

EFFETS DE LA *P*-CHLOROPHENYLALANINE ET DU 5-HYDROXYTRYPTOPHANE SUR LE SOMMEIL ET LE METABOLISME CENTRAL DES MONOAMINES ET DES PROTEINES CHEZ LE CHAT

PIERRE BOBILLIER, JEAN-LOUIS FROMENT, SOLANGE SEGUIN
et MICHEL JOUVET

Département de Médecine Expérimentale, Université Claude Bernard,
8, avenue Rockefeller, Lyon 8e, France

(Received 14 April 1973; accepted 9 May 1973)

Abstract—The state of sleep-wakefulness and the central metabolism of monoamines and proteins have been studied 6 hr after i.p. injection of DL-5-hydroxytryptophan (5 mg/kg) into cats pretreated (48 hr) with *p*-chlorophenylalanine (400 mg/kg). Insomnia and a marked diminution of the endogenous levels of 5-HT and 5-hydroxyindole-acetic acid without remarkable variation of NA were induced in the telencephalon of cats treated with *p*-chlorophenylalanine only. Injection of 5-hydroxytryptophan restored a normal sleep pattern and at the same time the metabolism of 5-HT increased significantly.

p-Chlorophenylalanine and 5-hydroxytryptophan did not alter the total *in vivo* cerebral protein synthesis measured 4 hr after the intraventricular injection of a ¹⁴C-amino acid mixture. However, we observed a positive correlation between sleep and protein synthesis in the telencephalon. Polyacrylamide gel electrophoresis of soluble proteins from that region suggested the presence of an acidic protein fraction of high molecular weight, the synthesis of which could be stimulated during sleep. The possible relationship between amines, proteins and sleep are discussed.

DE NOMBREUSES recherches s'attachent à impliquer les processus macromoléculaires dans la régulation des états fonctionnels du système nerveux central. De fait les changements d'activité neuronale s'accompagnent fréquemment de variations dans le métabolisme des acides nucléiques ou des protéines.¹⁻⁴ Dans des travaux précédents nous avons étudié, après privation instrumentale de sommeil, le métabolisme cérébral des protéines chez le rat en particulier pendant la phase de sommeil paradoxal (SP) qui se traduit sur le plan neurophysiologique par une augmentation de l'activité électrique des neurones corticaux. Malheureusement, les variations de synthèse protéique observées conjointement aux variations des états de vigilance sont délicates à interpréter en raison de facteurs aspécifiques associés (stress) mal contrôlables.^{5,6}

Pour cette raison, nous avons choisi un modèle pharmacologique permettant également de réaliser des variations importantes des états de sommeil mais sans facteur stressant surajouté. Les effets neuropharmacologiques de la parachlorophénylalanine (PCPA) sur le métabolisme central de la sérotonine (5HT) et la réalisation d'insomnie sont bien connus chez le chat.^{7,8} Dans ces conditions expérimentales un sommeil normal peut être rétabli par administration secondaire d'une faible dose de 5-hydroxytryptophane (5HTP).

Sur un tel modèle il nous a donc paru intéressant de mesurer *in vivo* chez le chat l'incorporation d'amino acides radioactifs dans les protéines cérébrales régionales en fonction des taux de sommeil enregistrés simultanément.

Les amino acides utilisés pour le marquage des protéines sont introduits par voie intraventriculaire pour éliminer les facteurs circulatoires périphériques, sujets à variation pendant le sommeil. Cette étude enfin est complétée par un inventaire du métabolisme des monoamines afin de contrôler la spécificité d'action de la PCPA et du 5-HTP et savoir si des changements éventuels du métabolisme protéique peuvent être liés ou non à la présence de 5-HT intratissulaire.

MATERIEL ET METHODES

Solutions utilisées. La DL-PCPA (Pfizer & Co.) est émulsionnée extemporanément avec une quantité équivalente de gomme arabique dans 10 ml de solution saline stérile. Le DL-5-HTP en ampoules scellées de 5 ml est fourni gracieusement par les laboratoires FERME. La solution mère de L-amino acides-14C (NEN GmbH Chemicals) est lyophilisée au préalable et dissoute extemporanément dans NaCl à 0,9 pour cent. Ce mélange de 15 amino acides est choisi de préférence à un seul précurseur afin d'assurer un marquage plus homogène des protéines.

Expérience neurophysiologique. Vingt-cinq chats adultes des deux sexes (poids moyen: 2-3,5 kg) sont opérés sous anesthésie générale au nembutal (25 mg/kg i.v.). Ces animaux sont implantés chroniquement au moyen d'électrodes corticale, musculaire et oculaire destinées à recueillir l'activité électrique sur un électroencéphalograph (Alvar). Une cannule ($d: 0,8$ mm) munie d'un manchon étanche est également implantée par stéréotaxie dans chaque ventricule latéral (coordonnées de Horsley-Clarke A:15,8; L:2,3; HC:6,5) et fixée à demeure à l'aide d'araldite. Tous les chats sont soumis à un traitement antibiotique systématique pendant les 3 jours suivant l'opération. La température rectale est contrôlée matin et soir. Les animaux sont placés dans des cages individuelles non insonorisées (t° ambiante: 22°) avec eau et nourriture délivrées une fois par jour (18 hr). Les conditions d'éclairement sont de 12 hr de lumière (7-19 hr) et 12 hr d'obscurité.

Huit à dix jours après l'intervention et dans les mêmes conditions d'environnement 16 chats reçoivent une injection i.p. de PCPA (400 mg/kg). Les 9 autres chats reçoivent parallèlement une injection i.p. du véhicule de la drogue (gomme arabique: 400 mg/kg). Quadrante-huit heures après ce traitement 2 groupes de 8 chats sont constitués: 5 mg/kg de DL-5-HTP dans NaCl à 0,9 pour cent ou la solution saline seule, sont administrés par voie ip.. respectivement aux 1er (PCPA + 5-HTP) et 2e groupes (PCPA). La solution saline est également administrée aux 9 autres chats formant le groupe témoin. Après 2 hr de latence destinées à éliminer le facteur "stress" de l'injection i.p., 20 μ Ci du mélange de L-amino acides-14C sont introduits dans chaque ventricule de tous les chats sous un volume salin de 100 μ l. Cette injection est réalisée à l'aide d'une seringue Hamilton de 1 ml munie d'un dispositif semi automatique. Les états de vigilance sont alors contrôlés pendant les 4 hr qui précèdent le sacrifice. Cette période d'incubation de 4 hr est déterminée de façon à obtenir le maximum de variations de vigilance dans les 3 groupes d'animaux pendant la synthèse protéique. Les tracés polygraphiques sont analysés minute par minute et les résultats exprimés sous forme d'histogrammes cumulatifs. Tous les animaux sont tués entre 15 et 17 hr par injection intraveineuse de 1,5 ml d'une solution saturée de KCl et en prenant soin

chaque fois d'inverser l'ordre de sacrifice des différents groupes, ceci afin de minimiser l'influence possible des variations circadiennes sur le métabolisme des monoamines⁹ et des protéines.¹⁰ Le cerveau est aussitôt prélevé et disséqué en chambre froide (+ 4°) en 9 structures selon une technique décrite chez le rat¹¹ (télencéphale gauche et droit, hippocampe, noyau caudé, mésencéphale, thalamus, hypothalamus, cervelet, moelle cervicale, bulbe + pont). Les tissus sont congelés à -15° jusqu'au moment des analyses biochimiques.

