

Université de Montréal

Rôle des neuromodulateurs dans les fonctions visuelles :
l'angiotensine II et la dopamine

par
Gino Coudé

Département de physiologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.
en sciences neurologiques
option neuropsychologie

Décembre, 2003

© Gino Coudé, 2003



W

4

U58

2004

v. 110



Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Rôle des neuromodulateurs dans les fonctions visuelles :
l'angiotensine II et la dopamine

présenté par

Gino Coudé

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Allan M. Smith
président-rapporteur

Dr Christian Casanova
directeur de recherche

Dr Adrianna Di Polo
membre du jury

Dr Gilles Bronchti
examineur externe

Dr Stéphane Molotchnikoff
représentant du doyen de la FES

Résumé

Bien que le système visuel soit un des systèmes les plus étudiés en neurosciences, les effets des neuromodulateurs sur les fonctions visuelles sont encore peu connus. Nous avons étudié les effets de deux neuromodulateurs, l'angiotensine II (Ang II) et la dopamine (DA), sur les réponses visuelles du collicule supérieur et de la rétine. Dans une première étude, nous avons voulu vérifier la contribution respective des récepteurs de l'Ang II, AT₁ et AT₂, dans l'inhibition de l'activité visuelle du collicule supérieur chez le rat en développement. L'Ang II réduit les potentiels évoqués visuels (PEV) chez le rat adulte. Cet effet est obtenu principalement via l'activité des récepteurs AT₁, avec une contribution moindre des récepteurs AT₂, moins nombreux. Nos résultats montrent que l'action inhibitrice de l'Ang II chez les rats immatures, s'effectue principalement via les récepteurs AT₂, conformément à la plus grande densité de ce type de récepteur à cet âge. Dans une seconde étude, nous avons voulu caractériser la contribution respective des sous-types de récepteurs dopaminergiques dans le traitement de l'information visuelle dans la rétine. Sachant que l'effet de la DA sur l'activité électrique de la rétine est globalement inhibiteur, nous avons examiné l'effet respectif des récepteurs de type D₁ et D₂ sur la diminution de l'onde *b* de l'électrorétinogramme par l'injection intravitréenne d'agonistes et antagonistes de la DA. Nos résultats montrent que ce sont les agonistes

D₁ (SKF38393 et A77693) qui sont responsables d'une diminution moyenne de 62% de l'amplitude pré-injection de l'onde *b*. La DA agit donc plutôt via les récepteurs D₁ et non via les récepteurs D₂. Dans une troisième étude, nous nous sommes intéressés à l'effet de la DA rétinienne sur la sensibilité au contraste des cellules du corps genouillé latéral (CGL). Cette étude a été motivée par des recherches qui suggèrent, tant sur le plan fondamental que clinique, que la DA rétinienne joue un rôle dans l'établissement d'une sensibilité au contraste normale. Afin de vérifier si les changements de DA de la rétine peuvent influencer les réponses de neurones situés en aval de la rétine, nous avons induit la dégénérescence des cellules dopaminergiques de la rétine avec la neurotoxine 6-hydroxydopamine (6-OHDA) et mesuré les réponses visuelles des cellules du corps genouillé latéral du chat. Nos résultats montrent que la sensibilité au contraste des cellules du CGL n'est pas affectée par la perte de DA rétinienne. Les réponses des cellules du CGL sont normales même lorsque les rétines affichent une perte de métabolites de DA de plus de 75%.

Mots clés : 6-hydroxydopamine, agoniste, antagoniste, collicule supérieur, corps genouillé latéral, électrorétinogramme, enregistrements unitaire, fonction de sensibilité au contraste, immunohistologie, injection intravitréenne, microinjection, potentiels évoqués visuels, rétine, tyrosine hydroxylase

English abstract

Even though the visual system is one of the most studied systems in neurosciences, the effects of neurotransmitters on the visual functions are mostly yet to be discovered. We studied the effects of two neurotransmitters, angiotensin (Ang II) and dopamine (DA), on the visual response of the retina and the superior colliculus. In a first study, we sought to determine the contribution of the Ang II receptors, AT₁ and AT₂, in the inhibition of the visual activity in the superior colliculus in juvenile rats. It has already been established that Ang II reduces the amplitude of visual evoked potentials in adult rats. This effect is carried mainly through the activity of the AT₁ receptors; AT₂ receptors have less impact because of their reduced number in adult animals. Our results showed that in juvenile rats, the inhibiting effect of Ang II was mediated mainly through the AT₂ receptors, as their number is larger in young animals. In a second study, we wanted to characterize the contribution of each sub-type of DA receptors, D₁ and D₂, in the treatment of visual information in the retina. As it was known that DA had a globally inhibiting effect on the electrical activity of the retina, we examined the roles of D₁ and D₂ receptors on the decrease of the *b*-wave of the electroretinogram, by injecting intravitreally DA agonists and antagonists. Our results show that the D₁ agonists (SKF38393 et A77693) were responsible of the average drop of 62% of the *b*-wave. This means that DA acts primarily through D₁ receptors at the

expense of D₂ receptors. In a third study, we looked at the influence of the retinal DA on the contrast sensitivity of the lateral geniculate nucleus (CGL). Past fundamental and clinical studies had suggested the implication retinal DA in the establishment of normal contrast sensitivity. In order to verify if changes in retinal DA could affect the response of neurons downstream of the retina, we induced degeneration of retinal dopaminergic cells, using the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and measured the visual response of CGL cells of the cat. Our results show that the contrast sensitivity of those cells was not affected by the depletion of retinal DA. The cellular response of the CGL was found to be normal, even if the retinas exhibited over 75% loss of DA metabolites.

Key-words : 6-hydroxydopamine, agonist, antagonist, contrast sensitivity function, electroretinogram, immunohistology, intravitreal injection, microinjection, lateral geniculate nucleus, retina, single unit recording, superior colliculus, tyrosine hydroxylase, visually evoked potentials

Table des matières	
Résumé	iii
English abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des sigles et abréviations	xv
Remerciements	xvii
Introduction	1
Le système visuel	1
1. Champs récepteurs	1
2. Organisation fonctionnelle des structures étudiées	2
2.1. Rétine	2
2.1.3.1. La voie verticale	6
2.1.3.2. La voie latérale	15
2.1.4.1. La vision photopique	17
2.1.4.2. La vision scotopique	18
2.2. Le corps genouillé latéral	25
2.3. Le collicule supérieur	28
Neuromodulation des fonctions visuelles	29
3. La dopamine.....	29

3.1. Dopamine rétinienne.....	30
3.1.1.1. Effets dans l' OPL	33
3.1.1.2. Effets dans l'IPL.....	34
3.1.1.3. Effets de la dopamine sur l'électrorétinogramme	34
3.2. La maladie de Parkinson	36
3.2. L'angiotensine II.....	38
Buts et hypothèses	41
Méthode	43
4. Étude 1 : Les effets de l'angiotensine II sur les potentiels évoqués visuels dans le collicule supérieur du rat immature	43
4.1. Préparation animale.....	43
4.2. Enregistrements électrophysiologiques	44
4.3. Administration des agents pharmacologiques	45
4.4. Protocole expérimental et analyse des données	45
4.5. Reconstructions histologiques des sites d'enregistrements.....	47
5. Étude 2 : Les effets de l'administration intraoculaire de ligands dopaminergiques sur l'amplitude de l'onde b de l'électrorétino-gramme du lapin.....	48
5.1. Préparation animale.....	48
5.2. Enregistrements électrophysiologiques	49

5.3. Agents pharmacologiques	50
5.4. Protocole expérimental	51
6. Étude 3 : Les effets de la perte de dopamine rétinienne sur la sensibilité au contraste des neurones du corps genouillé latéral chez le chat	52
6.1. Animaux.....	52
6.2. Injection de 6-OHDA.....	52
6.3. Préparation animale pour les enregistrements	55
6.4. Électrorétinogramme	56
6.5. Enregistrements unitaires	57
6.6. Stimulation visuelle	58
6.7. Procédures de traitement des tissus rétiniens	59
6.8. Procédures de marquage immunohistochimique.....	60
6.9. Quantifications neurochimiques.....	61
6.10. Reconstructions histologiques des sites d'enregistrements...62	
Étude 1: Effects of angiotensin II on visual evoked potentials in the superior colliculus of juvenile rats.	63
Étude 2: Effects of the intraocular administration of dopamine ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram	98
Étude 3: Effects of dopamine depletion on contrast sensitivity of cells in the lateral geniculate nucleus in cats.....	127

Discussion générale	177
7. Étude 1 : Les effets de l'angiotensine II sur les potentiels évoqués visuels dans le collicule supérieur du rat immature	179
7.1. Introduction	179
7.2. Récepteurs AT ₁ et AT ₂	180
8. Étude 2 : Les effets de l'administration intraoculaire de ligands dopaminergiques sur l'amplitude de l'onde <i>b</i> de l'électrorétino-gramme du lapin.....	181
8.1. Introduction	181
8.2. Les effets des agonistes D ₁ , le SKF38393 et le A77636 ...	182
8.3. Les effets de l'antagoniste D ₁ , le SCH23390.....	184
8.4. Les effets de l'agoniste D ₂ , le NPA.....	185
8.5. Les effets de l'antagoniste D ₂ , le sulpiride	186
8.6. Conclusions	187
9. Étude 2 : Les effets de l'injection intravitréenne de 6-Hydroxydopamine sur la sensibilité au contraste des cellules du CGL du chat	188
9.1. Vérification des atteintes structurelles de la rétine et impact sur la fonction rétinienne.....	188
9.2. Réponses des cellules du CGL après privation de DA	192
9.3. Conclusions	196
Conclusions.....	197

Avenues de recherche	198
Références	200
Annexe 1: article publié	222



Liste des tableaux

Tableau de l'étude 3 : Effects of intravitreal injection of 6-Hydroxy-dopamine on contrast sensitivity of LGN cells in cat

Table 1 Results of HPLC analyses..... 176

Liste des figures

Figures de la thèse

Figure 1 Anatomie rétinienne	5
Figure 2 Type de réponses des cellules ganglionnaires.....	14
Figure 3 Différence de gaussiennes.....	22
Figure 4 Coupe du corps genouillé latéral.....	26
Figure 5 Injections et enregistrements unitaires.....	54

Figure de l'étude 1 : Effects of angiotensin II on visual evoked potentials in the superior colliculus of juvenile rats

Figure 1 Coronal section of CS	92
Figure 2 Example of effect of Ang II	93
Figure 3 Example profile of action of Ang II.....	94
Figure 4 Dose dependant effect of Ang II.....	95
Figure 5 Ang II with AT ₁ and AT ₂ antagonists	96
Figure 6 Ang II at high concentration.....	97

Figures de l'étude 2 : Effects of the intraocular administration of dopamine ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram

Figure 1 Injections of SKF38393	123
Figure 2 Injections of A77636.....	124

Figure 3 Antagonist SCH23390 et sulpiride125

Figure 4 D₂ receptor agonist NPA126

Figures de l'étude 3 : Effects of intravitreal injection of 6-Hydroxy-dopamine on contrast sensitivity of LGN cells in cat

Figure 1 Examples of fits for LGN cell168

Figure 2 6-OHDA impact on Daergic cells.....169

Figure 3 *b*-wave comparison170

Figure 4 TH-labelling, HPLC and ERG.....171

Figure 5 Spatial frequency high cut-offs for LGN cells172

Figure 6 Comparison of contrast sensitivity function (CSF).....173

Figure 7 Comparison for C₅₀174

Figure 8 Comparison for the most affected cells175

Liste des sigles et abréviations

6-OHDA	6-hydroxydopamine
AA	Acide ascorbique
AchE	Acétylcholinesth�rase
cAMP	Ad�nosine monophosphate cyclique
cdm ⁻²	Candela par m�tre carr�
CGL	Corps genouillé latéral
cpd	Cycles par degrés
CS	Collicule supérieur
DA	Dopamine
DAB	Diaminobenzidine
DOG	Difference de gaussiennes
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
EEG	�lectroenc�phalogramme
EKG	�lectrocardiogramme
EPI	�pinephrine (adrénaline)
ERG	électrorétinogramme
fERG	électrorétinogramme de type <i>flash</i>
FFT	Fast Fourier Transform
FFT1	Première harmonique de la FFT
FFT2	Seconde harmonique de la FFT

CSF	Fonction de sensibilité au contraste
GABA	acide γ -aminobutyrique (γ -aminobutyric acid)
HPLC	High pressure liquid chromatography
HVA	Acide homovanillique (homovanillic acid)
i.m.	Intra-musculaire
i.p.	Intra-péritonéal
i.v.	Intra-veineux
INL	Couche nucléaire interne (inner nuclear layer)
IPL	Couche plexiforme interne
N ₂ O	Protoxyde d'azote
NE	Norépinéphrine (noradrénaline)
O ₂	Oxygène
ONL	Couche nucléaire externe (outer nuclear layer)
OPL	Couche plexiforme externe
PBS	Saline dans un tampon phosphate
pERG	Électrorétinogramme de type <i>pattern</i>
PEV	Potentiels évoqués visuels
PSTH	Histogramme post-stimulus (post-stimulus time histogram)
s.c	Sous-cutané
SNc	Substance noire <i>pars compacta</i>
TH	Tyrosine hydroxylase

Remerciements

À mon directeur de recherche, Christian Casanova, tout d'abord pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans l'environnement exceptionnel de son laboratoire. Je veux le remercier aussi pour ses nombreux conseils, pour sa patience, pour l'idée originale du projet et aussi pour m'avoir rappelé souvent cette dernière année que je devais « m'envoler ».
Merci Christian!

À mon parrain, Maurice Ptito, pour avoir mis à ma disposition les ressources de son laboratoire de neuroanatomie, et aussi pour ses bons conseils, dont le premier fut de me suggérer de faire un doctorat au laboratoire de Christian.

Aux membres du laboratoire : Odile, pour avoir laissé planer un mystère pendant tant d'années au sujet d'une vie parallèle que j'aurais mené. Ce n'est pas le cas, mais ça m'aura rendu intéressant; Fred, pour avoir été l'homme de la situation en tant de situations; Brian, pour régler les problèmes si élégamment (Brianized ou Ouellettized?); Martin, pour sa disposition à régler les problèmes de labo devant une bière et pour comprendre le sens de l'expression « trahis par le matériel »; Manishha, thanks for not beating me anymore and also for wearing a hood sometimes; Nawal, pour l'aide en phase terminale... et pour avoir ri de

mes blagues ; Geneviève, pour l'aide fournie à tant d'égards et surtout pour les bines de café enrobées de chocolat; Barbara, pour s'occuper du labo, donc de nous!; Éliane et Daniela, pour avoir partagé leur savoir dopaminergique et sans lesquelles le labo ne serait pas le même!

À Denis Boire pour les nombreux conseils en neuroanatomie et en statistiques, mais aussi pour une très pittoresque ballade en ambulance à Philadelphie.

Aux anciens du labo : Karine, pour ses très nombreux conseils qui me sauvaient de la catastrophe plusieurs fois par jour à mes débuts au labo ; Annie-Hélène pour m'avoir permis d'être cool ; Lotfi, pour avoir en quelques sortes tracé la voie ; Alex, pour avoir ri de mes jokes et Jean-François, pour les avoir trouvé drôles sans nécessairement rire. J'aimerais remercier aussi Julie Brûlé pour son aide à des moments-clés de ce projet, mais aussi pour m'avoir fait compter parmi mon cercle d'amis la meilleure optométriste du monde... pendant l'été 2003 !

Enfin, j'aimerais remercier la Fondation E.A. Baker de l'Institut National Canadien pour les Aveugles, l'Institut de Recherche en Santé du Canada, le Groupe de Recherches en Neuropsychologie Expérimentale et Cognitive, et la Facultés des Études Supérieures pour les bourses octroyées.

Introduction

Le système visuel

La vision est probablement le sens plus étudié en neurosciences et, par conséquent, le mieux connu. L'importance et la complexité de la vision se reflètent dans l'étendue des régions du cerveau consacrées aux fonctions visuelles. Il est en effet estimé que le tiers du cortex cérébral est impliqué dans la vision. En outre, le système visuel est bien conservé sur le plan phylogénique, en particulier la rétine, dont le plan général est similaire parmi tous les vertébrés. Étant donné la complexité du système visuel, seulement quelques uns des éléments-clés seront abordés dans cette introduction.

1. Champs récepteurs

La notion de champs récepteurs est capitale en neurosciences sensorielles. Levine et Shefner (1991) définissent un champ récepteur comme «area in which stimulation leads to response of a particular sensory neuron» (p. 691). Dans le contexte de la vision, le champ récepteur serait une région du champ visuel dont la stimulation provoque la réponse d'un neurone. On doit cependant préciser cette définition : le champ récepteur est plus que la simple notion de circonscription spatiale d'une stimulation mais renferme également les caractéristiques du stimulus qui évoque la réponse optimale. Ainsi, dans le cas d'une cellule ganglionnaire de la rétine ou d'un neurone

relais du CGL, la réponse optimale peut être causée par l'apparition ou la disparition de la lumière sous la forme d'un cercle lumineux d'une taille donnée. Des attributs plus complexes concernant la forme, la couleur, le mouvement d'une stimulation visuelle peuvent aussi faire l'objet d'une préférence dans d'autres parties du système visuel. Ce type de préférences fait partie intégrante des caractéristiques du champ récepteur d'un neurone, où qu'il soit dans la hiérarchie du système visuel.

2. Organisation fonctionnelle des structures étudiées

2.1. Rétine

Première étape du système visuel, la rétine transforme les photons en signaux neuraux qui sont par la suite transmis aux aires visuelles supérieures où l'image est reconstruite, et puis interprétée. La rétine est toutefois capable de traiter plusieurs aspects de l'information visuelle, telle que la luminance, le contraste, la couleur et le mouvement (Lam, 1997). Des processus de traitement encore plus complexes sont aussi effectués par les neurones rétiniens ; la découverte récente de la capacité de la rétine à distinguer le mouvement d'une figure par rapport à celui de l'arrière-plan en est un exemple (Olveczky et al., 2003).

Les caractéristiques anatomo-physiologiques de la rétine que nous allons aborder dans cette introduction sont communes à l'ensemble des mammifères. La recherche sur la rétine a beaucoup progressé grâce

aux travaux exécutés sur des vertébrés comme le poisson ou la salamandre (Djamgoz et Wagner, 1992; Witkovsky et Schutte, 1991). Les phénomènes biophysiques qui se produisent dans la rétine sont probablement les mêmes chez tous les vertébrés. Toutefois, comme le soulignent Masland et Raviola (2000) il existe chez certains vertébrés à sang froid des différences importantes par rapport aux mammifères en ce qui a trait aux caractéristiques neuronales (Peichl et al., 1987). Il faut donc généraliser avec prudence les résultats des recherches effectuées chez différentes espèces, en particulier lorsque ces espèces sont éloignées sur le plan phylogénique. C'est pourquoi les caractéristiques anatomo-fonctionnelles de la rétine des vertébrés non-mammifères ne seront citées que lorsque les données chez les mammifères ne sont pas disponibles.

2.1.1. Couches de la rétine

Malgré quelques différences, la rétine des mammifères, et en général des vertébrés est organisée selon un plan général bien conservé entre espèces. Ce plan comprend dix couches (**Figure 1**) si l'on parcourt la rétine de l'extérieur vers l'intérieur (ou de la partie distale vers la proximale): l'épithélium pigmentaire, la couche des photorécepteurs, la membrane limitante externe, la couche nucléaire externe, la couche plexiforme externe, la couche nucléaire interne, la couche plexiforme interne, la couche des cellules ganglionnaires, la couche des fibres nerveuses et, enfin, la couche limitante interne (Rodieck, 1998).

Toujours selon ce plan général, six types de neurones forment ce qu'on appelle la rétine neurale: les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines, les cellules ganglionnaires et les cellules interplexiformes. Nous allons aborder plus loin les particularités de chacun, mais attardons-nous d'abord sur l'organisation générale de la circuiterie de la rétine.

2.1.2. Circuiterie

Sans sous-estimer la complexité de la circuiterie de la rétine, on peut, en première approximation, résumer sa structure générale de manière simple (**Figure 1**). Une composante de la circuiterie permet une transmission « verticale » (on rencontre aussi dans la littérature les termes « directe » ou « centripète ») où l'information visuelle est transmise perpendiculairement aux couches de la rétine, des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires par le biais des cellules bipolaires (Cook et Becker, 1995). Une seconde composante de la circuiterie permet une transmission « latérale » de l'information visuelle, où l'input (souvent inhibiteur) est transmis par les cellules horizontales ou les cellules amacrines. Enfin, une troisième composante de la circuiterie, dite « centrifuge » est constituée essentiellement de cellules interplexiformes qui transmettent l'information des cellules ganglionnaires vers les photorécepteurs (Marshak, 2001). Cette dernière partie est encore très mal connue.

Figure 1 : Anatomie rétinienne

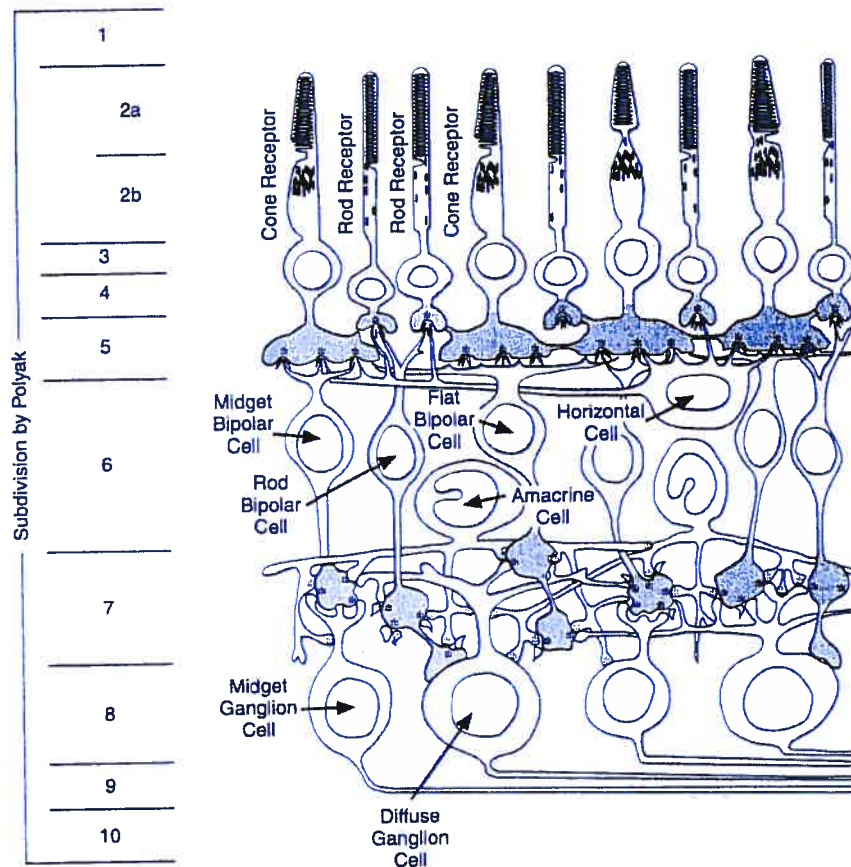


Figure 1. Représentation schématique d'une coupe de rétine de vertébré. L'organisation des couches de la rétine est la suivante : 1- épithélium pigmentaire rétinien (non-illustré). 2a- segment externe des photorécepteurs. 2b- segment interne des photorécepteurs. 3- membrane limitante externe. 4- couche nucléaire externe. 5- couche plexiforme externe. 6- couche nucléaire interne. 7- couche plexiforme interne. 8- couche des cellules ganglionnaires. 9- couche des fibres nerveuses. 10- membrane limitante interne. Tirée de Schwartz (1999).

La plupart des rétines de mammifères ont une région spécialisée où la densité des cellules et la résolution spatiale sont plus grandes (Wassle et Boycott, 1991). C'est la fovéa chez les primates, l'aire centrale chez le chat et la strie visuelle chez le lapin.

2.1.3. Types de cellules nerveuses

La majorité des données résumées ici sont tirées des ouvrages généraux et articles de revue suivants : (Feldman, et al., 1996 ; Rodieck, 1998 ; Masland et Raviola, 2000 ; Masland, 2001) Les ouvrages plus spécifiques sont, quant à eux, cités dans le texte.

Il y a dans la rétine six types de neurones responsables de la transmission de l'information visuelle. Afin d'accompagner la description des types neuronaux d'un aperçu fonctionnel, les différents types de cellules de la rétine seront décrits à l'intérieur des trois « voies » générales de transmission de l'information décrites plus haut : la voie verticale, la voie latérale et la voie centrifuge.

2.1.3.1. La voie verticale

C'est la voie par laquelle le signal neural prolonge, en quelque sorte, la lumière incidente à travers la rétine, des photorécepteurs à la couche des fibres nerveuses (Cook et Becker, 1995). Dans cette voie, il y a d'abord les neurones de premier ordre, les **photorécepteurs**. Ils sont de deux types : cônes pour la vision photopique (forte luminance) et

bâtonnets pour la vision scotopique (faible luminance). Les deux types comprennent des segments externe et interne situés dans la couche dite des photorécepteurs, un corps cellulaire situé dans la couche nucléaire externe et une partie synaptique située dans la couche plexiforme externe. La partie synaptique affiche une morphologie très stéréotypée, différente pour les bâtonnets et pour les cônes où elle se nomme respectivement « sphérule » et « pédicule ». Dans les deux cas ce sont les cellules bipolaires et horizontales qui sont contactées via des synapses glutamatergiques. Notons aussi que les sphérules des bâtonnets contactent les pédicules des cônes par les synapses électriques (Nelson et Kolb, 1983).

Comme les photorécepteurs sont situés en première ligne, ils sont responsables du seul phénomène physiologique lié au flux photonique à survenir dans le système visuel : la transduction de l'énergie photonique en potentiel électrique.

Les grandes lignes de la cascade biochimique sous-jacente à la phototransduction sont les suivantes. Il y a d'abord la photoactivation. Le segment externe des photorécepteurs est composé de disques dans lesquels on retrouve un photopigment appelé rhodopsine. La rhodopsine est composée d'une protéine, l'opsine et d'un chromophore qui lui est ancré, le 11-*cis* rétinol. Deux formes isomériques de ce chromophore, sont particulièrement importantes pour le phénomène de

phototransduction, soit la forme inactivée 11-*cis* rétinol et la forme activée tout-*trans* rétinol. Lorsqu'un photon atteint le segment externe d'un photorécepteur, il est absorbé par la rhodopsine et provoque la transformation du chromophore 11-*cis* rétinol en tout-*trans* rétinol par photoisomérisation. Cette transformation du chromophore conduit la rhodopsine à changer de conformation et à prendre à son tour une forme activée, la rhodopsine*.

Mentionnons que l'ouverture des canaux sodiques des photorécepteurs dépend d'une molécule, la guanosine monophosphate 3'5' cyclique (GMPc). La GMPc se lie à des sites spécialisés des canaux sodiques. Ces sites sont situés du côté de la surface interne de la membrane cellulaire et lorsqu'ils sont activés, ils maintiennent les canaux sodiques ouverts. La GMPc n'est pas attachée solidement aux sites de liaison des canaux et, en conséquence, elle s'attache et se détache continuellement. Le taux de liaison de la GMPc est évidemment proportionnel à sa concentration dans le cytoplasme. Une diminution de concentration entraîne une diminution du nombre de molécules liées aux canaux et donc, en conséquence, une diminution du nombre de canaux ouverts.

La rhodopsine* activée par la photoisomérisation, dont nous parlons plus haut, possède la capacité d'activer une protéine G (la transducine) qui peut se lier à la guanosine triphosphate (GTP). Avec cette liaison

de la rhodopsine* à la protéine G, cette dernière ne peut plus se lier à la GTP, et la remplacera par la guanosine diphosphate (GDP). La GDP remplacera la GTP sur un certain nombre de protéines G, qui elles, iront ensuite activer à leur tour la phosphodiesterase (PDE). La PDE ira hydrolyser un grand nombre de molécules de GMPc en GMP, diminuant ainsi la concentration intracellulaire de GMPc de manière à provoquer la fermeture des canaux sodiques.

Dans l'obscurité, la concentration d'ions Na^+ et Ca^{2+} dans le segment externe des photorécepteurs est inférieure à celle du milieu extracellulaire, l'intérieur de ces cellules est donc chargé négativement par rapport à l'extérieur. Les ions Na^+ et Ca^{2+} du milieu extracellulaire pénètrent dans le segment externe par le biais des canaux sodiques, mais cet afflux est compensé par une sortie d'ion K^+ par les canaux potassiques du segment interne. Avec la fermeture des canaux sodiques se produit une hyperpolarisation et une diminution de la libération de glutamate (Rodieck, 1998).

Les bâtonnets dominent en nombre les cônes, par un ratio de 120 à 1 chez l'humain (Rodieck, 1998), et de 20 à 1 en moyenne chez les mammifères (Masland, 2001). Ils sont pourtant absents de la fovéa chez l'humain et le primate, par contre ils dominent l'aire centrale du chat – un carnivore nocturne - par un ratio de 10 à 1 (Sterling, 1983). Les cônes sont responsables de la vision photopique et sont sensibles

à des longueurs d'ondes particulières qui permettent la vision des couleurs. Les bâtonnets ont quant à eux une sensibilité à la lumière plus grande que celles des cônes, mais ont, en contrepartie une sensibilité temporelle moindre.

Toujours en suivant la voie verticale, les neurones qui sont post-synaptiques aux photorécepteurs sont les **cellules bipolaires**. Elles sont de quatre types : bipolaires des cônes à centre « ON », bipolaires des cônes à centre « OFF », bipolaires des bâtonnets à centre « ON » et, un type beaucoup moins connu, les bipolaires à large champ, qui sont probablement aussi de type « ON ». À l'exception de ce dernier type dont les synapses se co-stratifient avec les dendrites des cellules dopaminergiques, les cellules bipolaires transmettent l'activation des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires.

Les cellules bipolaires des cônes peuvent donc être de type « ON » si leur réponse à la lumière est dépolarisante, ou « OFF » si cette réponse est hyperpolarisante. Les cellules bipolaires des bâtonnets, par contre, ne sont que d'un seul type, « ON » et elles se dépolarisent à la lumière (Dacheux et Raviola, 1986; Wassle et Boycott, 1991). Voyons d'où proviennent les réponses « ON » et « OFF » des cellules bipolaires. Le messager chimique libéré par les photorécepteurs est le glutamate, les différentes réponses « ON » et « OFF » des cellules bipolaires ont donc nécessairement une origine post-synaptique. Cette différence majeure

entre les réponses de type « ON » et « OFF » provient du type, ionotropique ou métabotropique, du récepteur au glutamate présent sur la cellule bipolaire. L'activation du premier entraîne une hyperpolarisation alors que celle du second cause une dépolarisation.

Prenons le cas d'une cellule bipolaire de type « OFF » dont le champ récepteur est frappé par la lumière, la diminution de la libération de glutamate du photorécepteur induite par la lumière, cause une baisse de l'activation des récepteurs post-synaptiques NMDA (ionotropiques) de la cellule bipolaire et cette dernière s'hyperpolarise. Dans le cas d'une cellule bipolaire de type « ON » dont le champ récepteur est illuminé, la réponse dépolarisante, quant à elle, est due à la présence de récepteurs métabotropiques dont l'inactivation, due à la diminution de glutamate libéré, amorce une cascade biochimique dont l'aboutissement est l'ouverture des canaux sodiques et la dépolarisation de la cellule. Les synapses des cellules bipolaires « ON » et « OFF » aboutissent dans des strates différentes de la couche interplexiforme interne, soit la sous-couche *a* pour les bipolaires « OFF » et la sous-couche *b* pour les bipolaires « ON », où elles vont rejoindre respectivement leur vis-à-vis ganglionnaires de même polarité. Chez la plupart des mammifères, il y a deux fois plus de cellules bipolaires des cônes que de cellules bipolaires des bâtonnets (Masland et Raviola, 2000).

La dernière étape de la voie verticale mène aux **cellules ganglionnaires** dont les axones sont la porte de sortie de la rétine vers le cerveau. Il existe une grande variété de cellules ganglionnaires quant à leur profil de réponse à la lumière et à leur morphologie. Entre 10 et 15 types sont identifiés selon des critères anatomiques et fonctionnels (Isayama et al., 2000; Masland, 2001). Nous l'avons mentionné, les canaux « ON » et « OFF » initiés par les cellules bipolaires sont maintenus dans les cellules ganglionnaires. Les cellules ganglionnaires à centre « ON » reçoivent des inputs des cellules bipolaires « ON » alors que les cellules ganglionnaires à centre « OFF » reçoivent des inputs des cellules bipolaires « OFF ».

Parmi les cellules ganglionnaires, les deux types les mieux connus sont les cellules nommées X et Y chez le chat et qui correspondent respectivement aux cellules P et M chez le primate (Troy et Shou, 2002). Ces deux catégories de cellules peuvent être de type centre « ON » ou centre « OFF » et leurs propriétés ont été étudiées par Enroth-Cugell et Robson (1966). Les cellules X et Y ont donc toutes deux des champs récepteurs concentriques, mais elles diffèrent en ce qui concerne les propriétés de la partie centrale de leur champ récepteur. Dans le cas des cellules X, le centre du champ récepteur est petit et effectue une somme linéaire des signaux qui le stimulent. Pour ce qui est des cellules Y, le centre du champ récepteur est plus

grand et effectue une sommation non-linéaire des signaux visuels (voir **Figure 2**).

D'autres études ont caractérisé le type de stimuli que préfèrent les cellules X et Y (Enroth-Cugell et Robson, 1966), les premières préfèrent les stimuli à fréquences spatiales et temporelles faibles, alors que les secondes préfèrent les grandes fréquences spatiales et temporelles. Les réponses des cellules X sont également plutôt toniques, tandis que les cellules Y présentent une réponse plus phasique. Il est à noter que les cellules-relais du CGL qui reçoivent l'input synaptique des cellules X et Y de la rétine ont le même profil de réponse que ces dernières (champs récepteurs concentriques, « ON » ou « OFF », sommation linéaire ou non, etc.) (Hoffmann et al., 1972; Bullier et Norton, 1979).

Il existe également sept autres types de cellules ganglionnaires habituellement regroupés sous le nom de cellules W (Dreher et Robinson, 1991). Leurs caractéristiques sont très variées ; certaines ont un profil de champ récepteur concentriques avec un centre ON » ou « OFF » et un profil de réponse phasique ou tonique à la manière des cellules X et Y (Enroth-Cugell et al., 1983) et codent la couleur (Wienrich et Zrenner, 1984). D'autres ont un champ récepteur sans profil concentrique, mais sont sélectives à la direction d'un mouvement (Oyster et Barlow, 1967; He et Masland, 1998).

Figure 2 : Type de réponses des cellules ganglionnaires

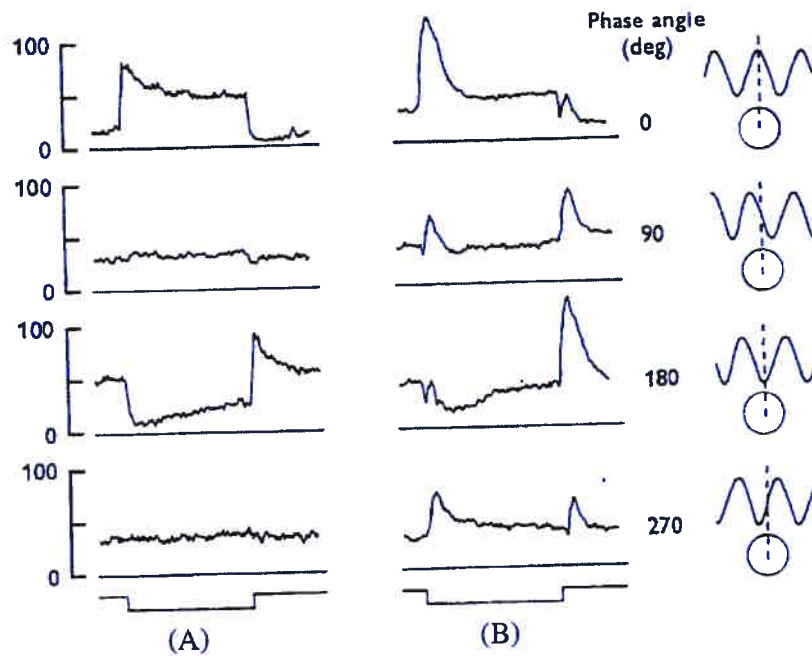


Figure 2. Les cellules de type X additionnent linéairement la lumière qui stimule leur champ récepteur, alors que ce n'est pas le cas des cellules de type Y. **A.** La réponse d'une cellule de type X à centre « OFF » à la l'apparition et au retrait d'un réseau sinusoïdal présenté à quatre phases différentes par rapport au diamètre du champ récepteur central (à droite). Pour une cellule de type X, il est possible de trouver deux phases (90° et 270°), pour lesquelles aucune réponses sera évoquée. Ceci correspond à ce qui est attendu d'un champ récepteur qui additionne linéairement la lumière ; pour ces deux phases, la somme de la lumière sur le centre du champ récepteur est égal à la lumière moyenne. **B.** Exemple de réponses pour une cellule de type Y à centre « OFF ». Il n'y a pas de phase nulle pour une cellule de type Y. Tirée de Enroth-Cugell et Robson (1966).

Il est estimé que la population de cellules ganglionnaires est constituée de 35-55% de cellules X, de 3 - 5 % cellules Y et de 45-60% de cellules W (Dreher et Robinson, 1991; Troy et Shou, 2002). Enfin, un dernier groupe de cellules ganglionnaires à été découvert récemment : ce sont des cellules ganglionnaires intrinsèquement photoréceptrices (Berson et al., 2002). Il s'agit d'une très faible proportion de cellules ganglionnaires (environ 2%) qui expriment le photopigment de la mélanopsine dans leurs dendrites. Ces cellules comptent par ailleurs pour 80% des cellules ganglionnaires qui projettent au noyau hypothalamique suprachiasmatique, ce qui suggère que ce sous-groupe de cellules est impliqué dans la régulation photonique du rythme circadien (Morin et al., 2003). Elle reçoivent un input des cellules bipolaires et ganglionnaires, ce qui suggère que les cônes et bâtonnets peuvent influencer leurs réponses (Belenky et al., 2003).

2.1.3.2. La voie latérale

La circuiterie responsable de la transmission latérale se compose des **cellules horizontales** et des **cellules amacrines**. L'arborescence, tant dendritique que synaptique des premières s'étend latéralement dans la couche plexiforme externe, alors que les secondes ramifient leurs prolongements principalement dans la couche plexiforme interne.

Tous les photorécepteurs, cônes et bâtonnets, reçoivent une rétroaction des **cellules horizontales** (McMahon et al., 2001). Les cellules

horizontales sont des éléments post-synaptiques de la première « synapse visuelle » comme les cellules bipolaires. Elles reçoivent un input glutamatergique des photorécepteurs et leur fournissent en retour une rétroaction négative GABAergique, en particulier sur les photorécepteurs voisins. Ce processus appelé « inhibition latérale » est capital pour engendrer la sensibilité au contraste : l'inhibition de la périphérie des champs récepteurs des cellules bipolaires permet la détection du contraste entre le centre et la périphérie (Cohen et Bodis-Wollner, 1990). Ce mécanisme augmente le contraste entre les régions sombres et claires adjacentes.

Les cellules horizontales sont peu nombreuses ; il y a dix fois plus de cellules amacrines et de cellules bipolaires qu'il n'y a de cellules horizontales (Masland et Raviola, 2000), mais les ramifications de ces dernières sont cependant très étendues. Elles ont en plus la capacité de former un syncytium avec les autres cellules horizontales au moyen de synapses électriques. Ce syncytium de plusieurs cellules à travers lequel le signal visuel peut circuler augmente l'étendue des champs récepteurs de ces cellules qui peut devenir de 10 à 100 fois plus grand que leur diamètre dendritique individuel (Bloomfield et al., 1995). Ce champ récepteur élargi contribue à étendre la portée de l'inhibition latérale et donc de la réponse antagoniste de la périphérie des cellules bipolaires et ganglionnaires (Xin et Bloomfield, 2000).

Ainsi, par l'inhibition latérale et la modulation directe, les cellules horizontales influencent la force des réponses, les propriétés spatiales et l'opposition des couleurs des signaux visuels des cellules bipolaires et des neurones subséquents de la rétine interne.

En ce qui concerne les **cellules amacrines**, il y en a au moins 29 types (Masland, 2001), et ce nombre peut aller jusqu'à 60 selon certaines estimations (MacNeil et al., 1999). Certaines cellules amacrines ont des synapses inhibitrices avec les cellules bipolaires et contrôlent ainsi l'impact qu'ont ces dernières sur les cellules ganglionnaires, elles peuvent donc modifier le profil de réponse des cellules ganglionnaires. Mentionnons également que des cellules amacrines, notamment celles qui sont dopaminergiques et dont nous reparlerons plus loin, modulent aussi les réponses d'autres cellules amacrines. On constate qu'à la différence des cellules horizontales, les cellules amacrines n'ont pas un rôle général unique, mais sont impliquées dans une circuiterie complexe et encore méconnue qui, ultimement, module les réponses des cellules ganglionnaires et donc le signal visuel de sortie de la rétine (Masland, 2001).

2.1.4. Anatomie fonctionnelle de la rétine

2.1.4.1. La vision photopique

La circuiterie de la vision photopique est simple. Les cônes font synapses avec deux types de cellules bipolaires : les cellules bipolaires

dépolarisantes (« ON ») et les cellules bipolaires hyperpolarisantes (« OFF »). Les cellules bipolaires dépolarisantes sont activées par le début du stimulus lumineux et font synapse avec les cellules ganglionnaires à centre « ON » (et qui ont une périphérie « OFF »). Les cellules bipolaires hyperpolarisantes (« OFF ») répondent, pour leur part, à la disparition du stimulus lumineux, et font synapses avec les cellules ganglionnaires à centre « OFF » (et qui ont une périphérie « ON »). La présence de tels champs récepteurs possédant un antagonisme centre-périphérie parmi les cellules bipolaires et ganglionnaires permet de transmettre le contraste. Comme décrit plus haut, la modulation de ce contraste s'effectue en partie par les cellules horizontales (Kolb, 1994).

2.1.4.2. La vision scotopique

Nous l'avons mentionné, il n'existe pas de cellules bipolaires « OFF » des bâtonnets. En conséquence, la circuiterie des bâtonnets est plus complexe et emprunte celle des cellules bipolaires « OFF » des cônes pour produire une réponse au contraste (Dacheux et Raviola, 1986; Wässle et Boycott, 1991). Il existe trois circuiteries différentes pour engendrer une réponse « OFF » en vision scotopique (Sharpe et Stockman, 1999). Chacune d'elle sera recrutée tour à tour selon les conditions lumineuses, soit, de la totale obscurité du fond (conditions scotopiques absolues), à la pénombre (conditions mésopiques).

La voie la plus sensible à la lumière est la suivante : les bâtonnets font synapse avec les cellules bipolaires (les cellules bipolaires des bâtonnets ne sont que d'un seul type : « ON ») qui dépolarisent à la lumière. Ces cellules bipolaires vont rarement contacter directement les dendrites des cellules ganglionnaires (Dacheux et Raviola, 1986), elles vont plutôt contacter les cellules amacrines (All) par des synapses glutamatergiques et des récepteurs post-synaptiques métabotropiques. Le signal des cellules All (qui elles se dépolarisent à la lumière) (Dacheux et Raviola, 1986) utilise ensuite la circuiterie des cônes (Strettoi et al., 1994) pour rejoindre les canaux « ON » et « OFF ». Pour ce faire, les cellules All inhibent les cellules bipolaires « OFF » (des cônes) par le biais de synapses glycinergiques et ensuite excitent les bipolaires « ON » par des synapses électriques (excitatrices). Une séparation des voies « ON » et « OFF » est obtenue et les cellules bipolaires « ON » et « OFF » excitent leur contrepartie ganglionnaire de même type. Une autre voie concerne le recrutement de la circuiterie des cônes par les bâtonnets dès la couche plexiforme externe. Des synapses électriques entre les sphérules des bâtonnets et les pédicules des cônes permettent aux bâtonnets d'utiliser les voies « ON » et « OFF » des cônes sans passer par les cellules bipolaires des bâtonnets (Sterling, 1995). Une troisième voie décrite par Hack et al. (1999) chez les rongeurs consisterait en des connexions synaptiques entre les bâtonnets et les cellules bipolaires « OFF » des cônes via des récepteurs ionotropiques du glutamate de type AMPA.

Les voies trois scotopiques qu'on vient de décrire empruntent donc la circuiterie des cônes.

