagami, T. (1993) New signaling mechanism of angiotensin II in neuroblastoma Neuro-2A cells: activation of soluble guanylyl cyclase via nitric oxide synthesis. *Molecular Pharmacology*. 43:603-608.
- Chalupa, L.M. et Rhoades, R.W. (1977) Responses of visual, somatosensory, and auditory neurones in the golden hamster's superior colliculus. *Journal of Physiology*. 270:595-626.
- Chang, R.S.L., Lotti, V.J., Chen, T.B., Faust, K.A. (1990) Two angiotensin II binding sites in rat brain revealed using [<sup>125</sup>I]Sar<sup>1</sup>, Ile<sup>8</sup>-Angiotensin II and selective nonpeptide antagonists. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 171(2):813-817.
- Chiu, A.T., Duncia, J.V., McCall, D.E., Wong, P.C., Price, W.A.Jr., Thoolen, M.J.M.C., Carini, D.J., Johnson, A.L., Timmermans, P.B.M.W.M. (1989) Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. III. Structure-function studies. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 250(3):867-874.
- Chiu, A.T., Smith, R.D., Timmermans, P.B.M.W.M. (1994) Defining angiotensin receptor subtypes dans *Angiotensin Receptors*. Saavedra, J.M. et Timmermans, P.B.M.W.M. (Eds). Plenum Press, New York. 49-65.
- Craelius, W., el-Sherif, N., Palant, C.E. (1989) Stretch-activated ion channels in cultured mesangial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 159:516-521.
- Crommelinck, M. et Guitton, D. (1994) Oculomotricité dans *Traité de Psychologie Expérimentale*. Richelle, M., Requin, J., Robert, M. (Eds), Presses Universitaires de France, Paris. 657-728.
- Culman, J., Hohle, S., Qadri, F., Edling, O., Blume, A., Lebrun, C., Unger, T. (1995) Angiotensin as neuromodulator/neurotransmitter in central control of body fluid and electrolyte homeostasis. *Clinical Experience in Hypertension*. 17:281-293.
- De Gasparo, M., Levens, N.R., Kamblar, B., Furet, P., Whitebread, S., Brechler, V., Bottari, S.P. (1994) The Angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor subtype. Dans *Angiotensin Receptors*. Saavedra, J.M. et Timmermans, P.B.M.W.M. (Eds). Plenum Press, New York. 95-117.



Denbow, D.M. (1985) Food and water intake response of turkeys to intracerebroventricular injections of angiotensin II. *Poultry Science*. 64:1996-2000.

Durmuller, N., Graham, J.L., Sowinski, P., Meldrum, B.S. (1997) The vital dye Evans blue mimics limbic seizures induced by kainate or pilocarpine. *Brain Research*. 753:283-290.

Dyer, R.S. et Annau, Z. (1977) Flash evoked potentials from rat superior colliculus. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*. 6:453-459.

Edwards, S.B. (1980) The deep cell layers of the superior colliculus: their reticular characteristics and structural organization. In *The reticular formation revisited*. Hobson, J.A., Brazier, M.A.B. (Eds). Raven Press, New York. 193-209.

Epstein, A.N., Fitzsimons, J.T., Rolls, B.J. (1970) Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. *Journal of Physiology*. 210:457-474.

Faller, D. et Ryan, M.P. (1992) Factors affecting chloride conductance in apical membrane vesicles from human placenta. *Journal of Membrane Biology*. 130:227-239.

Fisher-Ferraro, C., Nahmod, V.E., Goldstein, D.J., Finkielman, S. (1971) Angiotensin and renin in the rat and the dog brain. *Journal of Experimental Medicine*. 133(2):356-361.

Fujita, S. (1964) Analysis of neuron differentiation in the central nervous system by tritiated thymidine autoradiography. *Journal of Comparative Neurology*. 122:311-327.

Ganong, W.F. (1984) The brain renin-angiotensin system. *Annual Review of Physiology*. 46:17-31.

Ganten, D. et Speck, G. (1978) The brain renin-angiotensin system: a model for the synthesis of peptides in the brain. *Biochemical Pharmacology*. 27:2379-2389.

Ge, J. et Barnes, N.M. (1996) Alterations in angiotensin AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor subtype levels in brain regions from patients with neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*. 297:299-306.

- Gehlert, D.R., Speth, R.C., Wamsley, J.K. (1986) Distribution of [<sup>125</sup>I]Angiotensin II binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*. 18(4):837-856.
- Gehlert, D.R., Gackenheimer, S.L., Schober, D.A. (1991) Autoradiographic localization of subtypes of angiotensin II antagonist binding in the rat brain. *Neuroscience*. 44(2):501-514.
- Gelband, C.H., Zhu, M., Lu, D., Reagan, L.P., Fluharty, S.J., Posner, P., Raizada, M.K., Sumners, C. (1997) Functional interactions between neuronal AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors. *Endocrinology*. 138:2195-2198.
- Ghribi, O., Callebert, J., Plotkine, M., Boulu, R.G. (1994) Competitive NMDA receptor blockers reduce striatal glutamate accumulation in ischaemia. *Neuroreport*. 5:1253-1255.
- Goodale, M.A. (1973) Cortico-tectal and intertectal modulation of visual responses in the rat's superior colliculus. *Experimental Brain Research*. 17:75-86.
- Haas, H.I., Felix, D., Davis, M.D. (1982) Angiotensin excites hippocampal pyramidal cells by two mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2:21-32.
- Hadley, M.E. (1992) *Endocrinology*. Prentice-Hall Inc. New Jersey. p. 402-405,570.
- Harding, J.W., Stone, L.P., Wright, J.W. (1981) The distribution of angiotensin II binding sites in rodent brain. *Brain Research*. 205:265-274.
- Harding, J.W., Sullivan, M.J., Hanesworth, J.M., Cushing, L.L., Wright, J.W. (1988) Inability of [<sup>125</sup>I]Sar<sup>1</sup>,Ile<sup>8</sup>-Angiotensin II to move between the blood and cerebrospinal fluid compartments. *Journal of Neurochemistry*. 50:554-557.
- Harding, J.W., Wright, J.W., Swanson, G.N., Hanesworth, J.M., Krebs, L.T. (1994) AT<sub>4</sub> receptors: specificity and distribution. *Kidney International*. 46:1510-1512.
- Harvey, A.R. et Worthington, D.R. (1990) The projection from different visual cortical areas to the rat superior colliculus. *The Journal of Comparative Neurology*. 298:281-292.

