

NOBEL 2000

PRIX NOBEL DE MÉDECINE 2000

Paul Greengard

La phosphorylation des protéines dans le système nerveux

Jean-Antoine Girault

Paul Greengard est né le 11 décembre 1925 à New York. Biochimiste de formation, puis professeur de pharmacologie et de psychiatrie à la faculté de médecine de l'université de Yale (États-Unis), il dirige le laboratoire de neurosciences moléculaire et cellulaire de l'université Rockefeller à New York.

Le prix Nobel 2000 honore la Neurobiologie, en récompensant le travail de trois chercheurs qui, chacun avec des approches et des styles très différents, ont fait progresser de manière considérable notre connaissance des communications cellulaires dans le système nerveux. Arvid Carlsson a découvert le rôle de la dopamine comme neurotransmetteur dans le cerveau. Les travaux d'Eric Kandel ont identifié des mécanismes susceptibles de modifier de manière prolongée les propriétés des synapses, fournissant un début d'explication moléculaire aux processus de mémorisation et d'apprentissage. D'une certaine manière, le travail de Paul Greengard forme un lien entre celui des deux autres lauréats, puisque c'est lui qui a identifié les mécanismes moléculaires d'action de la dopamine et d'autres neurotransmetteurs « à action lente », qui sous-tendent la plasticité synaptique et de nombreux autres aspects de la physiologie neuronale.

Le rôle universel de l'AMP cyclique et de la protéine kinase activée par l'AMP cyclique

Paul Greengard a eu une carrière scientifique atypique, puisqu'après une formation initiale en physique, en chimie et en neurophysiologie, il a travaillé pendant près de dix ans dans l'industrie pharmaceutique avant de revenir au monde universitaire vers l'âge de 45 ans, à la fin des années 1960. A cette époque, on commençait à comprendre le mécanisme d'action de certaines hormones, mais les effets biochimiques des neurotransmetteurs restaient mystérieux. Deux découvertes réalisées quelques années auparavant ont profondément influencé sa démarche à cette période et certainement joué un rôle dans son retour vers la recherche fondamentale : la mise en évidence du rôle de l'adénosine 3',5' monophosphate (AMPc) comme second messenger par Earl Sutherland, et la découverte par Edwin Krebs et Edmond Fisher de la phosphorylation réversible des protéines, comme mode de régulation de leurs propriétés en réponse à des signaux extracellulaires. Ces deux découvertes fondamentales ont d'ailleurs déjà valu le prix Nobel à leurs auteurs en 1971 pour Sutherland, et en 1993 pour Krebs et Fisher. En 1968, Krebs *et al.* avaient montré que l'activation du catabolisme du

glycogène musculaire induite par l'adrénaline était liée à la stimulation par l'AMPc d'une protéine kinase spécifique, maintenant appelée PKA pour protéine kinase activée par l'AMPc [1]. Paul Greengard comprit immédiatement que les mêmes mécanismes pouvaient avoir une importance biologique qui dépassait largement la régulation du métabolisme du glycogène. Greengard et ses collaborateurs montrèrent que la PKA était exprimée dans de nombreux tissus de diverses espèces [2], qu'elle était particulièrement abondante dans le cerveau [3], et que l'activité neuronale augmentait les taux d'AMPc [4]. Plusieurs laboratoires, dont celui de Greengard, obtinrent aussi très vite des résultats mettant en évidence le rôle de l'AMPc dans les effets de la noradrénaline [5] et de l'activité électrique [6]. Ces résultats fournissaient un cadre conceptuel permettant d'expliquer les effets « moléculaires » de l'activité neuronale et de certains neurotransmetteurs. Cela fut formalisé dans la *proteïn kinase hypothesis* proposée en 1971 [7], selon laquelle l'AMPc et la PKA étaient impliqués non seulement dans la régulation du métabolisme, mais aussi dans les réponses physiologiques des neurones, en particulier dans la transmission synaptique. Cette hypothèse a été confirmée depuis par de nombreux travaux, notamment

par la démonstration directe des effets biologiques de la PKA dans les neurones [8], y compris dans les neurones d'Aplysie au cours d'une collaboration avec le laboratoire d'Eric Kandel [9]. En fait, l'importance du rôle des réactions de phosphorylation relayées par l'AMPc est maintenant si universellement reconnue qu'il paraît « trivial » d'évoquer une telle hypothèse en tant que telle. La seule modification notable de ce cadre conceptuel qui soit survenue au cours des dernières années, a été l'identification dans les neurones d'autres cibles de l'AMPc, sous la forme de certains canaux ioniques et de facteurs d'échange GTP/GDP de petites protéines G. Toutefois, il est toujours admis que la stimulation de la PKA explique la majorité des effets biologiques de l'AMPc chez les eucaryotes.