2.1.5. La fonction de sensibilité au contraste

Les cellules ganglionnaires et les cellules-relais du CGL ont des champs récepteurs à deux zones concentriques antagonistes : centre « ON » et périphérie « OFF » ou centre « OFF » et périphérie « ON ». Kuffler (1953) a été le premier à décrire cet antagonisme centre-périphérie des champs récepteurs des cellules ganglionnaires. Le profil particulier de ce type de champ récepteur peut être représenté par le modèle de la différence de deux distributions gaussiennes, dont l'équation est la suivante :

$$S(\nu) = \left(K_c \pi r_c \exp\left(-\left(\pi r_c \nu\right)^2\right) \right) - \left(K_s \pi r_s \exp\left(-\left(\pi r_s \nu\right)^2\right) \right)$$

où S est la sensibilité au contraste à une fréquence spatiale ν , K_c et K_s sont les sensibilités maximales pour le centre et pour la périphérie, et ou r_c et r_s sont les rayons du centre et de la périphérie, dont les limites sont définies par les points où la sensibilité maximale a diminué à $1/e$ de la valeur maximale (voir **Figure. 3**). Ce modèle représente efficacement la structure d'un champ récepteur tout en demeurant fort simple : seulement deux paramètres définissent les régions centrales et périphériques, leur rayon et leur sensibilité. La zone centrale est plus petite que la zone périphérique mais sa stimulation évoque une

réponse beaucoup plus forte. La réponse de la périphérie est soustraite à celle du centre car les régions sont antagonistes. Cette différence de gaussiennes décrit le profil de réponse d'un champ

Figure 3. Différence de gaussiennes

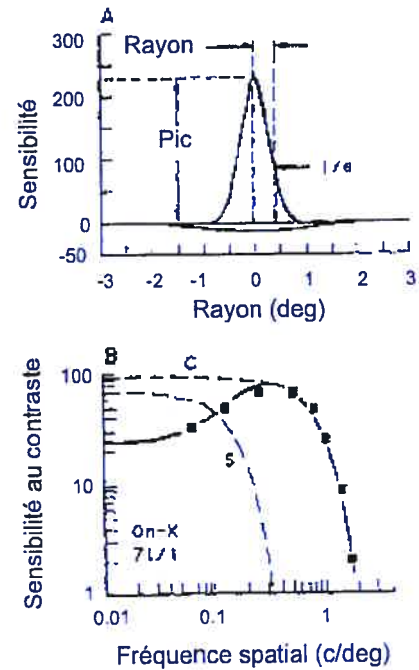


Figure 3 Exemple de distribution de la sensibilité gaussienne pour le centre et la périphérie d'une cellule ganglionnaire « ON » de type X de la rétine du chat. A. Illustration des paramètres de l'équation 1. B. Exemple du meilleur ajustement (*best fitting*) d'une réponse de cellule à l'équation 1. Adapté de Linsenmeier et al., (1982).

récepteur de type centre-périphérie comme ceux des cellules ganglionnaires de la rétine (Enroth-Cugell et Robson, 1966) ou du CGL (So et Shapley, 1979).

L'utilisation de réseaux sinusoïdaux à différents niveaux de contraste, de fréquences spatiales ou temporelles est une façon très efficace de stimuler le système visuel (Enroth-Cugell et Robson, 1966). Les réseaux sinusoïdaux sont également les stimuli les plus utilisés et ce sont ceux que nous allons donner en exemple pour expliquer le profil des champs récepteurs des cellules ganglionnaires et du CGL. L'interaction entre les deux gaussiennes de la **Figure 3 (haut)** représente une approximation adéquate des réponses des cellules ganglionnaires de la rétine ou relais du CGL lorsqu'elles sont stimulées par un réseau sinusoïdal (qu'il soit en mouvement ou statique avec inversion de phase). Cette relation peut être modélisée par la fonction de sensibilité au contraste (CSF, **Figure 3 bas**) (Enroth-Cugell et Robson, 1966; Linsenmeier et al., 1982):

La CSF mesure le contraste minimal - le seuil de contraste - qui évoque la réponse d'un neurone ou encore qui est détecté par un sujet. La fonction de sensibilité au contraste (la réciproque du seuil de contraste) est mesurée en fonction de la fréquence spatiale (en cycles par degrés) d'un réseau sinusoïdal.

2.1.5. Mesure de l'activité globale de la rétine, l'ERG

L'électrorétinogramme (ERG) est une sommation des potentiels électriques produits par une population de neurones de la rétine. Ce signal est habituellement enregistré à la surface de la cornée, lorsque la rétine est stimulée par un éclair lumineux (fERG). Le tracé d'ERG chez l'humain, le primate, le chat ou le lapin est habituellement composé d'une onde négative appelée onde *a*, suivie d'une onde positive appelée onde *b*. L'onde *a* est produite par l'hyperpolarisation des photorécepteurs (Miller et Dowling, 1970). L'onde *b*, plus proéminente, a une origine encore mal connue. Elle serait en partie le reflet directe de la dépolarisation des cellules bipolaires « ON » (Xu et Karwoski, 1994), mais aussi des courants engendrés par les cellules de Müller, à la suite des changements dans la concentration potassique dans l'espace extracellulaire, induits par les cellules bipolaires (Stockton et Slaughter, 1989). La dépolarisation des cellules bipolaires, à la suite d'une stimulation, augmenterait la concentration des ions K^+ dans l'espace extracellulaire se situant entre les cellules de Müller et les cellules bipolaires. Ce courant électrique dépolariserait les cellules de Müller pour produire l'onde *b* (Newman et Odette, 1984; Dong et Hare, 2000). De plus en plus de données montrent que les cellules de troisième ordre, amacrines et ganglionnaires, contribuent à l'onde *b* par un processus indépendant des cellules de Müller (Dong et Hare, 2000; Dong et Hare, 2002; Awatramani et al., 2001). L'onde *b* serait le

produit des contributions (parfois opposées) des cellules bipolaires, de Müller, amacrines et ganglionnaires.

2.2. Le corps genouillé latéral

Le CGL était autrefois vu comme un simple relais entre les cellules ganglionnaires de la rétine et le cortex cérébral. Les connaissances au sujet de cette structure ont beaucoup évolué et le CGL se voit maintenant concéder un rôle majeur dans la régulation du flot de l'information entre la rétine et le cortex visuel primaire (Sillito, 1997).

2.2.1. Organisation, afférences et projections

Le CGL du chat est une structure laminaire constituée de couches granulaires cellulaires distinctes séparées par des espaces contenant peu de corps cellulaires neuronaux (voir **Figure 4**) (Kaas et al., 1972; Dreher et Robinson, 1991). La couche la plus dorsale du CGL, la couche A, reçoit son input rétinien excitateur de l'œil controlatéral. La seconde couche, située plus ventralement par rapport à la couche A, est la couche A1. Cette dernière est excitée par l'input de l'œil ipsilatéral. La couche la plus ventrale est la couche C. En fait, il s'agit d'un complexe de trois couches, où la plus dorsale, C1, est tributaire de l'input rétinien controlatéral, C2, de l'input ipsilatéral ; et enfin, C3, ne reçoit pas d'input rétinien. Il est estimé que 40% des cellules ganglionnaires innervent les couches A et A1 et 20% innervent le complexe de la couche C (Leventhal et al., 1985).

Figure 4. Coupe coronale du corps genouillé latéral

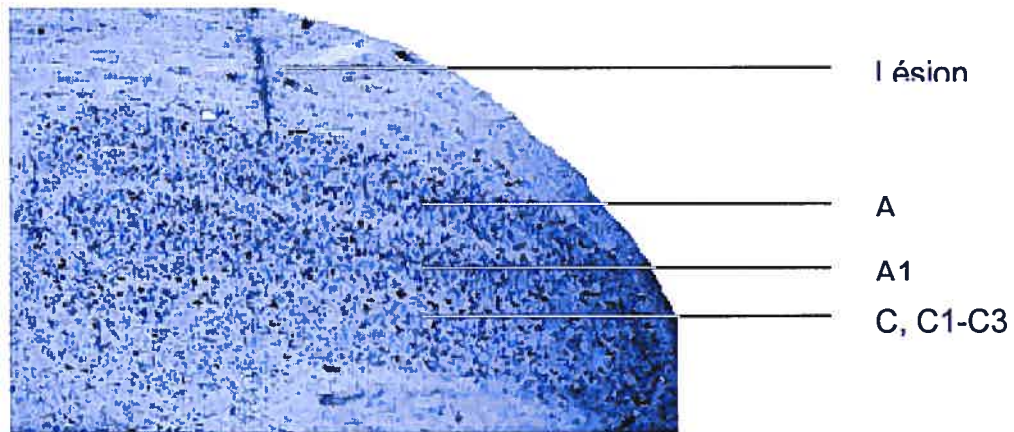


Figure 4. Vue d'une coupe coronale d'un corps genouillé latéral du chat montrant la distribution des corps cellulaires marqués par une coloration de Nissl. La partie latérale est à gauche. Les couches A, A1 et C sont séparées par des zones interlaminaires ayant relativement peu de cellules. La lésion a été causée par le passage d'une microélectrode d'enregistrement.

Le CGL est la cible principale des cellules ganglionnaires de la rétine, mais cette dernière n'est pas responsable de la plus grande partie des afférences du CGL (Sillito, 1997). C'est le cortex visuel primaire qui constitue la majorité (60%) des connexions excitatrices du CGL. Si on ajoute ces projections à celles en provenance de la formation réticulée du tronc cérébral et du noyau périgéniculé, on obtient un total de 80-90% des cellules dont les inputs synaptiques ne provient pas de la rétine (Sherman et Koch, 1986). En ce qui à trait aux projections du CGL, elles se dirigent principalement vers la couche IV du cortex visuel primaire (Sillito, 1997).

2.2.2. Propriétés des cellules du CGL

Nous l'avons laissé entendre, les cellules-relais du CGL ont des propriétés qui ressemblent à celles des cellules ganglionnaires de la rétine. Les cellules de type X correspondent aux cellules ganglionnaires X. Comme pour ces dernières, les champs récepteurs de ces cellules ont une petite zone centrale et répondent peu aux stimuli rapides. Ces cellules affichent une sommation spatiale linéaire des signaux visuels présents dans leurs champs récepteurs et affichent une réponse plutôt tonique aux stimuli. Les cellules de type Y correspondent aux cellules ganglionnaires Y. Leurs champs récepteurs ont une grande zone centrale et répondent bien aux stimuli rapides. Ces cellules affichent une sommation spatiale non-linéaire des signaux visuels présents dans leur champ récepteur. Le profil de réponse de

ces cellules est également plutôt phasique. Quant aux cellules W, comme les cellules ganglionnaire de type W, elles sont beaucoup plus hétérogènes que les cellules X ou Y.

Il y a toutefois quelques différences entre les propriétés des cellules ganglionnaires et des cellules-relais du CGL. Les cellules du CGL affichent un taux d'activité spontanée plus bas que leurs contreparties ganglionnaires et ont une moins forte réponse au contraste (Troy et Shou, 2002).

2.3. Le collicule supérieur

Le CS est une structure mesencéphalique divisée en sept couches parallèles à la surface tectale (Huerta et Harting, 1984). Les trois premières couches, dites couches superficielles, sont la *stratum zonale*, la *stratum griseum superficiale* et la *stratum opticum*. Ces couches superficielles sont strictement visuelles et elles reçoivent des afférences de la rétine et du cortex visuel. Les couches profondes, c'est-à-dire la *stratum griseum intermediale*, la *stratum album intermediale*, la *stratum griseum profundum* et la *stratum album profundum*, reçoivent des inputs de plusieurs aires sensorielles corticales et sous-corticales (visuelles, auditives et sensori-motrices) de même que des couches superficielles (Binns, 1999). Les diverses afférences sensorielles, sont connectées à travers les sept couches du CS, et il n'est pas étonnant que le CS soit considéré comme jouant un rôle important dans

l'intégration sensori-motrice, notamment des mouvements oculaires, des mouvements de la tête, de l'attention visuelle et de l'activité locomotrice (Meredith et Stein, 1983; Rhoades et al., 1991; Sprague, 1991).

Neuromodulation des fonctions visuelles

3. La dopamine

La dopamine (DA) est un neurotransmetteur faisant partie de la famille des catécholamines qui comprend entre autres la norépinéphrine et l'épinéphrine. Les récepteurs des catécholamines appartiennent tous à la superfamille des récepteurs métabotropiques - couplés à la protéine G. Il y a deux classes de récepteurs dopaminergiques, D₁ et D₂, qui se caractérisent par des propriétés de liaison différentes. Les récepteurs de classe D₁ augmentent l'activité de l'adénylate cyclase pour permettre l'accumulation d'AMPc alors que les récepteurs de classe D₂ inhibent son activité. La classe D₁ comprend les récepteurs D_{1A}, D_{1B}/D₅, D_{1C} et D_{1D} alors que la classe D₂ est composée des récepteurs D₂, D₃ et D₄. Il s'agit d'une différence fonctionnelle majeure qui nous suggère que l'effet global de la dopamine sur un neurone va dépendre du profil de distribution des récepteurs de classe D₁ et D₂ qu'il possède.

La dopamine est synthétisée dans le bouton synaptique. La première étape de la synthèse de la DA est l'hydroxylation de la l-tyrosine en l-dopa. Cette réaction se fait grâce à la tyrosine hydroxylase. La

seconde étape consiste en la décarboxylation de la l-dopa en DA et est catalysée par l'enzyme l-amino acide decarboxylase (AADC). La DA est également le précurseur de l'épinéphrine et de la norépinéphrine. La dégradation de la DA se fait selon deux voies, l'une impliquant l'enzyme catéchol-O-méthyltransférase (COMT) tandis que l'autre implique l'enzyme monoamine oxydase (MAO). Parmi les métabolites de la DA, on retrouve l'acide homovanillique (HVA) et l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC).

3.1. Dopamine rétinienne

La DA est la catécholamine la plus importante de la rétine. Elle y joue un rôle globalement inhibiteur (Nguyen-Legros et al., 1997a). On la retrouve dans la rétine de tous les vertébrés étudiés jusqu'à maintenant (Witkovsky et Schutte, 1991). Chez les mammifères, les cellules dopaminergiques sont de type amacrines ou interplexiformes et chez beaucoup d'espèces, elles sont des deux types. Chez certains mammifères, ce sont les cellules amacrines qui sont responsables de la majorité de la transmission dopaminergique. Chez le chat environ 95% des cellules dopaminergiques sont amacrines, les 5% restantes étant des cellules interplexiformes (Oyster et al., 1985; Takahashi, 1988). Chez le lapin, il n'y a que des cellules amacrines qui sont dopaminergiques, alors qu'à l'inverse, chez certains primates du nouveau monde comme le singe capucin (*cebus apella*) l'ensemble de la libération de DA est assurée par les cellules interplexiformes

(Witkovsky et Schutte, 1991). Même chez les espèces où les cellules amacriques assurent la transmission dopaminergiques comme le rat, seulement 2 à 5% des cellules amacriques sont dopaminergiques.

Les dendrites et axone des cellules dopaminergiques se ramifient dans la partie la plus distale du IPL (Nelson et Kolb, 1983) et quelques prolongements atteignent l'OPL chez certaines espèces (Marshak, 2001), mais la présence de ces dernières varie beaucoup d'une espèce à l'autre (Witkovsky et Schutte, 1991) et leur révélation histologiques dépend probablement autant de la sensibilité de la méthode de marquage utilisée que de la réelle présence ou absence d'innervation. En général ce sont les projections vers le IPL qui dominent (Nelson et Kolb, 1983). Les projections vers le OPL n'ont d'ailleurs pas été détectées chez le chat jusqu'à présent.

Considérons de manière plus spécifique les cellules amacriques dopaminergiques, puisqu'elles dominent les rétines des rongeurs, des lagomorphes, des félins et de la plupart des primates (incluant les macaques et les humains). Elles sont localisées dans la partie la plus proximale de la couche nucléaire interne (Pourcho, 1982; Oyster et al., 1985; Takahashi, 1988; Nguyen-Legros et al., 1997b). L'input synaptique de ces cellules dopaminergiques provient de deux types de cellules du INL, principalement des cellules bipolaires, probablement les cellules bipolaires à grand champ récepteur, capables

d'échantillonner la luminance sur de grandes surfaces afin d'« informer » les cellules dopaminergiques de la luminosité ambiante (Marshak, 2001), mais aussi des cellules amacrines (dont certaines sont d'autres cellules dopaminergiques) (Hokoc et Mariani, 1987). Les cellules dopaminergiques font la majorité de leurs synapses sur les cellules amacrines AII (Voigt et Wassle, 1987). Ces données ont conduit à suggérer que la DA joue un rôle modulateur dans la voie des bâtonnets (Daw et al., 1990; Djamgoz et Wagner, 1992). Contini et Raviola (2003) ont récemment montré que les synapses que font les cellules amacrines dopaminergiques sur les cellules AII sont de type GABAergique. Les autres projections des cellules dopaminergiques sont principalement localisées dans le IPL. Les cellules sur lesquelles elles font synapses sont encore mal connues.

Certaines données suggèrent la possibilité que la DA soit libérée de façon paracrine afin d'atteindre des récepteurs distants (Bjelke et al., 1996). De plus, il y a un manque de concordance entre la distribution des récepteurs à la DA, qu'on retrouve sur presque tous les neurones de la rétine, et la localisation des projections (Nguyen-Legros et al., 1999) ce qui tend à confirmer l'hypothèse de la transmission paracrine de la DA. Ce mode de transmission par diffusion de la DA expliquerait pourquoi toutes les cellules de la rétine semblent affectées par la dopamine et qu'elles ont des récepteurs à DA (Nguyen-Legros et al., 1999).

3.1.1. Fonction de la DA rétinienne

Il est maintenant connu que la quantité de DA rétinienne synthétisée et libérée varie selon les conditions de luminance. La DA est impliquée dans plusieurs processus rétiniens (Djamgoz et Wagner, 1992; Witkovsky et Schutte, 1991), mais son rôle le mieux documenté concerne l'adaptation aux conditions lumineuses. La DA est impliquée dans cette tâche complexe qui consiste à adapter aux différentes conditions de luminance la capacité de la rétine à détecter le contraste (Marshak, 2001). Cet ajustement est important sur le plan fonctionnel car il permet au contraste de luminance d'être détecté sur un large éventail d'intensités lumineuses et aussi parce qu'il amoindrit la saturation des réponses. Ce processus se fait principalement grâce aux interactions des cellules de la voie latérale, les cellules horizontales et amacrines.

3.1.1.1. Effets dans l'OPL

Les effets de la DA dans l'OPL concernent principalement deux cibles. La DA ferme les synapses électriques qui existent entre les cellules horizontales. Les cellules horizontales sont couplées par des synapses électriques et peuvent former un syncytium de plusieurs cellules à travers duquel le signal visuel peut circuler. La DA module le couplage des cellules horizontales chez les mammifères (He et al., 2000). La dopamine s'est vue attribuée la capacité de moduler les réponses à la

lumière des cellules horizontales chez le poisson (Knapp et Dowling, 1987; Knapp et al., 1990). Elle potentialiserait l'activité des récepteurs glutamatergiques ionotropiques des cellules horizontales, ce qui favoriserait l'inhibition de la périphérie des champs récepteurs des cellules bipolaires et la détection du contraste centre-périphérie (Dowling, 1990).

3.1.1.2. Effets dans l'IPL

Bien que les détails de ce processus restent encore méconnus, la DA est capable de changer le poids de certaines synapses, à la fois dans l'OPL et l'IPL. En basses conditions scotopiques, la DA inhibe les cellules AII, et découple les synapses électriques qui existent parmi les AII et avec les cellules bipolaires (Yazulla et al., 2001). L'effet net de la DA au niveau de l'IPL est de réduire la réponse à la lumière des cellules bipolaires des cônes (Maguire et Hamasaki, 1994).

3.1.1.3. Effets de la dopamine sur l'électrorétinogramme

Quelques études ont rapporté des effets des ligands des récepteurs dopaminergiques sur les composantes de l'ERG chez les mammifères. Chez le lapin adapté à l'obscurité, Jagadeesh et Sanchez (1981) ont constaté une diminution de l'amplitude de l'onde *b* après l'administration systémique d'un agoniste mixte des récepteurs D₁ et D₂ (l'apomorphine). Plus récemment et toujours chez le lapin, mais cette

fois-ci par des injection intra-vitréennes de DA, des chercheurs ont observé une diminution des ondes *b* et *c* (Textorius et al., 1989) et ce toujours en conditions scotopiques.

Inversement, plusieurs recherches ont obtenu une augmentation de l'amplitude de l'onde *b* après administration d'antagonistes de la DA ou encore de la neurotoxine 6-OHDA qui détruit les cellules dopaminergiques. Ainsi, utilisant les antagonistes fluphénazine (D_1), halopéridol (mixte D_1 et D_2) et sulpiride (D_2), Schneider et Zrenner (1991), ont produit une forte augmentation de l'amplitude de l'onde *b* chez des yeux isolés de chats adaptés à l'obscurité. D'un autre coté des études qui ont examiné les effets de la perte de dopamine induite par la 6-OHDA sur l'ERG, (Olivier et al., 1986; chez le lapin) et (Skrandies et Wässle 1988; chez le chat) ont rapporté une augmentation des ondes *a* et *b*. Globalement, ces études indiquent une augmentation de l'onde *b* de l'ERG produite par le blocage ou par une destruction de la transmission dopaminergique. Ces effets, comme ceux des agonistes de la DA, corroborent le rôle globalement inhibiteur de la DA sur la transmission de l'activité visuelle dans la rétine. L'effet de la destruction des cellules dopaminergiques de la rétine sur l'ERG reste cependant controversé, à tout le moins chez le chat. En effet, Maguire et Smith (1985) ne rapportent pas de différence d'amplitude de l'onde *b* en conditions scotopiques après injection intravitréenne de 6-OHDA chez le chat. Leur méthode est pourtant similaire à celle de

Skrandies et Wässle (1988). Les quantités de toxine utilisée et le temps de survie y étant même plus grands, soit 50µg/50µl et trois jours pour Maguire et Smith contre 20µg/10µl et 23 heures pour l'étude de Skrandies et Wässle.

Les résultats que nous venons de décrire illustrent l'importance de la DA dans le traitement de l'information visuelle dans la rétine. Nous allons maintenant examiner l'impact de la perte de DA chez l'humain atteint de la maladie de Parkinson.

3.2. La maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson (MP) se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques, principalement ceux de la substance noire pars compacta et, de façon beaucoup moins importante, ceux de l'aire tegmentale ventrale (Dauer et Przedborski, 2003). Les symptômes cliniques les plus fréquents et les plus marqués sont de type moteur : l'akinésie (lenteur d'initiation des mouvements et tendance à l'immobilité), la rigidité aux mouvements passifs et la présence de tremblements. Ces symptômes moteurs constituent la base sur laquelle s'appuie le diagnostic, les éléments sur lesquels s'évaluent la progression de la maladie et l'effet bénéfique éventuel de la médication (Colcher et Simuni, 1999). La MP se manifeste également par des symptômes non-moteurs, plus particulièrement, d'ordre psychiatrique, cognitif et sensoriel. Parmi ces derniers, on note

des déficits olfactifs, notamment en ce qui concerne les seuils de détection et d'identification des odeurs (Mesholam et al., 1998), mais aussi des déficits visuels dont nous parlerons un peu plus longuement.

3.2.1. Déficiences visuelles dans la MP

Les déficits visuels des parkinsoniens ont été rapportés pour la première fois par Bodis-Wollner et Yahr (1978), ces derniers montraient que les PEV étaient anormaux chez les patients atteints de la maladie. Ces résultats suggéraient déjà que la déficience en DA des patients atteints de la MP affectait également les voies visuelles. Plusieurs études ont par la suite examiné les problèmes visuels des patients atteints de la MP, de sorte qu'il est maintenant bien établi que les patients parkinsoniens ont des déficits de sensibilité au contraste (Bodis-Wollner, 2002). Ce déficit se distingue de la perte d'acuité car il a la particularité d'être plus prononcé pour les stimuli qu'un observateur normal a plus de facilité à voir. En d'autres termes, les déficits (Bodis-Wollner et Yahr, 1978) de ces patients affectent le pic de la courbe de sensibilité au contraste soit, la sensibilité au contraste pour les fréquences spatiales moyennes et élevées (Bodis-Wollner, 1990b; Bodis-Wollner et al., 1987; Bodis-Wollner, 1990a).

3.2. L'angiotensine II

L'angiotensine II (Ang II) est un octapeptide communément associé au maintien de l'homéostasie des fluides ; l'Ang II est le principal médiateur du système rénine-angiotensine (RAS) (Bunnemann et al., 1993; von Bohlen und Halbach, 2003). L'Ang II se retrouve principalement dans les glandes surrénales. On retrouve, toutefois, l'angiotensine dans les tissus extra-rénaux, notamment, dans le cerveau des mammifères (Ganten et Speck, 1978). Les récepteurs de l'angiotensine sont de deux types principaux AT₁ et AT₂. Il existe aussi deux autres types, soit les récepteurs AT₃ impliqués dans la différenciation cellulaire et les récepteurs AT₄ que l'on retrouve dans le cerveau et qui sont impliqués dans la mémoire et la cognition. L'Ang II est synthétisée à partir d'un précurseur, l'angiotensinogène. La première étape de la synthèse de l'Ang II implique la conversion du précurseur angiotensinogène en Ang I par l'enzyme rénine. La seconde étape, soit la conversion de l'Ang I en Ang II, nécessite l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) pour l'hydrolyse de la terminaison carboxyl.

Comme l'Ang II est associée à la régulation des fluides corporels, il n'est pas étonnant que ses récepteurs se trouvent dans les régions du cerveau reliées à ces fonctions, comme le noyau supra-optique, l'organe sub-fornical, les noyaux périventriculaires et l'area postrema. Dans ces régions, l'Ang II agit plutôt via les récepteurs de type AT₁ (Harris et Inagami, 1995). L'Ang II n'est pas seulement impliquée dans

les fonctions associées à l'homéostasie des fluides et au contrôle cardiovasculaire. Elle est notamment impliquée dans la cognition (Wayner et al., 1995; Walther et al., 1999; Winnicka et Wisniewski, 1999) via, par exemple, des récepteurs AT₁ de l'hippocampe ventral. Elle est aussi impliquée dans le contrôle de la motricité (Ambühl et al., 1992; Raghavendra et al., 1998), toujours via des récepteurs AT₁, mais cette fois-ci situés dans l'olive inférieure.

Plus pertinent encore pour notre recherche, l'Ang II est aussi impliquée dans la modulation des fonctions visuelles, où elle exerce une action inhibitrice, toujours via les récepteurs AT₁, dans la rétine (Jacobi et al., 1994) et le CGL (Albrecht et al., 1997). L'action inhibitrice de l'Ang II dans le système visuel se retrouve également au niveau du collicule supérieur (CS), où l'administration intracérébrale de ce peptide dans les couches superficielles inhibe les PEV, principalement via les récepteurs AT₁ (Merabet et al., 1994).

3.2.1. Angiotensine II et collicule supérieur

Les études autoradiographiques ont montré que le CS du rat adulte possède des récepteurs AT₁ et AT₂ dans ses couches superficielles (Michels et al., 1994; Wright et Harding, 1994). Ces couches reçoivent et intègrent les inputs visuels de la rétine et du cortex visuel et renferment des neurones qui répondent fortement à la stimulation visuelle. Il a été montré que l'Ang II inhibe fortement cette activité

visuelle et que, pour la plus grande part, cette inhibition se fait via les récepteurs AT₁ (Merabet et al., 1997). Ces observations sont en accord avec la conception générale selon laquelle l'Ang II exerce ses effets physiologiques par le biais des récepteurs AT₁. Bien que les récepteurs AT₂ aient aussi été associés à des effets neuromodulateurs de l'Ang II (Ambühl et al., 1992; Xiong et Marshall, 1994), ils ont été davantage associés à la régénérescence, au développement et à la maturation neuronale (Wright et al., 1995; Shenoy et al., 1999). Une partie de ces conclusions provient du fait que le ratio des récepteurs AT₁ et AT₂ au sein de plusieurs structures du système visuel change avec le développement. Par exemple, dans le CGL, les récepteurs AT₂ ne sont présents que pendant le développement foetal et post-natal (Michels et al., 1994), et dans d'autres structures comme le SC, la densité de ces récepteurs diminue avec l'âge (Cook et al., 1991; Millan et al., 1991; Rowe et al., 1991; Tsutsumi et Saavedra, 1991a; Tsutsumi et Saavedra, 1991b; Tsutsumi et al., 1993).

Dans le cerveau du rat, la densité des récepteurs de l'angiotensine augmente pendant les deux premières semaines post-natale (Baxter et al., 1980), et elle atteint un maximum dans le mésencéphale à 14 jours post-natals, ce qui correspond au moment où l'animal ouvre les yeux et où le CS montre une activité visuelle (Molotchnikoff et Itaya, 1993).

Buts et hypothèses

Bien que nos connaissances sur le système visuel soient maintenant très étendues, la neuromodulation des fonctions visuelles est encore peu connue. Notre intérêt s'est d'abord porté vers l'action modulatrice de l'Ang II. Ainsi dans **l'étude 1**, nous nous sommes intéressé à savoir si l'Ang II pouvait moduler l'information visuelle chez le rat en développement. Nous avons voulu examiner la contribution respective des récepteurs de l'Ang II, AT₁ et AT₂, dans l'inhibition de l'activité visuelle du CS chez le rat en développement. Notre hypothèse de départ était que l'Ang II exerce son action via les récepteurs AT₂ chez l'animal immature étant donné que ce sous-type de récepteur est davantage exprimé pendant cette période.

Les possibilités limitées de moduler l'effet de l'Ang II chez le rat en développement nous ont conduit vers un autre neuromodulateur, la DA, dont la libération peut être modulée par l'Ang II. La DA n'étant pas présente dans le CS, nous nous sommes tourné vers la rétine. Malgré le grand nombre de données suggérant que la DA affecte la réponse à la lumière de la rétine, bien peu est connu sur la contribution respective des sous-types de récepteurs de la DA. Dans **l'étude 2**, nous avons donc voulu examiner la contribution respective des récepteurs D₁ et D₂ dans la fonction rétinienne via l'enregistrement de l'onde *b* de l'ERG.

Il y a maintenant beaucoup de données et ce, tant en recherche fondamentale que clinique, qui montrent que la DA est impliquée dans la neuromodulation des fonctions visuelles. Plusieurs études suggèrent qu'une perte de dopamine dans la rétine peut engendrer une diminution de la sensibilité au contraste. Dans **l'étude 3**, nous avons voulu tester l'hypothèse selon laquelle la perte de dopamine rétinienne se reflèterait sur la fonction de sensibilité au contraste des neurones au-delà de la rétine, soit dans le CGL. Dans l'hypothèse où la DA est impliquée dans les relations entre le centre et la périphérie des champs récepteurs, la destruction des neurones dopaminergiques devrait altérer la capacité des neurones du CGL à coder pour le contraste.

Méthode

4. Étude 1 : Les effets de l'angiotensine II sur les potentiels évoqués visuels dans le collicule supérieur du rat immature

4.1. Préparation animale

Les expériences ont été pratiquées sur des rats Long Evans normotensifs âgés entre 14 et 35 jours et pesant entre 30 et 130 g. Tous les animaux ont été traités selon les directives du Conseil canadien pour la protection des animaux. L'anesthésie est induite par injection i.p. d'uréthane à 25% (2,5 g/kg) et d'atropine (0,04 mg/kg) est ajoutée pour les rats pesant plus de 50 g afin de diminuer les sécrétions trachéales. Un niveau adéquat d'anesthésie est assuré tout au long de l'expérience par l'absence de réflexe à l'étirement ou au pincement des membres. Une dose de rappel d'anesthésique est donnée au besoin. Les rats sont placés dans un appareil stéréotaxique pour petits animaux (Stoelting). L'ECG est surveillé continuellement et la température corporelle est maintenue à 37°C par un coussin chauffant (FHC) rétroactivement régulé par une sonde thermique. De l'atropine sulfate (1%) est utilisée pour dilater les pupilles et les cornées sont protégées par l'application de larmes artificielles. De la lidocaïne hydrochloride (2%) est administrée à tous les points de pression ou d'incision. Une craniotomie bilatérale est pratiquée tout juste antérieurement à λ pour exposer le cortex cérébral au-dessus du CS de chaque hémisphère. La dure-mère est incisée et repliée chez les animaux de

30 jours et plus seulement. Un microscope chirurgical est utilisé pour placer une microélectrode de verre de manière à ce que l'extrémité pénètre tout juste le cortex. L'ouverture pratiquée dans le crâne est ensuite remplie avec de l'agar de manière à protéger les tissus de la dessiccation. La microélectrode est descendue verticalement dans les couches supérieures du CS sur la base de réponses visuelles, ou des coordonnées stéréotaxiques chez les animaux les plus agés. À la fin de chaque expérience, une solution d'aCSF contenant le colorant Chicago Blue Sky (0,2-0,5%) est injectée pour confirmer la position de l'électrode dans les couches superficielles du CS.

4.2. Enregistrements électrophysiologiques

Une microélectrode de verre avec une ouverture d'environ 25µm est utilisée pour les enregistrements des PEV. Cette électrode sert également pour l'administration de l'Ang II et de ses antagonistes (voir plus loin). Le signal est amplifié et filtré à des bandes passantes entre 10 et 1000 Hz, et montré dans un oscilloscope avant d'être acheminé vers un logiciel d'acquisition (le logiciel SIGAVG et ensuite sa version MS Windows® SIGNAL v.1.x; CED, Cambridge, R-U) via une interface analogue-numérique. La stimulation visuelle est fournie par un photostimulateur (Grass, intensité 4, durée 10µs, fréquence 1Hz) placé à 30 cm de l'œil controlatéral à l'hémisphère enregistré. Les PEV de 35 présentations successives sont moyennés.

4.3. Administration des agents pharmacologiques

À des fins de comparaisons entre les animaux immatures et adultes, la même procédure d'injection que chez les rats adultes a été utilisée (Merabet et al., 1994; 1997). Une nanopompe (WPI A1400 nanoliter injector,) a été modifiée pour permettre simultanément l'injection par micropression du contenu de la microélectrode de verre et l'enregistrement des PEV de la région immédiate du bout de l'électrode. Lors des premières expériences, l'Ang II (val5 Ang II: Ciba-Geigy Ltd) était dissoute dans du NaCl (0.9%), de l'aCSF fut ensuite utilisée (mM; NaCl 124, KCl 3, KH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2.5, NaHCO₃ 26, d-glucose 10, 1-ascorbate2, et CaCl₂ 3.4; osmolarité: 297 mOsm; pH = 7.2–7.3). Les concentrations du peptide varient de 10⁻³ M à 10⁻¹² M, à une vitesse d'injection de 10 nl/min durant quatre minutes. En ce qui concerne l'injection des antagonistes Losartan (DUP 753) et PD 123319, des concentrations de 10⁻³ M à 10⁻⁶ sont utilisées. Les antagonistes et l'Ang II sont injectés simultanément à concentrations égales mais pour un ratio de 1 :10 (Ang II: antagoniste).

4.4. Protocole expérimental et analyse des données

L'électrode est descendue et positionnée à la surface du CS, tel que déterminé par la manifestation de la première réponse visuelle. L'électrode est ensuite avancée et positionnée dans les couches superficielles du CS sur la base de la forme des PEV. Les champs récepteurs des potentiels sont ensuite cartographiés. Les PEV sont

enregistrés à des intervalles de une à deux minutes jusqu'à ce que le tracé de l'onde et son amplitude soient stables, ensuite, trois enregistrements contrôles sont pris et l'agent pharmacologique est injecté. Dès l'injection complétée, des enregistrements sont pris après une, trois et six minutes et, par la suite, aux cinq minutes, jusqu'à récupération complète ou partielle de l'amplitude du PEV. L'aire, l'amplitude et la latence des PEV sont calculées avant, pendant et après l'injection des agents pharmacologiques. Les mesures de l'aire sous la courbe et de l'amplitude des PEV sont fortement corrélées ($r(45)=0.85$, $P < 0.001$). L'amplitude des PEV a été choisie pour quantifier les effets des agents pharmacologiques tel qu'utilisé précédemment pour notre recherche sur les animaux adultes (Merabet et al., 1994; 1997). Les valeurs calculées sont ensuite normalisées et la magnitude de l'effet est exprimée en pourcentage de l'amplitude des PEV contrôles à fin de comparaisons entre les expériences. Les résultats globaux sont exprimés en moyenne et erreur standard et les différences statistiques sont déterminés par des ANOVA one-way et des tests post-hoc de Dunnett ou des ANOVA sur des rangs (Kruskal-Wallis) et des tests pour comparaisons multiples de Dunn, le choix de l'une de ces deux options dépendant de la distribution des variables ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$). Les données en pourcentage subissent une transformation racine carrée de l'arc sinus avant d'effectuer les tests statistiques. Une injection n'est couronnée de succès seulement si : 1. Les enregistrements contrôles sont stables ; 2. il y a une relation

temporelle claire entre l'injection et les changements de PEV ; 3. L'électrode n'est pas obstruée tel que confirmé par le son caractéristique de la pompe pendant l'injection et le fait que la solution coule de l'électrode après le retrait de cette dernière 4. il y a une récupération d'au moins 75% de l'amplitude contrôle ; 5. le colorant Chicago Blue Sky injecté à la fin de l'expérience est localisé dans la *stratum griseum superficiale*.

4.5. Reconstructions histologiques des sites d'enregistrements

Chaque animal reçoit une dose létale d'halothane par inhalation. Le cerveau est ensuite fixé dans le PFA (10%) pour une période d'une semaine. Le tissu fixé est ensuite coupé en sections coronales de 100µm et marqué de manière à révéler l'activité de acetylcholinesterase (AChE). Cette procédure a été accomplie pour chacune des expériences de manière à confirmer la position des injections marquées par le colorant Chicago Blue Sky.

5. Étude 2 : Les effets de l'administration intraoculaire de ligands dopaminergiques sur l'amplitude de l'onde b de l'électrorétinogramme du lapin

5.1. Préparation animale

Les expériences ont été réalisées sur 29 lapins pigmentés adultes pesant entre 2,5 et 3,5 kg. Les animaux sont maintenus dans un cycle jour-nuit de 12 heures. Les animaux ont été traités selon les directives du Conseil canadien pour la protection des animaux. Toutes les procédures concernant cette expérience ont commencé le matin afin de minimiser l'influence du rythme circadien. Les animaux sont pré-anesthésiés avec de l'Atravet (0,5 mg/kg) et de l'iso-atropine (0,1 mg/kg) 30 minutes avant l'anesthésie générale induite avec de l'uréthane (1,5 g/kg i.v.) (Sigma-Aldrich), administrée par la veine orbitale de l'oreille. Un anesthésique local, la lidocaine hydrochloride 2%, est administré à tous les points de pression ou d'incision. Le rythme cardiaque et le niveau de saturation du sang en oxygène est surveillé constamment grâce à un oxymètre (Nonin) et une trachéotomie est ensuite pratiquée. Les réflexes sont ensuite vérifiés afin de s'assurer d'un niveau d'anesthésie adéquat pendant la chirurgie. L'animal est ensuite placé dans un appareil stéréotaxique et paralysé par une injection intraveineuse de gallamine triethiodide (10 mg/kg/hr) mélangé avec du dextrose ringer (5%) et ventilé artificiellement (N₂O/O₂: 70/30% et halothane 0.5-1%). Le pic expiratoire de CO₂ est

maintenu entre 28 et 32 mmHg via l'ajustement du volume et du rythme respiratoire. L'EKC est surveillé continuellement et la température corporelle maintenue entre 37 et 38 C° par un tapis chauffant rétroactivement régulé par une sonde thermique. Les pupilles sont dilatées par de l'atropine et de la phényléphrine hydrochloride est utilisée pour rétracter les membranes nictitantes. Afin d'éliminer la possibilité qu'un changement de diamètre pupillaire influence l'amplitude de l'ERG, des pupilles artificielles ont été utilisées lors de certaines expériences. Les cornées ont été protégées de la dessiccation par l'application de larmes artificielles.

5.2. Enregistrements électrophysiologiques

Des électrodes cornéennes de type Jet (Universo S.A., Suisse) sont placées sur les cornées des deux yeux. Deux électrodes sous-dermales sont ensuite placées sur le pont inter-oculaire et sur le dessus de la tête entre les deux oreilles et servent respectivement de référence et de mise à terre. Le signal est amplifié (P511, Grass, West Warwick, RI) et filtré à des bandes passantes de 1 à 1000 Hz, selon les directives de l'ISCEV. Le signal est ensuite acheminé vers une interface analogue-numérique (1401plus, CED, Cambridge, R-U), et l'acquisition est assurée par le logiciel Signal (v. 2.0x, CED, Cambridge R-U). Un programme informatique personnalisé permet d'enregistrer toutes les 15 minutes pour toute la durée de l'expérience. Afin d'assurer une stimulation uniforme des rétines, des demi balles de ping-pong sont

utilisées pour couvrir les yeux et produire un effet Ganzfeld. La stimulation visuelle consiste en une série d'éclairs générés par un photo-stimulateur (PS33plus, Grass-, West Warwick, RI, E-U), ces éclairs ont des fréquences et d'intensités variables. En conditions scotopiques, les éclairs sont présentés à une fréquence de 0,1 Hz et à une intensité de $0,1 \text{ cdm}^{-2}$, la luminance ambiante étant de 0 cdm^{-2} . Sous ces conditions, chaque ERG est la moyenne de 5 éclairs. En conditions mésopiques, les éclairs sont présentés à 0,5 Hz, pour une intensité de 2 cdm^{-2} , la luminosité ambiante est de 13 cdm^{-2} . Pour, les conditions photopiques, les éclairs sont présentés à 1 Hz et à une intensité qui correspond à 80% du point de saturation de l'amplitude de l'onde *b*. Pour chacune des conditions de luminance scotopique, mésopique et photopique, l'onde de l'ERG est moyennée respectivement 5, 15 et 30 fois.

5.3. Agents pharmacologiques

Les substances actives utilisées pour caractériser la contribution des récepteurs de type D_1 sont les agonistes (Sigma) A77636 (RBI-Sigma) et l'antagoniste SCH23390. L'implication des récepteurs de type D_2 est déterminée par l'agoniste norpropylapomorphine (NPA) (Sigma), et l'antagoniste sulpiride (Sigma). De l'eau stérile est utilisée comme véhicule, à l'exception du sulpiride qui est dissout dans de l'acide chloridrique (0,1 N). Les concentrations injectées varient de 1mg par 100 μ l à 0,00001mg par 100 μ l et les injections intravitréennes ont été

faites avec des aiguilles 30G1/2 (BD) et une seringue de type Hamilton à environ 3 mm postérieurement au limbus.

5.4. Protocole expérimental

L'ERG est enregistré pour les deux yeux durant une période contrôle de deux heures afin de déterminer un niveau de base pour l'amplitude de l'ERG minimisant ainsi la variabilité. L'injection intravitréenne des agents pharmacologiques dans l'œil test est immédiatement suivie de celle du véhicule dans l'œil contrôle. L'ERG est ensuite enregistré jusqu'à ce qu'il y ait récupération totale ou partielle de l'amplitude de l'onde *b*, ce qui peut durer au maximum 24 heures après l'injection.

Après la session d'enregistrement, les animaux sont euthanasiés par injection i.v. de pentobarbital (Euthanyl 240mg/ml, 0.4 mg/Kg). Les globes oculaires sont ensuite prélevés et disséqués dans le but d'examiner sommairement l'emplacement du site d'injection et en particulier l'intégrité du cristallin.

L'analyse des données consistait en la mesure des ondes *a* et *b* et de leur latence pour les enregistrements pris à intervalle prédéterminés avant et après les injections. La signifiante statistique a été déterminée par des tests *t*, et des anovas pour les données paramétriques et des tests de Kruskal-Wallis pour les données non-paramétriques.

6. Étude 3 : Les effets de la perte de dopamine rétinienne sur la sensibilité au contraste des neurones du corps genouillé latéral chez le chat

6.1. Animaux

Ces expériences ont été réalisées sur des chats adultes normaux des deux sexes pesant entre 2.5 et 4.5 kg. Ces animaux ont été traités en accord avec les directives du Conseil canadien pour la protection des animaux.

6.2. Injection de 6-OHDA

Les animaux sont d'abord pré-anesthésiés par une injection sous-cutanée d'acépromazine maléate (Atravet™ 10 mg/ml ; 0.05 ml/kg ; Ayerst Veterinary Laboratories, Guelph, ON, Canada) et d'atropine (0.4 mg/ml ; 0.1 ml/kg ; Sabex, Inc., Boucherville, QC, Canada). Après 30 minutes, l'animal est anesthésié par inhalation avec un mélange de 5% d'halothane (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada) distribué par un vaporisateur d'halothane (Ohmeda Tec4 ; Bimeda-MTC Santé Animale, Inc.), et d'O₂ et de N₂O dans un ratio de 50 : 50. Pendant l'injection intravitréenne de 6-OHDA, le volume d'halothane administré est réduit à 2%. Un degré approprié d'anesthésie est assuré par l'absence de réponse au pincement des commissures interdigitales des pattes postérieures. Le rythme cardiaque et la saturation sanguine

en oxygène sont surveillés au moyen d'un oxymètre (Modèle 8500, Nonin Medical, Inc., Plymouth, MN, É-U). Une goutte de Phényléphrine hydrochloride (Mydrin® 2.5% ; Algon Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) afin de rétracter les membranes nictitantes. Deux gouttes de proparacaine hydrochloride ophtalmique (0.5% ; Alcaine®, Alcon Canada, Inc., Mississauga, On, Canada) sont administrées quelques minutes comme analgésique topique avant l'injection de 6-OHDA.