- Heemskerk, F.M.J., Zorad, S., Seltzer, A., Saavedra, J.M. (1993) Characterization of brain angiotensin II AT<sub>2</sub> receptor subtype using [<sup>125</sup>I]CGP 42212A. *Neuroreport*. 4:103-105.
- Hetzler, B.E., Heilbronner, R.L., Griffin, J., Griffin, G. (1981) Acute effects of alcohol on evoked potentials in visual cortex and superior colliculus of the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 51:69-79.
- Hodges, J.C. (1994) Angiotensin antagonists: agents that interact with the AT<sub>2</sub> receptor and their potential therapeutic utilities. *Experimental Opinions and Therapeutic Patents*. 4(11):1325-1338.
- Huerta, M.F. et Harting, J.K. (1984) Connectional organization of the superior colliculus. *Trends in Neuroscience*. 7:286-289.
- Ikeda, J., Terakawa, S., Murota, S., Morita, I., Hirakawa, K. (1996) Nuclear disintegration as a leading step of glutamate excitotoxicity in brain neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 43:613-622.
- Islas, L., Pasantes-Morales, H., Sanchez, J.A. (1993) Characterization of stretch-activated ion channels in cultured astrocytes. *Glia*. 8:87-96.
- Itaya, S.K., Fortin, S., Molotchnikoff, S. (1995) Evolution of spontaneous activity in the developing rat superior colliculus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 73:1372-1377.
- Jan Danser, A.H., Derkx, F.H.M., Admiraal, P.J.J., Deinum, J., de Jong, P.T.V.M., Schalekamp, M.A.D.H. (1994) Angiotensin levels in the eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 35:1008-1018.
- Jarvis, M.F., Gessner, G.W., Ly, C.Q. (1992) The angiotensin hexapeptide 3-8 fragment potently inhibits [<sup>125</sup>I]angiotensin II binding to non-AT<sub>1</sub> or -AT<sub>2</sub> recognition sites in bovine adrenal cortex. *European Journal of Pharmacology*. 219:319-322.
- Johnston, C.I. (1990) Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system. *Drugs*. 39:21-31.
- Jurklics, B., Eckstein, A., Jacobi, P., Kohler, K., Risler, T., Zrenner, E. (1995) The renin-angiotensin system—a possible neuromodulator in the human retina? *Ger Journal of Ophthalmology*. 4(3):144-150.

Kamino, K., Sakai, T., Momose-Sato, Y., Sato, K. (1993) Optical indications of early appearance of postsynaptic potentials in the embryonic chick brain stem. *Japanese Journal of Physiology*. 43(suppl.1):S43-S51.

Köller, M., Krause, H.P., Hoffmeister, F., Ganten, D. (1975) Endogenous brain angiotensin II disrupts passive avoidance behavior in rats. *Neuroscience Letters*. 14:71-75.

Lassègue, B., Griendling, K.K., Alexander, R.W. (1994) Molecular biology of angiotensin II receptors. dans *Angiotensin Receptors*. J.M. Saavedra, P.B.M.W.M. Timmermans (Eds). Plenum Press, New York. 17-48.

Lebrun, C.J., Blume, A., Herdegen, T., Seifert, K., Bravo, R., Unger, T. (1995) Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of FOS, JUN and KROX proteins. *Neuroscience*. 65(1):93-99.

Li, Z. et Ferguson, A.V. (1993a) Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. *American Journal of Physiology*. 265:R302-R309.

Li, Z. et Ferguson, A.V. (1993b) Angiotensin II responsiveness of rat paraventricular and subfornical organ neurons in vitro. *Neuroscience*. 55(1):197-207.

Li, Z. et Ferguson, A.V. (1996) Electrophysiological properties of paraventricular magnocellular neurons in rat brain slices: modulation of  $I_A$  by angiotensin II. *Neuroscience*. 71:133-145.

Lund, J.S. et Lund, R.D. (1972) The effects of varying periods of visual deprivation on synaptogenesis in the superior colliculus of the rat. *Brain Research*. 42:21-32.

Martin, J.H. (1991) Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neuroscience Letters*. 127: 160-164.

Meffert, S., Stoll, M., Steckelings, U.M., Bottari, S.P., Unger, T. (1996) The angiotensin II  $AT_2$  receptor inhibits proliferation and promotes differentiation in PC12W cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 122:59-67.

Mendelsohn, F.A.O., Quirion, R., Saavedra, J.M., Aguilera, G., Catt, K.J. (1984) Autoradiographic localization of angiotensin II receptors in rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 81:1575-1579.

Merabet, L., De Gasparo, M., Casanova, C. (1994) Neuromodulatory effects of angiotensin II in the visual layers of the rat superior colliculus. *NeuroReport*. 5:2649-2652.

Merabet, L. (1995) Neuromodulatory effects of angiotensin II on the visual responses of the rat superior colliculus. Thèse de Doctorat, Université de Sherbrooke, 92 pages.

Merabet, L., De Gasparo, M., Casanova, C. (1997) Dose-dependent inhibitory effects of angiotensin II on visual responses of the rat superior colliculus: AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor contributions. *Neuropeptides*. 31:469-481.

Michels, K.M., Heemskerk, F.M.J., Saavedra, J.M. (1994) Selective changes in angiotensin II AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptor subtypes in the rat superior colliculus following eye enucleation. *Neuroscience*. 53(4):835-844.

Millan, M.A., Jacobowitz, D.M., Aguilera, G., Catt, K.J. (1991) Differential distribution of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences(USA)*. 88:11440-11444.

Moffett, R.B., Bumpus, F.M., Husain, A. (1987) Cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Sciences*. 41:1867-1879.

Molotchnikoff, S. et Itaya, S.K. (1993) Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Developmental Brain Research*. 72:300-304.

Molotchnikoff, S. et Shumikhina, S. (1996) The lateral posterior-pulvinar complex modulation of stimulus-dependent oscillations in the cat visual cortex. *Vision Research*. 36:2037-2046.

Mooney, R.D., Zhang, Y., Rhoades, R.W. (1994) Effects of angiotensin II on visual neurons in the superficial laminae of the hamster's superior colliculus. *Visual Neuroscience*. 11:1163-1173.

Morris, C.E. et Horn, R. (1991) Failure to elicit neuronal macroscopic mechanosensitive currents anticipated by single-channel studies. *Science*. 251:1246-1249.

Mungall, B.A., Shinkel, T.A., Sernia, C. (1995) Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. *Neuroscience*. 67(2):505-524.

Muratani, H., Averill, D.B., Ferrario, C.M. (1991) Effect of angiotensin II in ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Physiology*. 260:R977-R984.

Näveri, L. (1995) The role of angiotensin receptor subtypes in cerebrovascular regulation in the rat. *Acta Physiologica Scandinavica*. 155(Suppl.630):1-48.

Nealey, T.A. et Maunsell, J.H. (1994) Magnocellular and parvocellular contributions to the responses of neurons in macaque striate cortex. *Journal of Neuroscience*. 14:2069-2079.

Nicholson, C. (1985) Diffusion from an injected volume of a substance in brain tissue with arbitrary volume fraction and tortuosity. *Brain Research*. 333:325-329.

Page, I.H. et Helmer, O.M. (1940) A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and reninactivator. *Journal of Exp. Med.* 71:29-42.

Paxinos, G. et Watson, C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press.

Paxinos, G. et Watson, C. (1997) The rat brain in stereotaxic coordinates. London: Academic Press.

Pellegrino, M., Pellegrini, M., Simoni, A., Gargini, C. (1990) Stretch-activated cation channels with large unitary conductance in leech central neurons. *Brain Research*. 525:322-326.

Phillips, M.I. (1987) Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annual Review of Physiology*. 49:413-435.

Phillips, M.I., Speakman, E.A., Kimura, B. (1993) Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regulatory Peptides*. 43:1-20.