ANALYSES BIOCHIMIQUES

Dosage des monoamines. Les concentrations tissulaires en monoamines sont déterminées seulement dans l'hémisphère gauche. Les autres structures, dont l'hémisphère droit, sont destinées à l'étude du métabolisme protéique. Chaque tissu est pesé puis homogénéisé (appareil Ultra-Turrax) dans un mélange glacé d'éthanol eau (74:26 v/v) dans la proportion de 1 à 10 (p/v) et ajusté à pH 6,1. La 5-HT et la noradrénaline (NA) sont purifiées par chromatographie sur résine Amberlite CG 120¹² et dosées^{13, 14} par spectrofluorimétrie (appareil Jobin-Yvon) à partir de fractions aliquotes de l'élut acétique. Le tryptophane (TRP) et l'acide 5-hydroxy-indole acétique (5-HIAA) contenus dans les filtrats d'Amberlite sont séparés¹² successivement par passage sur résine Dowex AG 50 WX4 (200-400 mesh) et adsorption sur Sephadex G10. Leur dosage s'effectue également par spectrofluorimétrie: le TRP selon une modification¹² de la technique d'Udenfriend¹⁵ et le 5-HIAA après condensation avec l'ortho-phtaldéhyde.¹³ La tyrosine (TYR) est mesurée directement par fluorimétrie sur une fraction de l'homogénéisat initial de tissu centrifugé après réaction avec le 1-nitroso-2-naphtol.¹⁵ Les rendements respectifs des différents dosages sont déterminés à l'aide d'étalons internes. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux témoins.

Dosage des protéines. La totalité du tissu appartenant à chaque structure cérébrale est homogénéisée pendant 2 min environ dans du saccharose 0,32 M glacé (10 ml/g de tissu) à l'aide d'un Potter-Elvehjem. Les protéines contenues dans 1 ml d'homogénéisat sont précipitées par un égal volume de TCA à 10% (p/v). Après centrifugation à 2000 g pendant 20 min le surnageant ou fraction TCA-soluble est conservé. Le précipité de protéines est purifié par plusieurs lavages successifs avec du TCA à 5% et enfin de l'éthanol-éther (1:1, v/v). Le culot final est dissous dans 2 ml de NaOH 0,1 N. De cette solution 2 fractions aliquotes sont prélevées. L'une est destinée au dosage spectrofluorimétrique des protéines¹⁵ endogènes par rapport à une solution standard d'ovalbumine cristallisée. La seconde sert à mesurer la radioactivité incorporée dans les protéines. Pour cela à 1 ml de la solution alcaline sont ajoutés 10 ml d'Insta-Gel (Packard). Avant d'être comptés dans un spectromètre réfrigéré à scintillation liquide (Tri Carb Packard) tous les échantillons sont acidifiés afin de supprimer la chimiofluorescence du solvant. La radioactivité des acides aminés libres et de leurs métabolites contenus dans la fraction TCA-soluble est également mesurée après addition d'un mélange scintillant classique.¹⁶ Les corrections de rendement sont faites à l'aide du standard externe de l'appareil ou par la méthode du rapport des canaux. Les mesures sont exprimées en dpm/mg de protéines. Le rapport activité spécifique (AS) des protéines/radioactivité totale de la fraction TCA-soluble ou activité spécifique relative, bien qu'approximatif représente une valeur plus juste de la capacité de synthèse protéique du tissu. Il permet d'éliminer les différences dans

les quantités d'isotopes injectées à chaque animal et de corriger dans une certaine mesure la dilution isotopique des précurseurs des protéines.

Electrophorèse des protéines. Cette analyse est pratiquée sur toutes les structures cérébrales prélevées à l'exception de la moelle qui pose un problème de contamination par les lipides au cours de la préparation. Les protéines solubles dites de la phase cytoplasmique non particulaire sont extraites à partir de fractions aliquotes des homogénéisats initiaux de tissu dans le sucrose 0,32 M par centrifugation (ultracentrifugeuse MSE) à 100 000 g pendant 2 h. Les protéines de la phase soluble limpide sont dosées par la méthode indiquée précédemment avant d'être soumises à la séparation électrophorétique proprement dite d'après le système à gradient discontinu de pH décrit par Ornstein et Davis.¹⁷ Les gels sont préparés dans des tubes en pyrex de 5 mm de diamètre intérieur et 10 cm de long. Les longueurs du gel de séparation, du gel condensant et du gel échantillon sont respectivement de 40, 20 et 40 mm. La préparation des différents gels est faite conformément aux indications du fabricant de produits chimiques (Canalco). La concentration des gels en monomère d'acrylamide est de 7,5%. Les quantités de protéines mélangées au gel échantillon sont d'environ 100 µg. Le profil des protéines acides est obtenu par électrophorèse à pH 8,9 pratiquée dans une chambre en plexiglass à 16 tubes avec 2 mA par tube (générateur de tension LKB) et à la température de 18°. Le traceur utilisé est le bleu de bromophénol. Le temps de migration est d'environ 2,5 hr. Les gels sont colorés pendant au minimum 1 h au contact d'une solution de noir amidon (Merck) à 0,5% (p/v) dans de l'acide acétique à 7%. L'excès de colorant est ensuite éliminé par électrophorèse (15 mA/tube pendant 30-45 min). Les bandes protéiques ainsi révélées sont analysées par densitométrie optique au moyen d'un photomètre enregistreur Kipp et Zohnen.

Dans les cas d'analyse de la radioactivité incorporée dans les bandes protéiques la quantité de matériel disposée sur chaque gel est supérieure (300 µg). Après photographie et enregistrement densitométrique les gels sont déposés sur une plaque de silice, congelés à -20° puis découpés en tranches de 0,5 mm d'épaisseur à l'aide d'un sectionneur mécanique de tissu de type McIlwain. Chaque tranche de gel est dépolymérisée¹⁸ dans un flacon de comptage Packard par 0,3 ml de H₂O₂ à 30% pendant 3 hr à 70°. On ajoute 10 ml d'Insta-Gel. La radioactivité des protéines ainsi solubilisées est mesurée (50 min à 5°) et exprimée en DPM/tranche de gel.

Calculs statistiques. Les analyses statistiques des différences entre les groupes d'animaux sont exprimées par la valeur de P (test en "t" de Student). Les corrélations entre 2 variables à l'intérieur d'un même groupe sont réalisées à l'aide du test de régression linéaire "r".

RESULTATS

Résultats neurophysiologiques

Ces résultats sont résumés dans le Fig. 1. Ils montrent que 48 hr après PCPA les animaux présentent une insomnie caractéristique portant à la fois sur le sommeil lent (SL) et le sommeil paradoxal. Par contre, l'aspect polygraphique du sommeil est pratiquement normal chez les animaux du groupe PCPA + SHTP. Il est à noter que les résultats exprimés en fonction de la durée des enregistrements après l'injection intraventriculaire révèlent pendant la 1ère heure qui suit cette injection, une inhibition marquée portant surtout sur le sommeil paradoxal. Cette inhibition affecte davantage

le groupe témoin que le groupe expérimental PCPA + 5HTP. Tous les chats traités ont une température rectale normale.