La 6-OHDA (2,4,5-trihydroxyphenethylamine ; 150-250 µg ; Sigma Chemical Co, St-Louis, MO, É-U) et l'acide ascorbique (AA ; acide L -ascorbique ; 300 µg ; Sigma Chemical Co, St-Louis, MO, É-U) sont chacune dissoute dans un tampon phosphate (PBS) et mélangés. Le mélange est introduit dans un microperfuseur (aiguille papillon de calibre 25) et injecté à 4-5 mm postérieurement au limbus afin d'éviter le corps ciliaire et la vascularisation conjonctivale. Dès que l'aiguille traverse la sclère à angle droit par rapport à une tangente sclérale, l'angle de pénétration est changé avant d'enfoncer davantage, l'aiguille pointant vers le fond d'œil pour éviter le cristallin (voir la **Figure 5** pour une illustration de la procédure). Les deux yeux sont injectés : l'un avec la toxine, l'autre avec le véhicule (PBS et AA.). Cette procédure est répétée deux jours plus tard avec les mêmes doses, pour un volume total injecté de 300 à 500 µg pour la 6-OHDA et de 600 µg pour l'AA.

Figure 5. Injection et enregistrement unitaire

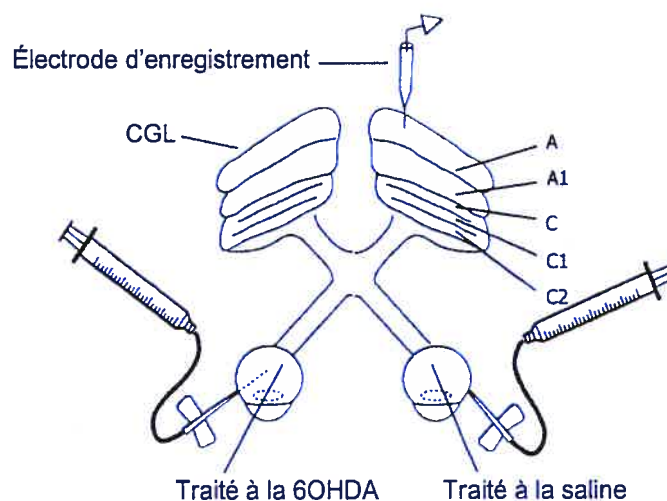


Figure 5 : Représentation schématique d'une injection et de la position d'une microélectrode pour l'enregistrement unitaire. L'injection de 6-OHDA (150 à 250 μ g/100 μ g) est monoculaire et une injection du même volume de saline est faite dans l'œil controlatéral. La même procédure est répétée deux jours plus tard. Les enregistrements unitaires sont effectués de 2 à 5 semaines après les injections.

Le traitement post-opératoire consiste en l'administration sous-cutanée d'un antibactérien (triméthoprime 40 mg/ml et sulfadiazine 200 μ g ;

0,06 ml/0,45 kg ; Tribissen® 24%, Schering Canada, Inc., Pointe-Claire, QC, Canada) aux 24 heures et d'un analgésique (buprénorphine hydrochloride ; Temgesic®, Reckitt-Benkiser Healthcare, Ltd., Hull, R-U) aux 12 heures. L'animal est sur pied quelques minutes après l'anesthésie. Une période de repos de deux à cinq semaines sépare les injections intratravitréennes des enregistrements.

6.3. Préparation animale pour les enregistrements

Les animaux sont pré-anesthésiés et anesthésiés de la même manière que décrite plus haut (section 3.2), à une exception près : l'isoflurane (Forane®, Bimeda-MTC Santé animale, Inc., Guelph, ON, Canada), remplace l'halothane durant la chirurgie préparatoire. Un analgésique, la lidocaine hydrochloride (Xylocaine® 2%, Astra Pharma, Inc., Mississauga, ON, Canada) est administré à tous les points d'incision ou de pression. Après la canulation de la veine céphalique et la trachéotomie, l'animal est paralysé avec de la gallamine triethiodide (2%; Sigma Chemical, St-Louis, MO, É-U). La myorelaxation induite par la gallamine triethiodide permet d'immobiliser les yeux et ainsi de stabiliser la position des champs récepteurs pendant la durée de l'expérience. L'animal est ensuite placé dans un appareil stéréotaxique (Kopf) et ventilé de manière artificielle avec une pompe respiratoire (modèle 6025, Ugo Basile, Comerio, Italie) et un mélange O₂/N₂O (33/66%) auquel s'ajoute 0.5% d'halothane. Le pic expiratoire de CO₂ pour chaque cycle ventilatoire (ET CO₂) est analysé par un capnomètre

(Datex-Engstrom Division, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finlande). Pendant toute la durée de l'expérience, la température de l'animal est maintenue entre 36.5 et 37.5 °C par un tapis chauffant rétroactivement régulé par une sonde thermique rectale. L'EEG et l'EKG sont aussi surveillés. Une infusion constante de solution de Ringer lactée (Baxter Corp., Allergan Inc., Markham, ON, Canada) est assurée par une pompe à seringue (Modèle A-99, Razel Scientific Instruments, Inc., Samford, CT, É-U). La midriase est obtenue via l'administration topique de sulfate d'atropine (Isopto® atropine, Algon Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) et les membranes nictitantes sont rétractées avec de la phényléphrine hydrochloride.

6.4. Électrorétinogramme

L'électrorétinogramme est enregistré avec des électrodes cornéennes de type Jet (Universo S.A., Suisse) enduites de lubrifiant (Celluvisc®, Allergan, Markham, ON, Canada) et délicatement posées sur les cornées. Une électrode de référence sous-dermale est insérée à environ 5 mm postérieur au canthus externe de chaque œil et une mise à terre est insérée à la base du crâne. Des demi balles de ping-pong sont posées sur les yeux afin de créer un effet Ganzfeld. L'animal est ensuite adapté aux conditions lumineuses. Le stimulus est un éclair fourni par un stimulateur photique (Modèle PS33-PLUS, Grass Telefactor, Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, É-U) et un contrôleur (Pro 4™ ; World Precision Instruments, Inc. Sarasota, FL, É-U).

L'intensité de la stimulation varie entre 0,09 et 15,55 cdm^{-2} . Le signal est amplifié (1000x ; bandes passantes 1 à 1000 Hz ; amplificateur : modèle P511, Grass Telefactor ; Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, É-U) et acheminé vers un logiciel d'acquisition (Signal®, Cambridge Electronic Design, Ltd., Cambridge, R-U) via une interface analogue numérique (1401, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, R-U).

6.5. Enregistrements unitaires

Une crâniotomie est pratiquée aux coordonnées Horsley-Clarke suivantes (antéropostérieur : 3 à 9, médio-latéral: 7-13). Une microélectrode de tungstène verni (2-5 $\text{M}\Omega$; A-M Systems, Inc., Carlsborg, WA, É-U) est placée dans le CGL à l'aide d'un micro-descendeur hydraulique (modèle 50-11-5 , FHC, Inc., Bowdoinham, ME, É-U) afin d'effectuer les enregistrements unitaires. Les coordonnées du lieu d'enregistrement sont de 6-7 mm dans le plan antéropostérieur, 8,5-9,5 mm dans le plan médio-latéral et de 11,5-12,5 mm de profondeur. Le cortex exposé est recouvert d'agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, É-U) et puis de cire fondue afin de sceller la chambre d'enregistrement. Le signal est amplifié (1000 à 5000x , bande passante de 30 à 10 000 Hz; amplificateur de modèle P511, Grass Telefactor ; Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, É-U : Grass Instrument Division, West Warwick, RI, É-U), observé à l'oscilloscope et suivi par le biais d'un moniteur audio. L'activité unitaire est enregistrée après avoir été isolée du reste du signal grâce à une

fenêtre de discrimination (modèle 121, WPI, inc., Sarasota, FL, É-U) et elle est acheminé vers un logiciel d'acquisition et de stimulation (VS v1.72, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, R-U) et un micro-ordinateur PC via une interface analogue/numérique (1401, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, R-U). Les réponses sont enregistrées en PSTH en séries de 10 ms. Les cornées sont protégées avec des lentilles cornéennes de courbure et de puissance appropriées.

6.6. Stimulation visuelle

Dès qu'un neurone répondant à des stimuli visuels est isolé, les limites de son champ récepteur sont cartographiées à l'aide d'un ophtalmoscope sur un écran tangentiel faisant face à l'animal. Chaque neurone, dont l'activité unitaire est enregistrée, est testé via un synthétiseur d'image pour écran cathodique (Picasso, Innisfree, Cambridge, MA, É-U) contrôlé par le logiciel d'acquisition et de stimulation (VS, v1.72 Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, R-U) via une interface analogue/numérique (1708, Cambridge Electronic Design Ltd., Cambridge, R-U), afin d'obtenir un profil quantitatif de réponses. Les stimuli sont présentés sur un écran cathodique (modèle 5114, Data Check Corp, San Diego, CA, É-U) placé à 57 cm devant l'animal.

Les stimuli sont présentés de façon pseudo-aléatoire et répétés au minimum quatre fois. Le niveau de contraste des stimuli est déterminé par la formule suivante :

$$C = \frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\max} + L_{\min}}$$

où, L_{\max} est la luminance maximale, et L_{\min} , la luminance minimale.

6.7. Procédures de traitement des tissus rétiniens

Les animaux sont euthanasiés par une injection bolus de penthobarbital (0,5ml/kg ; Euthanyl). Les yeux sont ensuite prélevés rapidement et posés dans du PBS à 4°C. Les globes oculaires sont sectionnés à environ 2 mm postérieur au limbus. Le segment antérieur est enlevé et la plus grande part de vitré est retirée de la chambre postérieure. Pour les rétines soumises à une analyse de HPLC, le segment postérieur est coupé en deux parties : nasale et temporale. La moitié temporale du segment postérieur est disséquée sur glace : la rétine et la membrane choroïde sont d'abord délicatement séparées de la sclère, ensuite la rétine est pelée de la choroïde avec un pinceau. La technique utilisée pour le HPLC est celle de Ste-Marie et al., (1996). La demi-rétine temporale est pesée et congelée dans des tubes pour microcentrifugeuse, à une température de -80°C, jusqu'au traitement du tissu pour l'analyse de HPLC (voir section 3.9). La deuxième moitié du segment postérieur est déposée dans une solution de PFA 4% pour

deux heures. Ensuite la choroïde et la rétine sont détachées de la sclère, en prenant bien soin de couper le nerf optique. La choroïde est ensuite détachée de la rétine. L'épithélium pigmentaire est enlevé en brossant très délicatement la surface distale de la rétine avec un pinceau. La rétine est déposée dans une solution de sucrose à 5% jusqu'au lendemain. La rétine est étendue sur une lame (rétine proximale vers le haut) et des entailles sont pratiquées en périphérie pour permettre l'étalement du tissu. Une fois la rétine étalée, le vitré restant est enlevé en brossant très doucement la surface.

6.8. Procédures de marquage immunohistochimique

Le marquage des cellules exprimant la tyrosine hydroxylase dans le tissu rétinien a été réalisé selon la méthode de Versaux-Botteri et al., (1986) et utilise la méthode de marquage dite ABC (avidin-biotin-peroxidase complex). Le tissu est d'abord incubé pendant 10 minutes dans une solution de 2% d'albumine de sérum bovin (Sigma Chemical, St-Louis, MO, É-U), 2,5% de sérum normal de chèvre (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, É-U) et de 1% de triton (Sigma Chemical, St-Louis, MO, É-U) afin de bloquer le marquage non-spécifique. Une incubation de 24 heures suivra dans la même solution à laquelle on a ajouté l'anticorps primaire de lapin dirigé contre la tyrosine hydroxylase (rabbit anti-tyrosine hydroxylase (polyclonal, Novus Biologicals, Littleton, CO, É-U). Dès le lendemain, la rétine est incubée pendant trois jours dans une solution de 2,5% d'albumine de

sérum bovin (Sigma Chemical, St-Louis, MO, É-U), 2% de sérum normal de chèvre et de 0,3% de triton auquel on ajoute l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps de lapin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, É-U). Après rinçage, la rétine est trempée dans un kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, É-U) pendant 30 minutes, puis incubée dans 0,0025% de DAB (Sigma Chemical, St-Louis, MO, É-U) pour cinq minutes et 2 à 5 minutes de 0,0025% de DAB avec 0,004% de H₂O₂.

6.9. Quantifications neurochimiques

La quantité de DA et de ses métabolites est mesurée dans les hémirétines via la méthode HPLC. Au moment de prendre les mesures de DA et de ses métabolites, les échantillons sont homogénéisés et les débris cellulaires enlevés. La méthode de dosage est l'HPLC par détection électrochimique coulométrique (Coulchem II, Model 5011, SPE, Ltd, Concord, Canada). L'appareil de chromatographie équipé d'une colonne Novapak C18 (2mm x 150mm, Waters). La phase mobile était constituée d'une solution de 20 mM d'acide citrique, de 50mM de d'acétate de sodium, de 1,875 mM d'heptanesulfonate et de 0,125 mM d'EDTA.

Le pH est ajusté à 4,05 avec de l'acide acétique glaciale. Du méthanol est ensuite ajouté dans un ratio de volume tampon/méthanol de 93 :7. Les pics sont classifiés selon les temps de rétention de référence de

substances connues. L'aire sous chaque pic est intégrée et les ratios des aires de nos échantillons par rapport à des échantillons de substances connues. À l'aide d'équations de régression calculées à partir de ces courbes standard, les concentrations des substances d'intérêts dans les échantillons peuvent être estimées. Les niveaux de DA et de ses métabolites ont été quantifiés en picomole par milligramme de tissus et peuvent ensuite être comparés entre rétines traitées par la toxine et rétines traitées par le véhicule.

6.10. Reconstructions histologiques des sites d'enregistrements

Afin de pouvoir reconstruire les descentes d'électrodes et connaître les sites d'enregistrements, des lésions électrolytiques ont été faites le long des pénétrations d'électrodes. À la fin des sessions d'enregistrements, le cerveau est coupé en blocs dans l'appareil stéréotaxique et ensuite déposé dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Les tissus sont ensuite congelés et des coupes coronales en séries du CGL d'une épaisseur de 40 μm sont effectuées. Une coloration au crésyl violet permet ensuite de distinguer les différentes couches du CGL et d'identifier les sites d'enregistrements à l'intérieur du CGL.

Étude 1: Effects of angiotensin II on visual evoked potentials
in the superior colliculus of juvenile rats.

(Coude G, Marois A, et Casanova C., (2000) *Neuropeptides*. 34(3-4):203-10.)

Manuscript published in 2000 in *Neuropeptides* 34 (3&4), 203-210

**EFFECTS OF ANGIOTENSIN II ON VISUAL EVOKED POTENTIALS
IN THE SUPERIOR COLLICULUS OF JUVENILE RATS**

Gino Coudé M.Ps, Anney Marois M.Sc, and Christian Casanova Ph.D

*Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada*

Correspondence should be addressed to:

Christian Casanova,
Laboratoire des Neurosciences de la Vision,
École d'optométrie, Université de Montréal,
C.P. 6128, Succ. Centre-Ville,
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7.

Tel:514-343-2407

Fax:514-343-2382

e-mail:christian.casanova@umontreal.ca

Grants attributed for the research:

This work was supported by a team grant (# MT-13391) from the Medical Research Council of Canada held in collaboration with Nicole Gallo-Payet and Marcel Daniel Payet of the Université de Sherbrooke.

ABSTRACT

There are age-related changes in the relative expression of the AT₁ and AT₂ receptors of angiotensin II (Ang II) in brain regions such as the superior colliculus, a midbrain visual structure where both receptor subtypes are found. We investigated the effects of Ang II on gross visual activity in the colliculus of anesthetized rats aged between 15 and 35 post-natal days. Microinjection of Ang II in the superficial layers yielded a strong reduction in the amplitude of visual evoked potentials in a dose-related manner. Injection of the peptide in more ventral collicular layers did not modify the potential confirming the discrete localization of the angiotensinergic receptors in the superficial layers. Preliminary data indicated that the co-injection of Ang II with Losartan or PD 123319 yielded a partial blockade of Ang II suppressive effects, indicating that both AT₁ and AT₂ receptors are likely to be involved in mediating these responses. Overall, this study shows that the inhibitory nature of Ang II action is similar in juvenile and adult animals^{1,2}.

INTRODUCTION

It is now clearly established that central angiotensin II (Ang II) is not solely associated with fluid homeostasis and blood pressure control because it can modulate neuronal activity in regions of the brain involved in cognition^{3,4,5}, motor control^{6,7}, and sensory integration^{8,9}. Consistent with these findings, we reported that local intra-cerebral administration of Ang II reduces the amplitude of visually evoked potentials in the superficial layers of the superior colliculus (SC) in adult rats¹. Comparable findings were reported in the SC of adult hamsters¹⁰. The SC contains both AT₁ and AT₂ receptors subtypes^{11,12} and the inhibitory action of Ang II on adult rat collicular gross visual activity was shown for the most part to be mediated by activation of AT₁ receptors². This observation is in agreement with the general view that Ang II exerts its physiological action through AT₁ receptor sub-types. Only a few *in vitro* studies have revealed a clear physiological role of the AT₂ receptors in the neuromodulatory activity of Ang II^{6,13}. AT₂ receptors have been associated with repair processes and neuronal development and maturation, depending on the experimental model^{14,15}. This conclusion is derived in part from the fact that in some structures (e.g., the lateral geniculate nucleus¹¹) AT₂ receptors are only found during the fetal and post-natal developmental period and that in other structures (such as the SC), the density of this receptor sub-type declines with age^{16, 17, 18, 19, 20,21}.

Baxter et al ²² showed that there is an increase in the density of angiotensinergic receptors in the brain during the first two weeks after birth. In the midbrain, the number of receptors peaks at post-natal day 14 (PND 14) which corresponds to, the time of opening of the eyelids and the onset of visual activity in the SC ²³. The Ang II receptor density then decreases and reaches near adult values after PND 40. To our knowledge, no studies have investigated in vivo the physiological action of Ang II in young animals. It is possible given the changes in receptor density and the relative proportions of AT₁-AT₂ receptors during brain development ^{17, 19, 20} that Ang II may have different physiological effects in young and adult animals. In the present study we investigated whether Ang II can modulate visual evoked activity in the SC of juvenile rats using an experimental approach similar to that previously utilized in adult animals ^{1,2}. Parts of these findings have been presented in abstract form ^{24,25}

METHODS

Animal Preparation

Experiments were performed on normotensive Long Evans rats aged between 14-35 days and weighing between 30 and 130 g. All

animals were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Anesthesia was induced by intra-peritoneal (i.p.) injection of Urethane 25% (2.5 g/kg). Atropine (0.04 mg/kg) was added to the solution for rats weighing more than 50 g to reduce tracheal secretions. The level of anesthesia was monitored throughout the experiment (i.e., using, a leg stretch or pinch reflex) and supplemental doses of anesthetic were administered when needed. The pups were placed in a stereotaxic head holder designed to secure small animals (Stoelting). The electrocardiogram (ECG) was continuously monitored and the core temperature was maintained near 37°C by a custom made small heating pad (FHC) placed under the animal. Atropine sulfate (1%) eye drops were used to dilate the pupils and the corneas were protected by application of artificial tears. Lidocaine hydrochloride (2%) was administered at all points of pressure and incision. A bilateral craniotomy was performed anterior to, *lambda* to expose the cerebral cortex overlying the SC of each hemisphere. The dura was incised and reflected only for animals older than PND 30. A surgical microscope was used to lower a glass microelectrode until the tip just penetrated the cortex. The skull opening was filled with agar to protect the tissues from dessication. Using a micromanipulator, the microelectrode was advanced vertically through the cortex and into the superficial layers of the SC on the basis of visual response cues, and for older animals, adult stereotaxic coordinates [36]. At the end of all experiments, a solution of artificial cerebrospinal fluid

(aCSF) stained with Chicago Sky Blue (0.2-0.5%) was injected to confirm that the electrode was located in the superficial layers of the colliculus (see Figure 1).

Recording and Visual Stimulation

Glass microelectrodes with a tip opening of ~25 μm were used to record visual evoked potentials (VEP) in the SC (see Merabet et al.² for details). The same microelectrode was used to deliver the peptide or its antagonists (see below). The signals were amplified and bandpass filtered between 10 and 1000 Hz [17, 43]. The recorded signals were also passed through an audio monitor and an oscilloscope. They were also fed to a PC compatible computer via an analogue/digital interface (CED 1401, CED Cambridge, UK). Triggered evoked potentials were averaged over 35 successive presentations using the SIGAVG software and later on, its MS Windows® version (SIGNAL v. 1.x; CED, Cambridge, UK). Gross visual stimulation was provided by a diffuse flash (Grass photostimulator, intensity level 4; duration 10 μs) placed 30 cm away from the contralateral eye of the hemisphere being recorded from. The stimulus frequency was set at 1 Hz.

Delivery of Pharmacological Agents

To permit a direct comparison between the effects of Ang II in juvenile and mature animals, we followed the same injection technique as

that used in adult rats ^{1,2}. The glass microelectrode filled with the drug was inserted in the head of a nanopump (WPI A1400 nanoliter injector) modified to allow the simultaneous recording of neuronal activity from the region immediately beneath the tip of the electrode. In the first experiments, Ang II (val5 Ang II: Ciba-Geigy Ltd.) was dissolved in NaCl (0,9%). It was later diluted in a more physiological medium, artificial cerebrospinal fluid (aCSF: in mM; NaCl 124, KCl 3, KH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2.5, NaHCO₃ 26, d-glucose 10, 1-ascorbate 2, and CaCl₂ 3.4; osmolarity: 297 mOsm; pH = 7.2-7.3). The peptide was administered by micropressure at concentrations varying from 10⁻³ M to 10⁻¹² M at a constant rate of 10 nl/min for a total of 40 nl for 4 min ². Studies of the effect of the specific AT₁ receptor antagonist Losartan (DUP 753) were carried out at 10⁻³ or 10⁻⁶ M and injected in conjunction with Ang II at equal concentrations ratios (1:1) but at an increased antagonist ratio (1:10 Ang II:Losartan)². A similar procedure was used to study the effect of the AT₂ receptor antagonist PD 123319.

Experimental Protocol and Data Analysis

The electrode was lowered and positioned at the surface of the colliculus (determined by the first appearance of a visual response to the flash presentation). The electrode was then slowly advanced and positioned in the superficial layers of the SC on the basis of the VEP waveform. The "multi-unit" receptive field at the recording site was

mapped. Recordings of the VEP were taken at approximately 1-2 min intervals until the waveform and amplitude appeared stable. Then, three successive control recordings were taken and the pharmacological agent was injected (the injection onset represents time at zero). The VEP was recorded every minute throughout the period of injection. Once injection was completed, recordings were taken 1, 3 and 6 min after injection and then every 5 min until a partial or total recovery of the VEP amplitude was observed. The area, amplitude and latency of the evoked potential waveform were calculated before, during, and after injection of the peptide. There was an intimate relationship between the measurements based on both the amplitude of the potential and the area under the curve ($r(45) = 0.85, p < 0.001$), and the former was used to, quantify the effects as was the case in our previous studies of adult animals. The calculated values were all normalized and the magnitude of the effect was expressed as a percentage (of the initial amplitude control measurements) to facilitate comparison across experiments. Overall results are expressed as means \pm SEM and statistical significance of the observed effects was determined using oneway ANOVA with Dunnett's post hoc test or ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis) with Dunn's multiple comparison test depending on the distribution of variables ($*p < 0.05, **p < 0.01$). Percentage data were subjected to arcsin-square root transformation before analysis. The injection was considered as successful only when: (1) control recordings ,

were stable; (2) there was a clear time relationship between the injection period and the potential changes; (3) the electrode was not obstructed (as confirmed by the characteristic sound of the pump during injection and by the fact that the solution could be released freely when the electrode was removed from the brain); (4) there was a partial or total recovery of the signal (to at least 75% of the control recordings); (5) the stained solution administered at the end of the experiment was located in the *stratum griseum superficiale*.

Histology

Each animal was given an overdose of Halothane by inhalation. The brain was then removed and fixed in buffered formalin (10%) for a period of one week. The fixed tissue was then cut in 100 μm coronal sections and stained to reveal acetylcholinesterase (AChE) activity. For each experiment, histological observation was carried out to confirm the position of the Chicago Sky Blue stained solution. Figure 1 depicts a photograph of a coronal plane through a rat SC showing the injection of Ang II in the superficial layers of the SC and a second more ventral injection in the *stratum griseum intermedate (SGI)*.

RESULTS

General observations

Out of 216 collicular injections, 134 were considered successful based upon the criteria described in the Methods section. At effective concentrations, Ang II always reduced the amplitude of the VEP with a maximum effect generally observed during or immediately after the end of injection. There was no change of the VEP latency. Representative examples are depicted in Figure 2. The averaged control potentials shown in the top panels are decreased by 49% and 44% respectively after the administration of 10^{-3} and 10^{-6} M Ang II. An almost complete recovery of the signal was observed 15 minutes after the end of injection (bottom panels). Panels A and B of Figure 3 show the profiles of action of the peptide for two different concentrations and are represented by the normalized amplitude of the VEP as a function of time. The reduction in the amplitude of the potentials occurred shortly after the onset of injection and the time course of the effect was much more abrupt than the recovery period. These last examples further suggest that the magnitude of the inhibition depends on the peptide concentration.

Dose Response Relationship

Ang II was injected at four different concentrations in order to reveal any concentration-dependent effect of the peptide. Overall, the

strength of the inhibitory effect of Ang II tended to decrease as the concentration of the peptide was lowered (Figure 4A). The concentrations of 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M yielded mean (\pm SEM) reductions in amplitude of the VEP of 45.4 ± 2.2 , 42.2 ± 3.0 , 34.5 ± 4 and $38.7 \pm 2.9\%$, respectively. ANOVA showed a significant effect of Ang II concentration on the VEP amplitude ($F(4,106) > 5.05$, $p < 0.001$). Dunnett's comparisons between each Ang II concentration and control aCSF injections (mean reduction of $25.5 \pm 3.3\%$) indicated that the mean reductions observed at concentrations of 10^{-3} M and 10^{-6} M were significant ($p < 0.01$). There was also a relationship between the Ang II concentration and the mean recovery time ($H(4) > 13.53$, $p < 0.01$). The VEP reached 75% of its initial amplitude after 25 and 21 min for, respectively, Ang II concentrations of 10^{-3} M and 10^{-6} M. The injections of Ang II at lower concentrations (10^{-9} and 10^{-12} M) were characterized by shorter recovery periods (14 and 10 min respectively). The duration of recovery at any concentration was not significantly different from that observed with aCSF ($p > 0.05$, Dunn's test). In summary, the magnitude of the inhibitory action of Ang II in juvenile rats and the duration of the associated recovery period tended to increase as the concentration of the peptide increased.

Localization of effects

We verified the laminar localization of the Ang II receptors by injecting the peptide in different layers of the colliculus. In all 6 cases, Ang II exerted its inhibitory action only when the injection was confined to the SGS. Injection below this visual layer yielded no significant change in the latency and magnitude of the VER. An example is shown in panel C of Figure 3. As expected, the administration of Ang II in the SGS decreased the strength of the visual response (unfilled circles). A second injection, made more ventrally (600 μm below the first site, in the *stratum opticum*) did not modify the signal.

Influence of age

We investigated the possibility that the action of Ang II may differ during the visual development of juvenile rats. In particular, we were interested in determining whether the effect of Ang II during the first week following the onset of visual activity in the colliculus was analogous or not to the effect observed in adulthood. Figure 4B shows that the effect in the youngest animals (PND 15-19) was similar to that observed for our complete sample (Figure 4A) and that previously reported for the adult². It is of note that Ang II tended to be more effective in the younger group of juvenile rats (PND 15-19), these are the visually active animals in which Ang II receptors are the most common²². Despite this latter observation, our study did not reveal significant differential effects of Ang II, neither at a

concentration of 10^{-3} M ($F(3,57)=2.04$, $p>0.05$) nor at 10^{-6} M ($H(2)=4.90$, $p>0.05$) throughout the targeted developmental period.

Receptor subtypes

In order to compare the contribution of the two receptors in the inhibitory action of Ang II between juvenile and adult rats, we investigated the effect of Ang II with the presence of selective AT₁ and AT₂ antagonists for animals aged between 15 and 24 days which is a period characterized by a high density of Ang II receptors in the midbrain. In one series of experiments, Ang II was injected with the AT₁ receptor antagonist Losartan (DUP 753). Co-injection of Losartan and Ang II at equal concentrations (10^{-3} or 10^{-6} M) yielded a partial blockade of the inhibitory effect of Ang II (Figure 5). In a second set of experiments, the effect of PD 123319, which specifically binds to AT₂ receptors, was studied. PD 123319 also reduced the effect of Ang II at the two concentrations used (10^{-3} and 10^{-6} M). This effect was more pronounced than that observed for the presence of Losartan, particularly at 10^{-6} M where it reached statistical significance ($F(2,28)>167$, $p<0.05$; Dunnett's test, $p<0.05$). Despite the relatively small number of injections, these observations suggest that both AT₁ and AT₂ receptors are likely to be involved in mediating the suppressive effect of Ang II in juvenile animals, with a greater effect on AT₂ receptors. In 8 cases, Ang II was injected with both Losartan and PD 123319. The overall degree of blockade when both antagonists were

present was not significantly greater than that observed with a single antagonist ($F(2,49)=0.24$, $p>0.05$).

Indirect peripheral effects

For 14 successful Ang II injections, we also quantitatively measured the ECG frequency throughout the control and injection periods to determine whether the inhibitory effect of Ang II in the colliculus of juvenile rats was associated with peripheral changes. In our experimental conditions, we did not observe any significant changes in heart rate frequency at any of the tested Ang II concentrations (repeated ANOVA, $F(4,49)=0.36$, $p>0.05$). As shown in Figure 6, the injection of Ang II yielded a decrease of collicular activity (empty symbols), whereas the ECG frequency was not affected (filled symbols).

DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first to demonstrate *in vivo* physiological effects of Ang II in brain structures of juvenile animals. Our results indicate that Ang II exerts an inhibitory action on collicular evoked potentials, an effect that is comparable to that observed in adult rats². These effects were confined to the superficial layers of the SC in agreement with the anatomical location of angiotensinergic receptors

revealed by autoradiographic studies ¹¹. This last observation also rules out the possibility that the action of Ang II reported in the present study arises from direct action of the peptide on the vascular circuitry within the colliculus (see Merabet et al ²). By injecting Ang II at various concentrations (10^{-3} M to 10^{-12} M), we demonstrated that the effects of the peptide express a dose-related dependency. In contrast to adult animals ¹, ², we did not observe a clear dose response relationship for concentrations less than 10^{-6} M, as shown in Figure 4. There are several possible explanations for this finding. (1) A smaller range of concentrations was tested in the juvenile rats compared to adult animals, so we did not get an effect. In our previous study, the action of Ang II at eight concentrations ranging from 10^{-3} to 10^{-10} M was studied ². (2) The effects at the lowest concentrations, and particularly at 10^{-9} M, could have been masked by the perturbation caused by the injection *per se*. Comparing the results from this study and Merabet et al. ² demonstrated that injection of the vehicle created a more pronounced transient perturbation in young than in adult animals (mean transient reduction of approximately 7% and 25% respectively). It is likely this difference occurs because the nervous tissue of immature animals is more sensitive to mechanical stress ²⁶. (3) It is also possible that the receptors in young animals are less sensitive to exogenous Ang II or that the cascade of cellular events triggered by Ang II are not fully developed. Co-administration of the aminopeptidase inhibitor amastatin with Ang II did

not increase the strength or duration of the Ang, II effects on collicular potentials (data not shown) ruling out, to some extent, the possibility that the activity of the peptidases may be different in juvenile and adult animals. (4) Finally, the lack of effect at lower Ang II concentration may reflect the functional immaturity of the nervous tissue of juvenile animals. We know that only a limited number of synaptic connections in the young will be consolidated and maintained in the adult ^{27, 28}, so the greater concentration of Ang II receptors found in juvenile animals ²² may be associated with non-functional synapses.

Preliminary data also suggest that the inhibitory action of Ang II in animals aged between 14 and 25 days involves activation of both AT₁ and AT₂ receptors. Again the data are different from those observed in adults ² as (1) the strength of the blockade was more pronounced in mature rats and, (2) in young animals, the blocking effect of the AT₂ receptors was more effective than that of the AT₁ receptors. The latter observation is interesting because it is consistent with the finding that the AT₂ receptor sub-type is more common in young than in adult animals ^{12, 17, 19}. The fact that we could not observe a strong blockade of the inhibitory action of Ang II with either losartan or PD 123319 in juvenile rats was surprising. Several explanations can be proposed. (1) Again, this may be related to the changes induced by the injection *per se* that may have masked the more subtle effects of the antagonists. (2) It is also possible that the receptors'

affinity to the antagonists is lower in immature animals, or that these antagonists bind to other receptors thereby reducing then their efficacy (unspecific biding). (3) Moreover, it is possible that the antagonists failed to effectively block the Ang II mediated effects because of an immediate action of Ang II. We used the same administration techniques as in adult animals ², which could indicate that the kinetics of the diffusion or action of Ang II differs between juvenile and mature rats. (4) A further possibility is that there is extensive inhibitory cross-talk ²⁹ between these two major receptors (AT₁ and AT₂) during development. For example, blocking the AT₂ receptors would reduce the inhibitory action on the AT₁ receptors, and increase the affinity of AT₁ receptors to Ang II, yielding a reduction of the VEP despite the presence of the antagonist. However, our observation that the blocking of both receptor sub-types did not fully block the Ang II mediated effects does not support this last explanation. However, these same observations are consistent with an alternative explanation regarding the weak effects of the Ang II antagonists in immature animals. It is possible that part of the action of Ang II was indirectly mediated trough AT₄ receptors which are also expressed in the SC ³⁰.

Finally, we did not observe any significant changes in cardiac rhythm during the administration of Ang II in the superficial layers of the SC of young animals. This observation is at odds with the data of D'Amico et al ³¹ which indicated that Ang II yielded cardiovascular changes in adult

rats. This discrepancy may be related to the difference in the age of the animals used in both studies. Unfortunately, we did not quantitatively analyze the ECG changes in our previous study using mature animals^{1, 2}; therefore it is possible that such changes occurred during the administration of the peptide but that they were not evident based on informal qualitative observations by those experimenters. Another factor that may have contributed to this disparity between the present study and that of D'Amico et al³¹ is that in our investigation, only 40 nl were injected over a period of 4 minutes while D'Amico and collaborators administered a larger volume (100 nl) over a very brief time period (5 sec.).

In conclusion, we have shown that Ang II induces a reduction of VEPs in the superficial layers of the SC of juvenile rats. This is the first *in vivo* demonstration that Ang II has a physiological action on the activity of neurons of immature animals. Therefore, Ang II can modulate the activity of the SC, a structure involved in visuo-motor functions, and consequently may influence the exploratory and avoidance behavior of the animals throughout their development. Preliminary data further suggest that the Ang II effects are mediated only in part by AT₁ and AT₂ receptors, with a greater contribution from the latter receptor sub-type.

REFERENCES

1. Merabet L, de Gasparo M, Casanova C. Neuromodulatory effects of angiotensin II in the visual layers of the rat superior colliculus. *Neuroreport*. 1994; 5: 2649-2652.
2. Merabet L, de Gasparo M, Casanova C. Dose-dependent inhibitory effects of angiotensin II on visual responses of the rat superior colliculus: AT₁ and AT₂ receptor contributions. *Neuropeptides*. 1997; 31: 469-481.
3. Wayner M J, Polan-Curtain J, Armstrong D L. Dose and time dependency of angiotensin II inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Peptides*. 1995; 16: 1079-10827
4. Walther T, Voigt J P, Fukamizu A, Fink H, Bader M. Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behav Brain Res*. 1999; 100: 1-4.
5. Winnicka M M, Wisniewski K. Disruption of temporo-entorhinal connections abolishes the facilitatory effect of angiotensins on memory in rats. *Pharmacol Res*. 1999; 40: 53-59.

6. Ambühl P, Felix D, Imboden H, Khosla M C, Ferrario C M. Effect of angiotensin II and its selective antagonists on inferior olivary neurones. *Regul Pept.* 1992; 41: 19-26.
7. Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni S K. Modulation of motor functions involving the dopaminergic system by AT₁ receptor antagonist Losartan. *Neuropeptides.* 1998; 32: 275-280.
8. Jacobi P C, Osswald H, Jurklics B, Zrenner E. Neuromodulatory effects, of the renin-angiotensin system on the cat electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35: 973-980.
9. Albrecht D, Broser M, Kruger H, Bader M. Effects of angiotensin II and IV on geniculate activity in nontransgenic and transgenic rats. *Eur J Pharmacol.* 1997; 332: 53-63.
10. Mooney R D, Zhang Y, Rhoades R W. Effects of angiotensin II on visual neurons in the superficial laminae of the hamster's superior colliculus. *Vis Neurosci.* 1994; 11: 1163-1173.
11. Michels K M, Heemskerk F M, Saavedra J M. Selective changes in angiotensin II AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat superior colliculus following eye enucleation. *Neuroscience.* 1994; 58: 835-844.

12. Wright J W, Harding J W. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev*, 1994; 18: 21-53.
13. Xiong H, Marshall K C. Angiotensin II depresses glutamate depolarizations and excitatory postsynaptic potentials in locus coeruleus through angiotensin II subtype 2 receptors. *Neuroscience*. 1994; 62: 163-175.
14. Wright J W, Harding J W. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂, and AT₄ and their functions. *Regul Pept*. 1995; 59: 269-295.
15. Shenoy U V, Richards E M, Huang X C, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology*. 1999; 140: 500-509.
16. Cook V I, Grove K 1, McMenamin K M, Carter M R, Harding J W, Speth R C. The AT₂ angiotensin receptor subtype predominates in the 18 day gestation fetal rat brain. *Brain Res*. 1991; 560: 334-336.

17. Millan M A, Jacobowitz D M, Aguilera G, Catt K J. Differential distribution of AT₁ and AT₂ angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. Proc Natl Acad Sci USA. 1991; 88: 11440-11444.
18. Rowe B P, Grove K L, Saylor D L, Speth R C. Discrimination of angiotensin II receptor subtype distribution in the rat brain using non-peptidic receptor antagonists. Regulatory peptides. 1991; 33: 45-53.
19. Tsutsumi K, Saavedra J M. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. Am J Physiol. 1991 a; 261: R209-R216.
20. Tsutsumi K, Saavedra J M. Differential development of angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. Endocrinology. 1991b; 128: 630-632.
21. Tsutsumi K, Seltzer A, Saavedra J M. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. Brain Res. 1993; 631: 212-220.
22. Baxter C R, Horvath J S, Duggin G G, Tiller D J. Effect of age on specific angiotensin II-binding sites in rat brain. Endocrinology. 1980; 106: 995-999.

23. Molotchnikoff S, Itaya S K. Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993; 72: 300-304.
24. Marois A, Darveau S, Casanova C. Effects of angiotensin II on the visual responses of the rat's superior colliculus during neonatal development. *Soc Neurosci Abst.* 1996; 22:635.
25. Patry O, Marois A, Casanova C. Effects of angiotensin II on the visual activity of the rat's superior colliculus during neonatal development: implication of AT₁ and AT₂ receptors. *J Am Acad Optometry.* 1997; 74: 121.
26. Akaoka H, Saunier C F, Chergui K, Charlety P, Buda M, Chouvet G. Combining in vivo volume-controlled pressure microinjection with extracellular unit recording. *J Neurosci Methods.* 1992; 42: 119-128.
27. Blue M E, Parnavelas J G. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *J. Neurocytol.* 1983; 12: 697-712.
28. Miller A J, MeKoon M, Pinneau M, Silverstein R. Postnatal synaptic development of the rat. *Brain Res.* 1983; 284: 205-213.

29. Gelband C H, Zhu M, Lu D et al. Functional interactions between neuronal AT₁ and AT₂ receptors. *Endocrinology*. 1997; 138: 2195-2198.
30. Wright J W, Krebs L T, Stobb J W, Harding J W. The angiotensin IV system: functional implications. *Front Neuroendocrinol*. 1995; 16: 23-52.
31. D'Amico M, Di Filippo C, Rossi F, Warner T D. Role of AT₂ receptors in the cardiovascular events following microinjection of angiotensin II into the superior colliculus of anaesthetised rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998; 357: 121-125.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to François Jolicoeur for his comments and suggestions and to O. Patry for his help in some experiments. Part of the salary of CC came from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ). GC and AM were respectively supported by "FCAR centre" and "FRSQ-FCAR santé" scholarships.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Photograph of a coronal section of a juvenile rat brain stained to reveal acetylcholinesterase (AChE) activity. The Ang II injections and recordings sites appear pale when compared to neighboring regions. Note that a first injection was located in the stratum griseum superficiale (SGS) while a second one was made in the stratum griseum intermediale (SGI). Abbreviation: (SO); stratum opticum.

Figure 2. Representative examples showing the effect of the injection of Ang II at two different concentrations (10^{-3} and 10^{-6} M in columns A and B, respectively) on VEPs recorded from the SGS of the SC. The peptide clearly reduced the amplitude of the VEP. An almost complete recovery of the potential was evident approximately 15 min after injection. The arrows represent stimulus onset. Injections in A and B were made at PND 25 and 22, respectively.

Figure 3. Panels A and B show representative examples of the profile of action of Ang II injected at two different concentrations. Normalized amplitude is plotted as a function of time. The vertically oriented rectangle represents the period of injection. The onset of injection is at time 0. Panel C illustrates the effects of Ang II as a function of depth in the colliculus. While the injection of Ang II (10^{-3} M) in the SGS decreased the amplitude

of the VEP (filled symbols), no effect was observed when Ang II was administered in a deeper layer (SO; open symbols). Injections in A, B and C were made at PND 24, 20 and 25, respectively.

Figure 4. Dose dependant inhibitory effect of Ang II as a function of the peptide concentration. In panel A, injections in all animal groups were pooled. The effects are compared to aCSF control injections, and were significant (Dunnett's test, $p < 0.01$) for concentrations $> 10^{-9}$ M. Panel B shows the mean reduction in amplitude observed for the youngest animal group (PND 15-19). Note that the maximum effect of Ang II was noted for juvenile rats aged between 15 and 19 days. The mean reduction in amplitude observed at 10^{-3} and 10^{-6} M was significantly different from that computed after administration of the vehicle (Dunn's test, $p < 0.05$). Number of injections for Ang II 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M and aCSF are 58, 26, 8, 6 and 17, respectively for panel A and 15, 9, 3, 4 and 6 respectively for panel B.

Figure 5. Injection of Ang II with AT₁ and AT₂ antagonists on the VEP amplitude at two different concentrations. Each bar represents the mean \pm SEM. Injection of Ang II with the AT₁ antagonist shows a slight blockade of the Ang II inhibitory effect. Similarly, injection of Ang II with the AT₂ receptor antagonist PD 123319 partially blocked the inhibitory action of the

peptide (Dunnett's test, $p < 0.05$). Number of injections from left to right is 25, 15, 13, 13, 10 and 8.

Figure 6. Injection of Ang II at a high concentration (10^{-3} M) did not significantly modify the frequency of the cardiac rhythm but strongly reduced the amplitude of the visual evoked potential.