La phosphorylation des protéines comme mécanisme d'action général des seconds messagers

L'intuition de Paul Greengard fut alors de réaliser que l'importance de la phosphorylation des protéines dépassait le rôle de l'AMPc et que ce type de réaction biochimique pouvait aussi rendre compte de l'action d'autres seconds messagers et, *in fine*, de l'immense majorité des signaux extracellulaires. Ainsi, Kuo et Greengard ont découvert en 1970 la protéine kinase activée par le GMPc [10]. Le rôle du Ca^{2+} , fondamental dans toutes les cellules, est peut-être encore plus manifeste dans les cellules excitables comme les neurones. Quelques années après la découverte des kinases activées par les nucléotides cycliques, plusieurs laboratoires, dont celui de Greengard [11], découvraient simultanément une nouvelle classe de protéine-kinases, activées par le Ca^{2+} et la calmoduline. La phosphorylation de protéines permettait ainsi de rendre compte des effets biochimiques de l'influx calcique. Cette découverte amena dès 1978 Greengard à élargir « l'hypothèse des protéine-kinases », suggérant que la plupart des signaux extracellulaires activaient, par l'intermédiaire de divers seconds messagers, des protéine-kinases, et que les variations de la phosphorylation de leurs substrats

expliquaient la majorité des actions physiologiques de ces signaux extracellulaires [12] (*figure 1*). Même si d'autres types de cascades de signalisation intracellulaires ont été découvertes depuis, on sait maintenant que les protéine-kinases et les protéine-phosphatases occupent une place prépondérante dans les mécanismes de transduction des signaux. En fait, l'identification par clonage moléculaire, et plus récemment par séquençage complet de génomes, d'un nombre croissant de protéine-kinases et de protéine-phosphatases a montré que leur rôle est universel et encore plus complexe qu'on ne pouvait l'imaginer initialement (*voir par exemple* [13]).

Identifier des protéines phosphorylées pour comprendre l'action des signaux extracellulaires

A la fin des années 1970, il était clair que les réactions de phosphorylation/déphosphorylation expliquaient une partie des actions physiologiques des signaux extracellulaires, notamment de la dépolarisation ou des neurotransmetteurs dans les neurones. Pour comprendre ces actions il fallait aller plus loin. L'étape suivante du travail de Paul Greengard fut donc d'identifier les protéines phosphorylées dans les neurones en réponse à des stimulus spécifiques. L'identification de ces protéines, la caractérisation de leurs fonctions bio-