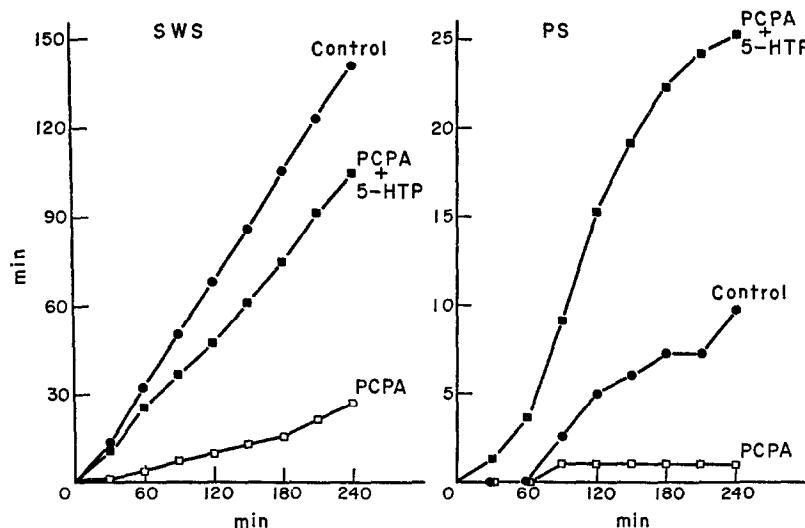


FIG. 1. Effets du 5-HTP et de la PCPA sur les quantités moyennes cumulées (min) de sommeil lent (SWS) et de sommeil paradoxal (PS) mesurées toutes les 30 min pendant 4 hr. 3 groupes de 8 chats sont constitués: les animaux témoins, les animaux recevant une injection i.p. de PCPA (400 mg/kg) 50 hr avant l'enregistrement (groupe PCPA) et les animaux recevant successivement une injection de PCPA (400 mg/kg) et 48 hr après une injection i.p. de DL-5-HTP (5 mg/kg) qui précède de 2 hr l'enregistrement (groupe PCPA + 5-HTP). L'injection intraventriculaire d'acides aminés ^{14}C est faite au temps 0.

Résultats biochimiques

Effets de la PCPA et du 5-HTP sur le métabolisme des monoamines. Sur la Fig. 2 on constate que les concentrations tissulaires de 5-HT et 5HIAA au niveau du télencéphale sont très basses chez les animaux ayant reçu la seule PCPA. Au contraire chez les animaux du groupe PCPA + 5HTP, les taux de 5HT et de 5HIAA, bien que demeurant inférieurs à ceux des témoins, augmentent de façon significative par rapport au groupe expérimental précédent. Dans les 2 groupes expérimentaux on observe une diminution relativement importante des quantités globales de TRP et de TYR tissulaires. Les taux de NA restent inchangés dans le groupe PCPA mais sont légèrement abaissés dans le groupe PCPA + 5HTP.

Effets de la PCPA et du 5HTP sur le métabolisme des protéines. Le Tableau 1 montre que chez les 3 groupes d'animaux la radioactivité libre de la fraction TCA-soluble ne présente pas d'écart marqué dans l'ensemble des structures étudiées à l'exception de la moelle et du pont + bulbe. Dans ces 2 structures on observe dans le groupe PCPA + 5HTP une diminution significative par rapport aux témoins. L'activité spécifique des protéines est la même dans tous les groupes quelle que soit la structure étudiée. Enfin, l'expression de la synthèse protéique des différents tissus après correction par la fraction TCA-soluble est également identique entre les 3 groupes (Fig. 3). L'absence de variations significatives du métabolisme protéique entre les groupes expérimentaux et par rapport aux témoins résulte en partie de l'assez grande

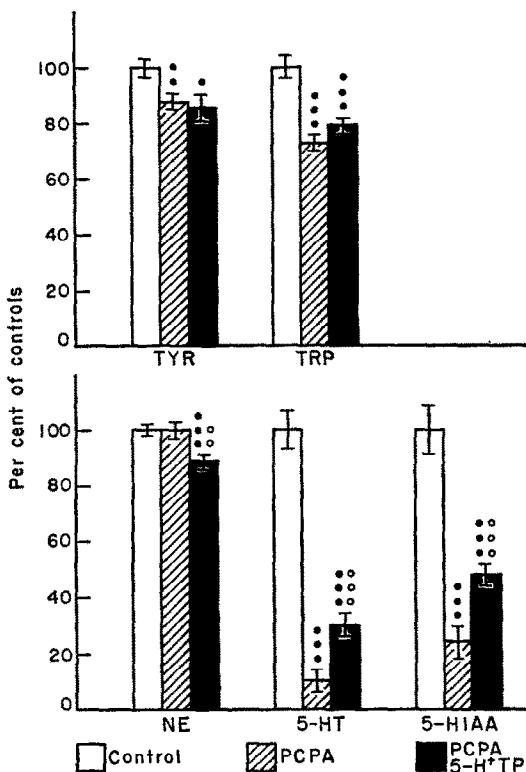


FIG. 2. Effets du DL-5-HTP (5 mg/kg) et de la PCPA (400 mg/kg) sur le métabolisme des monoamines au niveau du télencéphale de chat. Les groupes d'animaux sont identiques à ceux du Tableau 1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la moyenne \pm E.S.M. des valeurs obtenues pour le groupe témoin. Les taux de contrôle ($\mu\text{g/g}$) sont respectivement de $0,579 \pm 0,011$, $0,259 \pm 0,018$, $0,305 \pm 0,028$, $5,978 \pm 0,267$ et $25,729 \pm 0,796$ pour la noradrénaline (NE), la sérotonine (5-HT), l'acide 5-hydroxyindole acétique (5-HIAA), le tryptophane (TRP) et la tyrosine (TYR). Différences significatives par rapport aux témoins: * $P < 0,05$; ** $P < 0,02$; *** $P < 0,005$. Différences significatives entre les 2 groupes expérimentaux: ** $P < 0,002$; *** $P < 0,005$.

dispersion des valeurs. La voie intraventriculaire d'introduction des précurseurs marqués en est peut-être responsable en raison de l'hétérogénéité de capture et d'incorporation dans les protéines tissulaires de ces acides aminés distribués ainsi dans le liquide cérébrospinal.^{19,21} Une susceptibilité individuelle de réponse des animaux au traitement est également possible.

Dans cette éventualité nous avons donc recherché des relations fonctionnelles entre variables neurophysiologiques ou biochimiques à l'intérieur d'un même groupe par le test "r" de régression linéaire. Une relation positive au niveau de la structure télencéphalique existe entre l'index de synthèse protéique et la durée du SP ($r = 0,9287$; $P < 0,001$). Une telle relation n'est trouvée significative que chez les animaux du groupe PCPA + 5HTP et seulement pour les taux de SP enregistrés pendant la 1ère heure qui suit l'injection intraventriculaire de L-amino acids -14C. Le SL et l'index de synthèse protéique sont également corrélés chez ce même groupe de chats et dans la même structure ($r = 0,7670$; $P < 0,05$).

TABLEAU 1. EFFETS DE LA PCPA ET DU 5-HTP SUR L'INCORPORATION *in vivo* (DURÉE: 4 hr) DANS LES PROTÉINES CÉRÉBRALES DU CHAT D'UN MÉLANGE DE 20 μ Ci D'AMINO ACIDES 14 C INTRODUITS PAR VOIE INTRAVENTRICULAIRE.