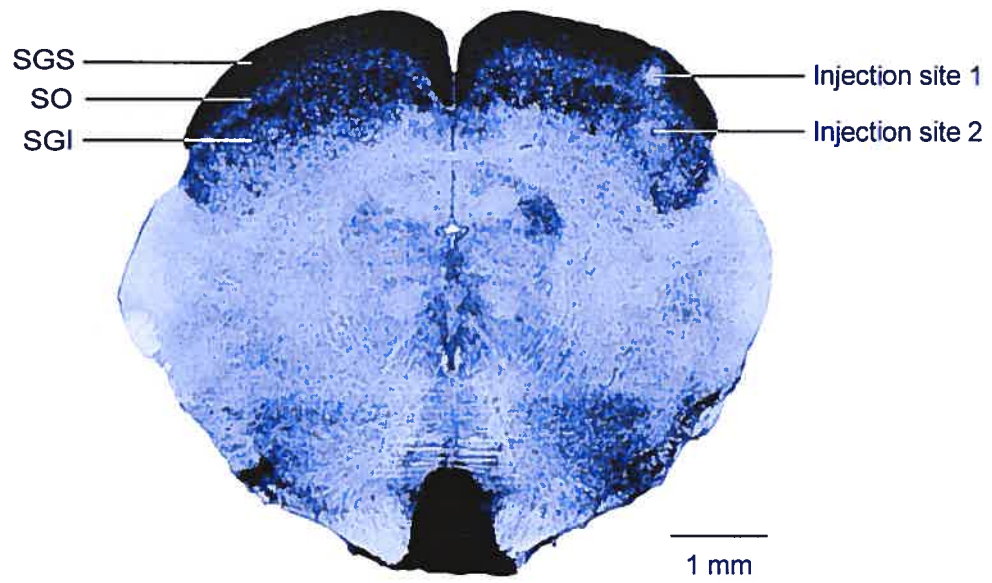


Figure 1: Coudé et al., (2000)

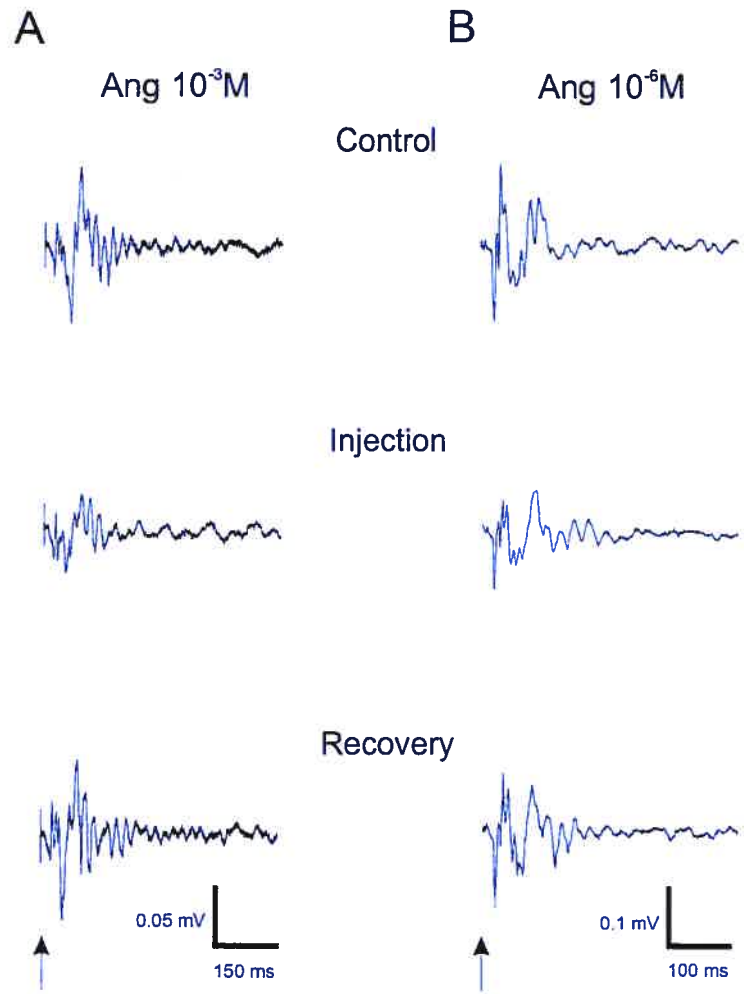


Figure 2: Coudé et al., 2000

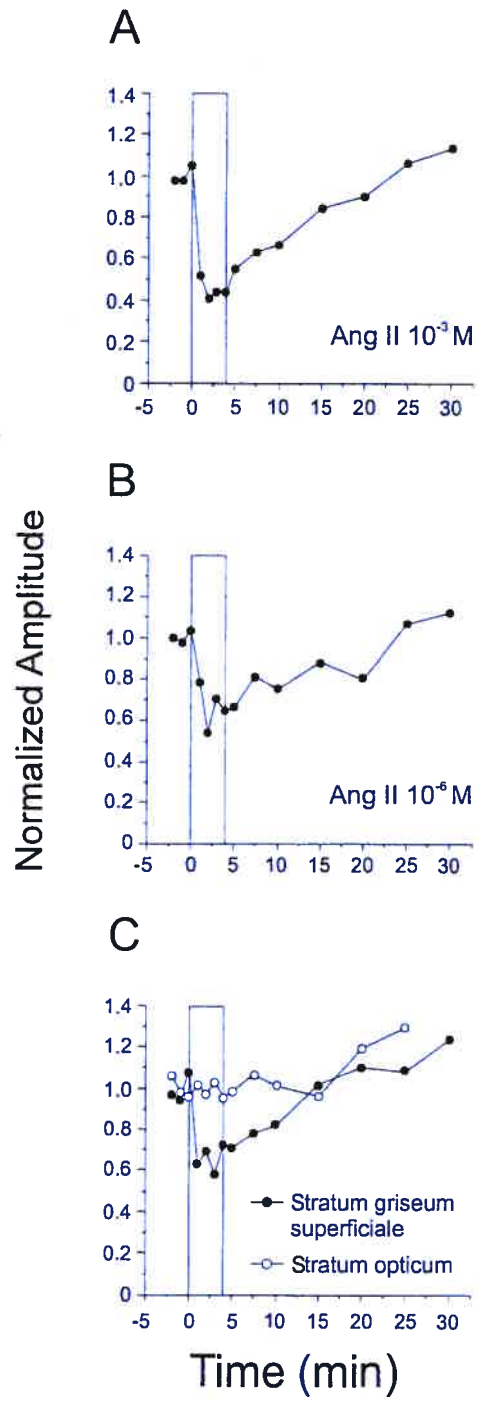


Figure 3: Coudé et al., 2000

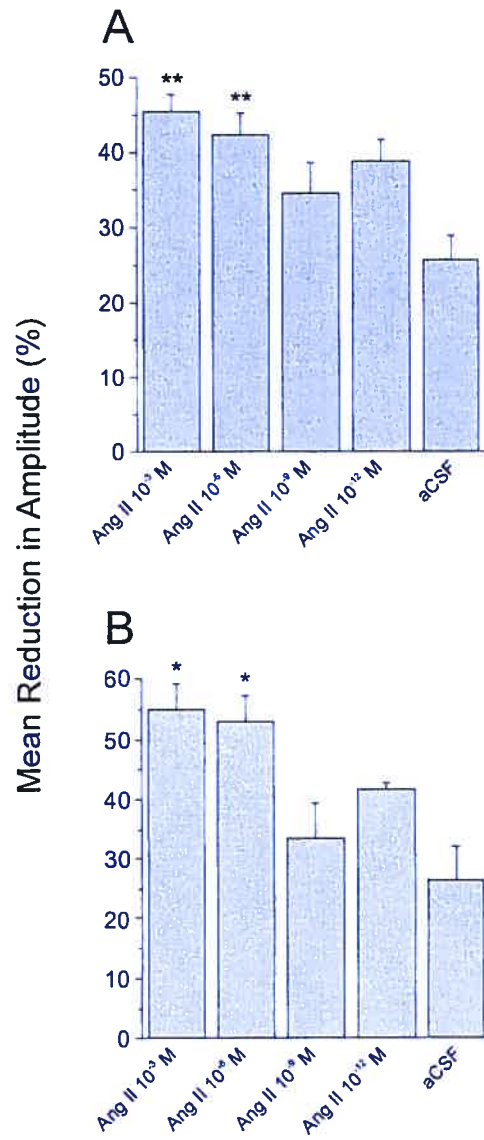


Figure 4: Coudé et al., 2000

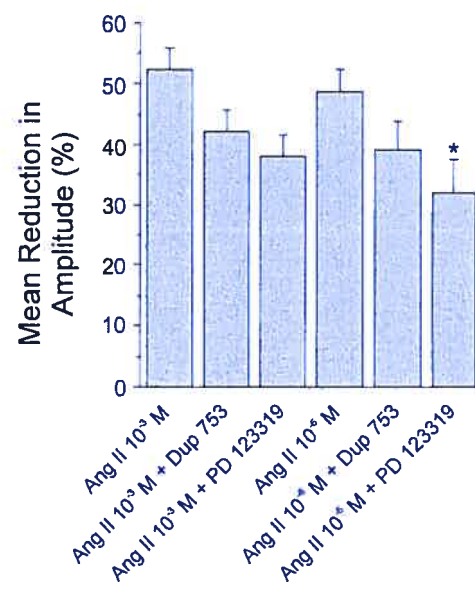


Figure 5: Coudé et al., 2000

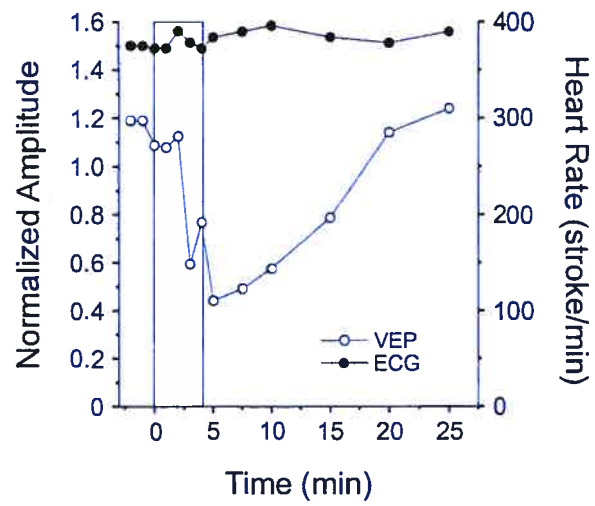


Figure 6: Coudé et al., 2000

Étude 2: Effects of the intraocular administration of dopamine ligands on the b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram

(soumis)

**Effects of the intraocular administration of dopamine ligands on the
b-wave amplitude of the rabbit electroretinogram**

Huppé-Gourgues F., Coudé G., P. Lachapelle, Casanova C.

Laboratoire des neurosciences de la vision, École d'optométrie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence should be addressed to:

Christian Casanova

Laboratoire des neurosciences de la vision

École d'optométrie, Université de Montréal,

C.P.6128 Succ. Centre-Ville,

Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Tel : 514-343-2407

Fax : 514-343-2382

e-mail : christian.casanova@umontreal.ca

Abstract:

In the retina of mammals, dopamine (DA) is generally released by amacrine cells and may alter the physiology of all retinal cells. It is known that apomorphine (a mixed D₁/D₂ receptor agonist) reduces the amplitude of the b-wave of the electroretinogram (ERG) in rabbit. In the present study, we investigated the implication of D₁ and D₂ receptors in the previously described DA-mediated effect on the ERG b-wave. In a first set of experiments, D₁ and D₂ agonists (D₁: SKF38393 and A77693, D₂: Nopropylapomorphine (NPA)) were administered intravitreally in one eye while the vehicle was injected in the other eye. In a second set of experiments, the action of D₁ and D₂ antagonist SCH23393, and sulpiride was studied. Our results showed that both D₁ agonists SKF38393 and A77636 provoked a reduction of the b-wave amplitude (34.0% and 59.2% of the pre-injection level, respectively). On the other hand, the D₂ agonist NPA failed to produce a significant change of the ERG components. Injecting the DA antagonists SCH23393 and sulpiride also reduce the b-wave amplitude (28.9% and 40.2%, respectively). Overall, these data suggest that the previously described effect of apomorphine on the rabbit ERG b-wave came from activation of D₁ receptors, and that those are likely to be preferentially involved in DA-mediated retinal processing.

Introduction:

The retina of all mammals contains dopamine (DA). In most cases, including rabbits, this catecholamine is released by a sub-type of amacrine cells (Dowling & Ehinger, 1978; Dowling et al., 1978; Oyster, Takahashi, Cilluffo, & Brecha, 1985) which are generally located in the proximal part of the inner nuclear layer and send extended processes to the most distal portion of the inner plexiform layer (Mitrofanis, Vigny, & Stone, 1988). It is generally considered that DAergic transmission does not act on a regular one to one basis but rather in a paracrine fashion (Nguyen-Legros, Versaux-Botteri, & Vernier, 1999). Accordingly, the activity of all neurons in the retina can be modulated by DA because they all exhibit D₁, D₂ or D₁ and D₂ receptors. A number of studies have revealed the implication of DA in various form of retinal processing such as light adaptation (Marshak, 2001) and horizontal cell coupling (He, Weiler, & Vaney, 2000). Because of this latter action, DA may be involved in the center-surround antagonism of retinal receptive fields (Bodis-Wollner, 1990; Boumghar, Marois, Jolicoeur, & Casanova, 1997).

In rabbit, it has been shown that the i.v. administration of apomorphine, a mixed D₁ and D₂ agonist, yields a reduction in the amplitude of the b-wave of the flash electroretinogram (ERG) (Jagadeesh & Sanchez, 1981). Comparable results were obtained after the intravitreal injection of DA (Textorius, Nilsson, & Andersson, 1989; Gottvall & Textorius, 2003). Our

laboratory later showed that the acute administration of apomorphine could induce a change in the contrast sensitivity of neurons in the lateral geniculate nucleus, i.e., the main thalamic target of ganglion cells (Boumghar et al., 1997). Conversely, the destruction of the retinal DAergic network by the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA), was shown to increase the amplitude of the ERG b-wave (Olivier, Jolicoeur, Lafond, Drumheller, & Brunette, 1986; Olivier, Jolicoeur, Lafond, Drumheller, & Brunette, 1987; Lafond et al., 1994).

Despite the bulk of neuroanatomical and physiological evidence that DA can modulate the activity of retinal cells in mammals, very little is known on the specific contribution of DA receptor subtypes in retinal functioning. In the present study, we investigated *in vivo* the contribution of D₁ and D₂ in the established DA-mediated reduction of the b-wave amplitude in rabbits. Parts of these findings have been presented in abstract form (Huppé-Gourgues, Coudé, & Casanova, 2002).

Methods

Animal preparation.

Experiments were carried out on 42 adult pigmented rabbits (2.5-3.5 kg) that were provided by the Université de Montréal animal facilities. Animals were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. A 12 hour light/dark cycle was used to maintain the animals

in a normal day-night cycle. All procedures described below started in the morning to minimize any influence of the circadian cycle. Atravet (0.5 mg/kg) and Iso-atropine (0.1 mg/kg) were administered to the animal 30 minutes before general anesthesia that was induced by urethane (1.5 g/kg i.v.) (Sigma-Aldrich), administered via the orbital vein of the ear. All surgical wounds and pressure points were infused by a local anesthetic (Lidocaine hydrochloride 2%). Heart rate and O₂ blood saturation were constantly monitored with an oxymeter (Nonin). A tracheotomy was performed. Deep tendon reflexes were checked to ensure a satisfactory level of anesthesia during the surgery. The animal was then placed in a stereotaxic frame and was paralyzed by intravenous injection of gallamine triethiodide (10 mg/kg/hr) mixed in dextrose ringer (5%) and artificially ventilated (N₂O/O₂: 70/30% plus halothane 0.5-1%). End-tidal CO₂ level was maintained between 28 and 32 mmHg by adjusting the stroke volume and respiratory rate. The electrocardiogram was continuously monitored, and the core temperature was maintained at 37-38 C° by a feedback controlled heating pad placed under the animal. Pupils were dilated with atropine and nictitating membranes were retracted with local application of phenylephrine hydrochloride. The corneas were protected from desiccation by applying artificial tears (carboxyl methylcellulose).

Recordings and visual stimulation.

ERG-Jet contact lens electrodes (Universo S.A., Switzerland) were placed on the cornea of the two eyes. Two subdermal electrodes were positioned on the bridge of the nose and between the ears on the top of the skull and served as ground and reference, respectively. Giving that DAergic substances can have a mydriatic effect (Corbett, Buckley, & Richards, 1994), and that the testing period lasted for several hours, artificial pupils of 6mm were used in some experiments. In these cases, the ERG was recorded with a DTL fiber (Hebert, Vaegan, & Lachapelle, 1999). No differences were noted between the effects of a given ligand on the ERG whether artificial pupils or regular jet electrodes were used. Moreover, casual observation of the pupil did not reveal any significant changes of its diameter during the testing periods.

Signals were amplified (P511, Grass, West Warwick, RI) and band-pass filtered between 1 and 1000 Hz, according to ISCEV guidelines. Signals were then fed to an analogue-digital interface (1401plus, CED, Cambridge, UK) and data acquisition was made using the software Signal (v. 2.0x, CED, Cambridge UK). A custom loop program allowed us to record ERGs exactly every 15 minutes for the whole duration of the experimental procedure. To provide a more uniform stimulation of the retinas, ping-pong balls cut in half covered the eyes (Ganzfeld-like stimulation).

Visual stimulation consisted of a series of flashes (PS33plus, Grass, West Warwick, RI) of different frequencies and intensities. In scotopic conditions, flashes were presented at a frequency (f) of 0.1 Hz, and at an intensity (i) of 0.1 cd/m², the background luminance (bl) being at 0 cd/m². The ERG was averaged 5 times. In mesopic conditions, parameters were set at: f= 0.5 Hz, i= 2cd/m², and bl= 13 cd/m². Signals were averaged 15 times. In photopic conditions (bl=30 cd/m²), flashes of 1 Hz were used, presented 30 times, at 80% of the b-wave amplitude saturation point.

Dopaminergic agents.

The active substances used to characterize the contribution of D₁ receptor subtypes were the agonists SKF38393 (Sigma) and A77636 (RBI-Sigma), and the antagonist SCH23390. The involvement of D₂ receptors was assessed by administering the agonist norpropylapomorphine (NPA) (Sigma), and the antagonist, sulpiride (Sigma). The ligands were dissolved in sterile water, with exception of sulpiride which was dissolved in 0.1N HCl. Concentrations used varied from 1mg per 100µl to 0.00001mg per 100µl. Injections were made in the vitreous humor by inserting a 30G1/2 needle (BD) attached to a 250µl Hamilton syringe throughout the sclera 2-3 mm caudal to the limbus.

Experimental protocol.

The ERG of both eyes was recorded every 15 min for a control period of 2 hours. This was done to minimize variability and to determine baseline

amplitude of the ERG components that were used to quantify the effects of the DAergic agents. The intravitreal injection of the latter was then made in the test eye (T0). This was immediately followed by the injection of the vehicle in the other eye (control eye). Recordings were then made every 15 min after the onset of injection until a partial or total recovery of the ERG was obtained. In general, recordings lasted 5 hours after the drug administration, but could be prolonged up to 24 hours. Once the last recording was made, the animal was killed with an i.v. injection of about 1.5 ml of pentobarbital sodium (Euthanyl 110 mg/Kg). Eyeballs were isolated and dissected for a gross evaluation of any trauma resulting from the injection procedure, and particularly to verify that no structure (e.g. lens) was inadvertently severed by the needle.

Data analysis included peak time and amplitude measurements taken prior to and at predetermined time intervals following the injection of the DAergic agents. The b-wave amplitude of the injected eye was compared to that of the control eye. Statistical significance was determined by using paired t-test, oneway ANOVA for parametric data and Kruskal-Wallis and Wilcoxon test for non-parametric data. For any test, the p level considered to be significant was equal to or lower than 0.05.

Results:*D1 receptor contribution to the b-wave amplitude*

The intraocular injection of the D₁ agonist SKF38393 reduced the amplitude of the ERG signal. A representative example is shown in Figure 1. SKF38393 reduced the b-wave amplitude by 30%, while the latency of waveform remained constant at 82.3 ± 0.3 msec (panel A, upper traces). The vehicle alone did not modify the ERG of the control eye (bottom traces). Panel B represents the time course of the action of the agonist. The maximal SKF38393 induced reduction was observed between one and two hours post-injection. A recovery was apparent four hours after injection and was virtually completed after seven hours (see also the upper-right ERG waveform in panel A). Panel B also shows the lack of changes of the ERG b-wave amplitude for the control eye throughout the recording period. Pooled data from 24 SKF38393 injections were normalized and results are shown in panel C of Figure 1. The maximum inhibitory effect of the DA agonist was observed two hours post-injection, with a mean reduction of $34.0\% \pm 4.1\%$ ($t_{\text{paired}} = -3.66$, $p = 0.001$). The difference in b-wave amplitude between SKF38393 and control eyes became not significant seven hour post injection ($t_{\text{paired}} = -1.94$, $p = 0.06$). This effect was observed in 23 out of 24 injection and all 24 were used for graphic and statistic. In all results presented, statistics and graph were done with all injections data.

Two SKF38393 dosages were used in the study, 0.1 and 1mg/100 μ l. When compared to the vehicle, the low concentration yielded a mean decrease of 20.3% \pm 6.1% of the b-wave amplitude, while the high concentration lead to a reduction of 34.0% \pm 4.1%. Even if only two dosages were studied, the effect of SKF38393 appears to be dose-dependent (Kruskal-Wallis, $p = 0.0001$) because increasing the concentration of the agonist yielded an increase in the strength of the reduction of the b-wave. Only the dose of 1mg/100 μ l produces an effect that was statistically significant ($t_{\text{paired}} = -3.66$, $p = 0.001$). The action of SKF38393 (1mg/100 μ l) on the ERG b-wave was comparable in all conditions of illumination (oneway ANOVA, $f_{(22,2)} = 1.51$, $p = 0.24$). The reduction of the b-wave amplitude was 26.8% \pm 8.0% ($n = 6$), 45% \pm 6.8% ($n = 10$), and 34.6% \pm 5.1% ($n = 9$) in photopic, mesopic, and scotopic conditions, respectively.

The D₁ receptor agonist A77636 had a stronger effect on the b-wave than that of SKF38393. Panel A of Figure 2 shows example of injection of A77636 at a dosage of 1mg/100 μ l (filled symbol) and from the vehicle injection in the control eye (open symbol). The agonist dramatically reduced the b-wave amplitude 60.3% after 10 hours. Panel B of figure 2, the reduction of the b-wave amplitude after the injection of 0.5mg/100 μ l were 51.0% after 3 hours. Panel C of figure 2 no reduction of the b-wave amplitude were observe following the injection of 0.2mg/100 μ l of A77636.

Pooled by dosage of the injection of A77636 on the b-wave were presented on figure 2 panel D. A77636 at a dosage of 1mg/100 μ l by 60.3% \pm 4.6% after 10 hours. The profile of the reduction indicates that the b-wave reduction was significant (Wilcoxon, $p = 0.043$) two hours after the agonist administration. No recovery of the b-wave was observed on all 5 injections despite the fact that the recordings were made up to 18 hours after the injection. Injection of 0,5mg/100 μ l of A77636 produce a reduction of 43.0% \pm 6.5% of the b-wave amplitude after 3 hours. Two out of four injections recovered after 10 hours, the two other failed to recover. Lower dosage of A77636 (0,2mg/100 μ l) produce an average reduction of 44.1% \pm 5.4% of the b-wave ($n = 2$).

Blocking the D₁ receptors with the antagonist SCH23390 (1mg/100 μ l) also produced a reduction of 28.9% \pm 8.8% of the b-wave amplitude three hours post injection (Fig 3 panel A). The amplitude of the b-wave was significantly different from that of the control eye one hour after injection (Wilcoxon, $p = 0.028$) and the reduction in signal amplitude lasted for the next 6 hours. A significant effect of SCH23390 on the b-wave amplitude was observed in 4 out of 6 injections, and all the 6 injections were used for the graphic and the statistic.

D2 receptor contribution to b-wave amplitude

Injections of the D₂ receptor agonist NPA failed to produce any significant changes in the b-wave amplitude. Panel A of figure 4 shows the outcome

of twelve injections: clearly, there was no significant difference between the b-wave amplitude of the NPA-treated and normal eye up to ten hours after the injections. Increasing or decreasing the NPA concentration yielded comparable findings. This is illustrated in the panel B of Figure 4. Varying the dosage from 0.0001 to 1mg/100 μ l failed to produce any significant changes (Kruskal-Wallis, $p = 0.12$) in the waveform amplitude (1mg/100 μ l, mean reduction of the b-wave 27% \pm 1.8% $n = 10$; 0.1mg/100 μ l, 20.4 \pm 6.5% $n = 8$; 0.01mg/100 μ l, 16.7% $n = 1$; 0.001mg/100 μ l, 22.0 \pm 1.6% $n = 4$; 0.0001mg/100 μ l, -0.08 \pm 1.8% $n = 3$). Similarly, changing the luminance conditions of the recordings did not reveal any notable physiological impact of NPA (Kruskal-Wallis, $p = 0.73$). The number of injections in the photopic, mesopic, and scotopic condition were respectively 4, 4, and 1.

A different picture emerged when the D₂ receptor antagonist sulpiride was administered (Fig 3 panel B). This ligand produced a reduction of the b-wave amplitude that lasted for more than 15 hours after the injection onset. The maximum effect was seen 6 hours post-injection and the b-wave amplitude was reduced to 40.2 \pm 4.6% of the original amplitude (Wilcoxon, $p = 0.018$).

Discussion:

The present findings indicate that retinal activity, as measured by the b-wave of the electroretinogram, is mainly modulated by the activation of D₁ rather than D₂ receptors. Changes in lightning conditions failed to produce b-wave amplitude reductions. The absence of relationship between the observed changes and the various lightning conditions in which the testing was done suggest that the effective ligands studied here were not specific to the rod or cone pathways of the retina (Fyk-Kolodziej, Qin, & Pourcho, 2003).

The administration of the D₁ receptor agonists SKF38393 and A77636 produce a significant reduction in the amplitude of the b-wave, but not of the a-wave (data not shown). These results are in keeping those of Jagadeesh & Sanchez (1981) who demonstrated that the systemic administration of apomorphine, a mixed D₁ and D₂ agonist, provoked a decrease of the ERG b-wave in the same animal model. A comparable action of apomorphine of the ERG was also described in a rabbit non-isolated eye cup preparation Textorius, et al. (1989). To our knowledge, only one study had previously investigated the impact of SKF38393 on retinal evoked potentials. In rabbits, Marmor, Hock, et al. (1988) reported that the intra muscular injection SKF38393 had very little inhibitory effects on the b-wave amplitude and oscillatory potentials. The fact that they observed a more subtle effect that we did is likely due to the difference in

the mode of administration of the ligand (intra-muscular vs. intravitreal). We are not aware of any study reporting the effect of the agonist A77636 on the retinal function. On the basis of its action on the b-wave amplitude, and long lasting effect, this ligand appears to be more potent than SKF 38393. However, since no recovery could be observed, it is possible that A77636 had toxic effects at the higher dosage we used. Our findings that a D_1 agonist can modulate the amplitude of the ERG b-wave are further substantiated by the observation that, in monkey, the administration of the D_1 agonist cy208-243 reduces the pattern ERG at low spatial frequencies (Peppe, Antal, Tagliati, Stanzione, & Bodis-Wollner, 1998). The mechanisms by which the D_1 agonist used in the present study affects the ERG remains to be determined. It is known that the b-wave reflects the K^+ -mediated depolarisation of Müller cells (Stockton & Slaughter, 1989; Newman & Odette, 1984) even though there is recent evidence that depolarizing ON bipolar cells may also directly contribute to the waveform (Xu & Karwoski, 1994). Both cell types contain D_1 receptors (Nguyen-Legros et al., 1987; Nguyen-Legros, Simon, Caille, & Bloch, 1997; Veruki & Wässle, 1996) and may therefore contribute to the effects of the D_1 agonists.

While the administration of D_1 agonists induced a decrease of the ERG b-wave, the D_2 ligand studied here (NPA) failed to produce a change in the amplitude of the ERG. This is somewhat surprising given that Müller

cells, who are implicated in b-wave genesis, possess D₂ receptor (Biedermann, Frohlich, Grosche, Wagner, & Reichenbach, 1995). It is possible that activation of these receptors yielded subtle changes that may not be seen at the level of a gross retinal response such as the ERG. Another possibility may come from the fact that the presynaptic autoreceptors are of the D₂ type. Activation of the autoreceptors would reduce the synthesis and release of the endogenous DA which normally bind to both D₁ and D₂ receptors (Stanzione et al., 1999; Bodis-Wollner & Tzelepi, 1998), masking then any effect of the ligand.

Altogether, the results of the present study suggest that the effect of apomorphine on the retinal function described by others Jagadeesh & Sanchez (1981); Textorius, et al. (1989) was very likely mediated through activation of D₁ receptors.

The intravitreal injection of the D₁ antagonist SCH23390 produced a significant reduction of the b-wave amplitude, but less pronounced than that induced by the agonist SKF38393. This result was unexpected, given the fact that it has been shown that a reduction of the retinal DA content causes an increase in the b-wave amplitude in rabbits (Olivier et al., 1986; Olivier et al., 1987; Lafond et al., 1994), and cats (Skrandies & Wassle, 1988). Intuitively, blocking the D₁ receptors should yield a reduction of the sites available for DA, and therefore mimic a decrease of DA content. Other laboratory find the same contradictory effect in rabbits, Marmor,

Hock, et al. (1988) reported that the intra muscular injection of both SCH23390 and SKF38393 reduced the b-wave amplitude. Other laboratories also found that D₁ antagonist can modulate retinal responses. Wioland, Rudolf, et al. (1990) reported that haloperidol, a mixed D₁ and D₂ antagonist, yields a reduction of the b-wave amplitude of the chicken retina in photopic conditions. In cats, the observed effect was opposite to that described above as the administration of fluphenazine (D₁ antagonist) and sulpiride (D₂ antagonist) in the isolated, arterially-perfused cat eye enhanced the b-wave amplitude (Schneider & Zrenner, 1991). In the present study, SCH23390 was administered at a single dosage of 1mg/100µl. It may be possible that at this dosage, the ligand exhibits some neurotoxicity. This assumption however can hardly be reconciled with the fact that there was a recovery of the ERG waveform following the antagonist administration. The mechanisms by which SCH23390 can modify the retinal function remains to be determined.

While the D₂ agonist NPA had no effect on the ERG, the antagonist sulpiride provoked a long-lasting reduction of the b-wave amplitude. Again, other studies revealed that D₂ antagonists can alter retinal physiology. In rabbits, (Jagadeesh, Lee, & Salazar-Bookaman, 1980) reported that the intra-venous injection of chlorpromazine increased the amplitude of the b-wave. This effect is opposite to that described in the present study. It may be due to differences in the mode of administration or in the efficacy of

each drug. In cats, the administration of sulpiride induced an increase of the b-wave amplitude in scotopic conditions (Schneider et al., 1991). This is contrary to our findings and the difference may again come from inter-species differences or from the distinct experimental approach (in vivo vs. isolated eye preparation). It is possible that the reduction of b-wave amplitude that was observed here after the administration of sulpiride may be mediated through the DA autoreceptors. Blocking the presynaptic autoreceptors could raise the synthesis and exocytose of the endogenous DA, and the released DA could then activate both postsynaptic D₁ and D₂ receptors.

In conclusion, our data further support the involvement of DA in the modulation of retinal function. It specifically showed that the dopaminergic impact on the ERG b-wave is largely mediated by D₁ receptors. Given the lack of effect of D₂ agonists, it is likely that the D₁ receptors are preferentially involved in the transmission of information within the inner and middle parts of the retina.

Figure Legends

Figure 1: A: Representative example of ERGs before and after the intra ocular injection of D₁ receptors agonist, SKF38393 at 1mg/100µl (top traces) There is a reduction of about 30% of the b-wave amplitude A total recovery was observed seven hours post-injection. Injection of sterile water in the controlateral eye failed to modify the ERG waveform (bottom traces). B: Response profile of the SKF38393 action on the ERG b-wave amplitude as function of time. Arrows indicate the time at which the ERGs presented in panel A were selected. The vertical dotted line represents the injection time. C: Results from twenty-four injections of SKF38393 (1mg/100µl) and of the vehicle were pooled together and normalized 100% represent the average level before injection. A significant decrease was observed during two hours post-injection. In this and all figures: * = $p < 0.1$, ** = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$.

Figure 2: A: Example of the effect of the administration of the D₁ agonist A77636 (1mg/100µl) by the time after injection. B: example of the effect of the administration of the A77636 (0.5mg/100µl). C: example of the effect of the administration of the A77636 (0.2mg/100µl). D: Effect of different dosage on the b-wave reduction by the A77636. This high dosage 1mg/100µl and no recovery were observed at even after 20 hour on all 5 injections. The higher dosage produces a stronger reduction of the b-wave than two lowest concentrations. Number of injection were 5 in 1mg/100µl, intermediated dosage 0.5mg/100µl n = 4 and low dosage 0.2mg n = 2.

Figure 3: A: Effects of the D₁ receptor antagonist SCH23390 (1mg/100µl). The injection of this ligand caused a significant reduction of b-wave amplitude from two to six hours post-injection. 6 injections were pooled. B: Effect of the injection of the D₂ receptor antagonist sulpiride 1mg/100µl. The ligand produced a reduction that was maximal 6 hours after injection. Number of injections: 8.

Figure 4: A: Injection of the D₂ receptor agonist Norpropylapomorphine (NPA) (1mg/100µl) failed to modify the b-wave amplitude. Number of injections was 12. B: Effect of various concentrations of NPA (1mg/100µl to 0.0001mg/100µl) on the b-wave. No dosage was shown to produce a significant change of the waveform amplitude. The number of injections is shown at the top of each bars.

References

Biedermann, B., Frohlich, E., Grosche, J., Wagner, H.J., & Reichenbach, A. (1995). Mammalian Muller (glial) cells express functional D2 dopamine receptors. Neuroreport, *6*(4), 609-12.

Bodis-Wollner, I. (1990). Visual deficits related to dopamine deficiency in experimental animals and Parkinson's disease patients. Trends Neurosci, *13*(7), 296-302.

Bodis-Wollner, I., & Tzelepi, A. (1998). The push-pull action of dopamine on spatial tuning of the monkey retina: the effects of dopaminergic deficiency and selective D1 and D2 receptor ligands on the pattern electroretinogram. Vision Res, *38*(10), 1479-87.

Boumghar, L., Marois, A., Jolicoeur, F.J., & Casanova, C. (1997). Apomorphine modifies the visual responses of cells in the rabbit's lateral geniculate nucleus. Can J Physiol Pharmacol, *75*(7), 853-8.

Corbett, M.C., Buckley, S.A., & Richards, A.B. (1994). Ibopamine: a new preoperative mydriatic for cataract surgery. Eur J Ophthalmol, *4*(1), 29-34.

Dowling, J.E., & Ehinger, B. (1978). Synaptic organization of the dopaminergic neurons in the rabbit retina. J Comp Neurol, *180*(2), 203-20.

Fyk-Kolodziej, B., Qin, P., & Pourcho, R.G. (2003). Identification of a cone

bipolar cell in cat retina which has input from both rod and cone photoreceptors. J Comp Neurol, 464(1), 104-13.

Gottvall, E., & Textorius, O. (2003). Long-term behavior and intra-individual stability of the direct current electroretinogram and of the standing potential in the albino rabbit eye. Doc Ophthalmol, 106(2), 195-200.

He, S., Weiler, R., & Vaney, D.I. (2000). Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian retina. J Comp Neurol, 418(1), 33-40.

Hebert, M., Vaegan, & Lachapelle, P. (1999). Reproducibility of ERG responses obtained with the DTL electrode. Vision Res, 39(6), 1069-70.

Huppé-Gourgues, F., Coudé, G., & Casanova, C. (2002). Dopaminergic modulation of the retinal function in rabbit [Abstract]. Association for research in vision and ophthalmology.

Jagadeesh, J.M., Lee, H.C., & Salazar-Bookaman, M. (1980). Influence of chlorpromazine on the rabbit electroretinogram. Invest Ophthalmol Vis Sci, 19(12), 1449-56.

Jagadeesh, J.M., & Sanchez, R. (1981). Effects of apomorphine on the rabbit electroretinogram. Invest Ophthalmol Vis Sci, 21(4), 620-4.

Lafond, G., Cao, W., Drumheller, A., Jolicoeur, F.B., Zaharia, M., & Brunette, J. (1994). Selective effects of retinal dopamine depletion on partial ischemia-induced electroretinographic hyperresponses in rabbits. Doc Ophthalmol, 88(1), 89-97.

Marmor, M.F., Hock, P., Schechter, G., Pfefferbaum, A., Berger, P.A., & Maurice, R. (1988). Oscillatory potentials as a marker for dopaminergic disease. Doc Ophthalmol, 69(3), 255-61.

Marshak, D.W. (2001). Synaptic inputs to dopaminergic neurons in mammalian retinas. Prog Brain Res, 131, 83-91.

Mitrofanis, J., Vigny, A., & Stone, J. (1988). Distribution of catecholaminergic cells in the retina of the rat, guinea pig, cat, and rabbit: independence from ganglion cell distribution. J Comp Neurol, 267(1), 1-14.

Newman, E.A., & Odette, L.L. (1984). Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. J Neurophysiol, 51(1), 164-82.

Nguyen-Legros, J., Durand, J., Simon, A., Keller, N., Vigny, A., Dupuy, J., & Pouliquen, Y. (1987). Persistence of retinal dopamine cells in the degenerated eye of the cave salamander, *Proteus anguinus* L. Ophthalmic Res, 19(6), 309-17.

Nguyen-Legros, J., Simon, A., Caille, I., & Bloch, B. (1997). Immunocytochemical localization of dopamine D1 receptors in the retina of mammals. Vis Neurosci, 14(3), 545-51.

Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., & Vernier, P. (1999). Dopamine receptor localization in the mammalian retina. Mol Neurobiol, 19(3), 181-204.

Olivier, P., Jolicoeur, F.B., Lafond, G., Drumheller, A., & Brunette, J.R. (1987). Effects of retinal dopamine depletion on the rabbit electroretinogram. Doc

Ophthalmol, 66(4), 359-71.

Olivier, P., Jolicoeur, F.B., Lafond, G., Drumheller, A.L., & Brunette, J.R. (1986). Dose related effects of 6-OHDA on rabbit retinal dopamine concentrations and ERG B-wave amplitudes. Brain Res Bull, 16(5), 751-3.

Oyster, C.W., Takahashi, E.S., Cilluffo, M., & Brecha, N.C. (1985). Morphology and distribution of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons in the cat retina. Proc Natl Acad Sci U S A, 82(18), 6335-9.

Peppe, A., Antal, A., Tagliati, M., Stanzione, P., & Bodis-Wollner, I. (1998). D1 agonist CY208-243 attenuates the pattern electroretinogram to low spatial frequency stimuli in the monkey. Neurosci Lett, 243(1-3), 5-8.

Schneider, T., & Zrenner, E. (1991). Effects of D-1 and D-2 dopamine antagonists on ERG and optic nerve response of the cat. Exp Eye Res, 52(4), 425-30.

Skrandies, W., & Wassle, H. (1988). Dopamine and serotonin in cat retina: electroretinography and histology. Exp Brain Res, 71(2), 231-40.

Stanzione, P., Bodis-Wollner, I., Pierantozzi, M., Semprini, R., Tagliati, M., Peppe, A., & Bernardi, G. (1999). A mixed D1 and D2 antagonist does not replay pattern electroretinogram alterations observed with a selective D2 antagonist in normal humans: relationship with Parkinson's disease pattern electroretinogram alterations. Clin Neurophysiol, 110(1), 82-5.

Stockton, R.A., & Slaughter, M.M. (1989). B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. J Gen Physiol, 93(1), 101-22.

Textorius, O., Nilsson, S.E., & Andersson, B.E. (1989). Effects of intravitreal perfusion with dopamine in different concentrations on the DC electroretinogram and the standing potential of the albino rabbit eye. Doc Ophthalmol, 73(2), 149-62.

Veruki, M.L., & Wassle, H. (1996). Immunohistochemical localization of dopamine D1 receptors in rat retina. Eur J Neurosci, 8(11), 2286-97.

Wioland, N., Rudolf, G., & Bonaventure, N. (1990). Electrooculographic and electroretinographic study in the chicken after dopamine and haloperidol. Doc Ophthalmol, 75(2), 175-80.

Xu, X., & Karwoski, C.J. (1994). Current source density analysis of retinal field potentials. II. Pharmacological analysis of the b-wave and M-wave. J Neurophysiol, 72(1), 96-105.

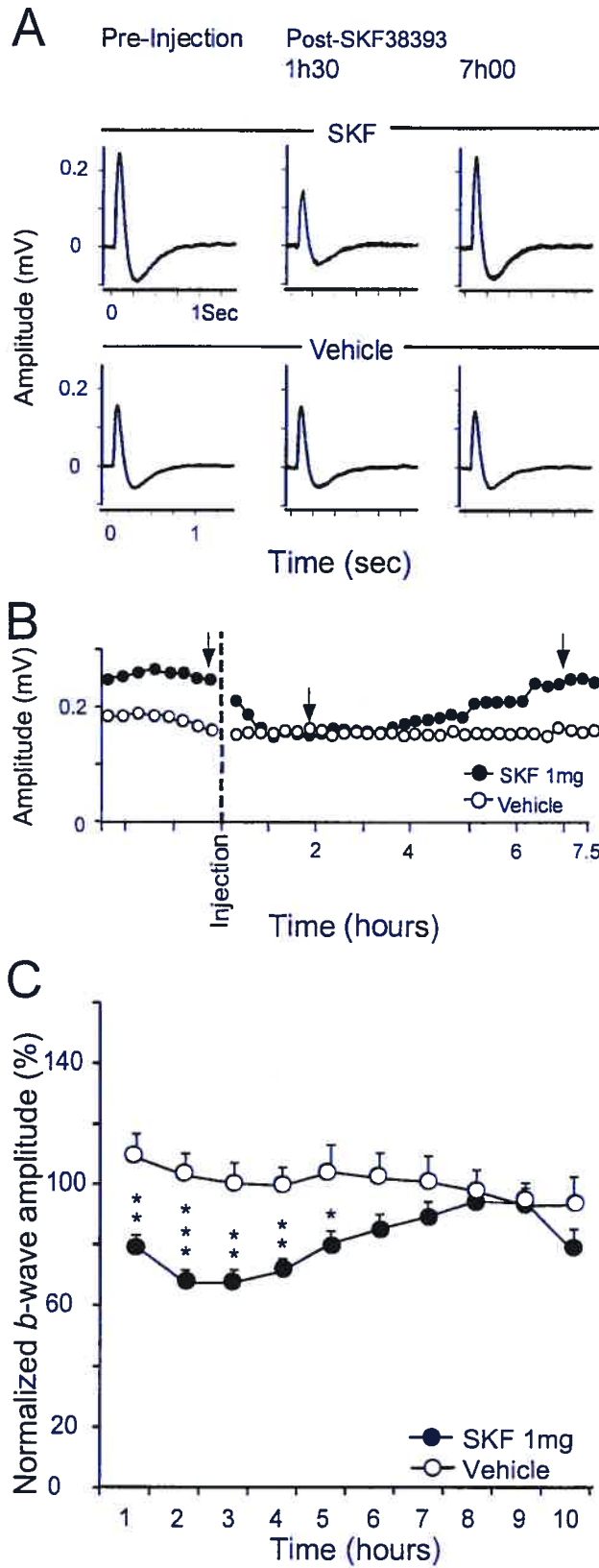


Figure 1 Huppé-Gourgues et al. 2004

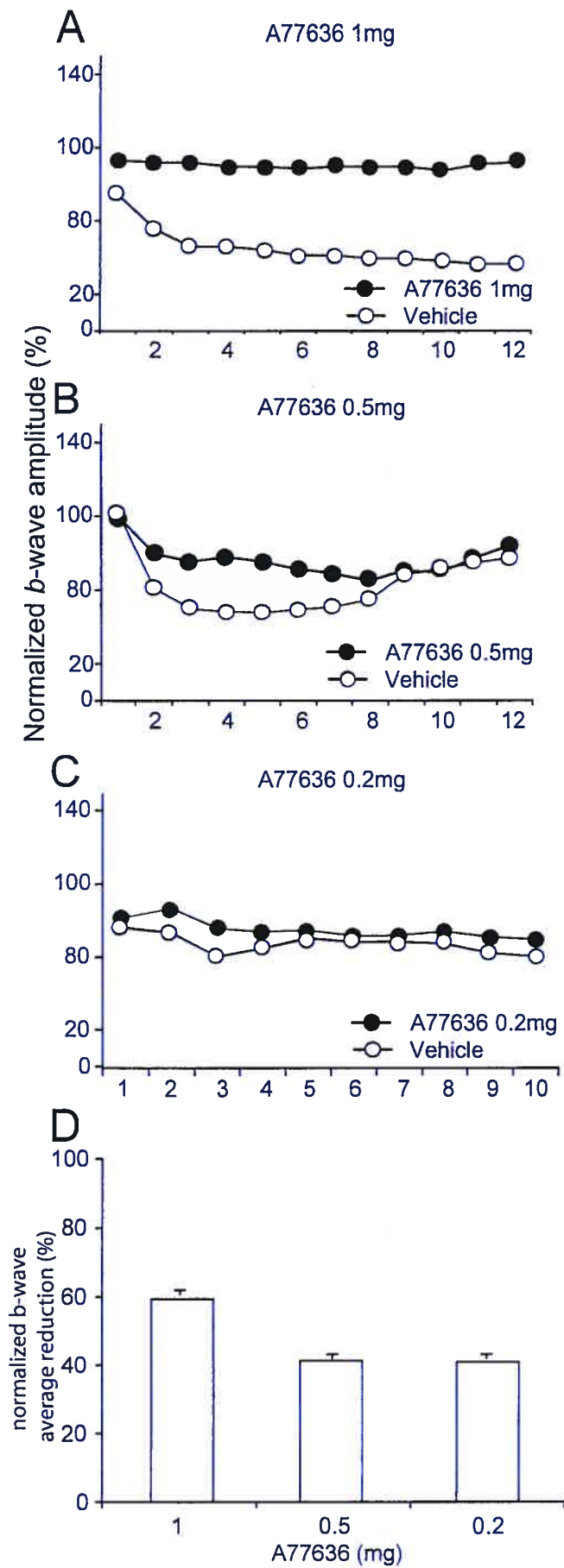


Figure 2 Huppé-Gourgues et al. 2004

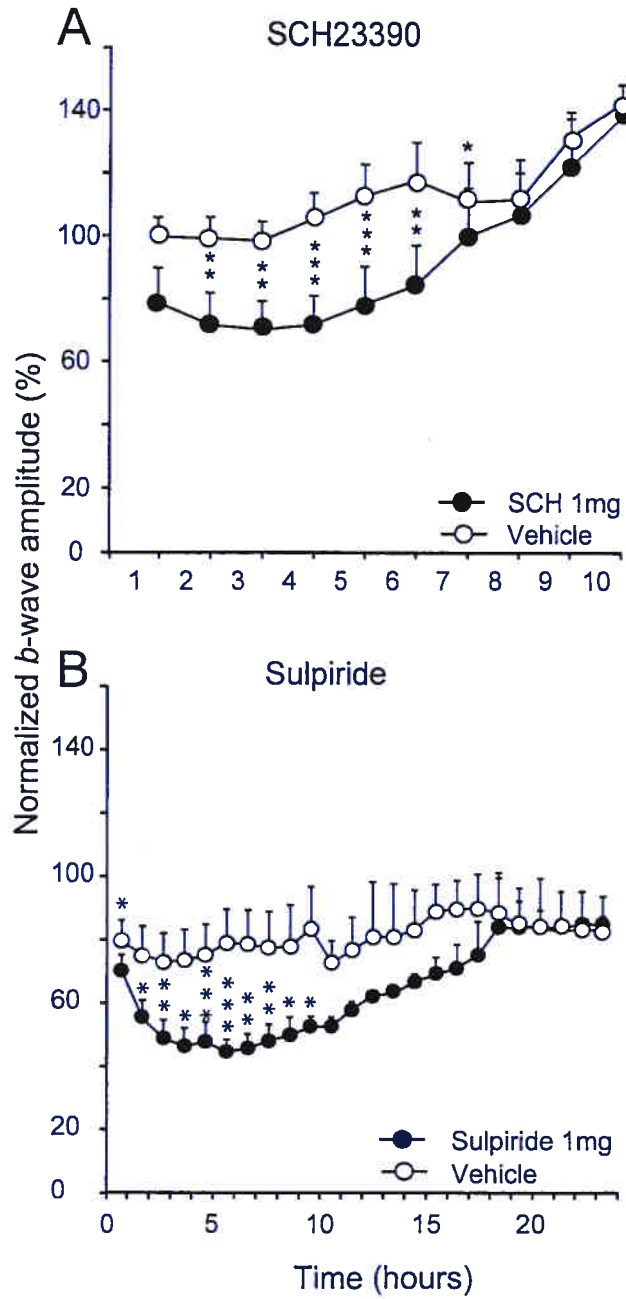


Figure 3 Huppé-Gourgues et al. 2004

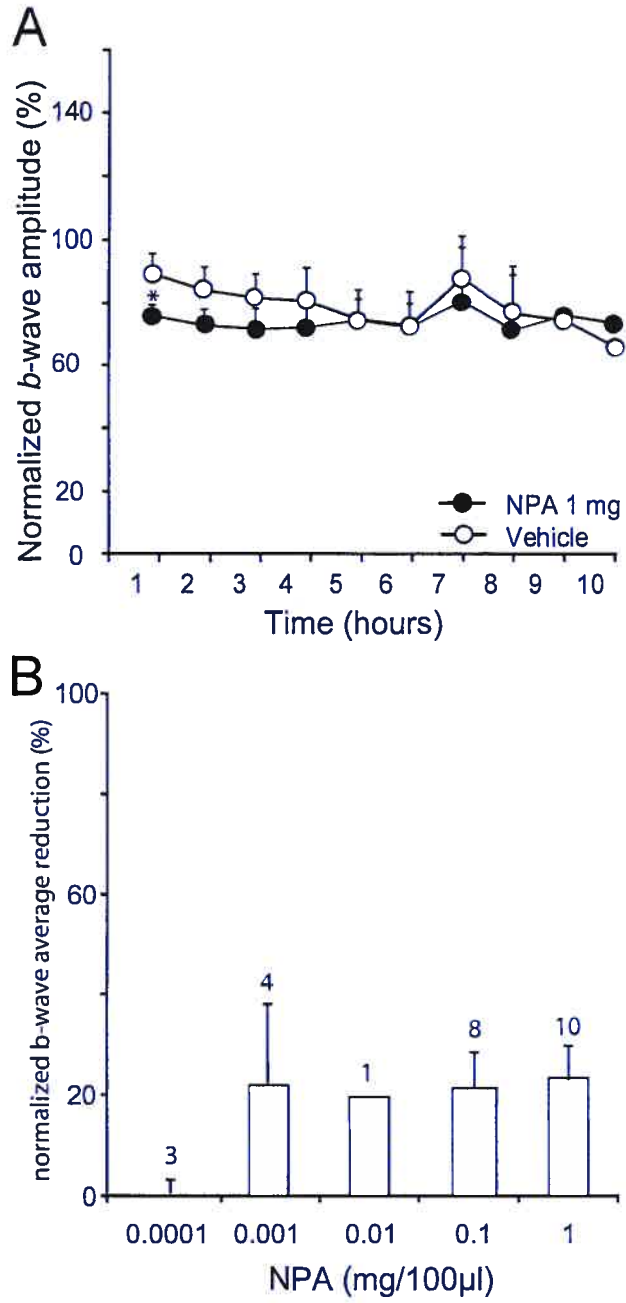


Figure 4 Huppé-Gourgues et al. 2004

Étude 3: Effects of dopamine depletion on contrast sensitivity
of cells in the lateral geniculate nucleus in cats

(sera soumis à *Investigative Ophthalmology and Visual Science*)

Effects of dopamine depletion on contrast sensitivity of cells in the lateral
geniculate nucleus in cats

Coudé, G. Huppé-Gourgues, F. Casanova, C.