Purves, D. et Lichtman, J.W. (1985) dans Principles of Neural Development. Sinauer Associates Inc., Sunderland, pp.205-227 et 271-300.

Regan, D. et Spekreijse, H. (1986) Evoked potentials in vision research 1961-86. *Vision Research*. 26(9):1461-1480.

- Rhoades, R.W., Mooney, R.D., Fish, S.E. (1991) Retinotopic and visuotopic representations in the mammalian superior colliculus dans *Vision and Dysfunction: Neuroanatomy of the Visual Pathways and their Development*. B. Dreher et S.R. Robinson (Eds). CRC Press, Boston. 150-175.
- Roseth, S., Fykse, E.M., Fonnum, F. (1995) Uptake of L-glutamate into rat brain synaptic vesicles: effect of inhibitors that bind specifically to the glutamate transporter. *Journal of Neurochemistry*. 65:96-103.
- Rowe, B.P., Grove, K.L., Saylor, D.L., Speth, R.C. (1991) Discrimination of angiotensin II receptor subtype distribution in the rat brain using non-peptidic receptor antagonists. *Regulatory Peptides*. 33:45-53.
- Saavedra, J.M. (1992) Brain and pituitary angiotensin. *Endocrinology Review*. 13:329-380.
- Saavedra, J.M., Israel, A., Plunkett, L.M., Kurihara, M., Shigematsu, K., Correa, F.M.A. (1986) Quantitative distribution of angiotensin II binding sites in rat brain by autoradiography. *Peptides*. 7:679-687.
- Schelling, P., Ganten, U., Sponer, G., Unger, T., Ganten, D. (1980) Components of the renin-angiotensin system in the cerebrospinal fluid of rats and dogs with special consideration of the origin and the fate of angiotensin II. *Neuroendocrinology*. 31:297-308.
- Serfaty, C.A. et Linden, R. (1994) Development of abnormal lamination and binocular segregation in the retinotectal pathways of the rat. *Developmental Brain Research*. 82:35-44.
- Sernia, C. (1995) Location and secretion of brain angiotensinogen. *Regulatory peptides*. 57:1-18.
- Shanmugam, S. et Sandberg, K. (1996) Ontogeny of angiotensin II receptors. *Cell Biology International*. 20(3):169-176.
- Siminoff, R., Schwassmann, H.O., Kruger, L. (1966) An electrophysiological study of the visual projection to the superior colliculus of the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 127:435-444.
- Simon, D.K. et O'Leary, D.D.M. (1992) Development of Topographic Order in the Mammalian Retinocollicular Projection. *The Journal of Neuroscience*. 12(4):1212-1232.

Sirett, N.E., Thornton, S.N., Hubbard, J.I. (1979) Angiotensin binding and pressor activity in the rat ventricular system and midbrain. *Brain Research*. 166:139-148.

Smith, R.D., Chiu, A.T., Wong, P.C., Herblin, W.F., Timmermans, P.B.M.W.M. (1992) Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 32:135-165.

Steckelings, U.M., Bottari, S.P., Unger, T. (1992) Angiotensin receptor subtypes in the brain. *Trends in Pharmacological Sciences*. 13:365-368.

Stein, B.E. (1981) Organization of the rodents superior colliculus: some comparisons with other mammals. *Behavioural Brain Research*. 3:175-188.

Stein, B.E. et Meredith, M.A.L. (1991) Functional organization of the superior colliculus dans *Vision and Dysfunction*. Cronly-Dillon, J.R.(Ed). CRC Press, Boston. vol.4:85-110.

Stephans, S.E. et Yamamoto, B.K. (1994) Methamphetamine-induced neurotoxicity: roles for glutamate and dopamine efflux. *Synapse*. 17:203-209.

Stoll, M., Steckelings, U.M., Paul, M., Bottari, S.P., Metzger, R., Unger, T. (1995) The angiotensin AT<sub>2</sub>-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*. 95:651-657.

Sun, K. et Ferguson, A.V. (1996) Angiotensin II and glutamate influence area postrema neurons in rat brain slices. *Regulatory Peptides*. 63:91-98.

Swanson, G.N., Hanesworth, J.M., Sardinia, M.F., Coleman, J.K.M., Wright, J.W., Hall, K.L., Miller-Wing, A.V., Stobb, J.W., Cook, V.I., Harding, E.C., Harding, J.W. (1992) Discovery of a distinct binding site for angiotensin II (3-8), a putative angiotensin IV receptor. *Regulatory Peptides*. 40:409-419.

Tang, K.C. et Pan, J.T. (1995) Differential effects of angiotensin II on the activities of suprachiasmatic neurons in rat brain slices. *Brain Research Bulletin*. 37(5):529-532.

Tigerstedt, R. et Bergman, P.G. (1898) Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie*. 8:223-271.



- Timmermans, P.B.M.W.M., Wong, P.C., Chiu, A.T., Herblin, W.F., Benfield, P., Carini, D.J., Lee, R.J., Wexler, R.R., Saye, J.M., Smith, R.D. (1993) Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*. 45(2):205-251.
- Toney, G.M. et Porter, J.P. (1993a) Functional roles of brain AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the central angiotensin II pressor response in conscious young spontaneously hypertensive rats. *Developmental Brain Research*. 71:193-199.
- Toney, G.M. et Porter, J.P. (1993b) Effects of blockade of AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in brain on the central angiotensin II pressor response in conscious spontaneously hypertensive rats. *Neuropharmacology*. 32(6):581-589.
- Tsutsumi, K. et Saavedra, J.M. (1991a) Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub>) in rat brain. *American Journal of Physiology*. 261:R209-R216.
- Tsutsumi, K. et Saavedra, J.M. (1991b) Differential development of angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. *Endocrinology*. 128(1):630-632.
- Tsutsumi, K. et Saavedra, J.M. (1992) Heterogeneity of angiotensin II AT<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Molecular Pharmacology*. 41:290-297.
- Tsutsumi, K., Seltzer, A., Saavedra, J.M. (1993) Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Research*. 631:212-220.
- Viswanathan, M., Seltzer, A., Saavedra, J.M. (1994) Heterogeneous expression of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptors in neointima of rat carotid artery and aorta after balloon catheter injury. *Peptides*. 15:1205-1212.
- Warton, S.S. et Jones, D.G. (1985) Postnatal development of the superficial layers in the rat superior colliculus: a study with Golgi-Cox and Kluver-Barrera techniques. *Experimental Brain Research*. 58:490-502.
- Wayner, M.J., Polan-Curtain, J., Armstrong, D.L. (1995) Dose and time dependency of angiotensin II inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Peptides*. 16(6):1079-1082.