	Activité spécifique des protéines (dpm/mg de protéines)			Fraction TCA-soluble (dpm/mg de protéines)		
	Témoins	PCPA	PCPA + 5HTP	Témoins	PCPA	PCPA + 5HTP
Moelle cervicale	3199 ± 615	3878 ± 953	2125 ± 740	1530 ± 272	1402 ± 310	711* ± 201
Télencéphale	1688 ± 394	1058 ± 137	1195 ± 230	482 ± 79	373 ± 22	432 ± 47
Cervelet	3598 ± 536	4414 + 1001	2178 ± 606	830 ± 110	925 ± 189	543 ± 125
Bulbe + pont	5666 ± 621	6577 ± 1082	3756 + 957	1652 ± 191	1733 ± 191	989* ± 210
Thalamus	3578 ± 404	3314 ± 535	3486 ± 285	790 ± 83	813 ± 56	729 ± 56
Mésencéphale	6551 ± 721	6317 ± 717	4986 + 988	1640 ± 177	1513 ± 206	1144 ± 205
Hippocampe	6715 ± 929	6693 ± 1356	8788 ± 1309	1712 ± 226	1694 ± 123	1696 ± 159
Caudé	12500 ± 1847	12833 ± 1101	12530 ± 1727	3129 ± 376	2801 + 208	2553 ± 176
Hypothalamus	13081 ± 1459	14010 ± 2278	11569 ± 1716	2969 ± 264	3307 ± 330	2437 ± 377

Les chats sont divisés en 3 groupes: les animaux témoins, les animaux recevant une injection i.p. de PCPA (400 mg/kg) 54 hr avant le sacrifice (groupe PCPA) et les animaux recevant successivement une injection de PCPA (400 mg/kg) et 48 hr après une injection i.p. de DL-5-HTP (5 mg/kg) qui précède de 6 hr le sacrifice (groupe PCPA + 5-HTP). Les valeurs représentent la moyenne ± S.E.M. de 8 animaux dans chaque groupe.

* P < 0,05.

Analyse électrophorétique des protéines. L'existence de telles corrélations fonctionnelles alors que le métabolisme général des protéines cérébrales des chats n'est affecté ni par la PCPA ni par le 5HTP nous a conduits à rechercher le retentissement éventuel des variations de la vigilance sur la synthèse de une ou plusieurs fractions protéiques seulement susceptibles d'être décelées par des techniques résolutives suffisamment fines comme l'électrophorèse.

L'analyse est pratiquée sur les protéines solubles de la phase cytoplasmique non particulière, car ces protéines sont un bon reflet des caractéristiques métaboliques de toutes les protéines cellulaires qui, dans leur grande majorité, sont synthétisées au niveau des périkarya puis libérées dans le milieu cytoplasmique.

Des études préliminaires faites sur les protéines solubles acides de plusieurs structures cérébrales de chats témoins montrent, sur un profil électrophorétique commun à toutes les structures (15-17 bandes) des nuances qualitatives et quantitatives caractéristiques des protéines de chaque structure (Fig. 4). Par contre, les protéines solubles du télencéphale sont similaires chez les 3 groupes de chats (Fig. 5); l'enregistrement densitométrique des 3 profils correspondants n'a pas révélé de différences quantitatives reproductibles. La mesure de la radioactivité incorporée à chacune des bandes protéiques séparées par électrophorèse montre une assez bonne correspondance avec l'enregistrement densitométrique et illustre ainsi leurs capacités de

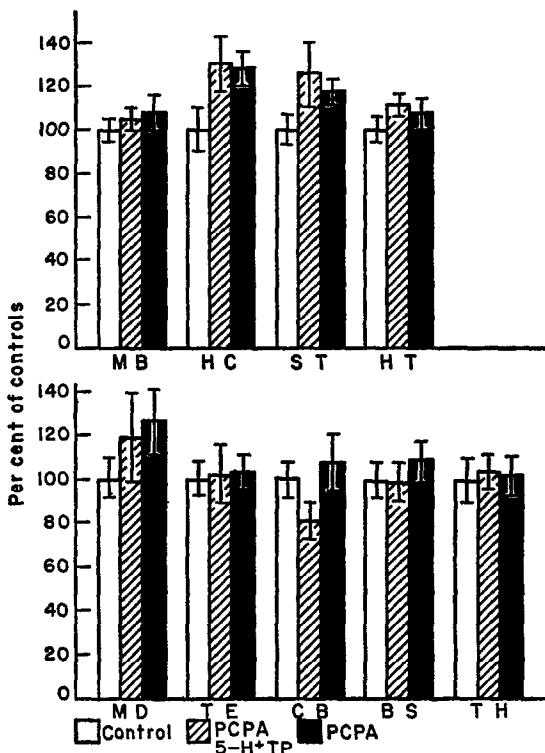


FIG. 3. Effets du DL-5-HTP (5 mg/kg) et de la PCPA (400 mg/kg) sur le métabolisme global des protéines cérébrales du chat estimé par le rapport: activité spécifique des protéines/fraction TCA-soluble. Ces groupes d'animaux sont identiques à ceux du Tableau 1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la moyenne \pm E.S.M. des valeurs obtenues pour le groupe témoin. Les différentes structures analysées sont la moelle cervicale (MD), le télencéphale (TE), le cervelet (CB), le bulbe + pont (BS), le thalamus (TH), le mésencéphale (MB), l'hippocampe (HC), le caudé (ST) et l'hypothalamus (HT).

synthèse (Fig. 6). Les courbes radioactives de chacun des groupes de chats correspondent bien également. Cependant, il faut noter dans la zone des protéines à poids moléculaire élevé la variation quantitative d'une bande presque inexistante dans le groupe PCPA et qui augmente de façon importante dans le groupe PCPA + 5HTP (Fig. 7).

DISCUSSION

Amines

5HT. L'ensemble des résultats neurophysiologiques et biochimiques présentés confirme bien les données acquises chez de nombreuses espèces animales.^{7,8,22-24} En particulier, il a été montré *in vivo* au niveau de l'hypothalamus et du noyau caudé une augmentation des concentrations endogènes de 5HT 1 et 24 hr après administration de faibles doses de 5HTP à 2 chats prétraités à la PCPA.²⁵ En outre, dans les 2 groupes expérimentaux PCPA et PCPA + 5HTP, la similitude des variations des taux de sommeil et des concentrations de 5HT et 5HIAA dans le télencéphale apporte un argument supplémentaire à l'hypothèse de l'intervention de la 5HT dans

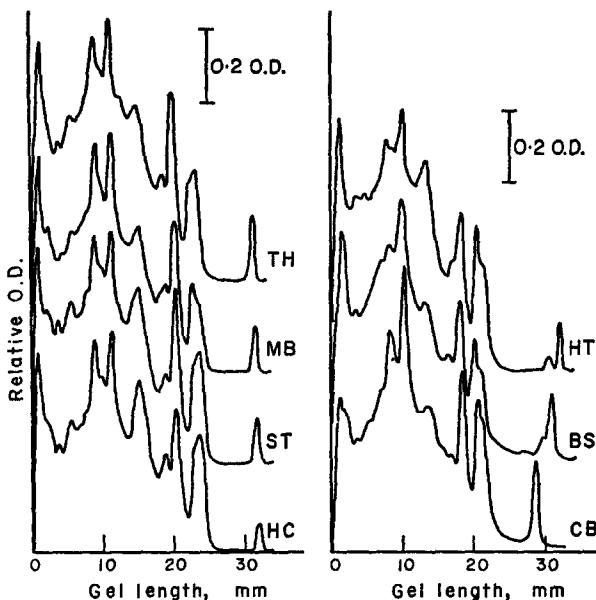


FIG. 4. Profils densitométriques obtenus après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines acides (pH 8,9) de la fraction cytosoluble de cerveau de chat. Comparaison entre les différentes structures suivantes: thalamus (TH), mésencéphale (MB), caudé (ST), hippocampe (HC), hypothalamus (HT), bulbe + pont (BS) et cervelet (CB). O.D. densité optique.