Laboratoire des neurosciences de la vision, École d'optométrie,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Correspondence should be addressed to:

Christian Casanova

Laboratoire des neurosciences de la vision

École d'optométrie, Université de Montréal,

C.P.6128 Succ. Centre-Ville,

Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

Tel : 514-343-2407

Fax : 514-343-2382

e-mail : christian.casanova@umontreal.ca

ABSTRACT

Retinal dopamine contribution to contrast sensitivity in lateral geniculate nucleus (LGN) cells was measured after intravitreal injections of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in cats. Injections of 300 to 500 μ g (or vehicle only) were performed in either eye, two to five weeks before recordings. 6-OHDA produced a strong degeneration of the dopaminergic amacrine cell (DA-AC) network as revealed by tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-IR). Control measurements of DA and DOPAC levels in retinas showed a decrease of those neurochemicals after 6-OHDA-treatment. However, as opposed to what was expected from the role of DA, the electroretinogram (ERG) b-wave amplitude was not consistently increased in 6-OHDA-treated retinas with respect to vehicle-treated. Our results show that neither spatial resolution (spatial frequency high cut-offs), nor contrast sensitivity (Contrast Sensitivity Function (CSF) and C_{50}) were affected by DAergic cell network degeneration. The CSF and C_{50} of a subset of cells from animals having a 75% retinal DOPAC depletion in 6-OHDA-treated retina were not significantly different from vehicle-treated. We could not demonstrate that retinal DA is involved in the CSF of LGN neurons in cats.

INTRODUCTION

Dopamine (DA) is an important neurotransmitter of the vertebrate retina, and much is known about the localization of its receptors (Nguyen-Legros et al., 1999), as well as the morphology of dopaminergic (DAergic) cells (Witkovsky and Schutte, 1991). In mammals, DAergic cells are amacrine and/or interplexiform cells, and both types are located in the proximal part of the inner nuclear layer (INL) (Dowling and Ehinger, 1978; Pourcho, 1982; Oyster et al., 1985). They predominantly branch in the most distal stratum of the inner plexiform layer (IPL) (Nelson and Kolb, 1983), with processes reaching the outer plexiform layer (OPL) (Witkovsky et al., 1991; Marshak, 2001). DA receptors are found on each class of neurons in the retina (Nguyen-Legros et al., 1999), and it is generally considered that DAergic transmission does not act on a regular one on one basis, but rather in a paracrine fashion (Bjelke et al., 1996; Nguyen-Legros et al., 1999; Contini and Raviola, 2003).

DA is involved in various retinal processes such as renewal of photoreceptors outer segments and retino-motor movements, a (Djamgoz and Wagner, 1992; Witkovsky and Dearry, 1992, for reviews). One of its most documented roles, across several vertebrate species, regards light adaptation. DA takes part in the complex task of

adapting contrast detection to the changing background light intensity (Marshak, 2001, for review). Although most of the mechanisms by which this process takes place remain unknown, DA appears to change the weight on certain synapses both in the OPL and IPL in response to variations in ambient light. Thus, DA modulates horizontal cell coupling (Hampson et al., 1994; He et al., 2000) which, in turn, is linked to the center-surround antagonism of bipolar cells mediating contrast sensitivity. DA also reduces directly the light response of bipolar (Yazulla et al., 2001) and ganglion cells (Jensen and Daw, 1986), and exerts indirect effects through circuits involving amacrine cells. Evidence suggests that the net effect of DA is to enhance the cone pathway activity in the OPL, while suppressing the rod pathway activity in the IPL (Maguire and Hamasaki, 1994; Marshak, 2001).

It has been hypothesized that retinal DA may be necessary to establish normal Contrast Sensitivity Function (CSF) of neurons in humans and animals (Bodis-Wollner, 1990). We examined the effect of retinal DA depletion on contrast sensitivity of lateral geniculate nucleus (LGN) cells. We examined the correspondence between the chemical, neuroanatomical and functional markers of DAergic network degeneration. Parts of these findings have been presented in abstract form (Coudé et al., 2002; Casanova and Coudé, 2003).

METHODS

Animals

Experiments were conducted on 17 normal adult cats of either sexes weighting between 2.5 and 4.5 kg which were treated in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Fifteen animals were submitted to the injection procedures described below. A second animal underwent retinal detachment after the intravitreal injections of a high dose of 6-OHDA and was euthanized. All animals were fed *ad libitum* and were subjected to a 12h light/dark cycle.

Intravitreal injection procedures

The animals were premedicated with a subcutaneous injection of acepromazine maleate (Atravet™ 10 mg/ml ; 0.05 ml/kg ; Ayerst Veterinary Laboratories, Guelph, ON, Canada) and atropine (0.4 mg/ml ; 0.1 ml/kg ; Sabex, Inc., Boucherville, QC, Canada). Thirty minutes following the injection, the animals were anaesthetised by inhalation of a mixture of halothane 5% (MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON, Canada) and O₂/N₂O in a 50:50 ratio. Halothane volume was gradually reduced and maintained at 2% during the intravitreal injections *per se*. Depth of anaesthesia was monitored by the absence of response to the inter-digital web pinching of the rear limbs. EKG and O₂ blood saturation were monitored using an oxygen saturation meter (Model 8500, Nonin Medical, Inc., Plymouth, MN,

USA). Few minutes before intravitreal injections, both phenylephrin hydrochloride (Mydrin® 2.5% ; Alcon Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) and ophthalmic proparacaine hydrochloride (0.5% ; Alcaine®, Alcon Canada, Inc., Mississauga, ON, Canada) were instilled to retract nictating membranes and induce topical analgesia, respectively. 6-OHDA (2,4,5-trihydroxyphenethylamine ; 150-250 µg/100µl ; Sigma Chemical Co, St-Louis, MO, USA) and ascorbic acid (AA ; L -ascorbic acid; 300 µg ; Sigma Chemical Co, St-Louis, MO, USA) were dissolved into phosphate buffered saline and mixed together. A 25-gauge winged needle infusion set filled with the mixture was used to inject the solution into the vitreous, through the sclera at a site located 4-5 mm posterior to the limbus. Both eyes were injected, one with the toxin, the other with the vehicle only (PBS and AA). This procedure was repeated two days later with the same dosage for a total injected quantity of 300 to 500 µg of 6-OHDA. Drops of antibiotic (Polysporin®, Pfizer Canada, Inc., Toronto, ON, Canada) were topically administered after the injections, prophylactically. A rest period of two to five weeks separated the injections from the physiological recordings.

Physiological recording preparation

Animal anaesthesia was induced using the afore-mentioned method. Following cephalic vein canulation and tracheotomy, myorelaxation was induced with gallamine triethiodide (2%; Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) for stabilizing eye position. Lidocaine hydrochloride

(Xylocaine® 2%, Astra Pharma, Inc., Mississauga, ON, Canada) was injected at each cut or pressure point. The animal was placed in a stereotaxic frame (Kopf) and artificially ventilated with a respiratory pump (model 6025, Ugo Basile, Comerio, Italy). The anesthetic mixture was made of O₂/N₂O (33/66%) and 0.5% halothane. End tidal CO₂ was analysed with a capnometer (Datex-Engstrom Division, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finland) and maintained between 28 and 32 mmHg by adjusting the stroke volume and respiratory rate. During the recordings, animal core temperature was maintained between 36.5 and 37.5 °C with a heating pad and a thermic probe feedback. EEG and EKG were monitored and a continuous infusion of lactated Ringer solution containing gallamine was provided by a syringe pump (Model A-99, Razel Scientific Instruments, Inc., Stamford, CT, USA). Mydriasis was obtained by topical instillation of atropine sulfate (Isopto® atropine, Algon Canada Inc., Mississauga, ON, Canada) and nictating membranes were retracted with phenylephrin hydrochloride.

ERG recordings

For all animals, the ERG was recorded from the treated and the normal eye using Jet-type electrodes (Universo S.A., Switzerland) on both corneas. Nine animals were tested in photopic, three in mesopic conditions and one in both conditions. Two subdermal electrodes were positioned at each canthi and on the back of the skull to serve as ground and reference, respectively. The signals were amplified (P511,

Grass, West Warwick, RI), and band-pass filtered between 1 and 1000 Hz, following ISCEV guidelines. They were then fed to an analogue-digital interface (1401plus, CED, Cambridge, UK), and data acquisition was made using Signal software (v. 2.0x, CED, Cambridge UK). Carboxyl methylcellulose sodium (Celluvisc®, Allergan xx) was used liberally to protect the cornea from desiccation. Visual stimulation consisted of a series of flashes (PS33plus, Grass, West Warwick, RI) of different intensities. In mesopic conditions, flash intensity was 0.1 to 16cdm^{-2} , with a background luminance of 13cd/m^2 . In photopic conditions, flash intensity was = 0.1 to 16cdm^{-2} , at 80% of the b-wave amplitude saturation point. In both conditions flashes were presented at a frequency of 0.2 Hz (Grass photostimulator) in photopic and mesopic conditions. ERG responses were averaged 10 times. Half ping-pong balls were placed in front of the eyes to create a Ganzfeld like stimulation. The animals were adapted to luminance conditions for 30 min prior to ERG recordings.

Single unit recordings in LGN

Craniotomies were performed bilaterally at Horsley-Clarke coordinates anterior: 3–9 and lateral: 7–13. The cortex was covered with warm agar and melted wax (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) in order to create a sealed chamber. Varnished tungsten microelectrodes (A&M Systems, Carlsborg, WA, USA; impedance between 1.5 and $5.0\text{m}\Omega$) were used to record extracellular single-unit activity in the LGN. An

hydraulic micro-drive (model 50-11-5, FHC, Inc., Bowdoinham, ME, USA) was used to lower the electrode in the brain. Neuronal activity was amplified (amplifier model P511, Grass Telefactor; Astro-Med, Inc., West Warwick, RI, USA) displayed on an oscilloscope, and played through an audio monitor. A window discriminator (model 121, WPI, inc., Sarasota, FL, USA) was used to isolate single units from the overall signal and the waveform of the action potentials were routinely examined. Digital signals were then fed to stimulation-acquisition software (Visual Stimulation; v1.72 CED, Cambridge, UK) via an analog-digital interface (CED 1401 plus). The response for each stimulus condition was recorded as a peri-stimulus time histogram (PSTH) (bin width of 10 ms), calculated as mean discharge for 5 runs and was analyzed off-line. Recording for a single trial occurred over a 4 sec period. Fast Fourier Transform (FFT) was performed on the histogram to determine the amplitude (in impulse s^{-1}) of the response frequency. The latter was calculated from all 400 bins and averaged over several (minimum of 4) presentations.

Visual stimulation

Units were first activated by stimulating the binocular visual field with light bars using a hand held light stimulator. Receptive fields were mapped by hand on a tangent screen subtending $80^{\circ} \times 107^{\circ}$ of visual angle, using an ophthalmoscope that could present circles up to 12° in diameter. Visual stimulation was generated by the Picasso Image

synthesizer (Picasso, Innisfree, Cambridge, MA, USA), controlled by the software package Visual Stimulation (VS) v1.72 (CED, Cambridge, UK). Stimuli were presented on a CRT (5117, Data Check, Van Nuys, CA, USA; mean luminance 14 cd/m²) placed 57 cm in front of the animal. The screen subtended 28°×28° of visual angle and stimuli covered the entire screen. The CRT was positioned so that its center was aligned with the receptive field center of the recorded unit.

Measurement of spatial contrast sensitivity

Stimuli used were counterphased and drifting sinewave gratings of varying spatial frequencies and contrast levels were used. Contrast levels were defined as follow:

$$C = \frac{L_{\max} - L_{\min}}{L_{\max} + L_{\min}}$$

Where, L_{\max} and L_{\min} are maximum and minimum luminances of the pattern, respectively. Contrast sensitivity is usually defined as the reciprocal of the contrast level required for the detection of gratings. The range of contrast used to test the LGN cells was from 1 to 100%. Responses to various contrast level were first best fitted with Naka-Rushton function:

$$r(c) = R_{\max} \frac{c^n}{c^n + c_{50}^n}$$

where R_{\max} is the maximum response, c is the contrast, C_{50} is the contrast at half of R_{\max} , and n is a nonlinearity coefficient. Cell responses showing a fit deemed unsatisfactory ($R^2 < 0.65$) were rejected from the analysis. This was usually due to a low response level. An example of cell response to contrast fitted to Naka-Rushton function is given in **Fig 1A** with a depiction of C_{50} values extraction. The method for determining contrast threshold was the same as used by Troy (1983a; 1983b). Contrast thresholds were based on the first component of the Fast Fourier Transform (FFT1) of the spontaneous cell activity. Means and standard deviations of the FFT1 on the spontaneous activity of each cell were measured for at least 12 periods of 4 sec each, and sampled over 1 to 2 hours. The response threshold was determined as the mean FFT1 value plus two standard deviations. Each cell was tested for contrast at a range of spatial frequency determined by its response preference (8 to 10 values ranging from 0.5 to 2.25 c/deg). The CSF for each geniculate cell is the reciprocal of the contrast threshold for all spatial frequencies at which the cell was tested. We fitted the CSF of each cell to the Difference Of Gaussians (DOG) function (Enroth-Cugell and Robson, 1966) (see example **Fig. 1B**):

$$S(\nu) = \left(K_c \pi r_c \exp\left(-(\pi r_c \nu)^2\right) \right) - \left(K_s \pi r_s \exp\left(-(\pi r_s \nu)^2\right) \right)$$

where S is the contrast sensitivity for a spatial frequency ν , K_c and K_s are peak sensitivities for centre and surround, and r_c et r_s the radii of center and surround, at which sensitivity has fallen to $1/e$ of the peak value. Again, cells showing an inadequate fit ($R^2 < 0.65$) were discarded from the analysis.

Differentiation of cell types

X- and Y-cells were differentiated using the fact that the second harmonic component dominates the responses of Y-cells to contrast-modulated gratings of high spatial frequency (Hochstein and Shapley, 1976).

Retinal tissue preparation

The animals were euthanized with a bolus injection of pentobarbital (0.5 ml/kg). The eyes were rapidly removed and hemisected 2 mm behind the limbus in order to remove the anterior segment. Each Retina was cut in half (a nasal and a temporal part). On ice, the temporal half-retina and the choroid were first separated from the sclera, then the retina was gently peeled from the choroid with a brush. The retinal tissue was kept in microcentrifugal tubes and stored at -80°C until the HPLC assays were conducted. The other half (nasal) retina was placed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 2 h at 4°C . The choroid membrane was detached from the retina and the pigment epithelium was removed by brushing the distal part of the retina. The

retina was cryoprotected with a 5% sucrose solution for 24 h, treated through a freeze-thaw procedure and mounted on a slide for whole-mount immunocytochemical labelling procedures.

Tyrosine hydroxylase immunostaining

Tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining was performed using the avidin-biotin-peroxydase complex (ABC) method. Briefly, the whole mounted half-retina was incubated in the following order: 1) in 2.5% normal goat serum (NGS; Sigma Chemical, St-Louis, MO, USA) in PBS containing 1% triton X-100 for 10 min at room temperature in order to block non-specific binding activity, 3) in rabbit polyclonal antibodies against TH (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) diluted 1:1000 in PBS containing 1% NGS and 1% Triton X-100 for 24 h at 4°C, 4) in biotinylated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA; diluted 1:100) in PBS for 72 h at room temperature, 5) in ABC solution (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in PBS for 30 min at 4°C and 0.0025% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) in PBS containing 0,004% of H₂O₂ for 5 min. After 2-5 min, as determined by the degree of staining, the reaction was stopped with several washes of PBS. The retina was mounted onto a gelatine-coated slide with the ganglion cell layer facing up, and coverslipped with depex.

Retinal dopamine assays

DA and DOPAC were assayed using the technique described by (Ste-Marie, Boismenu, Vachon, and Montgomery, 1996). Briefly, the chemicals were quantified by HPLC (Waters 600MS; Waters, Mississauga, Ontario, Canada) with coulometric electrochemical detection (Coulchem II model 5100; SPE, Concord, Ontario, Canada). Concentrations of metabolites in microdialysis samples were reported without correction for individual probe recoveries. Peak areas were integrated and the area ratios of sample to standard were plotted versus known concentrations. Regression equations calculated from these standard curves were used to determine the chemicals' concentration in the samples. The levels of DA and metabolites were quantified in picomole per milligram of tissue and compared between toxin- and vehicle-treated retinas.

Histology

Electrolytic lesions were made along all recording tracks in the LGN. At the end of the experiments, animals were euthanized. Brains were cut in blocks in the stereotaxic apparatus and then removed and placed in 4% PFA. Frozen serial sections of the thalamus were cut in a coronal plane at a thickness of 40 μ m. Cresyl Violet stain permitted the distinction of geniculate layers. The exact position of electrode tracks was verified to be in the LGN.

Experimental protocol

Two to five weeks post-injection, all animals were prepared for single-cells recording as stated previously and the ERG was first recorded for both eyes at various flash intensities to determine if 6-OHDA has affected normal retinal processing. ERG jet were then removed and contact lenses of appropriate refractive power were palaced. Single units from LGN were isolated, their response properties characterized and their contrast sensitivity measured. After the last recording, the animal was killed. The eyeballs were isolated and retinas dissected for HPLC analysis, retinal wholemounds staining and detection of gross abnormalities of the eye structure. Finally, histology of the brain was performed to confirm brain recording sites.

RESULTS

Effect of 6-OHDA on TH-immunoreactive cells

Intravitreal injection of 6-OHDA in 13 cats produced consistent effects on the retinal network. DAergic cells in all retinas treated with 6-OHDA showed marked signs of degeneration. Representative examples of saline- and 6-OHDA-treated retinas are shown in **Fig. 2**. The 6-OHDA treated retina of this animal was injected with a total of 300 μ g. The saline-treated retina (**Fig. 2A and 2B**) has a normal DAergic cell network, with a dense plexus of processes and characteristic ring-endings (empty arrows). In the 6-OHDA-treated (**Fig. 2C and 2D**),

strong degeneration signs can be seen in DAergic cells. The thin processes, including the ring endings disappeared, only the major dendrites are still visible. The TH-immunoreactive (TH-IR) plexus and the characteristic ring-endings almost disappeared in 12 out of 13 retinas. However, in all 13 retinas, the fine processes had vanished and thick only varicose swellings were apparent (filled arrows). These typical signs of neuronal degeneration suggest that the 6-OHDA injections were effective. Overall the very same degeneration characteristics were seen in each of the 13 cases.

The endogenous dopamine content

For a subgroup of eight animals, DA and DOPAC contents were assayed in half retinas from both eyes (temporal part) to further characterize the impact of the toxin. Results of HPLC analysis are shown in **Table 1**. The mean DA and DOPAC content expressed in pg/mg of tissues were 65.1 ± 12.1 and 10.1 ± 2.7 , respectively in the saline retinas. The 6-OHDA treated retinas show a DA and DOPAC content of 25.3 ± 4.4 and 3.7 ± 1.2 , respectively. Mean percent reduction in DA and DOPAC content in the 6-OHDA- retina with respect to saline-treated were 60.0 ± 8.6 and 65.4 ± 10.1 , respectively. The difference in DA and DOPAC concentrations between the two eyes were significant ($p = 0.016$ and $p = 0.008$, respectively; Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks test). DA content of 6-OHDA-treated retinas was reduced by more than 58% in 5 retinas. According to the

DOPAC level, which is the best indicator of DA catabolism, DA depletion was high (over 69% reduction) in six retinas and moderate (37.5% reduction) in one. This is in accordance with the strong degeneration of the DAergic cell network described above, since each animal in this subgroup showed an evident loss of the dense plexus TH-labelling. However, in one retina the DOPAC reduction was low (7.1%). In this latter case, the DA cell network was perhaps less affected than the other 6-OHDA-treated retinas, as TH-IR labelling showed some ring-endings despite obvious signs of degeneration.

Electroretinogram

In order to functionally assess the extent of 6-OHDA-induced DAergic retinal lesions, we recorded the ERG of both the 6-OHDA-treated and the saline eye before the LGN recording sessions. In most cases, there was an increase in the ERG b-wave amplitude for the 6-OHDA-treated eye. The example of photopic ERG recording in **Fig. 3A** displays the often reported b-wave amplitude increase in the 6-OHDA treated retina (top wave) when compared to the saline-treated retina (bottom wave). **Fig. 3B** shows the ratio of the b-waves amplitude for each animal (6-OHDA / saline). In photopic condition, most animals have an increased in the b-wave amplitude. In mesopic conditions, only two animals out of four showed an increased in b-wave amplitude. The effect of intravitreal 6-OHDA administration on ERG was sometimes inconsistent with either the anatomical degeneration of DAergic cells or the amount of retinal

DA and DOPAC (**Fig. 3**). Six out of eight animals submitted to TH-labelling, HPLC and electroretinogram showed signs of DA from all three methods. **Fig. 4** shows example of such a case. In two animals, the b-wave amplitude for the 6-OHDA- and saline-treated retinas did not match the neuroanatomical and HPLC results.

LGN recordings

Receptive fields mapping and spatial frequency tuning were obtained for 113 LGN cells. From this number, 44 and 69 cells were from saline-treated and 6-OHDA-treated eyes, respectively. For 97 of the 113 cells, a test for X- or Y-type cell response profile was performed, and only 7 cells were identified as Y-type. Only data for the 90 X-cells (40 saline and 50 6-OHDA) will be presented in the results.

Receptive field eccentricity

We measured receptive field eccentricity for It is known that cells having receptive fields in central and peripheral retina do not have the same contrast sensitivity and do not respond to the same range of spatial frequency (Pasternak and Horn, 1991). Thus it is reasonable to suppose that they may not have the same dependence on DA for establishing normal CSF either. In order to control for the possible bias of receptive field eccentricity, we conducted separate analysis for cells with receptive fields in the central (0-5°) and peripheral retina (5 to 34°).

Contrast Sensitivity Function

We tested the Contrast Sensitivity Function of 63 X-type cells. We compared the contrast sensitivity of cells driven from the saline- and 6-OHDA-treated eyes for a total of 30 and 33 cells, respectively. The statistical comparison (t-tests) was completed for each spatial frequency tested (from 0.5 to 2.2 c/deg, i.e. each point on the curves). The CSFs of the two groups were not significantly different at any spatial frequency (**Fig. 6A**). Again, we divided our sample in two groups; i.e. cells with central receptive fields (central retina; **Fig. 6B**) and cells with more peripheral ones (peripheral retina; **Fig. 6C**). There were no significant differences within these two subdivisions of our samples.

The extent of DA network degeneration being not the same for each animal, we considered separately a subgroup of most severely affected retinas. Perhaps a strong depletion of DOPAC is needed to see any effect on LGN cells. As previously stated the degeneration of the DA cell network in all 6-OHDA-treated retinas was anatomically confirmed, yet the HPLC analysis showed that they were affected to various degrees. Therefore we performed analyses on subgroups of cells from the most severely affected animals, i.e. having a retinal DOPAC reduction over 75%. The CSFs for these cells are shown in **Fig. 8A**

and their comparison yields no significant difference (6-OHDA: $n = 8$, and saline: $n = 11$).

Contrast response to counterphased gratings

Counterphased gratings allows one to reduce the impact of motion on contrast sensitivity. Contrast semi-saturation (C_{50}) was compared between saline and 6-OHDA groups. **Fig. 7** shows the mean C_{50} values for drifting gratings presented at various contrast levels. We first grouped all the cells (**Fig. 7A**), and no significant difference was observed between the means (saline: 0.25 ± 0.02 , $n = 35$; 6-OHDA: 0.26 ± 0.02 , $n = 44$; $p = 0.65$, t -test). As previously done we then separated our samples in two, according to the eccentricity of the cells receptive fields. There was no significant difference within the central retina (**Fig. 7B**; saline: 0.23 ± 0.01 , $n = 11$; 6-OHDA: 0.28 ± 0.02 , $n = 17$; $p = 0.32$, t -test) or at peripheral retina (**Fig. 7C**; saline: 0.26 ± 0.02 , $n = 24$; 6-OHDA: 0.26 ± 0.02 , $n = 27$; $p = 0.92$, t -test). Likewise, we examined the C_{50} for contrast modulated counterphased gratings, and no significant difference was found when all the eccentricities were put together (saline: 0.32 ± 0.03 , $n = 17$; 6-OHDA: 0.33 ± 0.03 , $n = 13$; $p = 0.87$, t -test) or split in groups (central retina : saline: 0.31 ± 0.05 , $n = 4$; 6-OHDA: 0.36 ± 0.03 , $n = 7$, not tested due to low sample size; and for peripheral retina: saline: 0.32 ± 0.03 , $n = 13$; 6-OHDA: 0.28 ± 0.06 , $n = 6$; $p = 0.45$, Mann-Whitney rank sum test - data not shown)

Spatial frequency high cut-offs

Spatial resolution of LGN cells was compared by means of spatial frequency high cut-offs. In **Fig. 5A**, The mean values for saline- and 6-OHDA-treated cells are given (0.61 ± 0.053 , $n = 40$ and 0.60 ± 0.055 , $n = 50$). The two groups were not found significantly different ($p = 0.76$, Mann-Whitney rank sum test). Comparison amongst cells with central receptive fields did not yield a significant difference, (**Fig. 5B**; saline: 0.76 ± 0.09 , $n = 13$; 6-OHDA: 0.78 ± 0.11 , $n = 18$; $p = 0.25$), neither did the comparison for peripheral receptive fields (Saline: 0.53 ± 0.063 , $n=27$; 6-OHDA: 0.54 ± 0.049 , $n = 32$; $p = 0.95$).

We compared the spontaneous activity and maximum discharge rate of cells at 100% contrast for saline- and 6-OHDA-treated retinas without finding any significant differences. Similarly, separate analyses on ON- and OFF-center cells did not yield significant differences. We wanted to verify if the cells in our saline injected group had normal properties as they should. Thus, we used two additional not injected animals for comparison with our saline-treated group. There was no significant difference between the CSF, high cut-offs and C_{50} for drifting gratings for these two groups.

The C_{50} values were also measured for 15 6-OHDA and 11 saline cells from these most affected animals, but again, no significant difference was found (saline: 0.22 ± 0.08 , and 6-OHDA: 0.22 ± 0.09 , $p = 0.93$,

Mann-Whitney test). For the sake of clarity, only fitted data to Naka-Rushton curves are shown ($R^2 > 0.85$). We also measured the C_{50} values for cells coming from the three animals having a DOPAC depletion of 80% and more (i.e. 89%, 86% and 82%) and found no difference between the saline (0.19 ± 0.16 , $n = 9$) and treated groups (median 0.21 ± 0.31 , $n = 8$) ($p = 0.41$; Mann-Whitney Rank sum test; results not shown).

DISCUSSION

A bulk of data links retinal DA to contrast sensitivity. We induced retinal DA depletion in cats with 6-OHDA and measured contrast sensitivity of LGN cells. Despite obvious neuroanatomical, neurochemical and functional signs of DAergic cell network alteration in the retina, neurons in the LGN showed no change in contrast sensitivity.

Dopaminergic cell network degeneration

Our results showing that DAergic cell network is strongly affected following 6-OHDA injections in cat are in agreement with previous studies. In the same species, Skrandies and Wässle (1988) reported degeneration signs very similar to those reported in the present research, namely the disappearance of the dense network of fine processes including ring-endings and apparition of thick varicose

swellings on the remaining bigger processes. In primate retina, Angulo et al., (Angulo et al., 2003) also described degeneration of DAergic processes as having comparable features, even though the toxin used was MPTP. Thus, it appears that the characteristics of DA cell lesions obtained with 6-OHDA are not exclusive to the toxin, but might rather reflect the general attributes of degeneration encountered in diseases involving DAergic cell degeneration.

DA and DOPAC assays

Results from HPLC analyses were in agreement with the data showing that 6-OHDA injections lowered the DA and DOPAC content of the retina in rabbits (Olivier et al., 1986; 1987) and cats (Maguire and Smith, 1985). These results are also coherent with the human data showing that PD patients present a diminution of retinal DA when compared to normal subjects (Harnois and Di Paolo, 1990). However, the amounts of DA and DOPAC found in the present research are very low (see **Table 1**) when compared to those reported in the literature. Maguire and Smith (1985) and Vaughn et al., (1989) reported the mean normal DA and DOPAC levels, in cat retina, to be about 10 to 50 folds higher than those found in the present study. The concentrations of DA obtained in rabbits are also two to five times higher than ours (Olivier et al., 1986). The discrepancies between our results and those in previous studies could not be explained by differences in light stimulation received by the animals in the short period preceding the

enucleation, since the lightening conditions were similar to those described by Vaughn et al., (1989). Moreover, DA liberation was insured by the fact the lights were on at that time. These differences may be better explainable by the fact that for 72h prior to the retinal collection, the anaesthetised and paralysed animals were submitted to abnormal light stimulation (gratings during electrophysiological recordings) interleaved with periods of dim light (during search and isolation of units). Since DA release is known to be at its lowest in low mesopic conditions (Marshak, 2001), this light stimulation profile could cause the DA release to be at its minimum. In addition, halothane and isoflurane (the anaesthetics used in our experiments) were recently revealed to affect D₂ receptors (Seeman and Kapur, 2003). It is possible that anaesthetics stimulated D₂ receptors and reduced DA synthesis. To our knowledge, no studies have examined DA and DOPAC contents in conditions similar to those characterizing our experiments.

ERG recordings

Our results show that 6-OHDA injected retinas generally display an increase of the b-wave amplitude. For seven out of ten cases in photopic conditions and in two out of four cases in mesopic conditions the 6-OHDA-treated eye presented a b-wave bigger amplitude than the saline-treated one. ERG components have been reported to be affected by DA in mammals. In dark-adapted rabbits, systemic injection

of the mixed D_1/D_2 receptors agonist apomorphine decreased the b-wave amplitude (Jagadeesh and Sanchez, 1981), as did the intraocular administration of DA (Gottvall and Textorius, 2003). Conversely, an increase of the b-wave amplitude was obtained with cat eyes arterially perfused with DA-antagonists fluphenazine, haloperidol and sulpiride (Schneider and Zrenner, 1991). Destruction of the retinal DA cell network by the neurotoxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) also increased the a and b-waves amplitude in dark-adapted rabbits (Olivier et al., 1986). The model generally accepted for the DAergic function (Lin and Yazulla, 1994; Marshak, 2001) states that DA dampens the ON-center bipolar cells depolarisation, both directly and indirectly. In a normal retina, light would induce the release of DA, which mediates the transition from scotopic to photopic vision by reducing photosensitivity and therefore the b-wave amplitude. Correspondingly, DAergic transmission blockage or depletion would trap the retina in the dark-adapted and thus produce an increased b-wave response. Our results show that 6-OHDA injected retinas displayed an increase of the b-wave in 7 out of ten cases in photopic conditions and in two out of four cases in mesopic conditions. Perhaps the discrepancies between the studies which have found reliable b-wave amplitude increase and those which did not could be related to species differences (Maguire et al., 1985; Skrandies et al., 1988). The b-wave amplitude increase was often found in diurnal animals such as rabbits (Olivier et al., 1986; Olivier et al., 1987) and macaques (Ghilardi et al., 1989) may be less reliable in a

nocturnal animals such as cats. This hypothesis is, however, hard to reconcile with the fact that the endogenous DA is light-released in mammals, including cats.

We used ERG because it allows a functional assessment of the retinal functions *in vivo*, before recording sessions in the LGN. The lack of correspondence between the ERG response, on the one hand, and TH-labelling and HPLC, on the other hand, strongly suggests that ERG's b-wave cannot be used as a predictor 6-OHDA-induced cell degeneration. The ratio of the b-wave amplitude (6-OHDA/ saline-treated) was variable and often inconsistent with DA depletion (**Fig. 3B**) and thus the ERG cannot be used as a tool to determine the presence of DAergic cell damage. To our knowledge, no studies examined the correspondence between retinal functions (ERG), structural changes (TH-IR cells), the concentration of DA and its metabolites and the DAergic cell network degeneration. Immunostaining labelling of TH-IR DAergic cells seems the most sensitive method for detecting the 6-OHDA effects.

LGN cell response

The primary goal of this study was to compare the Contrast Sensitivity Function (CSF) of LGN cells driven from 6-OHDA-treated retinas with those driven from the normal ones. Each retina involved in this experiment was labelled for TH to ensure that its DA cell network was intact (in the case of saline-treated retina) or affected (in the case of a

6-OHDA-treated retina). This proportion of Y-cells is in keeping with the recent description of LGN cell-type population by Troy and Shou (2002).

Despite signs of degeneration on every 6-OHDA-treated retina involved in this study, there were no significant differences in LGN cell response properties between 6-OHDA- and saline-treated retinas. We did not find any effect of retinal DA depletion by direct observation of cell response, spontaneous discharge, CSF curves, C_{50} or SFhc values. We would have expected a displacement of the peak of CSF from middle spatial frequency to low spatial frequency.

Many potential explanations can be brought up. One may argue that the lack of contrast sensitivity loss in the present study was due to the fact that DA was still present in the retina. We used three 6-OHDA dosages in these experiments (300, and 400 and 500 μ g). When the maximal dosage was used, in one out of two cases, severe retinal detachment was seen (results not shown). Such retinal detachment after administration of high doses of 6-OHDA was also reported in rabbits with doses between 250-500 μ g (Ehinger and Nordenfelt, 1977; Olivier et al., 1986). This suggests that we were likely using the highest dose of 6-OHDA we could, and that causing a more complete yet specific destruction of DAergic cells with this tool was impossible. Insufficient survival time could hardly be the factor responsible for the

lack of effects on the LGN cell response profile, since no relationship has been noted between the levels of DA, DOPAC depletion or the amplitude of the b-wave and the survival time.

Another possible explanation to our negative results could reside in the fact that DA may not have the same effect in central versus peripheral retina. If it was the case, we might have introduced a bias in our population by testing cells with fairly central receptive fields (two third of our cell population comes from receptive field located within 10° of the *area centralis*). It has been shown in many species that DAergic cells are not evenly distributed in the retina (Nguyen-Legros, Versaux-Botteri, and Savy, 1997). In cats, DAergic cells were described by different groups as being fairly evenly distributed over central and peripheral retina (Oyster et al., 1985; Takahashi, 1988) or as being more peripherally located (Wang, Cuenca, and Kolb, 1990). If, indeed, this last observation is accurate the peripheral retina would be more dependent on DAergic innervation to convey contrast sensitivity. However, our results show that contrast sensitivity was not changed in the peripheral retina.

In conclusion, we could not demonstrate a clear implication of DA in CSF in cats, even animals with a 75% DOPAC depletion and higher did not have abnormal cell response. This absence of effect is surprising since 6-OHDA has been found to reduce contrast sensitivity of ganglion

cells measured with pattern ERG in primates (Ghilardi et al., 1989). It may be possible that a retinal DA depletion sufficient to affect ganglion cell (the retinal output) contrast sensitivity cannot change cell response downstream in the visual system. Our results are relevant to human studies since they are at odd with the well accepted hypothesis according to which contrast sensitivity loss in PD patients is a consequence of retinal DA depletion (Bodis-Wollner, 1990; Bodis-Wollner et al., 1987).

Reference List

Angulo, A., de Juan, E., Martínez-Navarrete, G., Martín-Nieto, J., Barcia, C., Trinidad Herrero, M., & Cuenca, N. (2003). Decrease of GABAergic and glycinergic amacrine cells in the MPTP-treated monkey retina. IBRO.

Bjelke, B., Goldstein, M., Tinner, B., Andersson, C., Sesack, S.R., Steinbusch, H.W., Lew, J.Y., He, X., Watson, S., Tengroth, B., & Fuxe, K. (1996). Dopaminergic Transmission in the Rat Retina: Evidence for Volume Transmission. Journal of Chemical Neuroanatomy, 12(1), 37-50.

Bodis-Wollner, I. (1990). The Visual System in Parkinson's Disease. Research Publications - Association for Research in Nervous & Mental Disease, 67, 297-316.

Bodis-Wollner, I., Marx, M.S., Mitra, S., Bobak, P., Mylin, L., & Yahr, M. (1987). Visual Dysfunction in Parkinson's Disease. Loss in Spatiotemporal Contrast Sensitivity. Brain, 110(Pt 6), 1675-98.

Contini, M., & Raviola, E. (2003). Gabaergic Synapses Made by a Retinal Dopaminergic Neuron. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(3), 1358-63.

Casanova, C. Coudé, G. et Huppé-Gourgues, F. (2001) Contrast sensitivity function of neurons in the lateral geniculate nucleus after retinal dopamine depletion. Ophthalmic Research. 33 (suppl 1):p.86.

Coudé G, Huppé-Gourgues F; Casanova C (2002) Retinal dopamine depletion alters contrast sensitivity function of lateral geniculate cells in cats. ARVO Abstract, 1804, B814

Djamgoz, M.B., & Wagner, H.J. (1992). Localization and Function of Dopamine in the Adult Vertebrate Retina. Neurochemistry International, 20(2), 139-91.

Dowling, J.E., & Ehinger, B. (1978). Synaptic Organization of the Dopaminergic Neurons in the Rabbit Retina. Journal of Comparative Neurology, 180(2), 203-20.

Ehinger, B., & Nordenfelt, L. (1977). Destruction of Retinal Dopamine-Containing Neurons in Rabbit and Goldfish. Experimental Eye Research, 24(2), 179-87.

Ghilardi, M.F., Marx, M.S., Bodis-Wollner, I.; Camras, C.B., & Glover, A.A. (1989). The Effect of Intraocular 6-Hydroxydopamine on Retinal Processing of Primates. Annals of Neurology, 25(4), 357-64.

Gottvall, E., & Textorius, O. (2003). Concentration-Dependent Effects of Dopamine on the Direct Current Electroretinogram of Pigmented Rabbits During Prolonged Intermittent Recording. Documenta Ophthalmologica, 106(2), 161-9.

Hampson, E.C., Weiler, R., & Vaney, D.I. (1994). Ph-Gated Dopaminergic Modulation of Horizontal Cell Gap Junctions in Mammalian Retina. Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences, 255(1342), 67-72.

Harnois, C., & Di Paolo, T. (1990). Decreased Dopamine in the Retinas of Patients With Parkinson's Disease. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 31(11), 2473-5.

He, S., Weiler, R., & Vaney, D.I. (2000). Endogenous Dopaminergic Regulation of Horizontal Cell Coupling in the Mammalian Retina. Journal of Comparative Neurology, 418(1), 33-40.

Hochstein, S., & Shapley, R.M. (1976). Quantitative Analysis of Retinal Ganglion Cell Classifications. Journal of Physiology, 262(2), 237-64.

Jagadeesh, J.M., & Sanchez, R. (1981). Effects of Apomorphine on the Rabbit Electroretinogram. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 21(4), 620-4.

Jensen, R.J., & 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(3), 837-55.

Lin, Z.S., & Yazulla, S. (1994). Depletion of Retinal Dopamine Does Not Affect the Erg B-Wave Increment Threshold Function in Goldfish in Vivo. Visual Neuroscience, 11(4), 695-702.

Maguire, G., & Hamasaki, D.I. (1994). The Retinal Dopamine Network Alters the Adaptational Properties of Retinal Ganglion Cells in the Cat. Journal of Neurophysiology, 72(2), 730-41.

Maguire, G.W., & Smith, E.L. 3rd. (1985). Cat Retinal Ganglion Cell Receptive-Field Alterations After 6-Hydroxydopamine Induced

Dopaminergic Amacrine Cell Lesions. Journal of Neurophysiology, 53(6), 1431-43.

Marshak, D.W. (2001). Synaptic Inputs to Dopaminergic Neurons in Mammalian Retinas. Progress in Brain Research, 131, 83-91.