- Wayner, M.J., Merkel, A.D., Barone, F.C., Jolicoeur, F.B., Rondeau, D.B. (1976) Effects of angiotensin on drinking. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Suppl. 15:103-110.
- Wayner, M.J., Merkel, A.D., Jolicoeur, F.B. (1977) Effects of angiotensin II on schedule dependent and induced behavior at recovered body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 6:701-704.
- Wright, J.W. et Harding, J.W. (1992) Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Research Reviews*. 17:227-262.
- Wright, J.M. et Harding, J.W. (1995) Brain angiotensin receptor subtypes AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, and AT<sub>4</sub> and their fonctions. *Regulatory Peptides*. 59:269-295.
- Wright, J.W., Krebs, L.T., Stobb, J.W., Harding, J.W. (1995) The angiotensin IV system: functional implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 16:23-52.
- Xiong, H. et Marshall, K.C. (1994) Angiotensin II depresses glutamate depolarizations and excitatory postsynaptic potentials in locus coeruleus through angiotensin II subtype 2 receptors. *Neuroscience*. 62(1):163-175.
- Yamada, T., Horiuchi, M., Dzau, V.J. (1996) Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93:156-160.
- Zhou, J., Ernsberger, P., Douglas, J.G. (1993) A novel angiotensin receptor subtype in rat mesangium. *Hypertension*. 21:1035-1038.

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Christian Casanova, pour son aide inestimable tout au long de mon séjour dans son laboratoire, pour sa patience exemplaire ainsi que pour tout le reste.

Je remercie aussi le Dr. Stéphane Molotchnikoff pour m'avoir co-dirigé durant mes études graduées.

Je tiens aussi à remercier Karine, collègue et amie, pour avoir su m'écouter et m'encourager durant ces deux années. Je remercie aussi mes nouveaux et anciens collègues de laboratoire Alex, Jean-François et Tony.

Je remercie Darkise et Olivier, étudiants d'été, pour avoir participé à mon projet durant quelques mois.

Je remercie aussi mes parents pour m'avoir soutenue moralement et financièrement depuis toujours.

Je tiens finalement à remercier le fond pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) ainsi que le Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) pour la bourse qu'ils m'ont octroyée.

## ANNEXE

Au cours de ma formation académique dans le laboratoire, j'ai aussi participé à un projet autre que celui qui fait l'objet de mon mémoire. Ainsi, je suis co-auteur de l'article découlant de ce projet et qui est publié dans le *Journal Canadien de Physiologie et de Pharmacologie*.

Boumghar, L., Marois, A., Jolicoeur, F.J., Casanova, C. (1997) Apomorphine Modifies the Visual Responses of Cells in the Rabbit's Lateral Geniculate Nucleus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 75(7):853-858.

## Apomorphine modifies the visual responses of cells in the rabbit's lateral geniculate nucleus

L. Boumghar, A. Marois, F.J. Jolicoeur, and C. Casanova

**Abstract:** It has been shown that enhancing or reducing dopaminergic activity in the retina modifies the balance between center and surround responses of retinal neurons such as ganglion cells. We investigated how these changes are reflected in the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) by studying the effects of injections of apomorphine, a mixed D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> agonist of dopamine, on the visual responses of geniculate cells. Experiments were carried out on anesthetized adult pigmented rabbits. A varnished tungsten microelectrode was used to record single-unit activity in the dLGN. The flash electroretinogram was also recorded to monitor retinal changes and to confirm the success of the injections. Apomorphine was injected intravitreally or intravenously. The results can be summarized as follows. Apomorphine decreased the amplitude of the *b*-wave of the electroretinogram. For most dLGN cells, apomorphine produced a strong reduction in response amplitude evoked by sine-wave grating stimuli, presented at various spatial frequencies. Responses to flashing spots were also reduced but to a much lesser extent than those to gratings. In addition, the balance between the responses to small and large spots changed in favor of large stimuli. Consequently, after injection of apomorphine, the geniculate cells were preferentially activated by large-sized flashing stimuli. These data suggest that apomorphine can reduce the spatial contrast sensitivity of cells in the dLGN. This effect could be mediated by the reduction of the strength of lateral inhibition at the retinal level.

**Key words:** dopamine, Parkinson's disease, receptive fields, retinogeniculate pathway, spatial contrast sensitivity.

**Résumé :** Il a été démontré que la stimulation ou la réduction de l'activité dopaminergique dans la rétine modifie l'équilibre entre les réponses centrales et périphériques des neurones rétiniens, tels que les cellules ganglionnaires. Nous avons vérifié comment ces variations se reflètent dans le corps genouillé latéral dorsal (CGLd), en examinant les effets d'injections d'apomorphine, un agoniste D<sub>1</sub> et D<sub>2</sub> mixte de la dopamine, sur les réponses visuelles des cellules géniculées. Les expériences ont été effectuées sur des lapins pigmentés adultes, anesthésiés. Une microélectrode de tungstène verni a été utilisée pour enregistrer l'activité unitaire dans le CGLd. L'électrorétinogramme de flash lumineux a aussi été enregistrée pour observer les réponses rétinienne et pour confirmer le succès des injections. L'apomorphine a été injectée par voie intravitrée ou intraveineuse. Les résultats peuvent être résumés comme suit. L'apomorphine a diminué l'amplitude de l'onde *b* de l'électrorétinogramme. Dans la plupart des cellules du CGLd, l'apomorphine a provoqué une forte réduction de l'amplitude des réponses induites par les stimuli du réseau d'ondes sinusoïdales, présentés à diverses fréquences spatiales. Les réponses aux spots lumineux ont aussi été réduites, mais à un degré très inférieur à celles induites par les réseaux. De plus, l'équilibre entre les réponses aux spots de petite et de grande taille a été modifié en faveur de ces derniers. Ainsi, suite à l'injection d'apomorphine, les cellules géniculées ont été préférentiellement activées par les stimuli de grande taille. Ces résultats suggèrent que l'apomorphine peut réduire la sensibilité des cellules du CGLd au contraste spatial. Cet effet pourrait être véhiculé par la diminution de l'intensité de l'inhibition latérale au niveau de la rétine.

**Mots clés :** dopamine, maladie de Parkinson, champs récepteurs, voie rétino-géniculée, sensibilité au contraste spatial.

[Traduit par la Rédaction]

Received July 23, 1997.

L. **Boumghar**, Department of Ophthalmology and Department of Physiology and Biophysics, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada.

A. **Marois**, School of Optometry, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

F.J. **Jolicoeur**, Department of Psychiatry and Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada.

C. **Casanova**,<sup>1</sup> Department of Ophthalmology and Department of Physiology and Biophysics, Research Center of the Sherbrooke Geriatric University Institute, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC J1K 2R1, Canada, and School of Optometry, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

Author for correspondence at the School of Optometry, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada.