le déclenchement et le fonctionnement des états de sommeil.²⁶ Le fait que le 5HTP ne soit pas considéré normalement comme le précurseur physiologique de la 5HT⁸ et, que les taux de 5HT et 5HIAA ne reviennent que partiellement à la normale dans le groupe PCPA + 5HTP n'est cependant pas contradictoire avec les relations fonctionnelles envisagées. En effet, le délai séparant l'administration de 5HTP et le sacrifice des animaux peut expliquer qu'une fraction de la 5HT synthétisée ait été utilisée et dégradée. D'autre part, dans une telle situation expérimentale, l'effet "hypnogène" très rapide obtenu dès l'injection d'une faible dose de 5HTP est en faveur d'une capture préférentielle du 5HTP par les terminaisons nerveuses de ces neurones. On peut donc suggérer que les faibles concentrations de 5HT mesurées au niveau du télencéphale représentent bien celles du compartiment fonctionnel de synthèse. L'augmentation de 5HIAA supérieure à celle de 5HT dans le même groupe expérimental pourrait témoigner d'ailleurs d'une utilisation accrue de l'amino acide au niveau des terminales présynaptiques.

Catécholamines. Nos propres résultats démontrent l'absence d'effet de la PCPA sur la NA cérébrale endogène chez le chat, ce qui est en accord avec des travaux antérieurs.⁸

La non-spécificité d'action de la PCPA doit cependant être envisagée en raison des baisses modérées de Dopamine et de NA cérébrales observées chez plusieurs espèces animales²⁷⁻³⁰ ainsi que de l'inhibition de la synthèse de NA à partir de TYR radioactive.^{31,32} Chez le rat²³ nous avons également enregistré des baisses analogues de NA et de dopamine. Ceci est en désaccord en particulier avec un travail récent³³ décrivant (chez le chat) au niveau du tronc cérébral et du télodiencephale des diminutions importantes et équivalentes portant simultanément sur les catécholamines et la

sérotonine. Il paraît actuellement difficile d'interpréter de telles différences d'action en l'absence de données précises sur les mécanismes, directs ou indirects, d'inhibition des systèmes de synthèse catécholaminergiques par la PCPA. Des problèmes de techniques, de stress, de dose ou de mobilisation intracellulaire de la PCPA liée à la nature des sels ou du véhicule utilisés ne sont pas exclus. Il est également possible d'envisager que la tyrosine hydroxylase cérébrale présente des différences régionales d'activité ou de susceptibilité à la PCPA. Chez le rat et le chat, l'activité de la tyrosine hydroxylase varie^{34,35} effectivement selon les structures cérébrales dans des proportions telles que les concentrations intracellulaires de TYR pourraient réguler en partie la synthèse des catécholamines tout au moins dans les structures à forte activité enzymatique (mésencéphale, tronc cérébral, caudé . . .), l'enzyme n'étant alors plus saturée par son substrat. Ainsi pourraient s'expliquer certaines variations régionales²⁹ des baisses de NA cérébrale observées après PCPA chez ces animaux.

La diminution de NA après PCPA + 5HTP peut s'expliquer par 2 mécanismes. Il n'est pas exclu qu'une fraction du 5HTP exogène soit également captée et décarboxylée soit dans les cellules endothéliales soit dans d'autres neurones, en particulier les neurones catécholaminergiques;³⁶ en effet, 1a 5HTP et la DOPA décarboxylase sont peut-être des enzymes à activité identique vis-à-vis de ces deux substrats.³⁷⁻³⁹ Toutefois, il est peu vraisemblable que les faibles doses de 5HTP utilisées présentement puissent déplacer la NA de ses vésicules de stockage comme c'est le cas après inhibition périphérique de la DOPA décarboxylase et utilisation de fortes doses de 5HTP.⁴⁰ Par contre, la diminution légère mais significative de la NA observée après 5HTP semblerait donc plutôt relever d'un mécanisme d'activation neuronale, secondaire à la remise en jeu des neurones sérotoninergiques, se traduisant par une utilisation accélérée de la NA comme le suggèrent les taux de SP importants et supérieurs à ceux des témoins. Cette hypothèse est étayée par des arguments neurophysiologiques et neuropharmacologiques qui impliquent les systèmes catécholaminergiques dans les mécanismes du SP, tandis que le SL et les étapes préparatoires du SP dépendraient de mécanismes sérotoninergiques.²⁶

Acides aminés précurseurs. Les baisses de TRP et de TYR télencéphaliques confirment celles également signalées au niveau du cerveau total de rat après PCPA.⁴¹ La méconnaissance de la valeur relative des différents compartiments métaboliques ne nous autorise pas à interpréter la diminution du précurseur de la 5HT comme pouvant être un mécanisme de contrôle en retour des concentrations intracellulaires de TRP par les variations de synthèse de la 5HT.⁴² Il semble plutôt s'agir d'un mécanisme d'inhibition des systèmes de transport^{43,44} du TRP, soit au niveau de la barrière hématoencéphalique, soit au niveau membranaire par compétition avec la phénylalanine dont les concentrations intracérébrales augmentent dans des proportions importantes, avec un maximum aux environs de 48 hr après PCPA.⁴⁵ La baisse de TYR relève vraisemblablement soit du même mécanisme soit de la diminution de la TYR plasmatique circulante résultant de l'inhibition marquée de la phénylalanine hydroxylase hépatique par la PCPA.³⁰

Protéines

La démonstration de l'intervention des protéines cérébrales dans des processus fonctionnels se heurte à des difficultés majeures :