Nelson, R., & Kolb, H. (1983). Synaptic Patterns and Response Properties of Bipolar and Ganglion Cells in the Cat Retina. Vision Research, 23(10), 1183-95.

Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., & Savy, C. (1997). Dopaminergic and Gabaergic Retinal Cell Populations in Mammals. Microscopy Research & Technique, 36(1), 26-42.

Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., & Vernier, P. (1999). Dopamine Receptor Localization in the Mammalian Retina. Molecular Neurobiology, 19(3), 181-204.

Oliver, P., Jolicoeur, F.B., Lafond, G., Drumheller, A., & Brunette, J.R. (1987). Effects of Retinal Dopamine Depletion on the Rabbit Electroretinogram. Documenta Ophthalmologica, 66(4), 359-71.

Olivier, P., Jolicoeur, F.B., Lafond, G., Drumheller, A.L., & Brunette, J.R. (1986). Dose Related Effects of 6-OHda on Rabbit Retinal Dopamine Concentrations and Erg B-Wave Amplitudes. Brain Research Bulletin, 16(5), 751-3.

Oyster, C.W., Takahashi, E.S., Cilluffo, M., & Brecha, N.C. (1985). Morphology and Distribution of Tyrosine Hydroxylase-Like Immunoreactive Neurons in the Cat Retina. Proceedings of the

National Academy of Sciences of the United States of America, 82(18), 6335-9.

Pasternak, T., & Horn, K. (1991). Spatial Vision of the Cat: Variation With Eccentricity. Visual Neuroscience, 6(2), 151-8.

Pourcho, R.G. (1982). Dopaminergic Amacrine Cells in the Cat Retina. Brain Research, 252(1), 101-9.

Rotenstreich, Y., Fishman, G.A., Anderson, R.J., & Birch, D.G. (2003). Interocular Amplitude Differences of the Full Field Electroretinogram in Normal Subjects. British Journal of Ophthalmology, 87(10), 1268-71.

Savy, C., Simon, A., & Nguyen-Legros, J. (1991). Spatial Geometry of the Dopamine Innervation in the Avascular Area of the Human Fovea. Visual Neuroscience, 7(5), 487-98.

Schneider, T., & Zrenner, E. (1991). Effects of D-1 and D-2 Dopamine Antagonists on Erg and Optic Nerve Response of the Cat. Experimental Eye Research, 52(4), 425-30.

Skrandies, W., & Wassle, H. (1988). Dopamine and Serotonin in Cat Retina: Electroretinography and Histology. Experimental Brain Research, 71(2), 231-40.

Ste-Marie, L., Boismenu, D., Vachon, L., & Montgomery, J. (1996). Evaluation of Sodium 4-Hydroxybenzoate as an Hydroxyl Radical Trap Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection. Analytical Biochemistry, 241(1), 67-74.

- Takahashi, E.S. (1988). Dopaminergic Neurons in the Cat Retina. American Journal of Optometry & Physiological Optics, 65(5), 331-6.
- Troy, J.B. (1983a). Spatial Contrast Sensitivities of X and Y Type Neurones in the Cat's Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. Journal of Physiology, 344, 399-417.
- Troy, J.B. (1983b). Spatio-Temporal Interaction in Neurones of the Cat's Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. Journal of Physiology, 344, 419-32.
- Troy, J.B., & Shou, T. (2002). The Receptive Fields of Cat Retinal Ganglion Cells in Physiological and Pathological States: Where We Are After Half a Century of Research. Progress in Retinal & Eye Research, 21(3), 263-302.
- Wang, H.H., Cuenca, N., & Kolb, H. (1990). Development of Morphological Types and Distribution Patterns of Amacrine Cells Immunoreactive to Tyrosine Hydroxylase in the Cat Retina. Visual Neuroscience, 4(2), 159-75.
- Wink, B., & Harris, J. (2000). A Model of the Parkinsonian Visual System: Support for the Dark Adaptation Hypothesis. Vision Research, 40(14), 1937-46.
- Witkovsky, P., & Schutte, M. (1991). The Organization of Dopaminergic Neurons in Vertebrate Retinas. Visual Neuroscience, 7(1-2), 113-24.
- Yazulla, S., Studholme, K.M., Fan, S.F., & Mora-Ferrer, C. (2001). Neuromodulation of Voltage-Dependent K⁺ Channels in Bipolar Cells:

Immunocytochemical and Electrophysiological Studies. Progress in Brain Research, 131, 201-13.

Figure and table legends

Fig. 1. Examples of fits for an off X-type LGN cell. **A)** Cell response to increasing contrast fitted to Naka-Rushton function ($R^2 = 0.97$). The C_{50} value is 0.4 or 40% contrast. **B)** Contrast sensitivity function of the same cell fitted to Difference Of Gaussians function ($R^2 = 0.98$).

Fig. 2. 6-OHDA impact on DAergic cells. Representative examples of TH-IR cells in saline- and treated-retina from the same animal. **A-B.** Two examples of DAergic cells immunolabelled for TH after being treated with saline. A dense network of processes characterized by ring-endings (empty arrows) is visible. **C-D.** 17 days after treatment with 6-OHDA (two injections of 150 μ g, one day apart, for a total of 300 μ g) the cell network is less dense, fine ring-ending processes have disappeared and thick varicose swellings can be detected (filled arrows). Scale is 50 μ m for **A** and **C** and 20 μ m for **B** and **D**.

Fig. 3 b-waves comparison for saline and 6-OHDA-treated retinas. **A.** Example of ERGs from 6-OHDA (top) and saline (bottom) treated retinas showing an increased amplitude b-wave. **B.** b-waves amplitude ratios of 6-OHDA vs saline-treated retinas of each animal. In three out of ten cases the increased amplitude of the b-wave in photopic conditions was present (empty circles). In two out of four animals, the

increased the b-wave amplitude in mesopic conditions was present (filled circles). In those cases the results were consistent with the expected outcome.

Fig. 4. Correspondence between TH labelling, HPLC and ERG. A representative example of DAergic cell degeneration is showed here. In **A**, the TH labelling demonstrate a clear loss of the fine plexus of DAergic processes in 6-OHDA-treated retina. In **B**, the b-wave of the ERG shows a clear increase in amplitude. In **C**, the DA and DOPAC content has been dramatically reduced to 77 and 79%, respectively. In 6 out of 8 cases, there was a clear correspondence between the degeneration signs showed with the three methods. The scale in **A** is 20 μ m.

Fig. 5. Spatial frequency high cut-offs for LGN cells. **A.** Comparison SFcfs for the entire sample of cells (saline: 0.62 ± 0.061 , $n = 44$ and 6-OHDA: 0.58 ± 0.050 , $n = 62$; $p = 0.50$). **B.** Cells with central receptive fields (saline: 0.68 ± 0.08 , $n = 16$; 6-OHDA: 0.67 ± 0.07 , $n = 19$; $p = 0.25$). **C.** Cells with peripheral receptive fields (saline: 0.59 ± 0.08 , $n = 28$; 6-OHDA: 0.54 ± 0.07 , $n = 43$; $p = 0.11$). No significant differences were found.

Fig. 6. Comparison of contrast sensitivity function (CSF) for LGN cells. **A.** CSFs for all the cells in the sample **B.** CSFs for cells with central

receptive fields. **C.** CSFs for Cells with peripheral receptive fields°. No significant differences were found.

Fig. 7. Comparison of C_{50} for drifting gratings for LGN cells. **A.** Comparison of the contrast semi-saturation for the whole pool of cells, regardless the retinal eccentricity (saline: 0.25 ± 0.02 , $n = 35$; 6-OHDA: 0.26 ± 0.02 , $n = 44$; $p = 0.65$). **B.** Comparison of cells with central receptive fields (saline: 0.23 ± 0.01 , $n = 11$; 6-OHDA: 0.28 ± 0.02 , $n = 17$; $p = 0.32$). **C.** Comparison of cells with peripheral receptive fields (saline: 0.26 ± 0.02 , $n = 24$; 6-OHDA: 0.26 ± 0.02 , $n = 27$; $p = 0.92$). No significant differences were found.

Fig. 8. Comparison of CSF and C_{50} for drifting gratings from the most affected cells. Only cells from animals having undergone a 6-OHDA treatment that produced a 75% DOPAC lost were included in this analyse. **A.** The mean CSF available from this subset of cells shows no significant difference when compared to the saline-treated cells. Only fitted data to DOG curves are shown ($R^2 > 0.65$). 6-OHDA, $n = 11$; saline, $n = 8$. **B.** The C_{50} for drifting gratings were not significantly different when 6-OHDA (dotted lines) and saline-treated (gray lines) retinas were compared (0.21 ± 0.09 ; $n = 15$, and 0.21 ± 0.08 ; $n = 11$, Mann-Whitney test, $p = 0.93$). Only fitted data to Naka-Rushton curves are shown ($R^2 > 0.85$).

Table 1. Results of HPLC analyses. The results are expressed as pg/mg of tissue and % reduction in 6-OHDA-treated retina with respect to saline controls. Difference in DA and DOPAC between the two eyes were significant ($p = 0.016$ and $p = 0.008$, respectively; Wilcoxon's matched-pairs signed-ranks test).

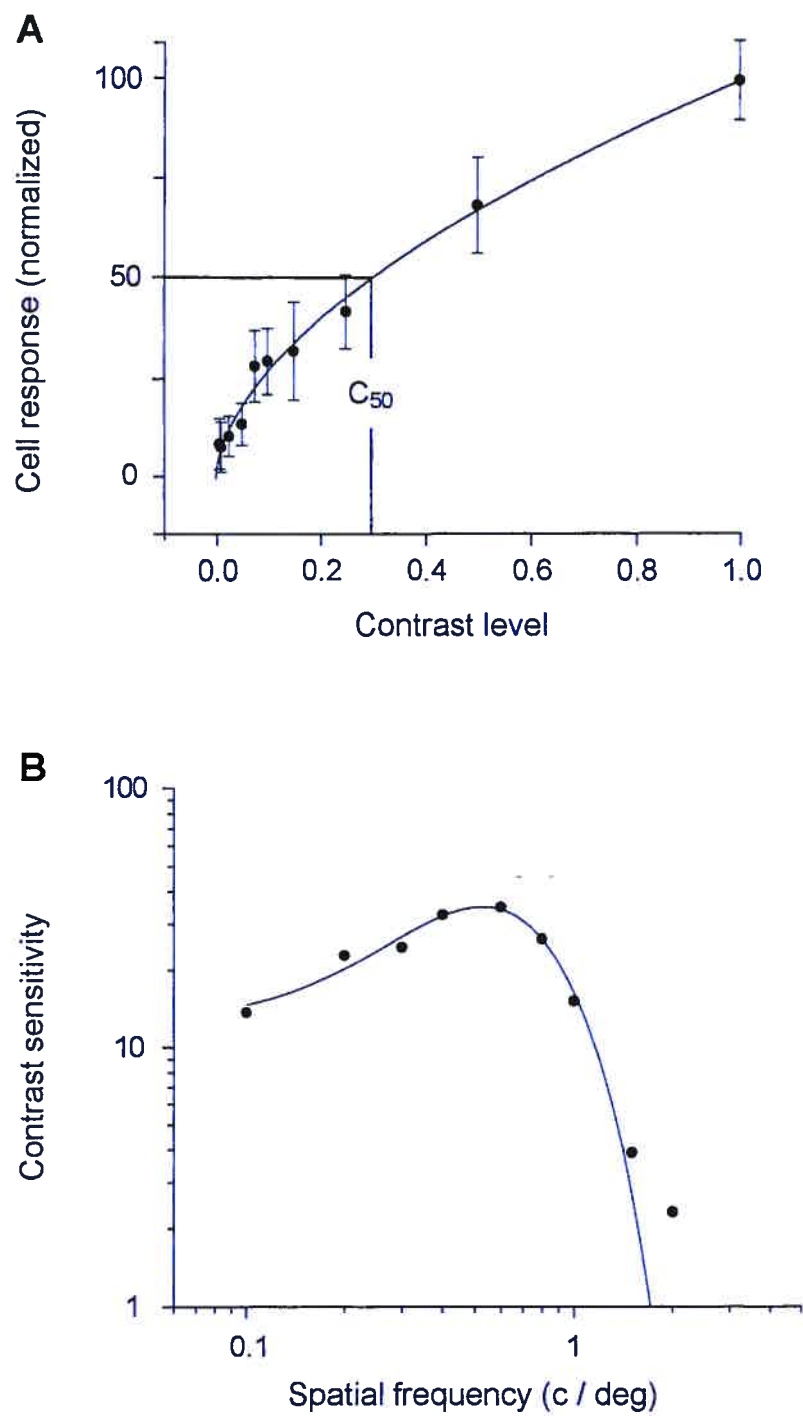


Figure 1, Coudé *et al.* (2004)

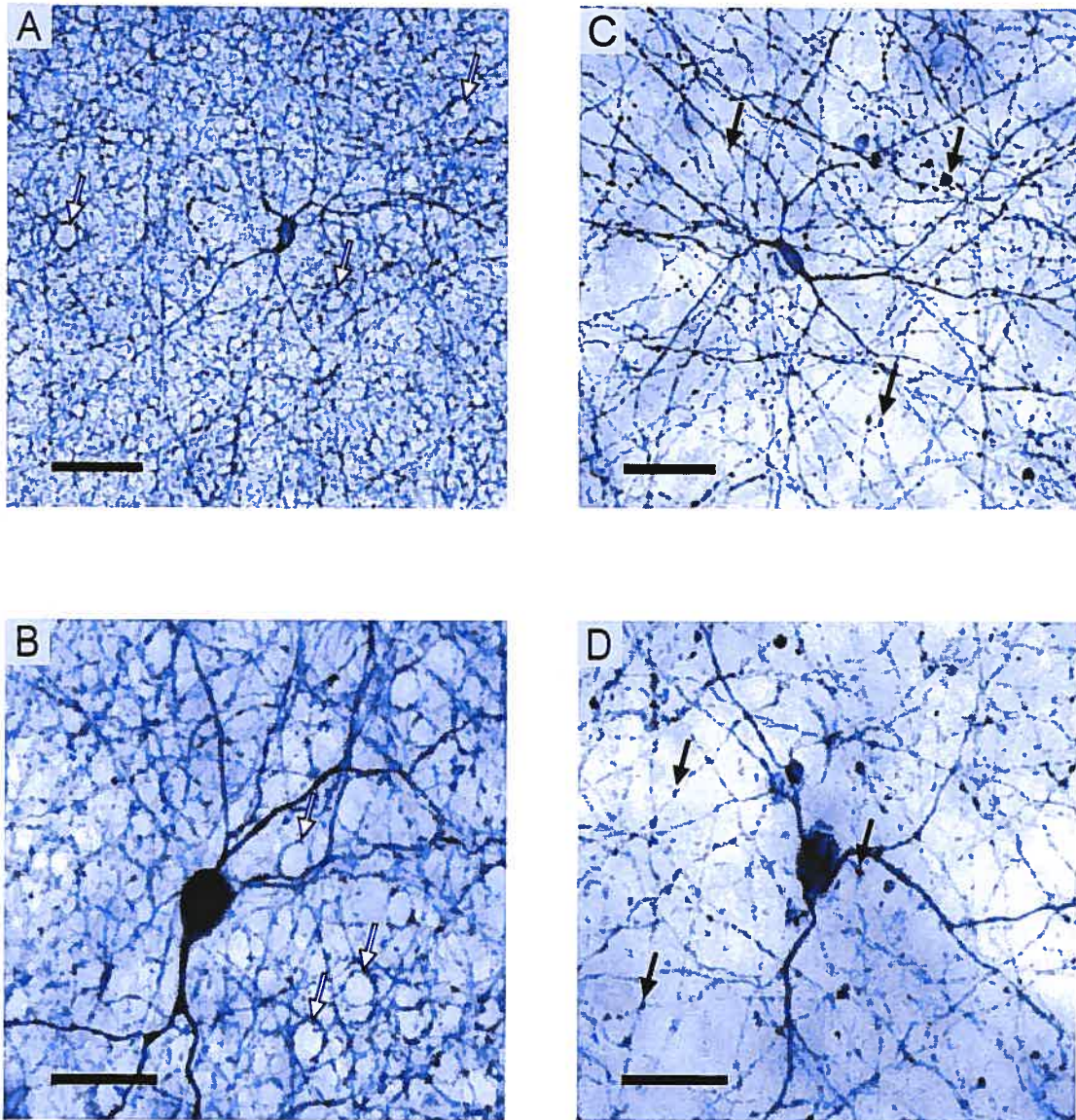


Figure 2, Coudé *et al.* (2004)

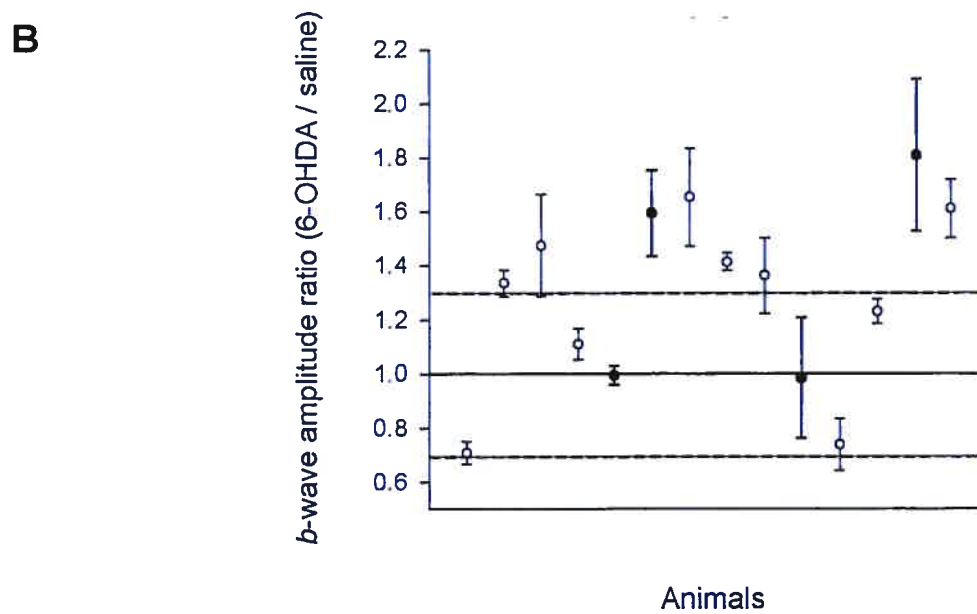
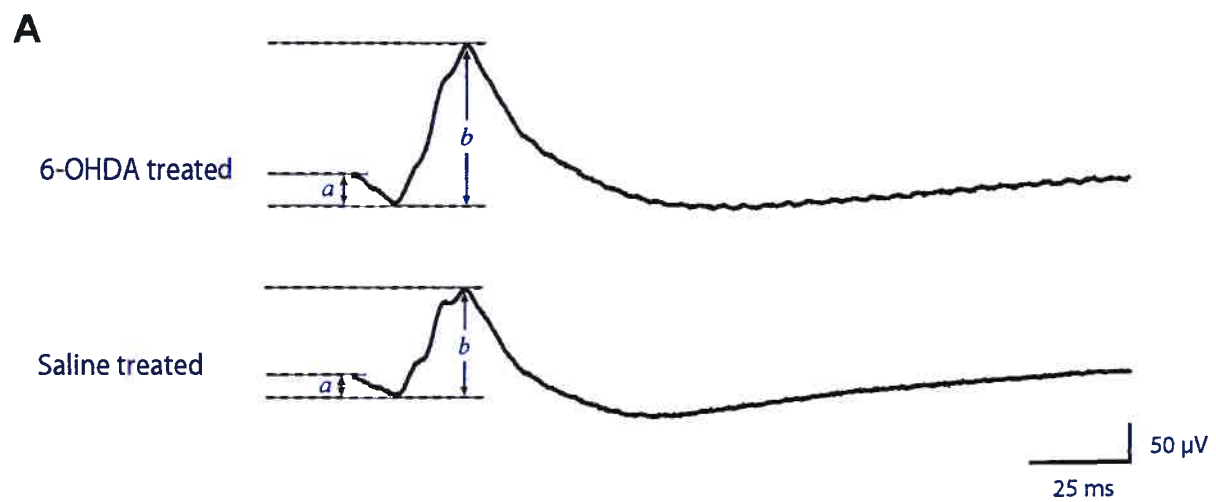
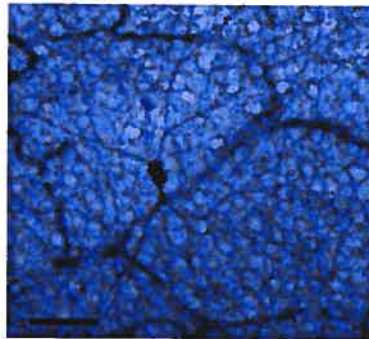


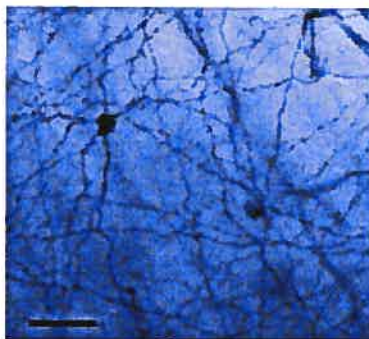
Figure 3, Coudé *et al.* (2004)

A

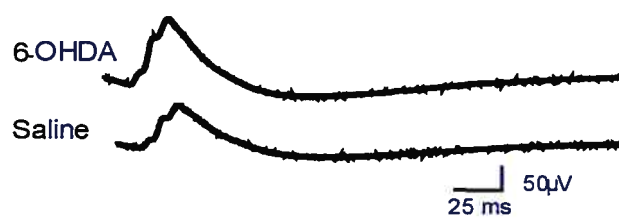
Saline



6-OHDA

Scale = 40 μ m2 x 150 μ g/ μ l

B



C

	Reduction
DA	77%
DOPAC	79%

Figure 4, Coudé *et al.* (2004)

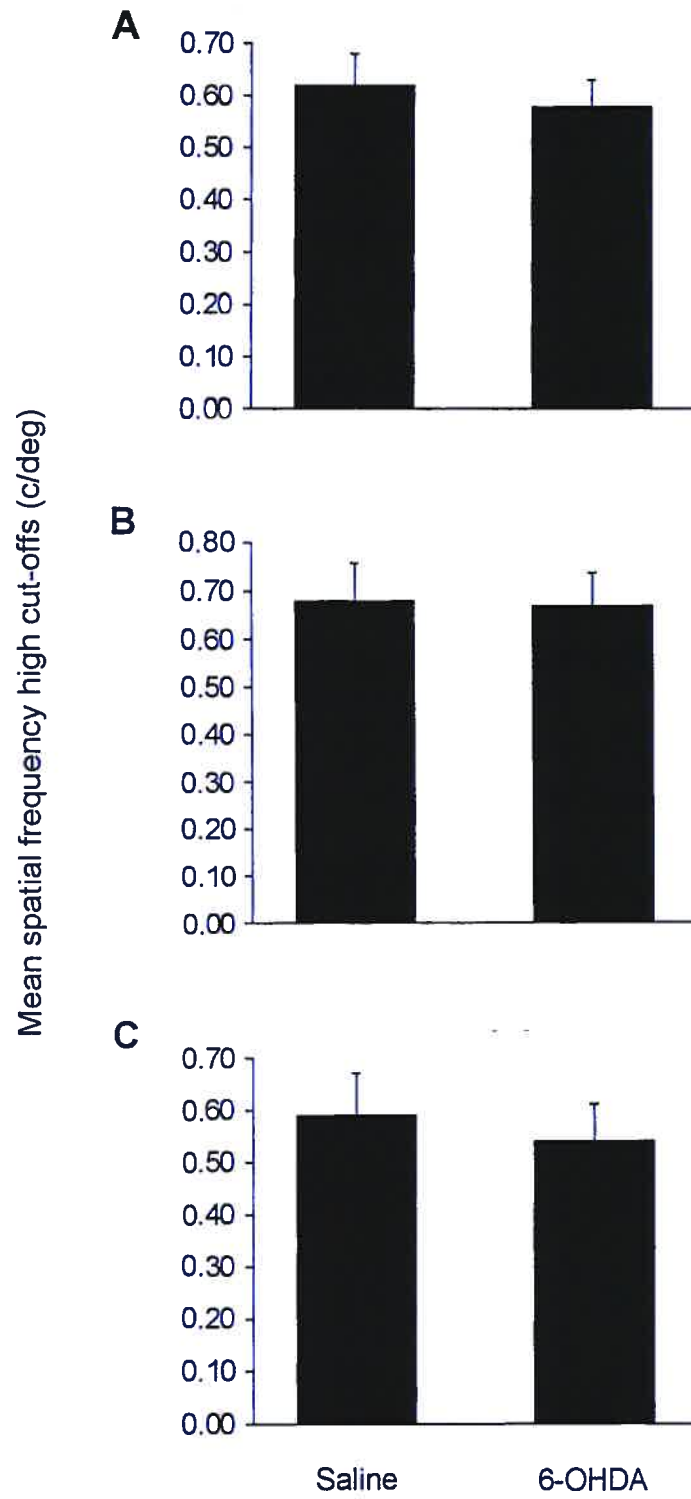


Figure 5, Coudé *et al.* (2004)

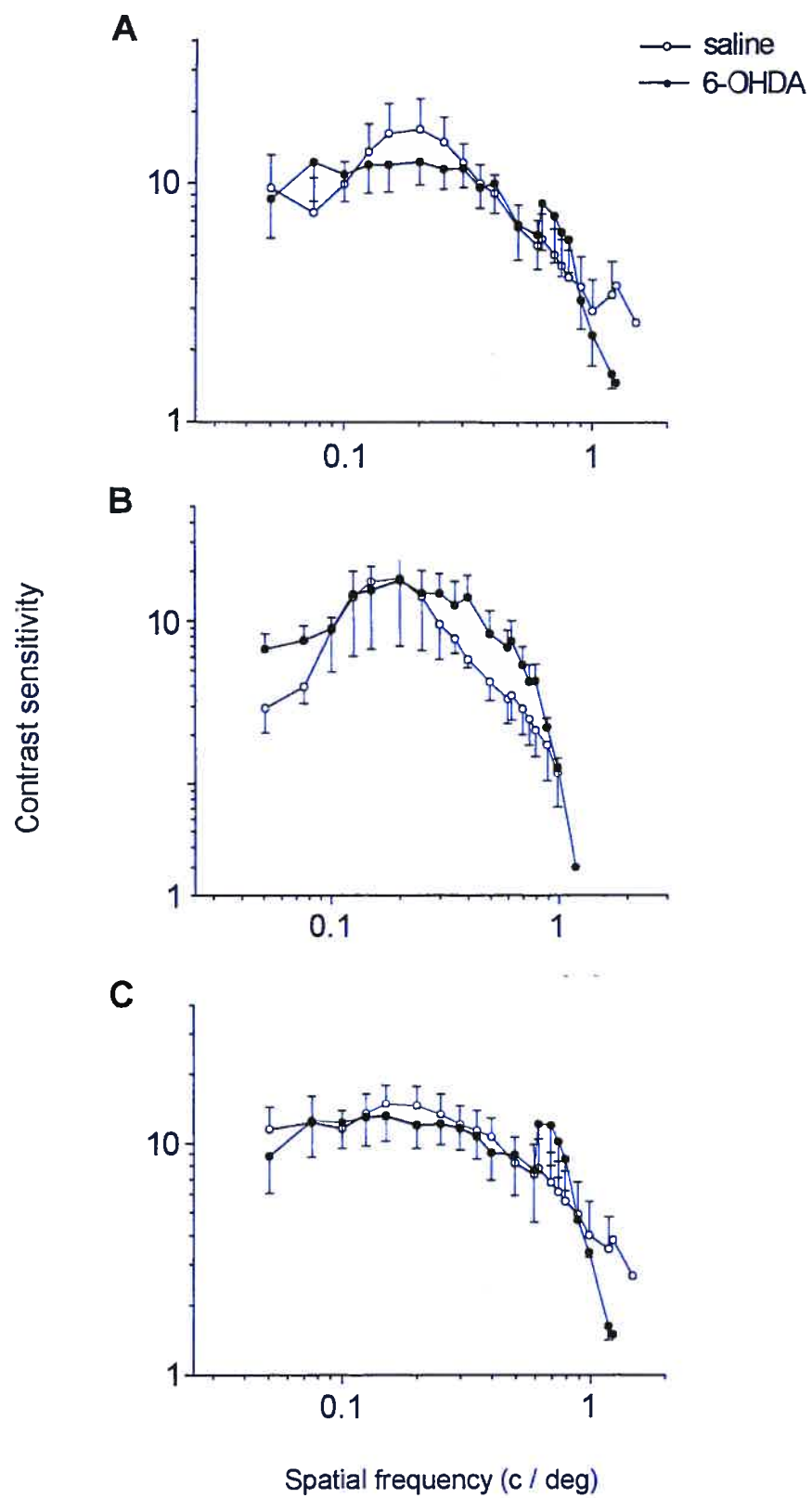


Figure 6, Coudé *et al.* (2004)

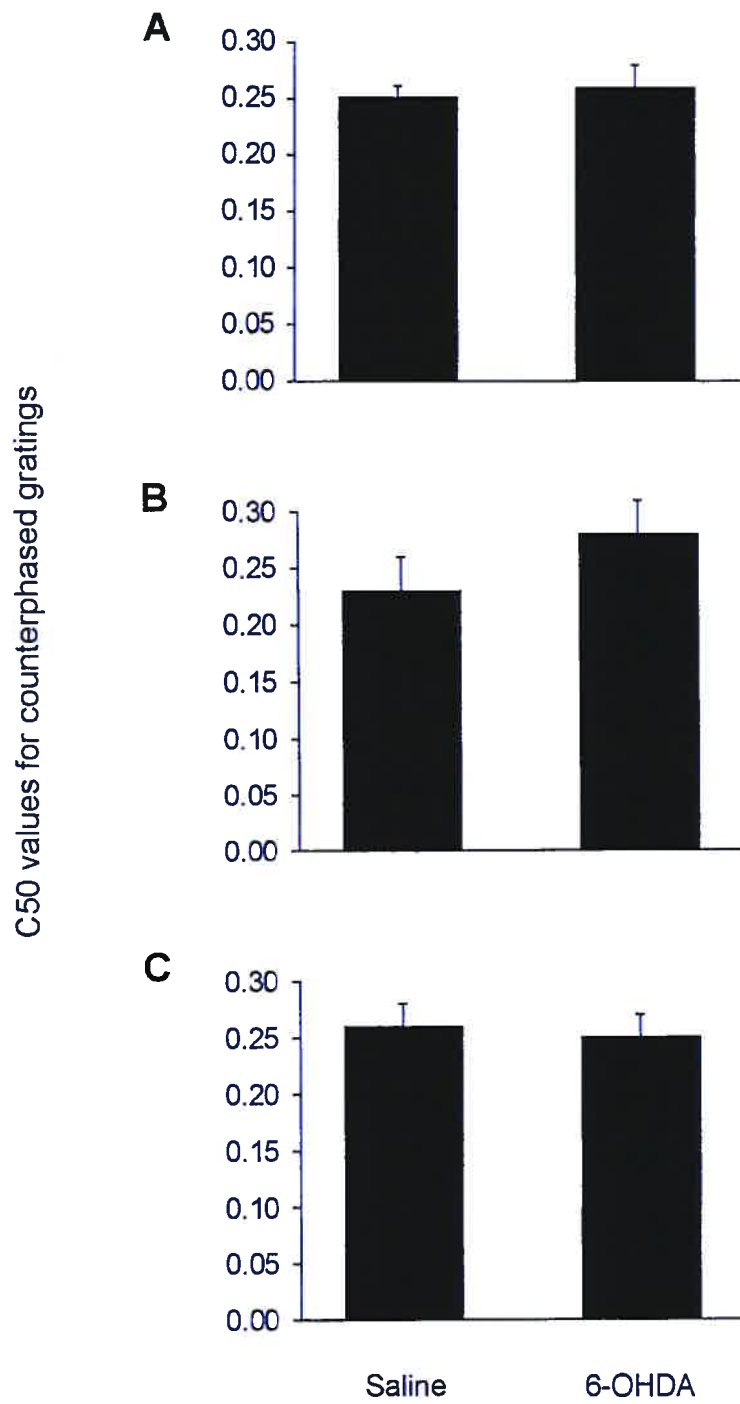


Figure 7, Coudé *et al.* (2004)

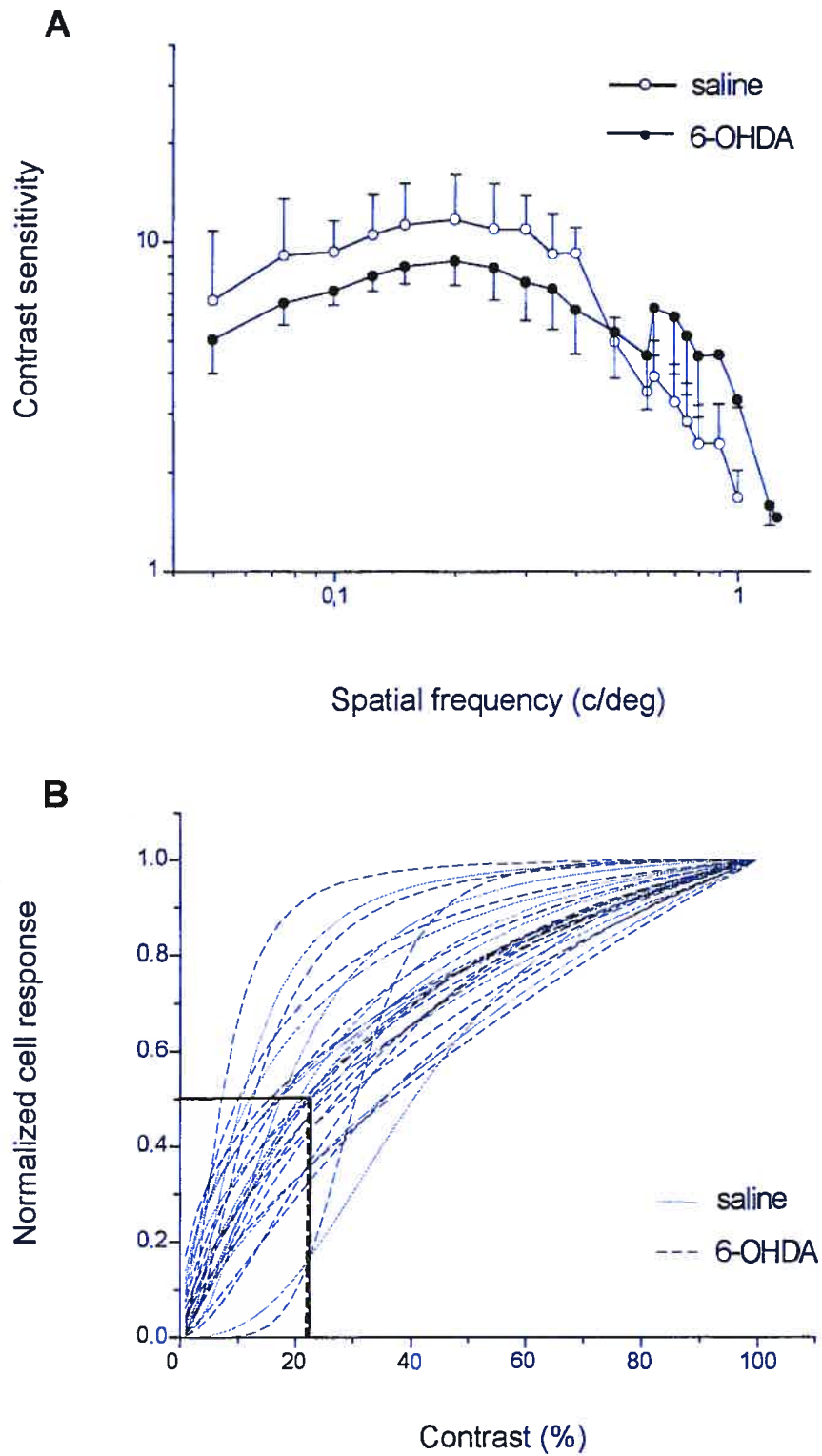


Figure 8, Coudé *et al.* (2004)

Animal ID	Dopamine			DOPAC		
	normal eye	6-OHDA treated	% reduction	normal eye	6-OHDA treated	% reduction
NG2708	30,6	19,0	37	5,4	3,4	38
NG2008	26,0	30,8	17	11,8	10,9	7
NG1106	127,1	52,4	59	25,7	6,6	74
GG2711	42,9	26,2	78	3,9	2,4	89
GG2011	76,6	17,8	77	3,9	0,8	79
GG0210	88,8	14,1	84	16,6	2,4	86
GG0409	50,6	26,0	48	6,4	2,0	69
GG1207	78,1	16,2	79	6,6	1,2	82
Mean ± SEM	65.10 ± 12.05	25.29 ± 4.37	59.93 ± 8.56	10.03 ± 2.72	3.70 ± 1.21	65.95 ± 10.06

Table 1, Coudé *et al.* (2004)

Discussion générale

Le système visuel est un des systèmes sensoriels les plus étudié. Pourtant le rôle des neuromodulateurs dans ce système est encore peu connu. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'action modulateur de l'Ang II sur les réponses visuelles du collicule supérieur du rat. Chez le rat adulte, la plus grande part de l'action de l'Ang II est induite par les récepteurs AT₁ (Merabet et al., 1994;1995). Les récepteurs AT₂ sont impliqués dans la maturation (Wright et al., 1995; Shenoy et al., 1999) et sont présents dans le CS du rat en développement (Baxter et al. (1980). Cette étude, l'étude 3, consistait donc à tester l'hypothèse selon laquelle l'Ang II peut moduler l'activité visuelle du jeune rat et que cette modulation se fait préférentiellement via les récepteurs AT₂. Les résultats ont montrés que ce dernier type de récepteurs joue un rôle plus important que les récepteurs AT₁, mais la capacité de bloquer l'action des récepteurs AT₂ par des ligands de l'Ang II est restée faible chez le rat en développement.

Pour cette raison nous nous sommes tournés vers la DA, dont l'activité peut être modulée par l'Ang II dans le système nerveux central. Nous avons sommes intéressés à la DA de la rétine, où nous avons caractérisé les effets des ligands dopaminergiques sur le traitement global du signal rétinien grâce à l'ERG. Nos résultats montrent que ce sont les récepteurs D1 qui sont responsables de l'effet globalement

inhibiteur qu'exerce la dopamine sur la rétine (étude 2). Dans un autre volet (étude 3), sachant que la dopamine rétinienne est connue pour son action modulatrice de la capacité de la rétine à détecter le contraste, nous nous sommes demandé si la perte de DA rétinienne pouvait avoir un impact sur les centres visuels supérieurs. Nos résultats montrent que la perte de DA rétinienne n'engendre pas de changements en ce qui concerne la sensibilité au contraste des neurones du CGL.

7. Étude 1 : Les effets de l'angiotensine II sur les potentiels évoqués visuels dans le collicule supérieur du rat immature

7.1. Introduction

L'Ang II module l'activité visuelle dans les couches superficielles du CS du rat immature. Ce dernier, contrairement à l'adulte, exprime d'avantage les récepteurs AT₂ que AT₁. Nous avons montré que l'action inhibitrice de l'Ang II dans les couches superficielles du CS est en accord avec le profil d'expression des récepteurs et donc que le type AT₂ y joue un rôle plus marqué que le type AT₁.

Cette étude est la première à démontrer les effets in vivo de l'Ang II sur le cerveau du rat immature. Les résultats montrent que l'action inhibitrice de l'Ang II sur les PEV du CS est comparable chez les rats immatures et chez les rats adultes (Merabet et al., 1997). Dans les deux cas, les effets sont limités aux couches où l'on retrouve les récepteurs angiotensinergiques (Michels et al., 1994), soit les couches superficielles. Cette dernière observation élimine la possibilité que l'effet de l'Ang II rapportée dans cette étude soit le produit direct de l'action du peptide sur la circuiterie vasculaire du CS.

7.2. Récepteurs AT₁ et AT₂

Nos données suggèrent également que l'action inhibitrice de l'Ang II chez les animaux de 14 à 25 jours implique les récepteurs AT₁ et AT₂. Ces résultats sont différents de ceux obtenus chez les adultes (Merabet et al., 1997). En effet, d'une part, le blocage de l'action de l'Ang II est moins efficace chez le jeune animal, et d'autre part, le blocage des récepteurs AT₂ est plus efficace que celui des AT₁. Cette dernière observation est intéressante car elle correspond aux observations selon laquelle les récepteurs AT₂ sont les plus communs chez le jeune animal (Wright et Harding, 1994; Millan et al., 1991; Tsutsumi et Saavedra, 1991). Le fait que nous n'ayons pas observé un fort blocage de l'inhibition de l'action de l'Ang II chez le rat immature avec le losartan ou le PD 123319 est inattendu. Plusieurs explications peuvent être proposées. Premièrement, il se peut que, encore une fois, ce résultat soit dû aux effets de l'injection comme tels qui auraient masqué des effets plus subtils des antagonistes. Deuxièmement, il est aussi possible que l'affinité des récepteurs soit aussi moindre chez les animaux immatures, où encore que ces antagonistes se lient à d'autres récepteurs réduisant ainsi leur efficacité due à des liaisons non-spécifiques. Troisièmement, il est également possible que l'action immédiate de l'Ang II devance le blocage des antagonistes. Bien que la technique utilisée soit la même que celle pour les rats adultes (Merabet et al., 1997), il se peut que la cinétique de la diffusion ou de l'action de l'Ang II diffère selon le degré de maturité du système

nerveux. Quatrièmement, il est aussi possible qu'il y ait un important « cross-talk » (Gelband et al., 1997) entre les récepteurs AT₁ et AT₂ durant le développement. Par exemple, le blocage des récepteurs AT₂ pourrait réduire l'action inhibitrice exercée sur les récepteurs AT₁ et augmenter l'affinité de ces derniers pour l'Ang II, produisant en conséquence une réduction des PEV malgré la présence de l'antagoniste. Ces observations sont également en accord avec les effets plutôt faibles des antagonistes de l'Ang II chez les animaux immatures. Il est possible qu'une partie de l'action de l'Ang II ait été indirectement engendrée par les récepteurs AT₄ qui sont également exprimés dans le CS (Wright et al., 1995).

8. Étude 2 : Les effets de l'administration intraoculaire de ligands dopaminergiques sur l'amplitude de l'onde *b* de l'électrorétinogramme du lapin

8.1. Introduction

Bien que l'effet de la DA sur l'onde *b* de l'ERG soit connu, on ne connaît pas la contribution respective des sous-types des récepteurs de la DA. Aucune étude n'avait examiné systématiquement l'effet des agonistes et antagonistes D1 et D2 sur l'ERG. Les résultats de cette étude confirment que l'activité rétinienne, telle que mesurée par l'amplitude de l'onde *b* de l'ERG est modulée via les récepteurs de DA,

et que cette modulation s'opère d'avantage par les récepteurs de type D_1 que ceux de type D_2 .

8.2. Les effets des agonistes D_1 , le SKF38393 et le A77636

L'administration d'agonistes des récepteurs D_1 , que ce soit le SKF38393 ou le A77636, a produit une réduction significative de l'amplitude de l'onde b , sans toutefois influencer l'onde a . Ces résultats sont en accord avec ceux de Jagadeesh et al., (1981) et de Textorius et al., (1989) qui ont respectivement démontré que l'administration systémique d'apomorphine (un agoniste mixte des récepteurs D_1 et D_2) et intraoculaire de DA, engendrent une diminution spécifique de l'onde b . Notre étude diffère de celle de Jagadeesh et al., (1981) et Textorius et al., (1989) par le fait qu'elle cible séparément les récepteurs D_1 et D_2 , et permet de dissocier leur contribution respective au profil de l'onde de l'ERG. Soulignons également que l'étude de Jagadeesh et al., (1981) diffère de celle de Textorius et al., (1989) et de la notre par le mode d'administration des ligands, soit le mode intra-veineux. Le mode d'administration intravitréen que nous avons utilisé permet d'affirmer avec une plus grande certitude que les effets pharmacologiques obtenus ne sont pas engendrés par des effets systémiques adverses. Prises ensemble, ces données suggèrent que la réduction de l'amplitude de l'onde b induite par l'apomorphine est produite par l'activation des récepteurs D_1 .

Les mécanismes par lesquels s'effectue la réduction de l'onde *b* via les récepteurs D_1 restent à déterminer. Il est bien documenté, toutefois, que la DA diminue la dépolarisation des cellules bipolaires « ON » (Maguire et Werblin, 1994; Wurziger et al., 2001) et que cela pourrait correspondre à la diminution de la photosensibilité (Lin et Yazulla, 1994) et à la réduction de l'onde *b* qui sont souvent observées. En d'autres mots, l'injection de DA contraint la rétine à s'adapter à l'obscurité, indépendamment des conditions lumineuses (Lin et Yazulla, 1994; Marshak, 2001). Les choses se compliquent toutefois, étant donné qu'une part que l'onde *b* provient de l'activité des cellules de Müller (Stockton et Slaughter, 1989), mais aussi des cellules amacrines et ganglionnaires comme il a été montré récemment (Dong et Hare, 2000; Dong et Hare, 2002; Awatramani et al., 2001) et que toutes ces cellules possèdent des récepteurs de type D_1 (Nguyen-Legros et al., 1999).