## Introduction

Dopaminergic amacrine and interplexiform retinal cells have been identified through the use of histofluorescence, immunocytochemistry, and autoradiography in various mammals (Kamp 1985; Dowling 1991), including rabbits (Witkovsky and Schütte 1991; Vaney et al. 1991). It is now well known that both  $D_1$  and  $D_2$  postsynaptic receptors are distributed throughout the retina and are found in all retinal cell layers (Witkovsky and Schütte 1991). Since only amacrine and interplexiform cells can release dopamine (DA), it appears that this transmitter not only establishes synaptic contacts with neighboring cells but that it also diffuses, in a more paracrine fashion, to reach receptors located on distant cells, i.e., the epithelium, photoreceptors, horizontal cells, bipolar cells, and ganglion cells as well as the Müller cells (Gardino et al. 1993; Muresan and Besharse 1993; Wagner et al. 1993; Dawson et al. 1992; Deary 1991). Therefore, DA may play a modulatory role in many visual processes. For example, in lower vertebrates, electrophysiological studies have shown that DA, via the formation of cAMP, reduces horizontal (H) cell light sensitivity and decreases electrical coupling (via gap junctions) between adjacent H cells (Dowling and Ehinger 1978; Dowling 1987, 1990; Yamada et al. 1992; Krizaj and Witkovsky 1993). The result of these effects could be a reduction of lateral inhibition mediated by H cells and a change in the antagonism between the center and surround regions of the receptive field of retinal neurons (bipolar and ganglion cells) (Piccolino 1988; Dowling 1991; Mangel 1991). Studies in rabbits and cats have shown that DA can modulate the responses of ganglion cells (Straschill and Perwein 1969; Dick and Miller 1981; Thier and Alder 1984; Jensen and Daw 1986). Using spots and annuli as stimuli, Thier and Alder (1984) and Jensen and Daw (1986) reported a shift in the center-surround balance of the receptive field of many ganglion cells when DA receptors were activated, suggesting that the contrast sensitivity of these cells was modified. The question we asked is how the changes of dopaminergic activity in the retina are reflected at the level of the central visual pathways. We focused on the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN) since it represents the first step of visual integration in the central nervous system. Also its activity directly depends on the retina, and any changes at the retinal level would presumably manifest themselves at the level of the thalamus. The aim of this study was to investigate the effects of apomorphine, a mixed  $D_1$  and  $D_2$  agonist, on the spatial response properties of geniculate cells.

## Methods

### Animal preparation

Experiments were carried out on normal pigmented rabbits (2.0–3.0 kg) premedicated with acepromazine and atropine (1.0 and 0.2 mg/kg, respectively). General anesthesia was induced by intravenous injection of urethane (1.5 g/kg). Lidocaine hydrochloride (2%) was given at surgical wounds and pressure points. All animals were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. A tracheotomy was performed, and the animal was then secured in a stereotaxic frame. A heating pad was placed under the animal, and the core temperature was kept constant at 37–38°C. The electrocardiogram was monitored throughout the experiment. The animal was paralyzed by injection of gallamine triethiodide (10 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup>) and artificially respired with a gas mixture of N<sub>2</sub>O–O<sub>2</sub> (70:30) plus

fluothane (0.25–0.5%). The end-tidal CO<sub>2</sub> partial pressure was monitored by a capnometer and kept constant between 28 and 32 mmHg (1 mmHg = 133.3 Pa) by adjusting the rate and stroke volume of the respiratory pump. The animal was continuously infused with a solution of 5% dextrose in lactated Ringer's and gallamine triethiodide. Pupils were dilated with atropine and nictitating membranes were retracted with local application of phenylephrine hydrochloride (10%). The eyes were protected with contact lenses of appropriate power. A craniotomy was done over the lateral geniculate nucleus and the dura was removed. The exposed cortex was covered with warm agar and melted wax to create a sealed chamber.

### Recordings and visual stimulation

#### Retinal level

A corneal electrode was inserted near the limbus to record the electroretinogram (ERG) (bandwidth of 0.1–500 Hz). Responses were evoked by a diffuse flash (Grass PS2, Grass Instruments, Quincy, Mass.) and averaged over 25 stimulus presentations. The ERG was recorded to confirm the success of the drug administration since it has been shown that apomorphine reduces the amplitude of the ERG b-wave (Jagadeesh and Sanchez 1981; Drumheller et al. 1995).