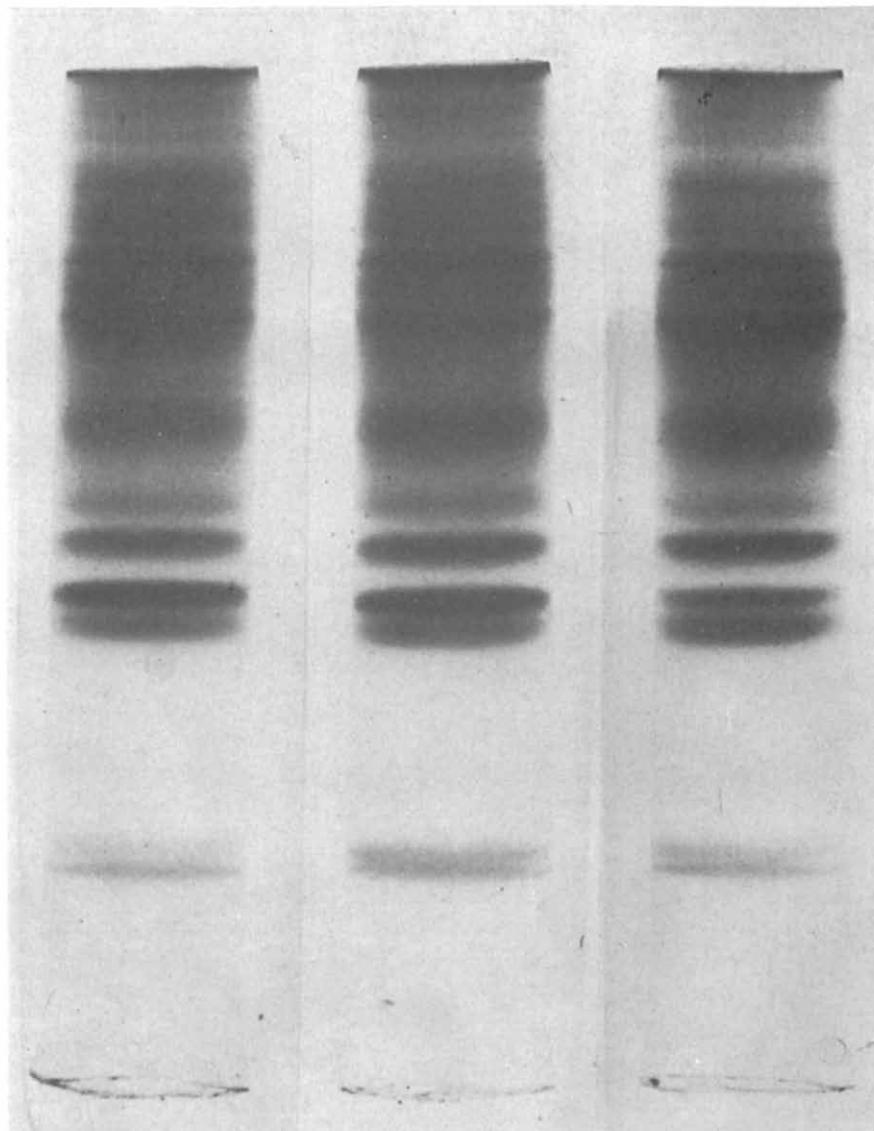


FIG. 5. Electrophorégrammes des protéines acides (pH 8,9) de la fraction cytosoluble du télencéphale de chat. Les 3 groupes d'animaux correspondant aux 3 types de gels sont identiques à ceux du Tableau 1. La quantité de protéines déposée sur chaque gel est d'environ 100 μ g.

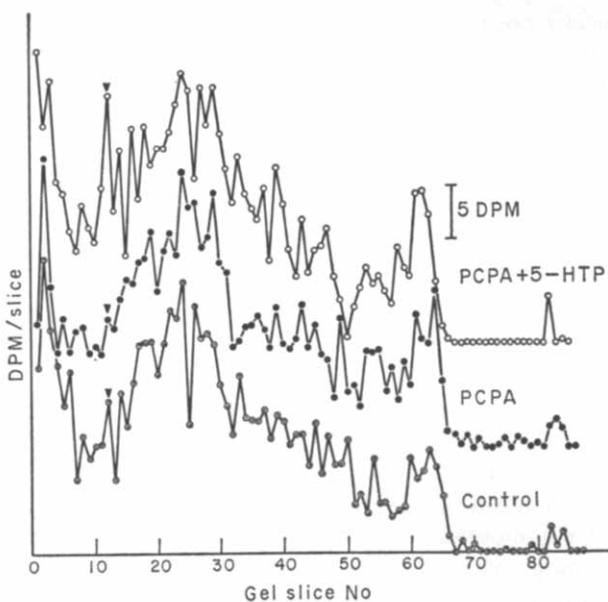


FIG. 7. Profils radioactifs obtenus après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines acides (pH 8,9) de la fraction cytosoluble du télencéphale de chat. Les 3 groupes d'animaux correspondant aux 3 courbes radioactives sont identiques à ceux du Tableau 1. L'échelle de chaque-courbe est arbitrairement décalée pour plus de clarté. Les flèches indiquent le positionnement de la fraction protéique sujette à variation.

(a) l'hétérogénéité métabolique qualitative et quantitative des protéines du SNC au niveau régional,⁴⁶ cellulaire⁴⁷ et subcellulaire.⁴⁸ Ainsi chez le chat, nous apportons un exemple de cette hétérogénéité, puisque pour chaque structure cérébrale analysée les protéines solubles acides de la fraction cytoplasmique non particulière sont caractérisées par un profil électrophorétique différent.

(b) l'absence de protéines spécifiques connues appartenant à un système organisé de neurones.

(c) la méconnaissance des compartiments métaboliques⁴⁹ tissulaires du/ou des précurseurs isotopiques utilisés comme marqueurs des protéines.

(d) le mélange dans une structure cérébrale donnée de plusieurs catégories de protéines les unes par exemple étant synthétisées *in situ*, tandis que d'autres sont transportées par le flot axonal⁵⁰ à partir de périkarya qui peuvent être fort éloignés de leurs terminaisons nerveuses.

La PCPA est un inhibiteur puissant de plusieurs protéines enzymatiques (phénylalanine hydroxylase,³⁰ tryptophane hydroxylase,⁴⁵ pyruvate kinase).⁵¹ En revanche, dans nos conditions expérimentales et en accord avec des travaux précédents⁵² cette drogue ne modifie pas les capacités de synthèse globale des protéines cérébrales chez le chat. Le seul effet indirect de la PCPA sur le métabolisme des protéines pourrait être une légère inhibition de la capture intracérébrale de certains amino acides, le mécanisme de cette inhibition se situant au niveau des systèmes transporteurs communs du groupe de la phénylalanine comme il a été discuté dans le paragraphe précédent.