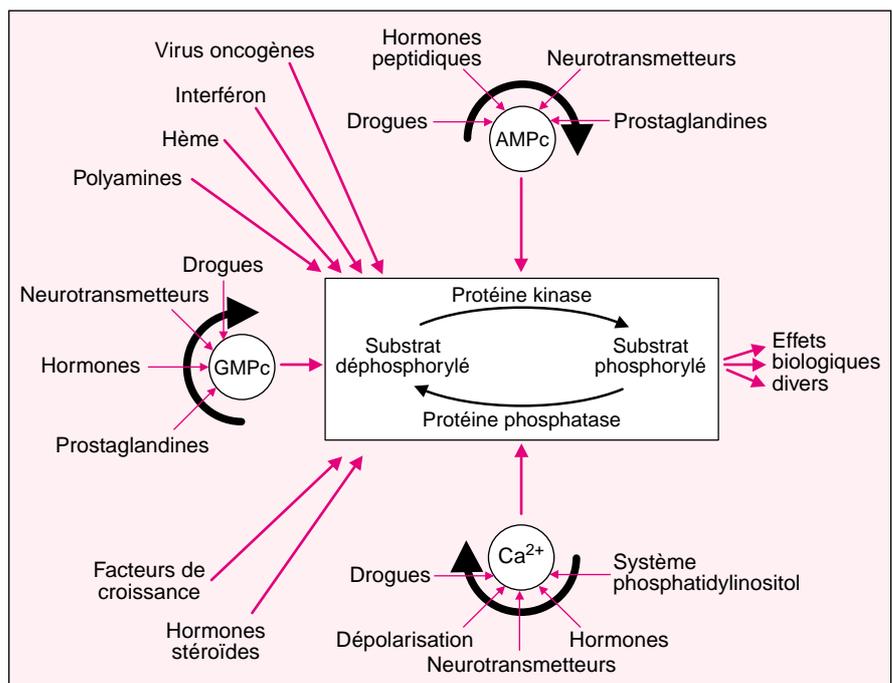


Figure 1. **L'hypothèse « protéine-kinase étendue ».** À la fin des années 1970, Paul Greengard propose que la phosphorylation des protéines rende compte des effets biologiques de la majorité des agents régulateurs (« premiers messagers »). Beaucoup d'entre eux agissent par l'intermédiaire de seconds messagers comme l'AMPc, le GMPc ou le Ca^{2+} , alors que d'autres modifient directement les systèmes de phosphorylation de protéines (encadré). Si la plupart des agents pharmacologiques (« drogues ») empêchent les effets des premiers messagers sur les seconds (par exemple, les antagonistes agissant sur les récepteurs), certains modifient directement les taux de seconds messagers (par exemple, les inhibiteurs des canaux calciques ou de la phosphodiesterase). Il est à noter que parmi tous les agents régulateurs proposés dans ce schéma, seules les hormones stéroïdes se sont avérées plus tard agir principalement par un mécanisme indépendant de la phosphorylation de protéines (d'après [27]).

logiques et de leur régulation par phosphorylation apparaissaient ainsi comme le moyen de comprendre réellement comment agissent les signaux extracellulaires. Étant donné le nombre de protéines réglées par phosphorylation, la tâche à laquelle s'est attelé le groupe de Paul Greengard dès le début des années 1970 était immense. En fait, au cours des dix ou quinze dernières années, un très grand nombre de laboratoires s'est joint *de facto* à cet effort : du fait de la généralité des régulations par phosphorylation, presque tous les laboratoires étudiant des protéines identifiées du fait de leur rôle dans certains processus physiologiques ou de leurs propriétés intrinsèques, ont été amenés à s'intéresser à leur régulation par les kinases et/ou les phosphatases. Ainsi, on connaît maintenant, dans les neurones comme dans les autres cellules, un grand nombre de protéines réglées par phosphorylation, comprenant par exemple des enzymes de synthèse de neurotransmetteurs, des protéines du cytosquelette, des canaux ioniques, des récepteurs, des facteurs de transcription et bien d'autres protéines au rôle structural, métabolique ou régulateur. L'étude systématique des protéines phosphorylées en réponse à l'AMPc, puis à d'autres stimulus, a amené Paul Greengard et ses collaborateurs à découvrir un certain nombre de protéines physiologiquement importantes dans les neurones et à caractériser leurs propriétés. On peut prendre comme exemple les synapsines, un groupe de protéines abondantes, associées aux vésicules synaptiques (voir [14]). La première synapsine, appelée à l'époque *protein 1*, a été identifiée initialement comme un substrat « particulière » de la PKA dans les terminaisons synaptiques [15]. Les travaux ultérieurs ont montré qu'il existait en fait plusieurs protéines apparentées phosphorylées par la PKA (synapsines Ia et Ib, synapsines IIa et IIb, et plus récemment synapsine III). L'étude des kinases activées par le Ca²⁺/calmoduline et susceptibles de phosphoryler la synapsine a d'ailleurs été à l'origine de la découverte de deux kinases majeures de ce groupe, la Ca²⁺/calmoduline kinase I (CaM-kinase I) qui phosphoryle la

synapsine I sur le même site que la PKA et la Ca²⁺/calmoduline kinase II (CaM-kinase II), qui la phosphoryle sur deux résidus spécifiques. On sait maintenant que ces deux enzymes jouent un rôle important dans de multiples types cellulaires, en particulier dans les neurones. Les nombreux travaux consacrés aux synapsines ont montré qu'elles s'associent réversiblement aux vésicules synaptiques et au cytosquelette d'actine et que la phosphorylation par la CaM-kinase II supprime cette association. Une fonction des synapsines I est donc d'assurer un enrichissement de vésicules de réserve à proximité des zones actives et de rendre ces vésicules disponibles lors de l'influx calcique. Les synapsines interviennent aussi dans la croissance axonale et la synaptogenèse.

Le mode d'action de la dopamine et la DARPP-32

Paul Greengard s'est intéressé à la dopamine très tôt au cours de son étude du mode d'action des neurotransmetteurs. En 1971, Keabian et Greengard montraient que la dopamine activait la production d'AMPc dans le ganglion cervical supérieur, et l'année suivante dans le striatum [16]. Il s'agissait de la première mise en évidence d'un « récepteur » de la dopamine, couplé à l'adénylyl cyclase, maintenant connu sous le terme de récepteur de type D1. Peu de temps après, il était montré que les neuroleptiques étaient capables de bloquer cette stimulation de la production d'AMPc par la dopamine [17, 18], confirmant ainsi l'hypothèse émise par Carlsson sur la base d'études métaboliques. De plus, Greengard montrait que les effets de la dopamine nécessitaient la présence d'un facteur cytosolique qui sera identifié comme le GTP [19], en accord avec le concept proposé par Martin Rodbell, qui avait été le premier à mettre en évidence le rôle d'une protéine liant le GTP dans l'activation de l'adénylyl cyclase (découverte qui a valu à Rodbell le prix Nobel en 1994). Ce n'est que plusieurs années plus tard qu'un deuxième type de récepteur de la dopamine, inhibant la production