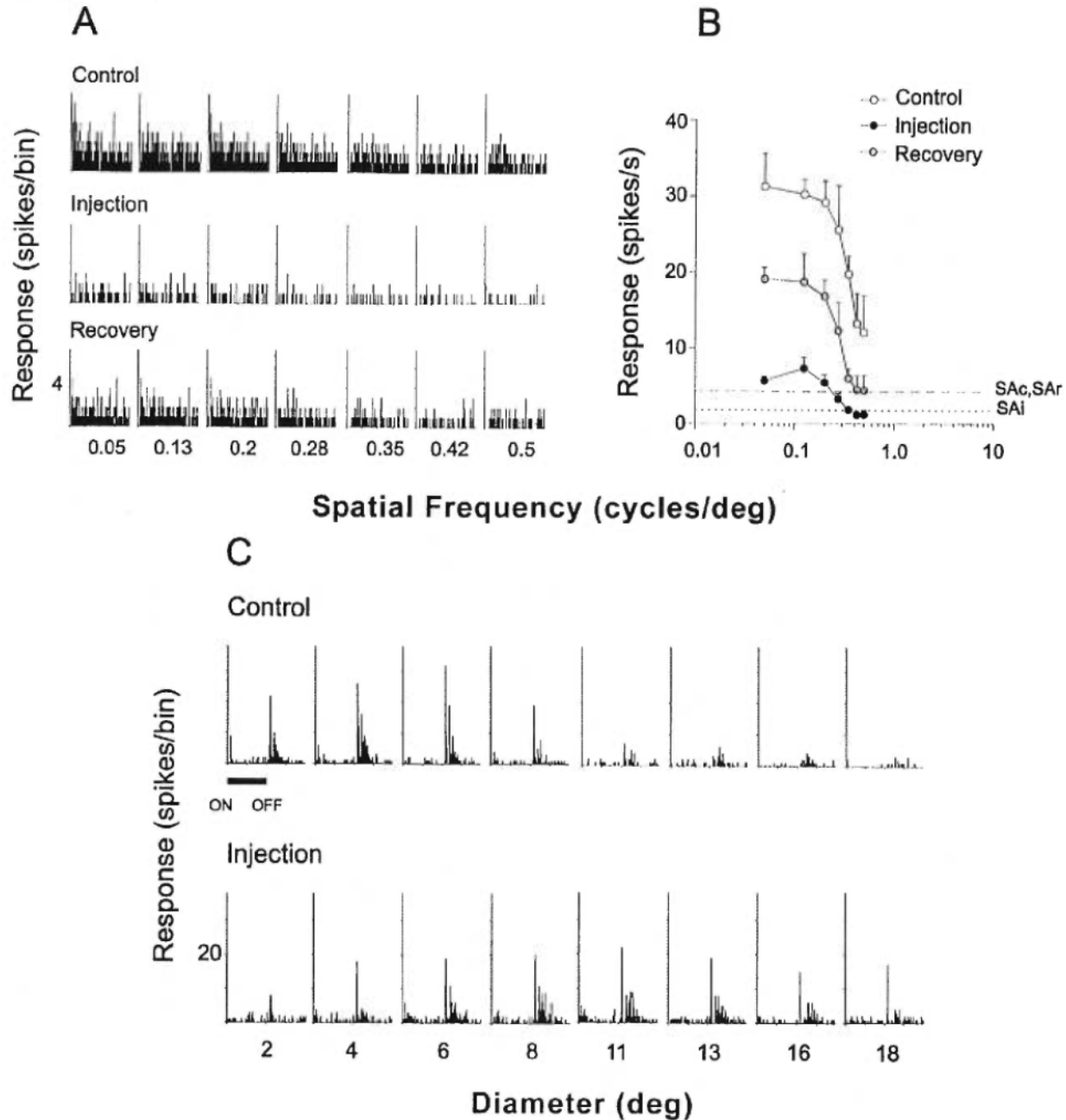
#### Lateral geniculate nucleus level

Varnished tungsten microelectrodes were used to record single-unit activity in the dLGN (0.3–20 kHz). The signals were amplified, displayed on an oscilloscope, and played through an audio monitor. Neuronal activity was also passed through a window discriminator and then fed to a computer for peristimulus time histogram (PSTH) acquisition. Manually controlled stimuli were projected on a translucent screen facing the contralateral eye of the animal onto which the position of the optic disk was plotted (Fernald and Chase 1971). Bars and circles of variable size were used to characterize the receptive field properties of the isolated unit such as the organization of the ON and OFF subregions, movement and direction selectivity. Each cell was classified as ON-, OFF-, or ON-OFF-center cells. For quantitative analysis, sinusoidal drifting gratings (presented as a full screen or in a circular window of varying diameter) were displayed on a cathode-ray tube (Tektronix 608) located 28 cm away from the animal's eye. The stimuli were generated by an image generator (Picasso, Innisfree, Cambridge, U.K.) interfaced with a Picasso controller (CED1708, CED, Cambridge, U.K.) connected to a desktop computer. Before data acquisition, a search program was used to evaluate the optimal values of grating parameters for each cell. The cell's responses at optimal direction were quantitatively studied as a function of spatial frequency (0.05 to 1 cycles/deg) and temporal frequency (0.5 to 30 Hz) and of contrast of the grating (1 to 80%). All cells we recorded were spatial frequency "low-pass" units, i.e., they did not show any attenuation of their responses at low spatial frequencies. This is a feature of almost all cells in the geniculostriate system of rabbits (Molotchnikoff et al. 1994, 1995). Flashing spots and annuli of varying diameters were also presented to study the ON and OFF responses and then determine the organization of the subregions of the receptive field and the level of antagonism between the center and the surround. A dark circular window appearing on the CRT and on which a spot of light was manually projected was used to position the receptive field at the center of the screen. The position of the receptive field was verified throughout the recording session. During each test, the activity for a blank screen with the same luminance as that of the stimuli was recorded (spontaneous discharges). Unless specified otherwise, each stimulus presentation (including the blank screen) lasted 4 s and was repeated four times. Presentations were randomly interleaved.

#### Injection protocol

The spatial tuning function of the dLGN cells and their responses to flashing spots of varying diameters were studied before and after the

1. Effect of intravenous injection of apomorphine on the spatial frequency function of a dLGN cell (low-pass type). Results are shown as (A) PSTHs and (B) corresponding tuning curve. The SE is shown for each data point. Apomorphine strongly reduced the responses at all frequencies. (C) Response of the same cell as a function of the size of a stationary flashing spot. In the control situation, the cell mainly responded to the extinction of the stimulus. Also, the discharge rate decreased as the size of the stimulus increased. After the administration of apomorphine, the cell became more responsive to large-sized stimuli. Duration of the PSTHs: 4 s. SA, spontaneous activity; c, control; r, activation; r, recovery.



tion of the agonist apomorphine (Research Biochemicals Inc., Rock, Mass.). Several controls were taken to measure the level of ability of the cell activity. A neuron was tested only if its visual onses were constant over time. The spike waveform was carefully yzed to verify that recordings were always made from the same In a first series of experiments, apomorphine diluted in NaCl (%) was injected intravenously in a range of doses (0.4–1 mg/kg) wn to reversibly reduce the ERG *b*-wave and to selectively alter metabolism in the retina (Jagadeesh and Sanchez 1981; Drumheller . 1995). However, to rule out any possible direct effect of apo-

morphine on cells in the dLGN itself or other regions of the brain, we subsequently injected the agonist intravitreously. We used concentrations (0.5–100 µg in a 100-µL volume) that yielded both a decrease of the ERG *b*-wave amplitude and a subsequent recovery of the signal that were similar to those observed following the intravenous administration of apomorphine.

Control experiments were performed to ensure that the changes in the responses were not caused by the injection per se, nor by a modification of the cells' responsiveness over time. These experiments showed that there was no change in the ERG and the discharge profile

of the geniculate cells after sham (i.e., insertion of the needle without any injection) or NaCl (0.9%) injections.

### Histology

Electrolytic lesions were made along recording tracks. At the end of each experiment, the animal was killed by an intravenous dose of pentobarbital sodium (total amount of 200–250 mg). The brain was removed from the skull and fixed in a solution of buffered formalin (10%). After 4–5 days, 60–80- $\mu$ m serial sections of the brain were cut in the coronal plane with a vibrotome. The sections were stained with cresyl violet to reveal Nissl substances to locate the position of the recording tracks in the geniculate nucleus.

### Results

A total of 14 of 20 geniculate cells were successfully tested, i.e., their responses were studied before and after apomorphine administration. Two of the remaining cells were lost either immediately after injection or before partial recovery. Four units showed too much response variability and were discarded from the present analysis.

When tested with drifting sine-wave gratings, apomorphine always reduced the visual responses of geniculate cells. This effect was observed for all cell classes encountered. A representative example is shown in Fig. 1. Figure 1A illustrates the cell response to the movement of a sine-wave grating. In the control situation, the unit responded with unmodulated discharges and did not show any attenuation of its responses at low spatial frequencies (low-pass cell). Intravenous injection of apomorphine (0.57 mg/kg) yielded a strong reduction (about 80%) of the responses evoked at all spatial frequencies (see the corresponding tuning curves in Fig. 1B). The spontaneous level was only slightly reduced (dashed lines in Fig. 1B). A partial recovery of the response could be noticed 110 min after the injection.

The reduction of visual responsiveness to drifting gratings was observed for all cells regardless of the mode of apomorphine administration. Despite the relatively small sample size, some noteworthy observations emerged. First, the degree of reduction appeared to vary as a function of concentration. For instance, at the highest dose used (100  $\mu$ g) the reduction was ~90%, while lower doses (0.5–1  $\mu$ g) yielded a decrease of the discharge rate of ~50%. Secondly, in most cases, a full or partial recovery of the visual responses was observed within 2 h. However, no recovery could be noted in two experiments in which a high dose of apomorphine was injected. Thirdly, the spontaneous activity level of the cells was generally not affected following apomorphine administration, suggesting a reduction of the signal-to-noise ratio. Finally, there was no apparent relationship between these changes and the organization of the subregions of the receptive field of the geniculate units.

The effects of apomorphine on the responses to flashing concentric stimuli were not as consistent as those observed with drifting gratings. For 8 units, the ON or OFF responses evoked by small- or large-sized stimuli were equally reduced. For this group of cells, apomorphine produced an overall decrease of the responses to either drifting gratings or flashing spots of light. However, it should be pointed out that the responses to spots were generally less affected than those to gratings. For a smaller group of cells (6), a more specific effect was observed. A representative example is shown in Fig. 1C.