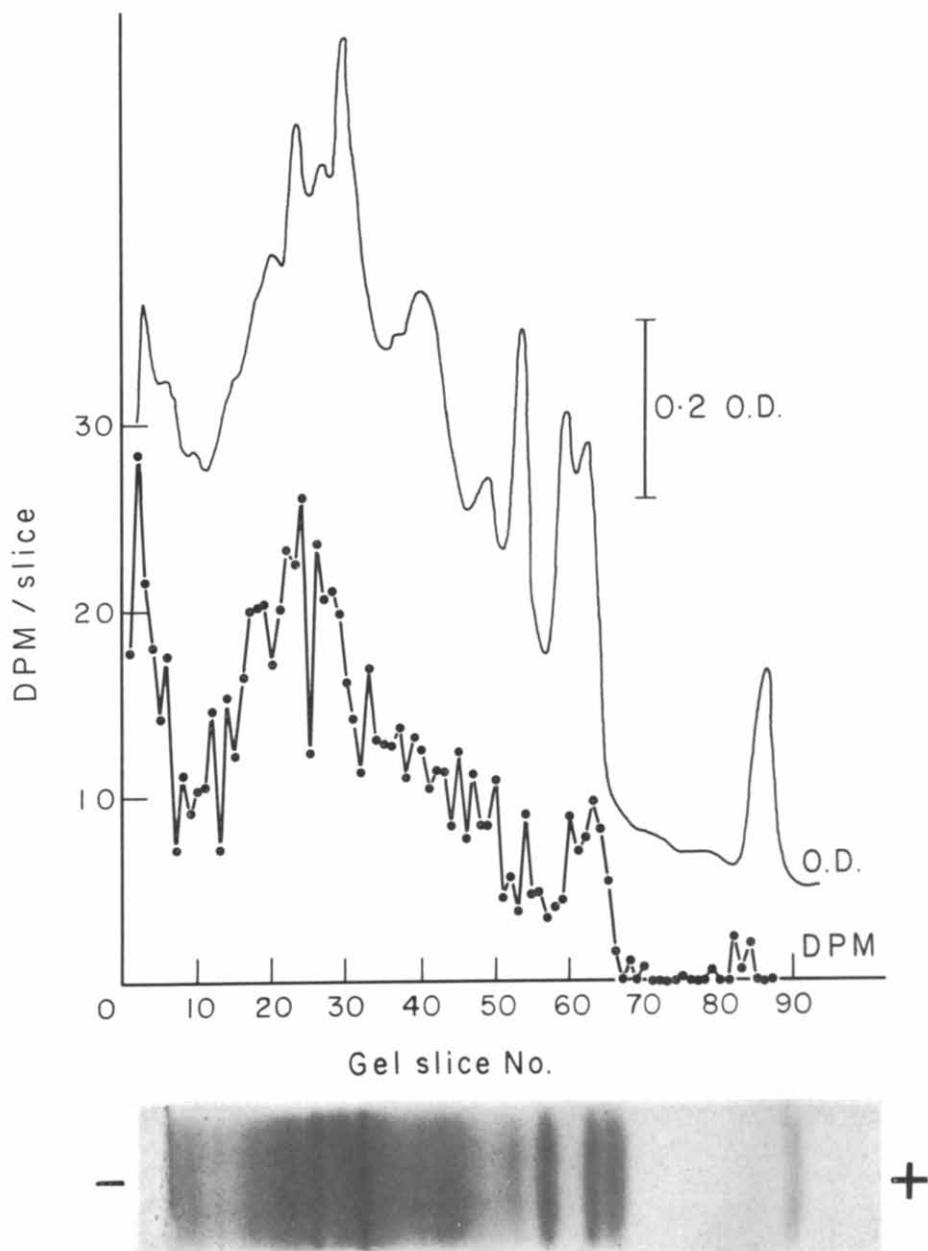


FIG. 6. Chat témoin: comparaison entre les profils radioactifs et densitométriques obtenus après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines acides (pH 8,9) de la fraction cytosoluble du télencéphale. La courbe radioactive est obtenue par le comptage de tranches (500 μ m) de deux gels additionnés. La quantité de protéines déposée sur chaque gel est de 300 μ g environ.
 O.D., densité optique.

La relation linéaire positive au niveau du télencéphale entre le taux de sommeil et le degré de synthèse protéique peut donc être interprétée comme étant spécifique en raison de l'absence d'effet pharmacologique de la PCPA ou du 5HTP. Cette corrélation n'est trouvée cependant que chez les animaux du groupe PCPA + 5HTP. L'examen des résultats neurophysiologiques permet d'apporter une tentative d'explication: la 1ère résulte de l'inhibition marquée du SP pendant la 1ère heure qui suit l'injection intraventriculaire et qui affecte surtout les animaux témoins, ceux du groupe précédent ayant en effet une propension plus grande à récupérer du fait de leur privation de sommeil pharmacologique. Le stress associé à l'injection intraventriculaire elle-même est responsable de l'inhibition de sommeil et a déjà été discuté chez le rat.⁵³ Or, cette inhibition survient précisément pendant l'heure où a lieu l'incorporation maximum des amino acides dans les protéines,⁵⁴ ce qui tend par conséquent à minimiser les effets fonctionnels recherchés. La 2e explication tient à l'existence d'un gradient de pénétration tissulaire des amino acides à partir du LCR.^{55,56} La synthèse protéique restant localisée à quelques mm de tissu avoisinant les ventricules, les processus métaboliques fonctionnels survenant à distance risquent d'être masqués. La diminution du phénomène fonctionnel pendant la synthèse des protéines et l'inhomogénéité de marquage des structures associée à la grande stabilité du métabolisme protéique peuvent expliquer les difficultés rencontrées à obtenir des résultats significatifs.

Le fractionnement électrophorétique ultérieur des protéines solubles du télencéphale a permis de visualiser une fraction protéique marquée, localisée dans la zone des protéines à poids moléculaire élevé, dont les variations de synthèse semblent dépendre du niveau de vigilance des 3 groupes de chats. Cette bande n'est pas un artéfact dû aux lipides car ceux-ci migrent en général dans ce système en avant de la zone des protéines à poids moléculaire léger. Enfin, le pourcentage d'amino acides cétogènes (leucine) présent dans le mélange d'isotopes utilisés est trop faible pour représenter un niveau de marquage lipidique décelable. Cette bande pourrait donc correspondre à l'expression d'un phénomène fonctionnel cellulaire. A cet égard il a été montré récemment que le profil de synthèse d'ARN à haut poids moléculaire variait selon l'état d'activité électrique du cortex.⁵⁷ Il est encore difficile à présent de définir une relation causale entre synthèse protéique spécifique et niveau de vigilance ou bien concentration présynaptique de monoamines. La 5HT toutefois semble devoir être exclue car plusieurs résultats concordants montrent que cette amine a plutôt un rôle inhibiteur vis-à-vis de la synthèse protéique.^{58,59} La NA en revanche stimulerait l'incorporation de ³²P dans les phospholipides cérébraux.^{60,61} Il nous semble donc plus logique de supposer que le mise en jeu d'une subpopulation particulière de protéines de la classe des protéolipides soit liée à l'augmentation de l'activité des neurones corticaux pendant le SP. Le rôle éventuel et la nature enzymatique ou structurale des espèces macromoléculaires contenues dans la bande protéique isolée restent à élucider.

Remerciement—Ce travail a bénéficié de l'aide de l'I.N.S.E.R.M. (Unité 52), de la D.R.M.E., (contrat 71-009) et du C.N.R.S. (L.A. 162).