Il est impossible de connaître l'origine exacte de l'onde *b*. Ainsi, il a été montré récemment que l'onde *b* reflète aussi en partie la contribution des cellules de la rétine interne, soit les cellules amacrines et ganglionnaires (Dong et Hare, 2000). La DA est connue depuis longtemps pour son action inhibitrice sur les cellules ganglionnaires (Straschill et Perwein, 1969) mais il n'a été montré que récemment que cette inhibition est due à une action directe via les récepteurs D_1 (Vaquero et al., 2001). La DA agit donc similairement sur les cellules

ganglionnaires et bipolaires, c'est-à-dire qu'elle module leur activité à la baisse, ce qui peut contribuer à la diminution de l'onde *b*.

Il est cependant plus difficile de comprendre quel effet net peut avoir sur l'onde *b* la modulation des cellules amacrines par la DA étant donné la variété de sous-types de cellules des circuits impliqués. Par exemple, la DA augmente l'activité des cellules amacrines cholinergiques (Hensler et Dubocovich, 1986) et GABAergiques (Veruki et Wassle, 1996) via les récepteurs D_1 , bien que les récepteurs D_2 soient aussi impliqués. L'effet dépolarisant de la DA sur ces cellules contribuerait, à lui seul, à augmenter l'amplitude de l'onde *b*, contrebalançant ainsi l'effet supprimeur de la DA sur les cellules bipolaires et ganglionnaires. Au delà de ces effets opposés, il est encore une fois difficile de séparer les contributions respectives d'un signal excitateur (cholinergique) et d'un signal inhibiteur (GABAergique) sur les variations d'amplitude de l'onde *b*.

8.3. Les effets de l'antagoniste D_1 , le SCH23390

L'injection intravitréenne de l'antagoniste des récepteurs D_1 , SCH23390, a produit une réduction significative de l'amplitude de l'onde *b*, mais moins prononcée que celle induite par l'agoniste SKF38393. Ces résultats sont surprenants étant donné qu'il a été montré, chez le lapin de surcroît, qu'une réduction de la quantité de DA à l'aide de la 6-OHDA produit une augmentation de l'amplitude de

l'onde *b* (Olivier et al., 1986; 1987; Lafond et al., 1994). On sait que la DA fournit un signal d'adaptation à la lumière : elle est libérée lorsque la rétine est stimulée par la lumière. En empêchant la DA endogène de se lier aux récepteurs D₁, on se serait attendu à ce que la rétine se maintienne dans un état d'adaptation à l'obscurité (Maguire et Hamasaki, 1994; Yazulla et al., 2001). Une autre équipe (Marmor et al., 1988) a obtenu des résultats similaires aux nôtres, et eux aussi chez le lapin, soit, une diminution de l'amplitude de l'onde *b* après injection i.m. de SCH23390.

8.4. Les effets de l'agoniste D₂, le NPA

Nos résultats indiquent que l'activation des récepteurs D₂ n'altère pas le tracé de l'onde *b* de l'ERG. L'absence de changements est toutefois étonnante étant donné que les cellules de Müller possèdent également des récepteurs de ce type (Biedermann et al., 1995). Ces résultats pourraient signifier que l'impact des cellules de Müller sur la genèse de l'onde *b* soit contrebalancé par les effets provenant directement des cellules bipolaires, amacrines ou ganglionnaires, qui elles, possèdent des récepteurs D₁. Le fait que l'activation des récepteurs D₂ n'influe pas sur le tracé de l'onde *b* appuie les données récentes qui montrent qu'une partie des courants qui produisent l'onde *b* sont indépendants des cellules de Müller (Dong et Hare, 2000; Awatramani et al., 2001). Il est aussi possible que l'activation des récepteurs D₂ produise des effets subtils, difficiles à mettre en évidence avec l'ERG. Peu d'études ont

examiné l'effet des agonistes spécifiques D1 et D2. et de façon générale, les effets physiologiques observés *in vivo* (notre étude) et *in vitro* (Marmor et al., 1988) proviennent des récepteurs D₁.

8.5. Les effets de l'antagoniste D₂, le sulpiride

Contrairement à l'agoniste D₂, le NPA, qui n'a pas eu d'effet sur l'ERG, l'antagoniste sulpiride a provoqué une réduction durable de l'amplitude de l'onde *b*. D'autres recherches ont précédemment montré que les antagonistes D₂ pouvaient altérer la physiologie rétinienne, mais les effets rapportés sont contraires aux nôtres. Les drogues sont différentes et administrées de manière différentes : chlorpromazine, i.v. pour Jagadeesh et al., (1980) et sulpiride dans œil isolé pour Schneider et Zrenner (1991). La réduction de l'onde *b* observée à la suite de l'administration de sulpiride peut toutefois être le résultat d'un effet pré-synaptique d'autorécepteurs qui, une fois bloqués, coupent les possibilités d'autorégulation de la synthèse et de la libération de la DA endogène. L'administration des antagonistes D₂ comme le sulpiride et le spiperone est déjà connue comme stimulant la synthèse de DA (Hadjiconstantinou et al., (1990). L'effet du sulpiride pourrait donc consister à augmenter la quantité de DA endogène qui, comme l'administration de DA, provoquerait la diminution de l'amplitude de l'onde *b*.

8.6. Conclusions

En conclusion, nos données apportent un support additionnel à l'implication de la DA dans la modulation des fonctions rétinienne. Elles montrent de manière spécifique que l'impact de la DA sur l'onde *b* de l'ERG est largement sous l'influence des récepteurs de type D_1 . Le rôle des récepteurs D_2 est plus difficile à cerner sur la base de nos résultats. Un certain nombre d'entre eux seraient des autorécepteurs ayant pour rôle de contrôler la synthèse et la libération de DA (Cohen et al., 1981; Hadjiconstantinou et al., (1990).

9. Étude 2 : Les effets de l'injection intravitréenne de 6-Hydroxydopamine sur la sensibilité au contraste des cellules du CGL du chat

L'injection intravitréenne de 6-OHDA a produit une dégénérescence des cellules dopaminergiques de la rétine et a entraîné une perte de DA et de DOPAC dans la rétine. Malgré ces signes évidents d'atteintes structurelles, l'enregistrement de l'ERG n'a pas montré d'impacts constants sur l'amplitude de l'onde *b*. La dégénérescence des cellules dopaminergiques de la rétine n'a pas eu d'impact sur la sensibilité au contraste et l'acuité des neurones du CGL innervés par les rétines affectées par la 6-OHDA.

9.1. Vérification des atteintes structurelles de la rétine et impact sur la fonction rétinienne

Puisque le but de étude 1 était de mesurer les conséquences de la perte de DA rétinienne sur les réponses du CGL, il était primordial de mesurer les effets de la toxine sur la cible, la rétine. Bien peu de données existent sur les correspondances entre les indicateurs de dégénérescence des cellules dopaminergiques de la rétine.

Nous avons d'abord mesuré les atteintes de la rétine sur le plan physiologique au moyen de l'ERG. Cette mesure *in vivo* avait pour but de vérifier *a priori* les déficits fonctionnels et donc de les prédire. Après

les enregistrements (ERG et CGL) et donc en *post mortem*, nous avons examiné l'état du réseau dopaminergique avec une procédure d'immunomarquage de la TH ; et avons soumis une partie de nos rétines à des analyses HPLC. À notre connaissance, aucune autre étude n'a examiné les correspondances entre l'ERG, le marquage immunohistochimique de la tyrosine hydroxylase des cellules dopaminergiques et la quantité de DA et de ses métabolites.

L'examen de nos rétines montre que l'injection intravitréenne de 6-OHDA chez le chat affecte grandement le réseau de cellules dopaminergiques. Les caractéristiques de cette dégénérescence ressemblent beaucoup à celles décrites par Skrandies et Wässle (1988), c'est-à-dire la disparition du réseau dense de fins prolongements, et des formations en anneau ou *ring-endings* et la présence de gros renflements variqueux sur les prolongements plus gros restants. Chez le primate, Angulo et al., (2003) ont décrit la dégénérescence des cellules dopaminergiques avec les mêmes signes distinctifs, bien que la dégénérescence y ait été produite par des injections systémiques de la neurotoxine MPTP. Il semblerait donc que le type de lésions obtenues avec la 6-OHDA ne soit pas exclusif à cette toxine, mais serait plutôt le reflet du type d'atteintes neuronales rencontrées lors de maladies dégénératives impliquant les cellules dopaminergiques.

Les résultats des analyses de HPLC s'accordent avec les données qui montrent que l'injection de 6-OHDA diminue la quantité de DA et de DOPAC dans la rétine, chez le lapin (Olivier et al., 1986; 1987) et chez le chat (Maguire et Smith, 1985). Ces résultats sont aussi cohérents avec les données provenant des études chez l'humain et qui montrent que les patients atteints de la MP ont une diminution de DA rétinienne lorsque comparés à des sujets normaux (Harnois et Di Paolo, 1990).

Nos résultats montrent que les rétines injectées à la 6-OHDA présentent généralement l'augmentation d'amplitude de l'onde *b* (hyper-réponse) tel que rapporté dans la littérature (Olivier et al., 1986; 1987; Skrandies et Wassle, 1988). Dans 7 des 10 cas testés en conditions photopiques, et deux des quatre cas testés en conditions mésopiques, l'ERG a montré une hyper-réponse de l'onde *b*.

Rappelons que l'utilisation de l'ERG avait comme objectif de nous permettre de connaître l'étendue de l'altération du réseau de cellules dopaminergiques avant de procéder aux sessions d'enregistrement.

À ce titre, bien que l'ERG puisse concorder avec la perte de DOPAC et la diminution du marquage du fin réseau de prolongements, il ne peut être utilisé comme un indicateur fiable de l'effet de la 6-OHDA. L'inconstance avec laquelle la 6-OHDA a affecté l'amplitude de l'onde *b*, peut être mis en parallèle avec les résultats déjà rapportés chez le chat où la 6-OHDA s'est vue, dans un cas, provoquer une

augmentation d'amplitude de l'onde *b* (Maguire et Smith, 1985), et dans un autre, ne pas avoir d'effets (Skrandies et Wassle, 1988). Il est pourtant admis que la DA amoindrit la dépolarisation des cellules bipolaires à centre « ON », de même que le taux de décharge des cellules ganglionnaires à centre « ON ». Ainsi, la rétine intacte « utilise » la DA pour la transition de la vision scotopique à la vision photopique en réduisant la photosensibilité et donc, par extension, l'onde *b*. Ainsi, le blocage de la transmission dopaminergique, ou encore la diminution de la DA rétinienne, maintiendraient la rétine dans un état d'adaptation à l'obscurité (Lin et Yazulla, 1994; Marshak, 2001) ce qui peut produire une hyper-réponse. L'enregistrement de nos ERGs étant fait dans les conditions où la DA endogène est normalement libérée (en conditions mésopiques et photopiques), nous aurions dû obtenir une hyper-réponse dans l'œil traité à la 6-OHDA. Il est possible que des différences entre espèces soient responsables des divergences entre les résultats des études conduites chez les animaux diurnes comme le lapin (Olivier et al., 1986; Oliver et al., 1987) ou le macaque (Ghilardi et al., 1989), et celles chez les animaux nocturnes comme le chat (Maguire et Smith, 1985). Toutefois, il est pertinent de préciser que dans les cas où l'ERG était affecté par la 6-OHDA, les autres indicateurs montraient une dégénérescence, soit le marquage immunohistochimique des cellules dopaminergiques et le dosage de la DA et du DOPAC par l'analyse HPLC.

Ce manque de correspondance entre l'ERG, d'une part, et les atteintes structurales des cellules (TH-IR) et la quantité de DA et DOPAC, d'autre part, suggère fortement que l'onde *b* de l'ERG ne peut être utilisée pour prédire l'effet de la 6-OHDA, *in vivo*. Les ratios de l'amplitude de l'onde *b* pour les rétines traitées à la 6-OHDA et celles traitées à la saline sont variables (Fig. 3B) et l'ERG ne peut manifestement pas être utilisé comme outil pour déterminer les dommages des cellules dopaminergiques *in vivo* (Fig. 4B).

9.2. Réponses des cellules du CGL après privation de DA

Malgré les signes évidents de dégénérescence présents sur toutes les rétines traitées à la 6-OHDA impliquées dans cette étude, aucun effet significatif sur les propriétés des réponses des cellules du CGL n'a été détecté. Nous avons comparés les courbes de CSF, la semi-saturation au contraste (C_{50}), les limites supérieures de fréquence spatiale (spatial frequency high cut-offs) et le taux d'activité cellulaire sans trouver de différences significatives. Compte tenu que les taux de perte de DA et de DOPAC pouvait varier respectivement de 17 à 84% et 7 à 89% et donc possiblement masquer des effets, nous avons comparés les CSF et les valeurs de C_{50} pour un sous-groupe d'animaux dont la rétine traitée à la 6-OHDA montrait une perte de DOPAC d'au moins 75%. Même ces animaux qui ont pourtant subi des pertes de DA des plus importantes ne présentent pas de différences entre les cellules qui sont

innervées par la rétine traitée à la saline et ou à la 6-OHDA. Ces résultats inattendus suggèrent plusieurs explications.

En utilisant une méthode semblable à la nôtre en ce qui concerne la diminution de DA rétinienne, Ghilardi et al., (1989) ont rapportés une diminution de la sensibilité au contraste des cellules ganglionnaires chez le primate. Leur méthode consistait à utiliser la 6-OHDA intravitréenne pour réduire la DA et ensuite à mesurer la sensibilité au contraste à l'aide du pERG. Il est évidemment difficile de comparer des espèces aussi différentes (primate et félin), de plus nos enregistrements rétiniens effectués avec la technique de l'ERG par éclairs ne nous permet pas de savoir si la sensibilité au contraste des cellules ganglionnaires est affectée. Il est possible que la 6-OHDA intravitréenne puissent réduire la sensibilité au contraste de la rétine, mais sans affecter celle du CGL.

Il est possible que la perte de DA rétinienne ne se reflète pas sur le CGL. Une première raison pourrait être que les champs récepteurs des cellules du CGL possèdent un antagonisme de la périphérie plus grand que celui des cellules ganglionnaires. En effet, l'antagonisme centre-périphérie est augmenté d'environ 50% à la synapse retino-géniculée (Ruksenas et al., 2000). Les neurones du CGL pourraient donc être moins sensibles à la perte de sensibilité au niveau de la rétine. Une seconde raison pourrait être que la dopamine du CGL compense les

effets de la perte de DA rétinienne. Zhao et al., (2002) ont montrés que la DA facilite la réponse des cellules du CGL aux stimuli de petite taille. Le CGL pourrait donc avoir des capacités énormes à compenser l'input rétinien.

L'absence d'impact de la 6-OHDA sur les cellules du CGL pourrait aussi être imputable à la méthode utilisée. On peut tout d'abord argumenter que l'absence d'effets sur la sensibilité au contraste dans la présente étude est due à une réduction insuffisante de DA. Nous avons utilisé trois doses différentes au cours des expériences (300, 400 et 500 μ g), et dans un des deux cas où la dose maximale a été utilisée, un sévère décollement de rétine est survenu. Le décollement rétinien à la suite de l'administration de fortes doses de 6-OHDA a aussi été rapporté dans la littérature, entre autres, chez le lapin, pour des doses de 6-OHDA de 250 à 500 μ g (Ehinger et Nordenfelt, 1977; Olivier et al., 1986). Cela suggère que nous utilisions fort probablement la dose de 6-OHDA la plus haute que nous pouvions et que, corollairement, tenter de causer une destruction plus généralisée tout en restant spécifique aux cellules dopaminergiques est impossible avec cet outil. Peut-être qu'une autre toxine pourrait causer une destruction complète tout en conservant sa spécificité.

Une autre explication possible de nos résultats négatifs réside dans le fait que la DA pourrait ne pas avoir le même effet selon l'excentricité

rétinienne. Il se pourrait que nous ayons échantillonné des cellules ayant des champs récepteurs trop centraux (près des deux tiers de nos cellules ont des champs récepteurs situés entre 0 et 10 degrés de l'aire centrale). En effet, il est établi que la répartition des cellules dopaminergiques n'est pas uniforme dans la rétine de plusieurs espèces (Nguyen-Legros et al., 1997b). Chez le chat, elles sont décrites comme distribuées également selon certains auteurs (Oyster et al., 1985; Takahashi, 1988), alors que d'autres mentionnent plutôt que la rétine périphérique présente une plus forte densité de cellules dopaminergiques (Wang et al., 1990). Si la distribution des cellules dopaminergiques favorisait la périphérie, il serait fort probable que cette partie de la rétine serait plus dépendante de la DA pour fournir une sensibilité au contraste normale que la partie centrale. Les recherches effectuées chez l'humain ont d'ailleurs montré que les patients atteints de la MP ont une sensibilité au contraste plus gravement atteinte en rétine périphérique (Wink et Harris, 2000), là où la densité de cellules dopaminergiques a été confirmée comme plus grande (Savy et al., 1991; Nguyen-Legros et al., 1997b).

Nos résultats ne supportent pas l'hypothèse selon laquelle la DA rétinienne serait nécessaire à l'établissement d'une sensibilité au contraste normale (Bodis-Wollner et Onofrij, 1987; Bodis-Wollner, 1990a). Bien que l'activité du CGL dépende directement de la rétine et que cette dernière ait été frappée par une dégénérescence importante

des cellules dopaminergiques, aucune différence significative n'a été trouvée. Même les cellules du CGL provenant de chats ayant subi une perte de dopamine rétinienne d'au moins 75% affichent un profil de réponse normal.

9.3. Conclusions

À notre connaissance, aucune étude chez le mammifère n'avait encore comparé la sensibilité au contraste de cellules extra-rétiniennes après destruction des cellules dopaminergiques de la rétine. Si, la DA rétinienne n'affecte pas le système visuel au-delà des cellules ganglionnaires, le modèle développé par Bodis-Wollner et Yahr (Bodis-Wollner et Yahr, 1978) à l'effet que la DA rétinienne soit responsable des déficits de sensibilité au contraste rencontrés chez les patients parkinsoniens doit être revue. La perte de DA chez les patients atteints de PD pourrait aussi avoir une origine corticale. Certains patients parkinsoniens ont des déficits visuels plus prononcés pour certaines orientations (Regan et Maxner, 1987; Bulens et al., 1988). Comme la rétine humaine est exempte de neurones sélectifs à l'orientation, il est probable que le cortex visuel soit impliqué dans le déficit.

Conclusions

Nous avons étudié l'influence de deux neuromodulateurs dans le système visuel de trois espèces de mammifères. Nous avons montré que l'Ang II induit une réduction des PEV dans les couches superficielles du CS des rats immatures. Ainsi, l'Ang II peut moduler l'activité du CS, une structure impliquée dans les fonctions visuo-motrices, et conséquemment, peut influencer les comportements exploratoires et d'évitement des animaux au cours de leur développement. Étant donné que les récepteurs AT₂ sont exprimés davantage que les AT₁ et semblent avoir un rôle dans le développement, notre hypothèse était qu'ils allaient être plus importants au niveau fonctionnel chez l'animal immature. Nos données suggèrent que les effets de l'Ang II sont produits en partie via les récepteurs AT₁ et AT₂, avec une contribution plus grande de ce dernier type.

Dans une seconde étude, nous avons confirmé l'action modulateur de la DA sur la photosensibilité globale de la rétine mesurée par l'onde *b* de l'ERG. Nous avons montré que l'activité modulateur de la DA sur la photosensibilité, s'effectue principalement par le biais du sous-type de récepteur D₁.

Dans une troisième étude, nous avons provoqué une dégénérescence des cellules dopaminergiques avec la neurotoxine 6-OHDA. Nous

avons mesuré le degré d'atteinte du réseau dopaminergique avec les techniques d'immunohistochimie, de HPLC et d'ERG. Nos résultats indiquent que l'ERG n'est pas un prédicteur, de la perte de DA et de DOPAC rétinien, ni de l'atteinte structurale des cellules dopaminergiques.

Notre résultat le plus important est d'avoir montré que la perte de DA rétinienne n'influence pas la sensibilité au contraste des cellules du CGL. Bien que l'action neuromodulatrice de la DA dans plusieurs fonctions rétiniennes soit bien établie, la seule perte de DA rétinienne est insuffisante pour altérer les réponses visuelles des neurones du CGL. La sensibilité au contraste du CGL est ainsi suffisamment robuste pour ne pas être modifiée par une perte de DA importante (révélée par une perte de 75% de DOPAC).

Avenues de recherche

Il serait intéressant d'étudier plus en détail l'effet de la dopamine sur la sensibilité au contraste. Par exemple, en comparant l'effet de la 6-OHDA intravitréenne sur les sensibilités au contraste rétinienne et géniculée. Ceci pourrait se faire en combinant une mesure rétinienne de sensibilité au contraste comme le pERG ou l'enregistrement dans le nerf optique avec des enregistrements unitaires du CGL. Ce type d'expérience permettrait de mesurer les effets de la perte de DA sur les cellules ganglionnaires et géniculées chez un même animal. Une telle

expérience offrirait la possibilité de tester l'impact de la perte de DA sur la sensibilité au contraste des cellules ganglionnaires et de voir si ces effets se répercutent sur les réponses des cellules au sein du CGL.

Une seconde avenue de recherche serait d'injecter directement dans le CGL des agonistes ou antagonistes de la DA afin d'examiner comment la transmission dopaminergique peut moduler directement les fonctions du CGL, un peu comme nous avons examiné l'action de l'Ang II sur l'activité d'une structure comme le CS.

Références

- Akaoka, H., Saunier, C. F., Chergui, K., Charlety, P., Buda, M., et Chouvet, G. (1992). Combining in Vivo Volume-Controlled Pressure Microejection With Extracellular Unit Recording. *Journal of Neuroscience Methods*, 42(1-2), 119-28.
- Albrecht D, Broser M, Kruger H, et Bader M. (1997) Effects of angiotensin II and IV on geniculate activity in nontransgenic and transgenic rats. *European Journal of Pharmacology*, 332:53-63.
- Ambühl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, et Ferrario CM. (1992) Effect of angiotensin II and its selective antagonists on inferior olivary neurones. *Regulatory Peptides*, 41: 19-26.
- Angulo, A., de Juan, E., Martínez-Navarrete, G., Martín-Nieto, J., Barcia, C., Trinidad Herrero, M., et Cuenca, N. (2003). Decrease of GABAergic and glycinergic amacrine cells in the MPTP-treated monkey retina. *IBRO*.
- Awatramani, G., Wang, J., et Slaughter, M. M. (2001). Amacrine and Ganglion Cell Contributions to the Electroretinogram in Amphibian Retina. *Visual Neuroscience*, 18(1), 147-56.
- Baxter, C. R., Horvath, J. S., Duggin, G. G., et Tiller, D. J. (1980). Effect of Age on Specific Angiotensin II-Binding Sites in Rat Brain. *Endocrinology*, 106(3), 995-9.
- Berson, D. M., Dunn, F. A., et Takao, M. (2002). Phototransduction by

Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295(5557), 1070-3.

Biedermann, B., Frohlich, E., Grosche, J., Wagner, H. J., et Reichenbach, A. (1995). Mammalian Muller (Glial) Cells Express Functional D2 Dopamine Receptors. *Neuroreport*, 6(4), 609-12.

Binns, K.E. (1999) The synaptic pharmacology underlying sensory processing in the superior colliculus. *Progress in Neurobiology*, 59(2):129-59.

Bjelke, B., Goldstein, M., Tinner, B., Andersson, C., Sesack, S. R., Steinbusch, H. W., Lew, J. Y., He, X., Watson, S., Tengroth, B., et Fuxe, K. (1996). Dopaminergic Transmission in the Rat Retina: Evidence for Volume Transmission. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 12(1), 37-50.

Bloomfield, S. A., Xin, D., et Persky, S. E. (1995). A Comparison of Receptive Field and Tracer Coupling Size of Horizontal Cells in the Rabbit Retina. *Visual Neuroscience*, 12(5), 985-99.

Blue, M. E., et Parnavelas, J. G. (1983). The Formation and Maturation of Synapses in the Visual Cortex of the Rat. II. Quantitative Analysis. *Journal of Neurocytology*, 12(4), 697-712.

Bodis-Wollner, I. (1990a). The Visual System in Parkinson's Disease. *Research Publications - Association for Research in Nervous & Mental Disease*, 67, 297-316.

- Bodis-Wollner, I. (1990b). Visual Deficits Related to Dopamine Deficiency in Experimental Animals and Parkinson's Disease Patients. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 296-302.
- Bodis-Wollner, I. (2002). Visualizing the Next Steps in Parkinson Disease. *Archives of Neurology*, 59(8), 1233-4.
- Bodis-Wollner, I., Marx, M. S., Mitra, S., Bobak, P., Mylin, L., et Yahr, M. (1987). Visual Dysfunction in Parkinson's Disease. Loss in Spatiotemporal Contrast Sensitivity. *Brain*, 110(Pt 6), 1675-98.
- Bodis-Wollner, I., et Onofrj, M. (1987). The Visual System in Parkinson's Disease. *Advances in Neurology*, 45, 323-7.
- Bodis-Wollner, I., et Yahr, M. D. (1978). Measurements of Visual Evoked Potentials in Parkinson's Disease. *Brain*, 101(4), 661-71.
- Bulens, C., Meerwaldt, J. D., et Van der Wildt, G. J. (1988). Effect of Stimulus Orientation on Contrast Sensitivity in Parkinson's Disease. *Neurology*, 38(1), 76-81.
- Bullier, J., et Norton, T. T. (1979). Comparison of Receptive-Field Properties of X and Y Ganglion Cells With X and Y Lateral Geniculate Cells in the Cat. *Journal of Neurophysiology*, 42(1 Pt 1), 274-91.
- Bunnemann, B., Fuxe, K., et Ganten, D. (1993). The Renin-Angiotensin System in the Brain: an Update 1993. *Regulatory Peptides*,

46(3), 487-509.

Cohen, B., & Bodis-Wollner, I. (1990). Vision and Brain. Dowling J.E. *Functional and pharmacological organisation of the retina: dopamine, interplexiform cells, and neuromodulation* (pp. 1-18). New-York: Raven Press Ltd..

Cohen J, Iuvone PM, et Neff NH. (1981) Neuroleptic drugs activate tyrosine hydroxylase of retinal amacrine cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*, 218(2):390-4.

Colcher, A., et Simuni, T. (1999). Clinical Manifestations of Parkinson's Disease. *Medical Clinics of North America*, 83(2), 327-47.

Contini, M., et Raviola, E. (2003). Gabaergic Synapses Made by a Retinal Dopaminergic Neuron. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(3), 1358-63.

Cook, J. E., et Becker, D. L. (1995). Gap Junctions in the Vertebrate Retina. *Microscopy Research & Technique*, 31(5), 408-19.

Cook VI, Grove KI, McMenamin KM, Carter MR, Harding JW, et Speth RC. (1991) The AT2 angiotensin receptor subtype predominates in the 18 day gestation fetal rat brain. *Brain Research*, 560:334-336.

Dacheux, R. F., et Raviola, E. (1986). The Rod Pathway in the Rabbit

Retina: a Depolarizing Bipolar and Amacrine Cell. *Journal of Neuroscience*, 6(2), 331-45.

Dauer, W., et Przedborski, S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39(6), 889-909.

Daw, N. W., Jensen, R. J., et Brunken, W. J. (1990). Rod Pathways in Mammalian Retinae. *Trends in Neurosciences*, 13(3), 110-5.

Djamgoz, M. B., et Wagner, H. J. (1992). Localization and Function of Dopamine in the Adult Vertebrate Retina. *Neurochemistry International*, 20(2), 139-91.

Dong, C. J., et Hare, W. A. (2000). Contribution to the Kinetics and Amplitude of the Electroretinogram B-Wave by Third-Order Retinal Neurons in the Rabbit Retina. *Vision Research*, 40(6), 579-89.

Dong, C. J., et Hare, W. A. (2002). Gabac Feedback Pathway Modulates the Amplitude and Kinetics of Erg B-Wave in a Mammalian Retina in Vivo. *Vision Research*, 42(9), 1081-7.

Dreher, B., & Robinson, S. R. (1991). Neuro-anatomy of the Visual Pathways and Their Development. L. J. Garey, B. Dreher , & S. R. Robinson *The organization of the visual thalamus*. (pp. 176-234). UK: Macmillan Press.

Ehinger, B., et Nordenfelt, L. (1977). Destruction of Retinal Dopamine-

Containing Neurons in Rabbit and Goldfish. *Experimental Eye Research*, 24(2), 179-87.

Enroth-Cugell, C., et Robson, J. G. (1966). The contrast sensitivity of retinal ganglion cells of the cat. *Journal of Physiology (London)*, 187, 517-552.

Enroth-Cugell, C., Robson, J. G., Schweitzer-Tong, D. E., et Watson, A. B. (1983). Spatio-Temporal Interactions in Cat Retinal Ganglion Cells Showing Linear Spatial Summation. *Journal of Physiology*, 341, 279-307 .

Feldman, R. S., Meyer, J. S., & Quenzer, L. F. (1996). *Principles of neuropsychopharmacology* . Massachusetts: Sianuer Associates, Inc Publishers.

Ganten, D., et Speck, G. (1978). The Brain Renin-Angiotensin System: a Model for the Synthesis of Peptides in the Brain. *Biochemical Pharmacology*, 27(20), 2379-89.

Gelband, C. H., Zhu, M., Lu, D., Reagan, L. P., Fluharty, S. J., Posner, P., Raizada, M. K., et Sumners, C. (1997). Functional Interactions Between Neuronal At1 and At2 Receptors. *Endocrinology*, 138(5), 2195-8.

Ghilardi, M. F., Marx, M. S., Bodis-Wollner, I., Camras, C. B., et Glover, A. A. (1989). The Effect of Intraocular 6-Hydroxydopamine on Retinal Processing of Primates. *Annals of Neurology*, 25(4), 357-

64.

Hack, I., Peichl, L., et Brandstatter, J. H. (1999). An Alternative Pathway for Rod Signals in the Rodent Retina: Rod Photoreceptors, Cone Bipolar Cells, and the Localization of Glutamate Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 14130-5.

Hadjiconstantinou M, Krajnc D, Rossetti Z ,et Neff NH. (1990) Modulation of dopamine metabolism in the retina via dopamine D2 receptors. *Brain Research*, 12;533(1):20-3.

Harnois, C., et Di Paolo, T. (1990). Decreased Dopamine in the Retinas of Patients With Parkinson's Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31(11), 2473-5.

He, S., et Masland, R. H. (1998). On Direction-Selective Ganglion Cells in the Rabbit Retina: Dendritic Morphology and Pattern of Fasciculation. *Visual Neuroscience*, 15(2), 369-75.

He, S., Weiler, R., et Vaney, D. I. (2000). Endogenous Dopaminergic Regulation of Horizontal Cell Coupling in the Mammalian Retina. *Journal of Comparative Neurology*, 418(1), 33-40.

Hensler, J. G., et Dubocovich, M. L. (1986). D1-Dopamine Receptor Activation Mediates [3h]Acetylcholine Release From Rabbit Retina. *Brain Research*, 398(2), 407-12.

- Hoffmann, K. P., Stone, J., et Sherman, S. M. (1972). Relay of Receptive-Field Properties in Dorsal Lateral Geniculate Nucleus of the Cat. *Journal of Neurophysiology*, 35(4), 518-31.
- Hokoc, J. N., et Mariani, A. P. (1987). Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity in the Rhesus Monkey Retina Reveals Synapses From Bipolar Cells to Dopaminergic Amacrine Cells. *Journal of Neuroscience*, 7(9), 2785-93.
- Huerta, M.F et Harting, J.K. (1984) Connectional analysis of the superior colliculus. *Trends in Neuroscience*, 7:286-289.
- Isayama, T., Berson, D. M., et Pu, M. (2000). Theta Ganglion Cell Type of Cat Retina. *Journal of Comparative Neurology*, 417(1), 32-48.
- Jacobi PC, Osswald H, Jurklies B, et Zrenner E. (1994) Neuromodulatory effects of the renin-angiotensin system on the cat electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35:973-980.
- Jagadeesh, J. M., Lee, H. C., et Salazar-Bookaman, M. (1980). Influence of Chlorpromazine on the Rabbit Electroretinogram. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 19(12), 1449-56.
- Jagadeesh, J. M., et Sanchez, R. (1981). Effects of Apomorphine on the Rabbit Electroretinogram. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 21(4), 620-4.

- Kaas, J. H., Guillery, R. W., et Allman, J. M. (1972). Some Principles of Organization in the Dorsal Lateral Geniculate Nucleus. *Brain, Behavior & Evolution*, 6(1), 253-99.
- Knapp, A. G., et Dowling, J. E. (1987). Dopamine Enhances Excitatory Amino Acid-Gated Conductances in Cultured Retinal Horizontal Cells. *Nature*, 325(6103), 437-9.
- Knapp, A. G., Schmidt, K. F., et Dowling, J. E. (1990). Dopamine Modulates the Kinetics of Ion Channels Gated by Excitatory Amino Acids in Retinal Horizontal Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(2), 767-71.
- Kolb, H. (1994). The Architecture of Functional Neural Circuits in the Vertebrate Retina. The Proctor Lecture.[Erratum Appears in Invest Ophthalmol 1994 Sep;35(10):3576]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35(5), 2385-404.
- Kuffler, S.W. (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, 16, 37-68.
- Lafond, G., Cao, W., Drumheller, A., Jolicoeur, F. B., Zaharia, M., et Realbrunette, J. (1994). Selective Effects of Retinal Dopamine Depletion on Partial Ischemia-Induced Electoretinographic Hyperresponses in Rabbits. *Documenta Ophthalmologica*, 88(1), 89-97.

- Lam, D. M. (1997). Neurotransmitters in the Vertebrate Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 38(3), 553-6.
- Leventhal, A. G., Rodieck, R. W., et Dreher, B. (1985). Central Projections of Cat Retinal Ganglion Cells. *Journal of Comparative Neurology*, 237(2), 216-26.
- Levine, M., & Shefner, J. (1991). *Fundamentals of Sensation and Perception*. Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing Company.
- Lin, Z. S., et Yazulla, S. (1994). Depletion of Retinal Dopamine Does Not Affect the Erg B-Wave Increment Threshold Function in Goldfish in Vivo. *Visual Neuroscience*, 11(4), 695-702.
- Linsenmeier, R. A., Frishman, L. J., Jakiela, H. G., et Enroth-Cugell, C. (1982). Receptive Field Properties of X and Y Cells in the Cat Retina Derived From Contrast Sensitivity Measurements. *Vision Research*, 22(9), 1173-83.
- MacNeil, M. A., Heussy, J. K., Dacheux, R. F., Raviola, E., et Masland, R. H. (1999). The Shapes and Numbers of Amacrine Cells: Matching of Photofilled With Golgi-Stained Cells in the Rabbit Retina and Comparison With Other Mammalian Species. *Journal of Comparative Neurology*, 413(2), 305-26.
- Maguire, G., et Werblin, F. (1994). Dopamine Enhances a Glutamate-Gated Ionic Current in Off Bipolar Cells of the Tiger Salamander

Retina. *Journal of Neuroscience*, 14(10), 6094-101.

Maguire, G. W., et Smith, E. L. 3rd. (1985). Cat Retinal Ganglion Cell Receptive-Field Alterations After 6-Hydroxydopamine Induced Dopaminergic Amacrine Cell Lesions. *Journal of Neurophysiology*, 53(6), 1431-43.

Marmor, M. F., Hock, P., Schechter, G., Pfefferbaum, A., Berger, P. A., et Maurice, R. (1988). Oscillatory Potentials as a Marker for Dopaminergic Disease. *Documenta Ophthalmologica*, 69(3), 255-61.

Marshak, D. W. (2001). Synaptic Inputs to Dopaminergic Neurons in Mammalian Retinas. *Progress in Brain Research*, 131, 83-91.

Masland, R. H. (2001). The Fundamental Plan of the Retina. *Nature Neuroscience*, 4(9), 877-86.

Masland, R. H., et Raviola, E. (2000). Confronting Complexity: Strategies for Understanding the Microcircuitry of the Retina. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 249-84.

McMahon, D. G., Zhang, D. Q., Ponomareva, L., et Wagner, T. (2001). Synaptic Mechanisms of Network Adaptation in Horizontal Cells. *Progress in Brain Research*, 131, 419-36.

Merabet, L., de Gasparo, M., et Casanova, C. (1994). Neuromodulatory Effects of Angiotensin II in the Visual Layers of the Rat Superior

Colliculus. *Neuroreport*, 5(18), 2649-52.

Merabet, L., de Gasparo, M., et Casanova, C. (1997). Dose-Dependent Inhibitory Effects of Angiotensin II on Visual Responses of the Rat Superior Colliculus: At1 and At2 Receptor Contributions. *Neuropeptides*, 31(5), 469-81.

Meshulam, R. I., Moberg, P. J., Mahr, R. N., et Doty, R. L. (1998). Olfaction in Neurodegenerative Disease: a Meta-Analysis of Olfactory Functioning in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Archives of Neurology*, 55(1), 84-90.

Michels, K. M., Heemskerk, F. M., et Saavedra, J. M. (1994). Selective Changes in Angiotensin II At1 and At2 Receptor Subtypes in the Rat Superior Colliculus Following Eye Enucleation. *Neuroscience*, 58(4), 835-44.

Millan, M. A., Jacobowitz, D. M., Aguilera, G., et Catt, K. J. (1991). Differential Distribution of At1 and At2 Angiotensin II Receptor Subtypes in the Rat Brain During Development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), 11440-4.

Miller, A. J., McKoon, M., Pinneau, M., et Silverstein, R. (1983). Postnatal Synaptic Development of the Rat. *Brain Research*, 284(2-3), 205-13.

Miller, R. F., et Dowling, J. E. (1970). Intracellular Responses of the

- Muller (Glial) Cells of Mudpuppy Retina: Their Relation to B-Wave of the Electroretinogram. *Journal of Neurophysiology*, 33(3), 323-41.
- Molotchnikoff S, et Itaya SK. (1993) Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Brain Research Development Brain Research*, 72: 300-304.
- Morin, L. P., Blanchard, J. H., et Provencio, I. (2003). Retinal Ganglion Cell Projections to the Hamster Suprachiasmatic Nucleus, Intergeniculate Leaflet, and Visual Midbrain: Bifurcation and Melanopsin Immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*, 465(3), 401-16.
- Nelson, R., et Kolb, H. (1983). Synaptic Patterns and Response Properties of Bipolar and Ganglion Cells in the Cat Retina. *Vision Research*, 23(10), 1183-95.
- Newman, E. A., et Odette, L. L. (1984). Model of Electroretinogram B-Wave Generation: a Test of the K⁺ Hypothesis. *Journal of Neurophysiology*, 51(1), 164-82.
- Nguyen-Legros, J., Simon, A., Caille, I., et Bloch, B. (1997a). Immunocytochemical Localization of Dopamine D1 Receptors in the Retina of Mammals. *Visual Neuroscience*, 14(3), 545-51.
- Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., et Savy, C. (1997b). Dopaminergic and Gabaergic Retinal Cell Populations in

Mammals. *Microscopy Research & Technique*, 36(1), 26-42.

Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., et Vernier, P. (1999). Dopamine Receptor Localization in the Mammalian Retina. *Molecular Neurobiology*, 19(3), 181-204.

Oliver, P., Jolicoeur, F. B., Lafond, G., Drumheller, A., et Brunette, J. R. (1987). Effects of Retinal Dopamine Depletion on the Rabbit Electroretinogram. *Documenta Ophthalmologica*, 66(4), 359-71.

Olivier, P., Jolicoeur, F. B., Lafond, G., Drumheller, A. L., et Brunette, J. R. (1986). Dose Related Effects of 6-OHda on Rabbit Retinal Dopamine Concentrations and Erg B-Wave Amplitudes. *Brain Research Bulletin*, 16(5), 751-3.

Olveczky, B. P., Baccus, S. A., et Meister, M. (2003). Segregation of Object and Background Motion in the Retina. *Nature*, 423(6938), 401-8.

Oyster, C. W., et Barlow, H. B. (1967). Direction-Selective Units in Rabbit Retina: Distribution of Preferred Directions. *Science*, 155(764), 841-2.

Oyster, C. W., Takahashi, E. S., Cilluffo, M., et Brecha, N. C. (1985). Morphology and Distribution of Tyrosine Hydroxylase-Like Immunoreactive Neurons in the Cat Retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(18), 6335-9.

- Peichl, L., Ott, H., et Boycott, B. B. (1987). Alpha Ganglion Cells in Mammalian Retinae. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 231(1263), 169-97.
- Pourcho, R. G. (1982). Dopaminergic Amacrine Cells in the Cat Retina. *Brain Research*, 252(1), 101-9.
- Raghavendra V, Chopra K, et Kulkarni SK.(1998) Modulation of motor functions involving the dopaminergic system by AT1 receptor antagonist Losartan. *Neuropeptides*, 32:275-280.
- Regan, D., et Maxner, C. (1987). Orientation-Selective Visual Loss in Patients With Parkinson's Disease. *Brain*, 110(Pt 2), 415-32.
- Rhoades, R. W., Mooney, R. D., & Fish, S. E. (1991). Retinotopic and visuotopic representations in the Mammalian superior colliculus. *Vision and Dysfunction: Neuroanatomy of the visual pathways and their development*. Cronly-Dillon, J.R. (Ed.), CRC Press, Boston Vol.3:150-175.
- Rodieck, R. W. (1998). *The first step in seeing*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc Publishers.
- Rowe B.P, Grove K.L, Saylor D.L et 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.

- Ruksenas O, Fjeld I.T, Heggelund P. (2000) Spatial summation and center-surround antagonism in the receptive field of single units in the dorsal lateral geniculate nucleus of cat: comparison with retinal input. *Visual Neuroscience*. 17(6):855-70.
- Savy, C., Simon, A., et Nguyen-Legros, J. (1991). Spatial Geometry of the Dopamine Innervation in the Avascular Area of the Human Fovea. *Visual Neuroscience*, 7(5), 487-98.
- Schneider, T., et Zrenner, E. (1991). Effects of D-1 and D-2 Dopamine Antagonists on Erg and Optic Nerve Response of the Cat. *Experimental Eye Research*, 52(4), 425-30.
- Schwartz, S. H. (1999). *Visual Perception: A Clinical Orientation*. 2nd ed. Stamford: Appleton and Lange.
- Sharpe, L. T., et Stockman, A. (1999). Rod Pathways: the Importance of Seeing Nothing.[Erratum Appears in Trends Neurosci 2000 Jan;23(1):39]. *Trends in Neurosciences*, 22(11), 497-504.
- Shenoy UV, Richards EM, Huang XC, et Sumners C. (1999) Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology*, 140: 500-509.
- Sherman, S. M., et Koch, C. (1986). The Control of Retinogeniculate Transmission in the Mammalian Lateral Geniculate Nucleus. *Experimental Brain Research*, 63(1), 1-20.

Sillito, A. M. & J. H. E. (1997). Functional organization influencing neurotransmission in the lateral geniculate nucleus. M. Steriade *Thalamus* (pp. 1-52).

Skrandies, W., et Wassle, H. (1988). Dopamine and Serotonin in Cat Retina: Electroretinography and Histology. *Experimental Brain Research*, 71(2), 231-40.

So, Y. T., et Shapley, R. (1979). Spatial Properties of X and Y Cells in the Lateral Geniculate Nucleus of the Cat and Conduction Velocities of Their Inputs. *Experimental Brain Research*, 36(3), 533-50.

Sprague, J.M (1991). The role of the superior colliculus in facilitating visual attention and form perception. *Proceedings from the National Academy of Sciences*, 88: 1286-1289.

Ste-Marie, L., Boismenu, D., Vachon, L., et Montgomery, J. (1996). Evaluation of Sodium 4-Hydroxybenzoate as an Hydroxyl Radical Trap Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection. *Analytical Biochemistry*, 241(1), 67-74.

Sterling, P. (1983). Microcircuitry of the Cat Retina. *Annual Review of Neuroscience*, 6, 149-85.

Sterling, P. (1995). Vision. Tuning Retinal Circuits. *Nature*, 377(6551),

676-7.

Stockton, R. A., et Slaughter, M. M. (1989). B-Wave of the Electroretinogram. A Reflection of on Bipolar Cell Activity. *Journal of General Physiology*, 93(1), 101-22.

Straschill, M., et Perwein, J. (1969). The Inhibition of Retinal Ganglion Cells by Catecholeamines and Gamma-Aminobutyric Acid. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 312(3), 45-54.

Strettoi, E., Dacheux, R. F., et Raviola, E. (1994). Cone Bipolar Cells as Interneurons in the Rod Pathway of the Rabbit Retina. *Journal of Comparative Neurology*, 347(1), 139-49.

Takahashi, E. S. (1988). Dopaminergic Neurons in the Cat Retina. *American Journal of Optometry & Physiological Optics*, 65(5), 331-6.

Textorius, O., Nilsson, S. E., et Andersson, B. E. (1989). Effects of Intravitreal Perfusion With Dopamine in Different Concentrations on the Dc Electroretinogram and the Standing Potential of the Albino Rabbit Eye. *Documenta Ophthalmologica*, 73(2), 149-62.