The response to the grating was strongly reduced by the injection of apomorphine (see Fig. 1A). A different picture emerges if one considers the responses to flashing spots. As illustrated in the control situation, the cell responded preferentially to small spots of light ( $\leq 8^\circ$ ) at the offset of the stimulus. After the injection of apomorphine (i) the unit still responded to flashing spots despite the fact that very few discharges were evoked by the other stimulus, i.e., gratings, (ii) the response profile was dramatically changed as the cell became more responsive to large-sized flashing stimuli ( $\geq 6^\circ$ ). Additional examples are shown in Fig. 2. In both cases, apomorphine provoked a change in the cells' response profile in favor of large stimuli.

### Discussion

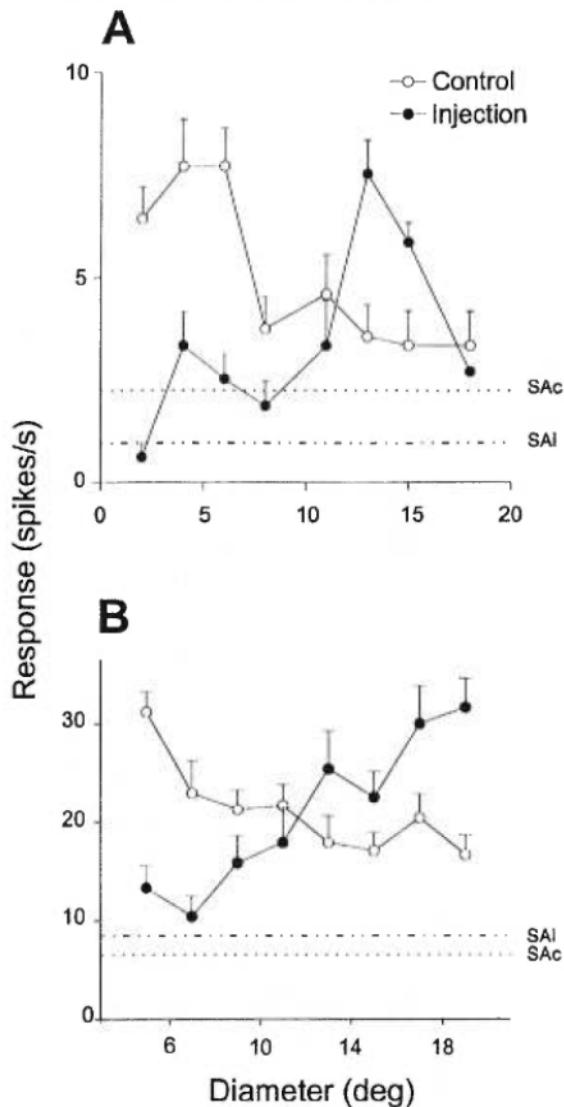
Our results indicate that apomorphine (systemic or intravitreal administration) generally reduced the responsiveness of cells in the lateral geniculate nucleus of normal pigmented rabbits. While responses to drifting gratings were more strongly affected than those to flashing spots, the profile of the discharges of a few cells evoked by stationary stimuli were significantly altered.

It is likely that the effects observed in the geniculate nucleus were mediated at the level of the retina.<sup>2</sup> In rabbit, apomorphine is known to reduce the amplitude of the ERG *b*-wave (Jagadeesh and Sanchez 1981; Drumheller et al. 1995). Moreover, a few studies showed that the visual responses of ganglion cells in cat and rabbit are strongly affected by DA or its agonist and antagonist (Thier and Alder 1984; Jensen and Daw 1984, 1986). The studies of Jensen and Daw (1984, 1986) are of particular interest as they were also done in rabbits. These authors studied, *in vitro* and *in vivo*, the effect of various dopaminergic agonists and antagonists on the responses of ganglion cells to flashing spots of light. Their findings indicate that the effects of these drugs can vary according to the receptive field properties. For instance, they reported that apomorphine decreased the spontaneous level of activity of OFF-center cells, while increasing or decreasing it for ON-center cells. Apomorphine also had little effect on the light-evoked discharges of some OFF-center cells, but reduced the surround responses of others. The overall visual responses of transient ON-center cells were always reduced. Parts of our results are concordant with these findings. In the present study, the main effect of apomorphine on dLGN cells was a decrease of visual responsiveness. Some of our data also suggest that apomorphine can modify the balance between the center and the surround of the cells' receptive field. The change appeared to be in favor of the periphery as the responses were shifted to large-sized stimuli. An interesting point in the present investigation is the fact that responses to drifting gratings (a periodic stimulus used to study the contrast sensitivity of cells or of the whole individual (see DeValois and DeValois 1990)) were

<sup>2</sup> We cannot totally rule out any direct effect of apomorphine on the dLGN when the drug was injected intravenously, since recent data from Albrecht et al. (1996) indicated that the microiontophoretic administration of dopamine reduced the cellular discharges of dLGN cells in rats. However, it is worth mentioning that, in our sample, the action of apomorphine was comparable whether it was administered in the vitreous or to the systemic circulatory system.



**g. 2.** Apomorphine modifies the response profile of some dLGN cells. For the two cells illustrated, (A) intravenous (0.45 mg/kg) and (B) intravitreal (10 µg in 100 µL) injection of apomorphine yielded reduction of the neural discharges to small stimuli. Simultaneously, there was an enhancement of the responses to large-sized stimuli. The SE is shown for each data point. c, spontaneous activity; i, inactivation.



ways decreased while the responses to flashing spots were reduced or persisted with or without a change in the cell response profile. It is worth pointing out that the grating was drifted across the cells' receptive field while the spots were stationary and flashed. Since it has been reported that DA may modulate the movement or direction sensitivity of retinal neurons (Jensen and Daw 1984), it is possible that the different effects we observed came from the fact that apomorphine affected preferentially the cells' sensitivity to moving stimuli. As a consequence, the response to grating appeared to be more affected than that evoked by the stationary spot. It would then be useful to compare the effect of apomorphine on the responses to both stimuli presented in the same mode, i.e., either drifting or moving. These experiments would be helpful in

determining which parameter (contrast or movement sensitivity) is more likely to be altered by the DA agonist. Nevertheless, our data indicate that the changes observed after apomorphine administration at the retinal levels are strongly reflected in the dLGN. Finally, it has been proposed that DA can reduce the strength of lateral inhibition at the retinal level, mainly by altering the electrical coupling between horizontal cells (Dowling 1991; Maguire and Hamasaki 1994). A consequence of this action would be a reduction of the surround antagonism of the receptive field of cells located beyond the photoreceptors (Dowling 1991). Our data showing that some dLGN cells respond only to large flashing stimuli in the presence of apomorphine are consistent with this possibility.