REFERENCES

1. E. GLASSMAN, *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 605 (1969).
2. D. A. RAPPOPORT and H. F. DAGINAWALA, in *Protein Metabolism of the Nervous System* (Ed. A. LAJTHA), pp. 459-489. Plenum Press, New York (1970).
3. R. E. BOWMAN and P. D. KOTTLER, in *Biochemistry of Brain and Behaviour* (Eds. R. E. BOWMAN and S. P. DATTA), pp. 301-326. Plenum Press, New York (1970).
4. H. HYDEN and P. W. LANGE, *Prod. natn. Acad. Sci., U.S.A.* **69**, 1980 (1972).
5. P. BOBILLIER, F. SAKAI, S. SEGUIN and M. JOUVET, *Life Sci.* **10**, 1349 (1971).
6. P. BOBILLIER, F. SAKAI, S. SEGUIN and M. JOUVET, *J. Neurochem.*, in press.
7. W. P. KOELLA, A. FELDSTEIN A. and J. S. CZIMAN, *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* **25**, 481 (1968).
8. J. F. PUJOL, A. BUGUET, J. L. FROMENT, B. JONES and M. JOUVET, *Brain Res.* **29**, 195 (1971).
9. P. BOBILLIER and J. R. MOURET, *Int. J. Neurosci.* **2**, 271 (1971).
10. K. RICHARDSON and S. P. R. ROSE, *Nature, Lond.* **223**, 182 (1971).
11. J. GLOWINSKI and L. L. IVERSEN, *J. Neurochem.* **13**, 655 (1966).
12. J. F. PUJOL, Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris (1970).
13. G. CURZON and A. R. GREEN, *Br. J. Pharmac.* **39**, 653 (1970).
14. U. S. VON EULER and F. LISHAJKO, *Acta physiol. scand.* **45**, 122 (1959).
15. S. UDENFRIEND, *Fluorescence Assay in Biology and Medicine*, p. 162. Academic Press, London (1962).
16. I. J. KOPIN, J. AXELROD and E. K. GORDON, *J. biol. Chem.* **236**, 2109 (1961).
17. L. ORNSTEIN and B. J. DAVIS, preprinted by Distillation Products Industries, Division of Eastman Kodak Co., Rochester, New York (1962).
18. R. W. YOUNG and H. W. FULHORST, *Anal. Biochem.* **11**, 389 (1965).
19. A. LAJTHA and J. TOTH, *J. Neurochem.* **9**, 199 (1962).
20. S. BERL and T. L. FRIGYESI, *J. Neurochem.* **16**, 405 (1969).
21. P. D. KOTTLER, R. E. BOWMAN and W. D. HAASCH, *Physiol. Behav.* **8**, 291 (1972).
22. V. FLORIO, A. SCOTTI DE CAROLIS and V. G. LONGO, *Physiol. Behav.* **3**, 861 (1968).
23. J. R. MOURET, P. BOBILLIER and M. JOUVET, *Eur. J. Pharmac.* **5**, 17 (1968).
24. E. D. WEITZMAN, M. M. RAPPOR, P. MCGREGOR and J. JACOBY, *Science, N.Y.* **160**, 1361 (1968).
25. J. HOYLAND, E. SHILLITO and M. VOGL, *Br. J. Pharmac.* **40**, 659 (1970).
26. M. JOUVET, in *Ergebnisse der Physiologie*, pp. 166-342. Springer, Berlin (1972).
27. E. G. MCGEER, D. A. V. PETERS and P. L. MCGEER, *Life Sci.* **7**, 605 (1968).
28. A. S. WELCH and B. L. WELCH, *Biochem. Pharmac.* **17**, 699 (1968).
29. F. P. MILLER, R. H. COX, W. R. SNODGRASS and R. P. MAICKEL, *Biochem. Pharmac.* **19**, 435 (1970).
30. B. K. KOE and A. WEISSMAN, *J. Pharmac. exp. Ther.* **154**, 499 (1966).
31. D. A. V. PETERS, M. FILCZEWSKI and I. M. MAZURKIEWICZ-KWILECKI, *Biochem. Pharmac.* **21**, 2283 (1972).
32. A. TAGLIAMONTE, P. TAGLIAMONTE, G. U. CORSINI, G. P. MEREU and G. L. GESSA, *J. Pharm. Pharmac.* **25**, 101 (1973).
33. H. H. KELLER, *Experientia* **28**, 177 (1972).
34. T. J. CICERO, L. G. SHARPE, E. ROBINS and S. S. GROTE, *J. Neurochem.* **19**, 2241 (1972).
35. E. G. MCGEER, P. L. MCGEER and J. A. WADA, *J. Neurochem.* **18**, 1647 (1971).
36. M. H. APRISON, T. KARIYA, J. N. HINGSTEN and M. TORU, *J. Neurochem.* **15**, 1131 (1968).
37. J. G. CHRISTENSON, W. DAIRMAN and S. UDENFRIEND, *Proc. natn. Acad. Sci., U.S.A.* **69**, 343 (1972).
38. K. L. SIMS, G. A. DAVIS and F. E. BLOOM, *J. Neurochem.* **20**, 449 (1973).
39. K. L. SIMS and F. E. BLOOM, *Brain Res.* **49**, 165 (1973).
40. K. FUXE, L. L. BUTCHER and J. ENGEL, *J. Pharm. Pharmac.* **23**, 420 (1971).
41. A. TAGLIAMONTE, P. TAGLIAMONTE, J. PEREZ-CRUET, S. STERN and G. L. GESSA, *J. Pharmac. exp. Ther.* **177**, 475 (1971).
42. A. TAGLIAMONTE, P. TAGLIAMONTE, J. PEREZ-CRUET and G. L. GESSA, *Nature, Lond.* **229**, 125 (1971).
43. K. NEAME, in *Applied Neurochemistry* (Eds. A. N. DAVISON and J. DOBBING). Blackwells, Oxford (1968).
44. M. C. MCKEAN, D. BOGGS and N. A. PETERSON, *J. Neurochem.* **15**, 235 (1968).
45. E. JEQUIER, W. LOVENBERG and A. SJOERDSMA, *Molec. Pharmac.* **3**, 274 (1967).
46. W. E. DAVIES, *J. Neurochem.* **17**, 1319 (1970).
47. P. M. PACKMAN, C. BLOMSTRAND and A. HAMBERGER, *J. Neurochem.* **18**, 1 (1971).
48. W. J. MCBRIDE and J. VANTASSEL, *Brain Res.* **44**, 177 (1972).
49. B. TIPLADY, *Brain Res.* **43**, 215 (1972).

50. H. C. FIBIGER, R. E. PUDRITZ, P. L. MCGEER and E. G. MCGEER, *J. Neurochem.* **19**, 1697 (1972).
51. W. S. SCHWARK, R. L. SINGHAL and G. M. LING, *Life Sci.* **9**, 939 (1970).
52. B. K. KOE, *Fedn. Proc.* **30**, 886 (1971).
53. J. MOURET, J. F. PUJOL and S. KIYONO, *Brain Res.* **15**, 501 (1969).
54. G. BANKER and C. W. COTMAN, *Archs. Biochem. Biophys.* **142**, 565 (1971).
55. E. LEVIN, C. A. GARCIA ARGIG and G. J. NOGUEIRA, *J. Neurochem.* **13**, 979 (1966).
56. A. V. LORENZO and S. R. SNODGRASS, *J. Neurochem.* **19**, 1287 (1972).
57. A. VITALE-NEUGEBAUER, A. GIUDITTA, B. VITALE and S. GIAQUINTO, *J. Neurochem.* **17**, 1263 (1970).
58. K. HEMMINKI, *J. Neurochem.* **19**, 2699 (1972).
59. K. HEMMINKI, *J. Neurochem.* **20**, 373 (1973).
60. J. M. SNEDDON and P. KEEN, *Biochem. Pharmac.* **19**, 1297 (1970).
61. G. R. BERG and D. C. KLEIN, *J. Neurochem.* **19**, 2519 (1972).

Résumé—Les états de vigilance et le métabolisme central des monoamines et des protéines ont été étudiés 6 hr après administration intrapéritonéale de DL-5-hydroxytryptophane (5 mg/kg) à des chats traités 48 hr auparavant avec de la *p*-chlorophénylalanine (400 mg/kg). La *p*-chlorophénylalanine seule provoque un état d'insomnie et, dans le télencéphale, une diminution importante des concentrations endogènes de 5HT et d'acide 5-hydroxyindoleacétique sans variation de Noradrénaline. L'injection secondaire de 5-hydroxytryptophane rétablit un sommeil normal et entraîne parallèlement une augmentation significative du métabolisme de la 5HT. La *p*-chlorophénylalanine et le 5-hydroxytryptophane ne modifient pas la biosynthèse globale des protéines cérébrales mesurée par l'incorporation *in vivo* pendant 4 hr d'amino acides ^{14}C injectés par voie intraventriculaire. Il existe cependant une bonne corrélation entre les états de sommeil et la capacité de synthèse protéique au niveau du télencéphale. L'analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide des protéines solubles de cette structure suggère la présence d'un groupe de protéines acides à poids moléculaire élevé dont la synthèse pourrait être stimulée pendant le sommeil. La possibilité d'interrelations sommeil-amines-protéines est discutée à ce propos.