Troy, J. B., et Shou, T. (2002). The Receptive Fields of Cat Retinal Ganglion Cells in Physiological and Pathological States: Where We Are After Half a Century of Research. *Progress in Retinal & Eye Research*, 21(3), 263-302.

- Tsutsumi K. et Saaverdra J.M. (1991a) Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *American J. of Physiology*, 261:R209-216.
- Tsutsumi K. et Saaverdra J.M. (1991b) Differential development of angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. *Endocrinology*, 128(1):630-632.
- Tsutsumi K., Senzer A, et Saaverdra J.M (1993) Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Research*, 631: 212-220.
- Vaquero, C. F., Pignatelli, A., Partida, G. J., et Ishida, A. T. (2001). A Dopamine- and Protein Kinase a-Dependent Mechanism for Network Adaptation in Retinal Ganglion Cells. *Journal of Neuroscience*, 21(21), 8624-35.
- Versaux-Botteri, C., et Nguyen-Legros, J. (1986). An Improved Method for Tyrosine Hydroxylase Immunolabeling of Catecholamine Cells in Whole Mounted Rat Retina. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 34(6), 743-7.
- Veruki, M. L., et Wassle, H. (1996). Immunohistochemical Localization of Dopamine D1 Receptors in Rat Retina. *European Journal of Neuroscience*, 8(11), 2286-97.
- Voigt, T., et Wassle, H. (1987). Dopaminergic Innervation of a II Amacrine Cells in Mammalian Retina. *Journal of Neuroscience*,

7(12), 4115-28.

von Bohlen und Halbach, O. (2003). Angiotensin Iv in the Central Nervous System. *Cell & Tissue Research*, 311(1), 1-9.

Walther T, Voigt JP, Fukamizu A, Fink H, et Bader M. (1999). Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behavioural Brain Research*, 100:1-4.

Wang, H. H., Cuenca, N., et Kolb, H. (1990). Development of Morphological Types and Distribution Patterns of Amacrine Cells Immunoreactive to Tyrosine Hydroxylase in the Cat Retina. *Visual Neuroscience*, 4(2), 159-75.

Wassle, H., et Boycott, B. B. (1991). Functional Architecture of the Mammalian Retina. *Physiological Reviews*, 71(2), 447-80.

Wayner MJ, Polan-Curtain J, et Armstrong DL. (1995) Dose and time dependency of angiotensin II inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Peptides*, 16: 1079-1082.

Wienrich, M., et Zrenner, E. (1984). Cone Mechanisms and Their Colour-Opponent Interaction in Monkeys and Cat. *Ophthalmic Research*, 16(1-2), 40-7.

Wink, B., et Harris, J. (2000). A Model of the Parkinsonian Visual System: Support for the Dark Adaptation Hypothesis. *Vision Research*, 40(14), 1937-46.

- Winnicka MM et Wisniewski K. (1999) Disruption of temporo-entorhinal connections abolishes the facilitatory effect of angiotensins on memory in rats. *Pharmacological Research*, 40:53-59.
- Witkovsky, P., et Schutte, M. (1991). The Organization of Dopaminergic Neurons in Vertebrate Retinas. *Visual Neuroscience*, 7(1-2), 113-24.
- Wright, J. W., et Harding, J. W. (1994). Brain Angiotensin Receptor Subtypes in the Control of Physiological and Behavioral Responses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 18(1), 21-53.
- Wright, J. W., Krebs, L. T., Stobb, J. W., et Harding, J. W. (1995). The Angiotensin Iv System: Functional Implications. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16(1), 23-52.
- Wurziger, K., Lichtenberger, T., et Hanitzsch, R. (2001). On-Bipolar Cells and Depolarising Third-Order Neurons as the Origin of the Erg-B-Wave in the Rcs Rat. *Vision Research*, 41(8), 1091-101.
- Xin, D., et Bloomfield, S. A. (2000). Effects of Nitric Oxide on Horizontal Cells in the Rabbit Retina. *Visual Neuroscience*, 17(5), 799-811.
- 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.

- Xu, X., et Karwoski, C. J. (1994). Current Source Density Analysis of Retinal Field Potentials. II. Pharmacological Analysis of the B-Wave and M-Wave. *Journal of Neurophysiology*, 72(1), 96-105.
- Zhao Y, Kerscher N, Eysel U, Funke K. (2000) D1 and D2 receptor-mediated dopaminergic modulation of visual responses in cat dorsal lateral geniculate nucleus. *Journal of Physiology*. 15;539(Pt1):223-38.

Annexe 1: article publié

Effects of angiotensin II on visual evoked potentials in the superior colliculus of juvenile rats.

Effects of angiotensin II on visual evoked potentials in the superior colliculus of juvenile rats

G. Coudé, A. Marois, C. Casanova

Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Summary There are age-related changes in the relative expression of the AT₁ and AT₂ receptors of angiotensin II (Ang II) in brain regions such as the superior colliculus, a midbrain visual structure where both receptor subtypes are found. We investigated the effects of Ang II on gross visual activity in the colliculus of anesthetized rats aged between 15 and 35 post-natal days. Microinjection of Ang II in the superficial layers yielded a strong reduction in the amplitude of visual evoked potentials in a dose-related manner. Injection of the peptide in more ventral collicular layers did not modify the potential confirming the discrete localization of the angiotensinergic receptors in the superficial layers. Preliminary data indicated that the co-injection of Ang II with Losartan or PD 123319 yielded a partial blockade of Ang II suppressive effects, indicating that both AT₁ and AT₂ receptors are likely to be involved in mediating these responses. Overall, this study shows that the inhibitory nature of Ang II action is similar in juvenile and adult animals (Merabet et al. 1994 and Merabet et al. 1997) © 2000 Harcourt Publishers Ltd

INTRODUCTION

It is now clearly established that central angiotensin II (Ang II) is not solely associated with fluid homeostasis and blood pressure control because it can modulate neuronal activity in regions of the brain involved in cognition (Wayner et al., 1995; Walther et al., 1999; Winnicka and Wisniewski, 1999), motor control (Ambühl et al., 1992; Raghavendra et al., 1998), and sensory integration (Jacobi et al., 1994; Albrecht et al., 1997). Consistent with these findings, we reported that local intra-cerebral administration of Ang II reduces the amplitude of visually evoked potentials in the superficial layers of the superior colliculus (SC) in adult rats (Merabet et al., 1994). Comparable findings were reported in the SC of adult hamsters (Mooney et al., 1994). The SC contains both AT₁ and AT₂ receptors subtypes (Michels et al., 1994; Wright and Harding, 1994) and the inhibitory action of Ang II on adult rat collicular gross visual activity was shown for the

most part to be mediated by activation of AT₁ receptors (Merabet et al., 1997). This observation is in agreement with the general view that Ang II exerts its physiological action through AT₁ receptor sub-types. Only a few *in vitro* studies have revealed a clear physiological role of the AT₂ receptors in the neuromodulatory activity of Ang II (Ambühl et al., 1992; Xiong and Marshall, 1994). AT₂ receptors have been associated with repair processes and neuronal development and maturation, depending on the experimental model (Wright et al., 1995; Shenoy et al., 1999). This conclusion is derived in part from the fact that in some structures (e.g. the lateral geniculate nucleus [Michels et al., 1994], AT₂ receptors are only found during the fetal and post-natal developmental period and that in other structures (such as the SC), the density of this receptor sub-type declines with age. (Cook et al., 1991; Millan et al., 1991; Rowe et al., 1991; Tsutsumi and Saavedra, 1991a; Tsutsumi and Saavedra, 1991b; Tsutsumi et al., 1993).

Baxter et al. (1980) showed that there is an increase in the density of angiotensinergic receptors in the brain during the first 2 weeks after birth. In the midbrain, the number of receptors peaks at post-natal day 14 (PND 14) which corresponds to the time of opening of the eyelids and the onset of visual activity in the SC (Molotchnikoff and Itaya, 1993). The Ang II receptor density then decreases and reaches near adult values after PND 40. To

Received 14 February 2000

Accepted 2 June 2000

Correspondence to: Christian Casanova, Laboratoire des Neurosciences de la Vision, École d'optométrie, Université de Montréal, CP 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Tel.: +1514 343 2407 Fax: +1514 343 2382; [REDACTED]

our knowledge, no studies have investigated *in vivo* the physiological action of Ang II in young animals. It is possible, given the changes in receptor density and the relative proportions of AT₁-AT₂ receptors during brain development (Millan et al., 1991; Tsutsumi and Saavedra, 1991a; Tsutsumi and Saavedra, 1991b), that Ang II may have different physiological effects in young and adult animals. In the present study we investigated whether Ang II can modulate visual evoked activity in the SC of juvenile rats using an experimental approach similar to that previously utilized in adult animals (Merabet et al., 1994; Merabet et al., 1997). Parts of these findings have been presented in abstract form (Marois et al., 1996; Patry et al., 1997).

METHODS

Animal Preparation

Experiments were performed on normotensive Long Evans rats aged between 14–35 days and weighing between 30 and 130 g. All animals were treated according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. Anesthesia was induced by intra-peritoneal (i.p.) injection of Urethane 25% (2.5 g/kg). Atropine (0.04 mg/kg) was added to the solution for rats weighing more than 50 g to reduce tracheal secretions. The level of anesthesia was monitored throughout the experiment (i.e., using a leg stretch or pinch reflex) and supplemental doses of anesthetic were administered when needed. The pups were placed in a stereotaxic head holder designed to secure small animals (Stoelting). The electrocardiogram (ECG) was continuously monitored and the core temperature was maintained near 37°C by a custom made small heating pad (FHC) placed under the animal. Atropine sulfate (1%) eye drops were used to dilate the pupils and the corneas were protected by application of artificial tears. Lidocaine hydrochloride (2%) was administered at all points of pressure and incision. A bilateral craniotomy was performed anterior to *lambda* to expose the cerebral cortex overlying the SC of each hemisphere. The dura was incised and reflected only for animals older than PND 30. A surgical microscope was used to lower a glass microelectrode until the tip just penetrated the cortex. The skull opening was filled with agar to protect the tissues from desiccation. Using a micromanipulator, the microelectrode was advanced vertically through the cortex and into the superficial layers of the SC on the basis of visual response cues, and for older animals, adult stereotaxic coordinates. At the end of all experiments, a solution of artificial cerebrospinal fluid (aCSF) stained with Chicago Sky Blue (0.2–0.5%) was injected to confirm that the electrode was located in the superficial layers of the colliculus (see Fig. 1).

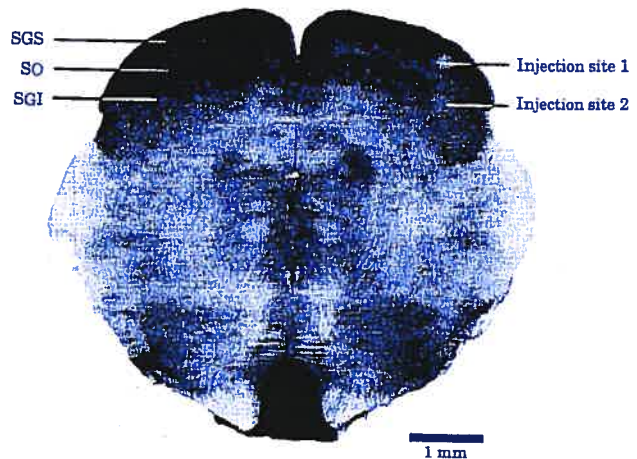


Fig. 1 Photograph of a coronal section of a juvenile rat brain stained to reveal acetylcholinesterase (AChE) activity. The Ang II injections and recordings sites appear pale when compared to neighboring regions. Note that a first injection was located in the stratum griseum superficiale (SGS) while a second one was made in the stratum griseum intermediale (SGI). Abbreviation: (SO); stratum opticum.

Recording and Visual Stimulation

Glass microelectrodes with a tip opening of ~25 μ m were used to record visual evoked potentials (VEP) in the SC (see Merabet et al., 1997 for details). The same microelectrode was used to deliver the peptide or its antagonists (see below). The signals were amplified and bandpass filtered between 10 and 1000 Hz. The recorded signals were also passed through an audio monitor and an oscilloscope. They were also fed to a PC compatible computer via an analogue/digital interface (CED 1401, CED Cambridge, UK). Triggered evoked potentials were averaged over 35 successive presentations using the SIGAVG software and later on, its MS Windows® version (SIGNAL v.1.x; CED, Cambridge, UK). Gross visual stimulation was provided by a diffuse flash (Grass photostimulator, intensity level 4; duration 10 μ s) placed 30 cm away from the contralateral eye of the hemisphere being recorded from. The stimulus frequency was set at 1 Hz.

Delivery of Pharmacological Agents

To permit a direct comparison between the effects of Ang II in juvenile and mature animals, we followed the same injection technique as that used in adult rats (Merabet et al., 1994; Merabet et al., 1997). The glass microelectrode filled with the drug was inserted in the head of a nanopump (WPI A1400 nanoliter injector) modified to allow the simultaneous recording of neuronal activity from the region immediately beneath the tip of the electrode. In the first experiments, Ang II (val¹⁵ Ang II; Ciba-Geigy Ltd) was dissolved in NaCl (0.9%). It was later

diluted in a more physiological medium, artificial cerebrospinal fluid (aCSF: in mM; NaCl 124, KCl 3, KH₂PO₄ 1.25, MgSO₄ 2.5, NaHCO₃ 26, d-glucose 10, 1-ascorbate 2, and CaCl₂ 3.4; osmolarity: 297 mOsm; pH = 7.2–7.3). The peptide was administered by micropressure at concentrations varying from 10⁻³ M to 10⁻¹² M at a constant rate of 10 nl/min for a total of 40 nl for 4 min. Studies of the effect of the specific AT₁ receptor antagonist Losartan (DUP 753) were carried out at 10⁻³ or 10⁻⁶ M and injected in conjunction with Ang II at equal concentrations ratios (1:1) but at an increased antagonist ratio (1:10 Ang II:Losartan) (Merabet et al., 1997). A similar procedure was used to study the effect of the AT₂ receptor antagonist PD 123319.

Experimental Protocol and Data Analysis

The electrode was lowered and positioned at the surface of the colliculus (determined by the first appearance of a visual response to the flash presentation). The electrode was then slowly advanced and positioned in the superficial layers of the SC on the basis of the VEP waveform. The 'multi-unit' receptive field at the recording site was mapped. Recordings of the VEP were taken at approximately 1–2 min intervals until the waveform and amplitude appeared stable. Then, three successive control recordings were taken and the pharmacological agent was injected (the injection onset represents time at zero). The VEP was recorded every minute throughout the period of injection. Once injection was completed, recordings were taken 1, 3 and 6 min after injection and then every 5 min until a partial or total recovery of the VEP amplitude was observed. The area, amplitude and latency of the evoked potential waveform were calculated before, during, and after injection of the peptide. There was an intimate relationship between the measurements based on both the amplitude of the potential and the area under the curve ($r(45)=0.85$, $P < 0.001$), and the former was used to quantify the effects as was the case in our previous studies of adult animals (Merabet et al., 1994; Merabet et al., 1997). The calculated values were all normalized and the magnitude of the effect was expressed as a percentage (of the initial amplitude control measurements) to facilitate comparison across experiments. Overall results are expressed as means \pm SEM and statistical significance of the observed effects was determined using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test or ANOVA on ranks (Kruskal–Wallis) with Dunn's multiple comparison test depending on the distribution of variables ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$). Percentage data were subjected to arcsin-square root transformation before analysis. The injection was considered as successful only when: 1) control recordings were stable; 2) there was a clear time relationship between the injection period and

the potential changes; 3) the electrode was not obstructed (as confirmed by the characteristic sound of the pump during injection and by the fact that the solution could be released freely when the electrode was removed from the brain); 4) there was a partial or total recovery of the signal (to at least 75% of the control recordings); 5) the stained solution administered at the end of the experiment was located in the *stratum griseum superficiale*.

Histology

Each animal was given an overdose of Halothane by inhalation. The brain was then removed and fixed in buffered formalin (10%) for a period of 1 week. The fixed tissue was then cut in 100 μ m coronal sections and stained to reveal acetylcholinesterase (AChE) activity. For each experiment, histological observation was carried out to confirm the position of the Chicago Sky Blue stained solution. Figure 1 depicts a photograph of a coronal plane through a rat SC showing the injection of Ang II in the superficial layers and a second more ventral injection in the *stratum griseum intermediale* (SGI).

RESULTS

General observations

Out of 216 collicular injections, 134 were considered successful based upon the criteria described in the Methods section. At effective concentrations, Ang II always reduced the amplitude of the VEP with a maximum effect generally observed during or immediately after the end of injection. There was no change of the VEP latency. Representative examples are depicted in Figure 2. The averaged control potentials shown in the top panels are decreased by 49% and 44% respectively after the administration of 10⁻³ and 10⁻⁶ M Ang II. An almost complete recovery of the signal was observed 15 min after the end of injection (bottom panels). Panels A and B of Figure 3 show the profiles of action of the peptide for two different concentrations and are represented by the normalized amplitude of the VEP as a function of time. The reduction in the amplitude of the potentials occurred shortly after the onset of injection and the time course of the effect was much more abrupt than the recovery period. These last examples further suggest that the magnitude of the inhibition depends on the peptide concentration.

Dose Response Relationship

Ang II was injected at four different concentrations in order to reveal any concentration-dependent effect of the

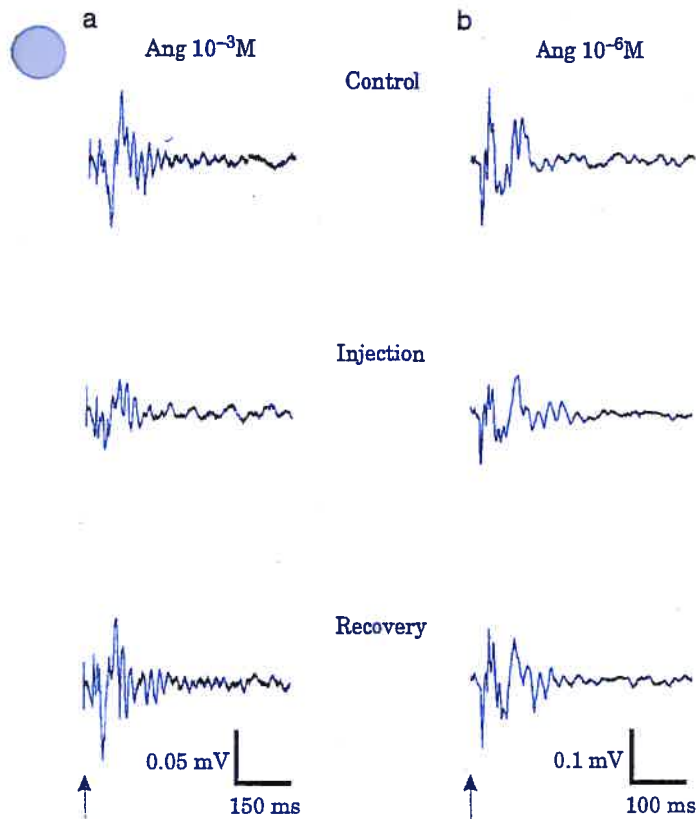


Fig. 2 Representative examples showing the effect of the injection of Ang II at two different concentrations (10^{-3} and 10^{-6} M in columns A and B, respectively) on VEPs recorded from the SGS of the SC. The peptide clearly reduced the amplitude of the VEP. An almost complete recovery of the potential was evident approximately 15 min after injection. The arrows represent stimulus onset. Injections in A and B were made at PND 25 and 22, respectively.

peptide. Overall, the strength of the inhibitory effect of Ang II tended to decrease as the concentration of the peptide was lowered (Fig. 4A). The concentrations of 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M yielded mean (\pm SEM) reductions in amplitude of the VEP of 45.4 ± 2.2 , 42.2 ± 3.0 , 34.5 ± 4 and $38.7 \pm 2.9\%$, respectively. ANOVA showed a significant effect of Ang II concentration on the VEP amplitude ($F(4,106)=5.05$; $P < 0.001$). Dunnett's comparisons between each Ang II concentration and control aCSF injections (mean reduction of $25.5 \pm 3.3\%$) indicated that the mean reductions observed at concentrations of 10^{-3} M and 10^{-6} M were significant ($P < 0.01$). There was also a relationship between the Ang II concentration and the mean recovery time ($H(4)=13.53$; $P < 0.01$). The VEP reached 75% of its initial amplitude after 25 and 21 min for, respectively, Ang II concentrations of 10^{-3} M and 10^{-6} M. The injections of Ang II at lower concentrations (10^{-9} and 10^{-12} M) were characterized by shorter recovery periods (14 and 10 min respectively). The duration of recovery at any concentration was not significantly different

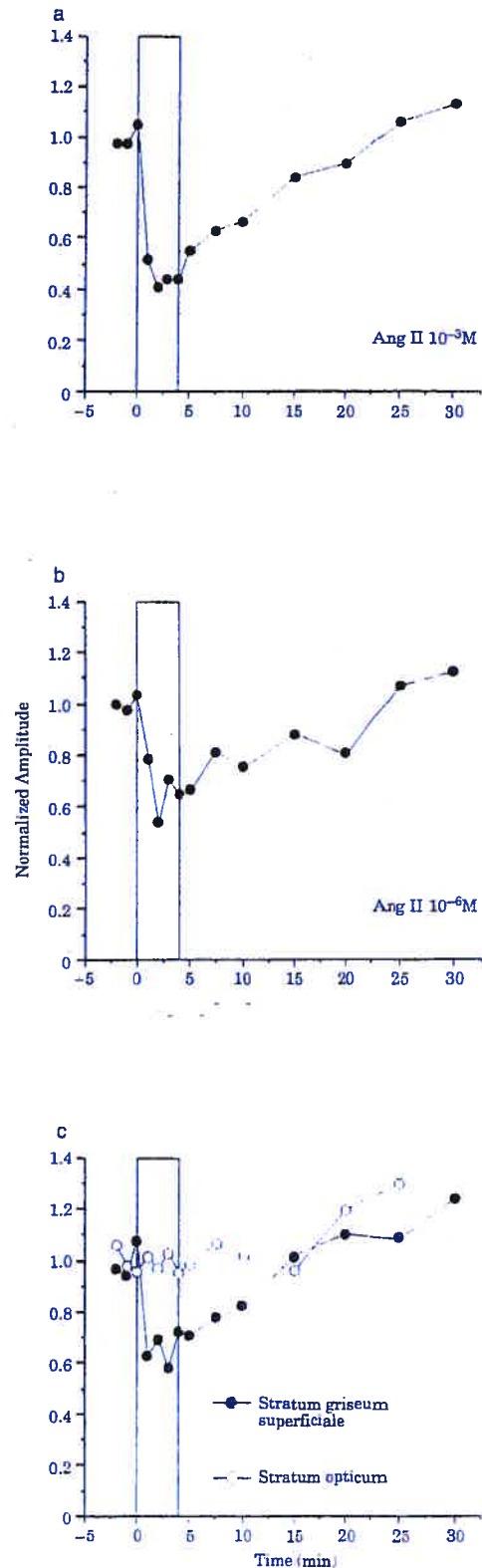


Fig. 3 Panels A and B show representative examples of the profile of action of Ang II injected at two different concentrations. Normalized amplitude is plotted as a function of time. The vertically oriented rectangle represents the period of injection. The onset of injection is at time 0. Panel C illustrates the effects of Ang II (10^{-9} M) as a function of depth in the colliculus. Injections in A, B and C were made at PND 24, 20 and 25, respectively.

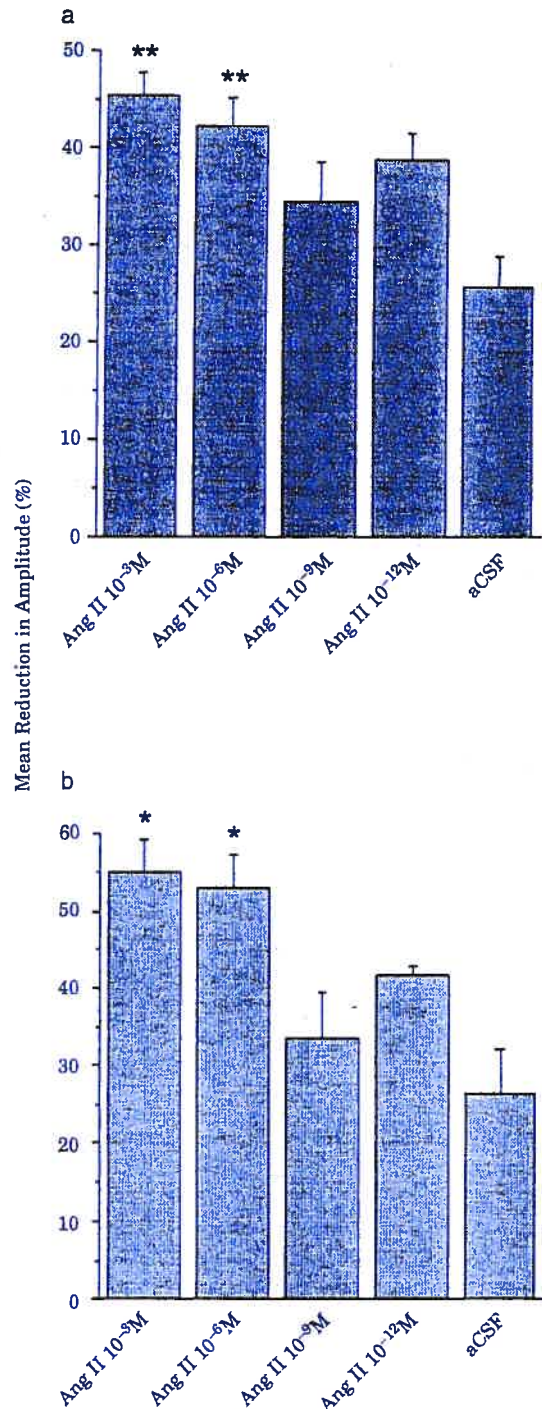


Fig. 4 Dose dependent inhibitory effect of Ang II as a function of the peptide concentration. In panel A, injections in all animal groups were pooled. The effects are compared to aCSF control injections, and were significant (Dunnnett's test, $P < 0.01$) for concentrations $>10^{-9}M$. Panel B shows the mean reduction in amplitude observed for the youngest animal group (PND 15–19). Note that the maximum effect of Ang II was noted for juvenile rats aged between 15 and 19 days. The mean reduction in amplitude observed at 10^{-3} and $10^{-6}M$ was significantly different from that computed after administration of the vehicle (Dunn's test, $P < 0.05$). Number of injections for Ang II 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-9} , $10^{-12}M$ and aCSF are 58, 26, 8, 6 and 17, respectively for panel A and 15, 9, 3, 4 and 6 respectively for panel B.

from that observed with aCSF ($P > 0.05$, Dunn's test). In summary, the magnitude of the inhibitory action of Ang II in juvenile rats and the duration of the associated recovery period tended to increase as the concentration of the peptide increased.

Localization of effects

We verified the laminar localization of the Ang II receptors by injecting the peptide in different layers of the colliculus. In all six cases, Ang II exerted its inhibitory action only when the injection was confined to the SGS. Injection below this visual layer yielded no significant change in the latency and magnitude of the VEP. An example is shown in panel C of Figure 3. As expected, the administration of Ang II in the SGS decreased the strength of the visual response (unfilled circles). A second injection, made more ventrally ($600 \mu m$ below the first site, in the *stratum optimum*) did not modify the signal.

Influence of age

We investigated the possibility that the action of Ang II may differ during the visual development of juvenile rats. In particular, we were interested in determining whether the effect of Ang II during the first week following the onset of visual activity in the colliculus was analogous or not to the effect observed in adulthood. Figure 4B shows that the effect in the youngest animals (PND 15–19) was similar to that observed for our complete sample (Fig. 4A) and that previously reported for the adult (Merabet et al., 1997). It is of note that Ang II tended to be more effective in the younger group of juvenile rats (PND 15–19), these are the visually active animals in which Ang II receptors are the most common (Baxter et al., 1980). Despite this latter observation, our study did not reveal significant differential effects of Ang II, neither at a concentration of $10^{-3} M$ ($F(3,57) = 2.04$; $P > 0.05$) nor at $10^{-6} M$ ($H(2) = 4.90$, $P > 0.05$) throughout the targeted development period.

Receptor subtypes

In order to compare the contribution of the two receptors in the inhibitory action of Ang II between juvenile and adult rats, we investigated the effect of Ang II with the presence of selective AT_1 and AT_2 antagonists for animals aged between 15 and 24 days which is a period characterized by a high density of Ang II receptors in the mid-brain (Baxter et al., 1980). In one series of experiments, Ang II was injected with the AT_1 receptor antagonist Losartan (DUP 753). Co-injection of Losartan and Ang II at equal concentrations (10^{-3} or $10^{-6}M$) yielded a partial

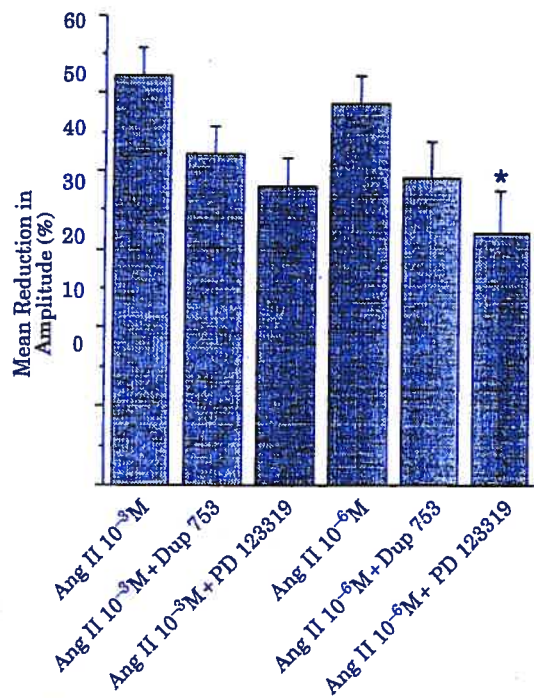


Fig. 5 Injection of Ang II with AT_1 and AT_2 antagonists on the VEP amplitude at two different concentrations. Each bar represents the mean \pm SEM. Injection of Ang II with the AT_1 antagonist shows a slight blockade of the Ang II inhibitory effect. Similarly, injection of Ang II with the AT_2 receptor antagonist PD 123319 partially blocked the inhibitory action of the peptide (Dunnett's test, $P < 0.05$). Number of injections from left to right is 25, 15, 13, 13, 10 and 8.

blockade of the inhibitory effect of Ang II (Fig. 5). In a second set of experiments, the effect of PD 123319, which specifically binds to AT_2 receptors, was studied. PD 123319 also reduced the effect of Ang II at the two concentrations used (10^{-3} and 10^{-6} M). This effect was more pronounced than that observed for the presence of Losartan, particularly at 10^{-6} M where it reached statistical significance ($F(2,28) = 3.67$, $P < 0.05$; Dunnett's test, $P < 0.05$). Despite the relatively small number of injections, these observations suggest that both AT_1 and AT_2 receptors are likely to be involved in mediating the suppressive effect of Ang II in juvenile animals, with a greater effect on AT_2 receptors. In eight cases, Ang II was injected with both Losartan and PD 123319. The overall degree of blockade when both antagonists were present was not significantly greater than that observed with a single antagonist ($F(2,49) = 0.24$, $P > 0.05$).

Indirect peripheral effects

For 14 successful Ang II injections, we also quantitatively measured the ECG frequency throughout the control and injection periods to determine whether the inhibitory effect of Ang II in the colliculus of juvenile rats was associated with peripheral changes. In our

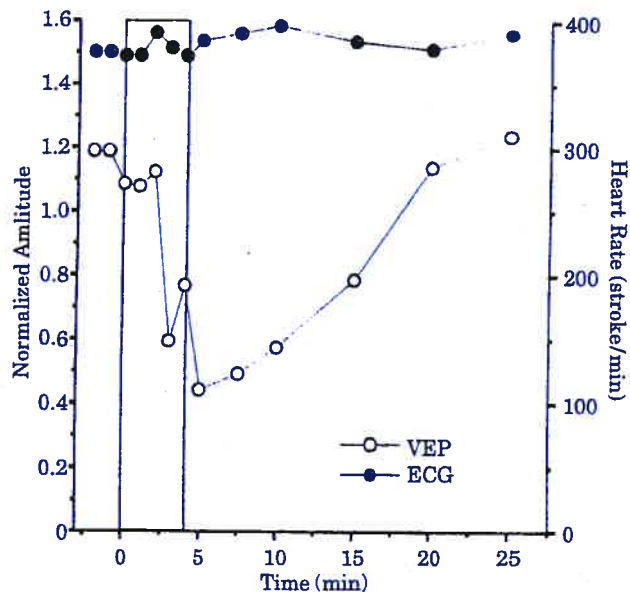


Fig. 6 Injection of Ang II at a high concentration (10^{-3} M) did not significantly modify the frequency of the cardiac rhythm but strongly reduced the amplitude of the visual evoked potential.

experimental conditions, we did not observe any significant changes in heart rate frequency at any of the tested Ang II concentrations (repeated ANOVA, $F(4,49) = 0.36$, $P > 0.05$). As shown in Figure 6, the injection of Ang II yielded a decrease of collicular activity (empty symbols), whereas the ECG frequency was not affected (filled symbols).

DISCUSSION

To our knowledge, this study is the first to demonstrate in vivo physiological effects of Ang II in brain structures of juvenile animals. Our results indicate that Ang II exerts an inhibitory action on collicular evoked potentials, an effect that is comparable to that observed in adult rats (Merabet et al., 1997). These effects were confined to the superficial layers of the SC in agreement with the anatomical location of angiotensinergic receptors revealed by autoradiographic studies (Michels et al., 1994). This last observation also rules out the possibility that the action of Ang II reported in the present study arises from direct action of the peptide on the vascular circuitry within the colliculus (see Merabet et al., 1997). By injecting Ang II at various concentrations (10^{-3} M to 10^{-12} M), we demonstrated that the effects of the peptide express a dose-related dependency. In contrast to adult animals (Merabet et al., 1994; Merabet et al., 1997), we did not observe a clear dose-response relationship for concentrations less than 10^{-6} M, as shown in Figure 4. There are several possible explanations for this finding.

1. A smaller range of concentrations was tested in the juvenile rats compared to adult animals, so we did not get an effect. In our previous study, the action of Ang II at eight concentrations ranging from 10^{-3} to 10^{-10} M was studied (Merabet et al., 1997). 2. The effects at the lowest concentrations, and particularly at 10^{-9} M, could have been masked by the perturbation caused by the injection per se. Comparing the results from this study and that of Merabet et al.'s study 1997 demonstrated that injection of the vehicle created a more pronounced transient perturbation in young than in adult animals (mean transient reduction of approximately 7% and 25% respectively). It is likely this difference occurs because the nervous tissue of immature animals is more sensitive to mechanical stress (Akaoka et al., 1992). 3. It is also possible that the receptors in young animals are less sensitive to exogenous Ang II or that the cascade of cellular events triggered by Ang II are not fully developed. Co-administration of the aminopeptidase inhibitor amastatin with Ang II did not increase the strength or duration of the Ang II effects on collicular potentials (data not shown) ruling out, to some extent, the possibility that the activity of the peptidases may be different in juvenile and adult animals. 4. Finally, the lack of effect at lower Ang II concentration may reflect the functional immaturity of the nervous tissue of juvenile animals. We know that only a limited number of synaptic connections in the young will be consolidated and maintained in the adult (Blue and Parnaveles, 1983; Miller et al., 1983), so the greater concentration of Ang II receptors found in juvenile animals (Baxter et al., 1980) may be associated with non-functional synapses.

Preliminary data also suggest that the inhibitory action of Ang II in animals aged between 14 and 25 days involves activation of both AT_1 and AT_2 receptors. Again the data are different from those observed in adults (Merabet et al., 1997) as 1. the strength of the blockade was more pronounced in mature rats and; 2. in young animals, the blocking effect of the AT_2 receptors was more effective than that of the AT_1 receptors. The latter observation is interesting because it is consistent with the finding that the AT_2 receptor sub-type is more common in young than in adult animals (Wright and Harding, 1994; Millan et al., 1991; Tsutsumi et al., 1991a). The fact that we could not observe a strong blockade of the inhibitory action of Ang II with either losartan or PD 123319 in juvenile rats was surprising. Several explanations can be proposed. 1. Again, this may be related to the changes induced by the injection per se that may have masked the more subtle effects of the antagonists. 2. It is also possible that the receptors' affinity to the antagonists is lower in immature animals, or that these antagonists bind to other receptors thereby reducing their efficacy (unspecific binding). 3. Moreover,

it is possible that the antagonists failed to effectively block the Ang II mediated effects because of an immediate action of Ang II. We used the same administration techniques as in adult animals (Merabet et al., 1997), which could indicate that the kinetics of the diffusion or action of Ang II differs between juvenile and mature rats. 4. A further possibility is that there is extensive inhibitory cross-talk (Gelband et al., 1997) between these two major receptors (AT_1 and AT_2) during development. For example, blocking the AT_2 receptors would reduce the inhibitory action on the AT_1 receptors, and increase the affinity of AT_1 receptors to Ang II, yielding a reduction of the VEP despite the presence of the antagonist. However, our observation that the blocking of both receptor sub-types did not fully block the Ang II mediated effects does not support this last explanation. However, these same observations are consistent with an alternative explanation regarding the weak effects of the Ang II antagonists in immature animals. It is possible that part of the action of Ang II was indirectly mediated through AT_4 receptors which are also expressed in the SC (Wright et al., 1995).

Finally, we did not observe any significant changes in cardiac rhythm during the administration of Ang II in the superficial layers of the SC of young animals. This observation is at odds with the data of D'Amico et al. (1998) which indicated that Ang II yielded cardiovascular changes in adult rats. This discrepancy may be related to the difference in the age of the animals used in both studies. Unfortunately, we did not quantitatively analyze the ECG changes in our previous study using mature animals; (Merabet et al., 1994; Merabet et al., 1997) therefore it is possible that such changes occurred during the administration of the peptide but that they were not evident based on informal qualitative observations by those experimenters. Another factor that may have contributed to this disparity between the present study and that of D'Amico et al. (1998) is that in our investigation, only 40 nl were injected over a period of 4 min while D'Amico and collaborators administered a larger volume (100 nl) over a very brief time period (5 sec).

In conclusion, we have shown that Ang II induces a reduction of VEPs in the superficial layers of the SC of juvenile rats. This is the first in vivo demonstration that Ang II has a physiological action on the activity of neurons of immature animals. Therefore, Ang II can modulate the activity of the SC, a structure involved in visuomotor functions, and consequently may influence the exploratory and avoidance behavior of the animals throughout their development. Preliminary data further suggest that the Ang II effects are mediated only in part by AT_1 and AT_2 receptors, with a greater contribution from the latter receptor sub-type.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to François Jolicoeur for his comments and suggestions and to O. Patry for his help in some experiments. Part of the salary of CC came from the 'Fonds de la Recherche en Santé du Québec' (FRSQ). GC and AM were respectively supported by 'FCAR centre' and 'FRSQ-FCAR santé' scholarships.

This work was supported by a team grant (#MT-13391) from the Medical Research Council of Canada held in collaboration with Nicole Gallo-Payet and Marcel Daniel Payet of the Université de Sherbrooke.

REFERENCES

- Akaoka H, Saunier CF, Chergui K, Charlety P, Buda M, Chouvet G. Combining in vivo volume-controlled pressure microinjection with extracellular unit recording. *Journal of Neuroscience Methods* 1992; 42: 119-128.
- Albrecht D, Broser M, Kruger H, Bader M. Effects of angiotensin II and IV on geniculate activity in nontransgenic and transgenic rats. *European Journal of Pharmacology* 1997; 332: 53-63.
- Ambühl P, Felix D, Imboden H, Khosla MC, Ferrario CM. Effect of angiotensin II and its selective antagonists on inferior olivary neurones. *Regulatory Peptides* 1992; 41: 19-26.
- Baxter CR, Horvath JS, Duggin GG, Tiller DJ. Effect of age on specific angiotensin II-binding sites in rat brain. *Endocrinology* 1980; 106: 995-999.
- Blue ME, Parnavelas JG. The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat. II. Quantitative analysis. *Journal of Neurocytology* 1983; 12: 697-712.
- Cook VI, Grove KI, McMenamin KM, Carter MR, Harding JW, Speth RC. The AT₂ angiotensin receptor subtype predominates in the 18 day gestation fetal rat brain. *Brain Research* 1991; 560: 334-336.
- D'Amico M, Di Filippo C, Rossi F, Warner TD. Role of AT₂ receptors in the cardiovascular events following microinjection of angiotensin II into the superior colliculus of anaesthetised rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 1998; 357: 121-125.
- Gelband CH, Zhu M, Lu D et al. Functional interactions between neuronal AT₁ and AT₂ receptors. *Endocrinology* 1997; 138: 2195-2198.
- Jacobi PC, Osswald H, Jurkies B, Zrenner E. Neuromodulatory effects of the renin-angiotensin system on the cat electroretinogram. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 1994; 35: 973-980.
- Marois A, Darveau S, Casanova C. Effects of angiotensin II on the visual responses of the rat's superior colliculus during neonatal development. *Society for Neuroscience abstract* 1996; 22: 635.
- Merabet L, de Gasparo M, Casanova C. Neuromodulatory effects of angiotensin II in the visual layers of the rat superior colliculus. *Neuroreport* 1994; 5: 2649-2652.
- Merabet L, de Gasparo M, Casanova C. Dose-dependent inhibitory effects of angiotensin II on visual responses of the rat superior colliculus: AT₁ and AT₂ receptor contributions. *Neuropeptides* 1997; 31: 469-481.
- Michels KM, Heemskerk FM, Saavedra JM. Selective changes in angiotensin II AT₁ and AT₂ receptor subtypes in the rat superior colliculus following eye enucleation. *Neuroscience* 1994; 58: 835-844.
- Millan MA, Jacobowitz DM, Aguilera G, Catt KJ. Differential distribution of AT₁ and AT₂ angiotensin II receptor subtypes in the rat brain during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1991; 88: 11440-11444.
- Miller AJ, McKoon M, Pinneau M, Silverstein R. Postnatal synaptic development of the rat. *Brain Research* 1983; 284: 205-213.
- Molotchnikoff S, Itaya SK. Functional development of the neonatal rat retinotectal pathway. *Brain Research Developmental Brain Research* 1993; 72: 300-304.
- Mooney RD, Zhang Y, Rhoades RW. Effects of angiotensin II on visual neurons in the superficial laminae of the hamster's superior colliculus. *Visual Neuroscience* 1994; 11: 1163-1173.
- Patry O, Marois A, Casanova C. Effects of angiotensin II on the visual activity of the rat's superior colliculus during neonatal development: implication of AT₁ and AT₂ receptors. *Journal of the American Academy of Optometry* 1997; 74: 121.
- Raghavendra V, Chopra K, Kulkarni SK. Modulation of motor functions involving the dopaminergic system by AT₁ receptor antagonist Losartan. *Neuropeptides* 1998; 32: 275-280.
- Rowe BP, Grove KL, Saylor DL, Speth RC. Discrimination of angiotensin II receptor subtype distribution in the rat brain using non-peptidic receptor antagonists. *Regulatory Peptides* 1991; 33: 45-53.
- Shenoy UV, Richards EM, Huang XC, Sumners C. Angiotensin II type 2 receptor-mediated apoptosis of cultured neurons from newborn rat brain. *Endocrinology* 1999; 140: 500-509.
- Tsutsumi K, Saavedra JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT₁ and AT₂) in rat brain. *American Journal of Physiology* 1991a; 261: R209-R216.
- Tsutsumi K, Saavedra JM. Differential development of angiotensin II receptor subtypes in the rat brain. *Endocrinology* 1991b; 128: 630-632.
- Tsutsumi K, Seltzer A, Saavedra JM. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. *Brain Research* 1993; 631: 212-220.
- Walther T, Voigt JP, Fukamizu A, Fink H, Bader M. Learning and anxiety in angiotensin-deficient mice. *Behavioural Brain Research* 1999; 100: 1-4.
- Wayner MJ, Polan-Curtain J, Armstrong DL. Dose and time dependency of angiotensin II inhibition of hippocampal long-term potentiation. *Peptides* 1995; 16: 1079-1082.
- Winnicka MM, Wisniewski K. Disruption of temporo-entorhinal connections abolishes the facilitatory effect of angiotensins on memory in rats. *Pharmacological Research* 1999; 40: 53-59.
- Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neuroscience and Biobehavioural Review* 1994; 18: 21-53.
- Wright JW, Harding JW. Brain angiotensin receptor subtypes AT₁, AT₂, and AT₄ and their functions. *Regulatory Peptides* 1995; 59: 269-295.
- Wright JW, Krebs LT, Stobb JW, Harding JW. The angiotensin IV system: functional implications. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1995; 16: 23-52.
- Xiong H, Marshall KC. Angiotensin II depresses glutamate depolarizations and excitatory postsynaptic potentials in locus coeruleus through angiotensin II subtype 2 receptors. *Neuroscience* 1994; 62: 163-175.