To our knowledge, the data presented here provide the first demonstration that visual responses of neurons beyond the retina can be altered by the systemic or intra-ocular administration of a dopaminergic agonist. The exact functional significance of these findings remains to be ascertained. However, it is noteworthy that in Parkinson's disease, where retinal DA deficiencies have been reported (Harnois and Di Paolo 1990), there is an impairment of the patient's contrast sensitivity function (Bodis-Wollner 1990; Bodis-Wollner and Tagliati 1993). It has been suggested that this defect could be the result of an alteration of retinal DA activity, putatively involving the D<sub>2</sub> receptors (Bodis-Wollner 1990; Tagliati et al. 1994). Our results are to some extent at odds with the above observations since they suggest that an increase of retinal DA activity may reduce the contrast sensitivity of cells in the dLGN. This discordance may be related to a species difference and (or) to the fact that apomorphine is a mixed D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> agonist. In this context, it would be of interest to study the effects produced by the administration of a purported specific D<sub>2</sub> agonist (e.g., *R*-norpropylapomorphine; Boumghar et al. 1994). Bearing in mind these differences, our results showing that the intra-ocular administration of apomorphine can influence central visual processing are in line with the hypothesis that associates the visual dysfunction of Parkinson's disease patients with an alteration of retinal DA function.

**Acknowledgments**

The authors are grateful to G. Picard for help during some experiments. This work was supported by the FORMOIL-OCULUS foundation and Fonds pour la formation de chercheurs et l'aide à la recherche (Quebec) (FCAR). L.B. and A.M. were, respectively, supported by a fellowship from l'Agence canadienne de développement international and FCAR.

**References**

Albrecht, D., Quaschling, U., Zippel, V., and Davidowa, H. 1996. Effect of dopamine on neurons of the lateral geniculate nucleus. An iontophoretic study. *Synapse*, **23**: 70-78.  
 Bodis-Wollner, I. 1990. The visual system in Parkinson's disease. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **67**: 297-316.  
 Bodis-Wollner, I., and Tagliati, M. 1993. The visual system in Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **60**: 390-394.  
 Boumghar, L., Belliveau, D., Jolicœur, F.B., and Casanova, C. 1994. Stimulation of retinal dopamine D<sub>2</sub> receptors affects amplitudes of the B but not A waves of the rabbit electroretinogram (ERG). *Soc. Neurosci. Abstr.* **20**: 1393.

- Dawson, D.A., Robinson, M.J., Macrea, I.M., Reid, J.L., and McCloch, J. 1992. Autoradiographic evaluation of forskolin and D1 dopamine receptor binding in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Brain Res.* **577**: 210–217.
- Deary, A. 1991. Light onset stimulates tyrosine hydroxylase activity in isolated teleost retinas. *Vis. Res.* **31**: 395–399.
- DeValois, R.L., and DeValois, K.K. 1990. *Spatial vision*. Oxford University Press, New York.
- Dick, E., and Miller, R.F. 1981. Peptides influence retinal ganglion cells. *Neurosci. Lett.* **26**: 131–135.
- Dowling, J.E. 1987. *The retina. An approachable part of the brain*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Dowling, J.E. 1990. Functional and pharmacological organization of the retina: dopamine, interplexiform cells, and neuromodulation. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* **67**: 1–18.
- Dowling, J.E. 1991. Retinal neuromodulation: the role of dopamine. *Vis. Neurosci.* **7**: 87–97.
- Dowling, J.E., and Ehinger, B.J. 1978. Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. *Comp. Neurol.* **180**: 203–220.
- Drumheller, A., Henni, H., Laffond, G., Brunette, J.R., and Jolicoeur, F. 1995. Differential effects of low versus high doses of apomorphine of retinal dopamine metabolism in light and dark adapted rabbit. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **50**: 83–90.
- Fernald, R., and Chase, R. 1971. An improved method for plotting retinal landmarks and focusing the eyes. *Vis. Res.* **11**: 95–96.
- Gardino, P.F., Dos Santos, R.M., and Hohoc, J.N. 1993. Histogenesis of topographical distribution of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cells in the developing chick retina. *Dev. Brain Res.* **72**: 226–236.
- Harnois, C., and Di Paolo, T. 1990. Decreased dopamine in the retinas of patients with Parkinson's disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**: 2473–2475.
- Jagadeesh, J.M., and Sanchez, R. 1981. Effects of apomorphine on the rabbit electroretinogram. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **21**: 620–625.
- Jensen, R.J., and Daw, N.W. 1984. Effects of dopamine antagonists on receptive fields of brisk cells and directionally selective cells in the rabbit retina. *J. Neurosci.* **4**: 2972–2985.
- Jensen, R.J., and Daw, N.W. 1986. Effects of dopamine and its agonists and antagonists on the receptive field properties of ganglion cells in the rabbit retina. *Neuroscience*, **17**: 837–855.
- Kamp, C.W. 1985. *Model for the brain*. Vol. II. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla. pp. 1–19.
- Krizaj, D., and Witkovsky, P. 1993. Effects of submicromolar concentrations dopamine on photoreceptor to horizontal cell communication. *Brain Res.* **627**: 122–128.
- Maguire, G., and Hamasaki, D.I. 1994. The retinal dopamine network alters the adaptational properties of retinal ganglion cells in the cat. *J. Neurophysiol.* **72**: 730–741.
- Mangel, S.C. 1991. Analysis of the horizontal cell contribution to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina. *J. Physiol. (London)*, **442**: 211–234.
- Molotchnikoff, S., Durand, V., and Casanova, C. 1994. Visual cortical neuron responses to drifting sine-wave gratings in rabbits. *Int. J. Neurosci.* **77**: 99–115.
- Molotchnikoff, S., Durand, V., and Lachapelle, P. 1995. Lateral geniculate neuron responses to drifting sine-wave gratings in rabbits. *Brain Res. Bull.* **37**: 283–288.
- Muresan, Z., and Besharse, J.C. 1993. D2-like dopamine receptors in amphibian retina: localization with fluorescent ligands. *J. Comp. Neurol.* **331**: 149–160.
- Piccolino, M. 1988. La vision et la dopamine. *La recherche*, **205**: 1456–1464.
- Straschill, M., and Perwein, J. 1969. The inhibition of retinal ganglion cells by catecholeamines and  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Pfluegers Arch.* **312**: 45–54.
- Tagliati, M., Bodis-Wollner, I., Kovanec, I., and Stanzione, P. 1994. Spatial frequency tuning of the monkey pattern ERG depends on D2 receptor-linked action of dopamine. *Vision Res.* **34**: 2051–2057.
- Thier, P., and Alder, V. 1984. Action of iontophoretically applied dopamine on cat retinal ganglion cells. *Brain Res.* **292**: 109–121.
- Vaney, D.I., Young, H.M., and Gynther, I.C. 1991. The rod circuit in the rabbit retina. *Vis. Neurosci.* **7**: 141–154.
- Wagner, H.J., Luo, B.G., Ariano, M.A., Sibley, D.R., and Stell, W.K. 1993. Localization of D2 dopamine receptors in vertebrate retinas with anti-peptide antibodies. *J. Comp. Neurol.* **331**: 469–481.
- Witkovsky, P., and Schütte, M. 1991. The organization of dopaminergic neurons in vertebrate retinas. *Vis. Neurosci.* **7**: 113–124.
- Yamada, M., Shigematsu, Y., Umetani, Y., and Saito, T. 1992. Dopamine decreases receptive field size of rod-driven horizontal cells in carp retina. *Vis. Res.* **32**: 1801–1807.