d'AMPc, a été mis en évidence. Paul Greengard ne s'est pas particulièrement intéressé aux récepteurs de la dopamine en tant que tels, mais a plutôt porté son attention sur les événements biochimiques activés par la mise en jeu des récepteurs D1. En effet, au début des années 1980, en comparant les substrats pour les principales protéines kinases dans les différentes régions du cerveau, Walaas, Nairn et Greengard avaient remarqué la présence spécifique dans le striatum d'un substrat soluble de la phosphorylation activée par l'AMPc [20]. Cette phosphoprotéine attira l'attention du fait de son enrichissement dans la région du cerveau la plus innervée par les neurones à dopamine. Cette protéine d'un poids moléculaire apparent de 32 000 et phosphorylée en réponse à l'AMPc et à la dopamine, appelée DARPP-32 (*dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein-32*), fut donc l'objet de recherches intenses dans son laboratoire. La séquence de la DARPP-32 présente une région de similarité avec une protéine inhibitrice de la phosphatase 1 (PP1), l'inhibiteur 1. Comme l'inhibiteur 1, la DARPP-32 lorsqu'elle est phosphorylée par la PKA devient un puissant inhibiteur de la PP1 [21], une phosphatase ubiquiste, capable de déphosphoryler de nombreuses protéines. La DARPP-32, est exprimée dans les neurones contenant les récepteurs D1 de la dopamine, dans certains autres neurones ainsi que dans d'autres types cellulaires, comme les cellules épithéliales des plexus choroïdes ou des tubules rénaux. La DARPP-32 est particulièrement enrichie dans les neurones épineux de taille moyenne, qui représentent la majorité des neurones du striatum et en forment la voie de sortie. Ces résultats indiquaient que dans les cellules qui expriment la DARPP-32, la dopamine est non seulement capable de stimuler la phosphorylation de protéines substrats de la PKA, mais aussi d'inhiber la déphosphorylation de nombreuses protéines.

Les neurones striataux sont des neurones GABAergiques, qui reçoivent une double innervation glutamatergique, excitatrice, venant du cortex cérébral, et dopaminergique, modu-

latrice, venant de la substance noire. La fonction du striatum est d'intégrer les informations d'origine corticale, sous le contrôle d'une modulation complexe par la dopamine, qui parfois s'oppose et parfois renforce les effets du glutamate. La disparition des neurones dopaminergiques nigrostriataux au cours de la maladie de Parkinson perturbe complètement le fonctionnement normal de ce système. De manière intéressante, Paul Greengard et ses collaborateurs ont montré que le glutamate et la dopamine avaient des effets opposés sur la phosphorylation de la DARPP-32. En effet, la stimulation des récepteurs NMDA du glutamate entraîne la déphosphorylation de la DARPP-32, par l'intermédiaire d'une phosphatase activée par le Ca^{2+} et la calmoduline, la calcineurine, mettant en évidence le rôle fonctionnel de cette phosphatase dans le système nerveux [22]. Dans les neurones striatonigraux, il existe donc une régulation bidirectionnelle de l'activité de la phosphatase 1 par la DARPP-32: la stimulation des récepteurs D1 de la dopamine l'inhibe (via la phosphorylation de la DARPP-32 par la PKA) et celle des récepteurs NMDA du glutamate l'active (via la déphosphorylation de la DARPP-32 par la calcineurine) (figure 2). Au cours des années suivantes, les résultats expérimentaux se sont accumulés, montrant que la DARPP-32 joue un rôle clé dans de nombreuses actions de la dopamine et d'autres messagers intercellulaires (voir [23] pour une revue récente). En particulier, la DARPP-32 participe à la régulation par la dopamine des récepteurs AMPA et NMDA du glutamate, et des canaux Ca^{2+} et Na^+ . L'invalidation du gène de la DARPP-32 montre qu'elle règle l'efficacité de la transmission dopaminergique, et qu'elle semble indispensable pour certaines réponses induites par les drogues qui modifient cette transmission [24]. Des travaux récents suggèrent que la DARPP-32 est en fait une protéine régulatrice aux fonctions complexes et pléiotropes puisque, lorsqu'elle est phosphorylée par la kinase Cdk5, elle devient capable d'inhiber la PKA [25] et qu'elle est nécessaire à l'expression de certains comporte-

ments réglés par la progestérone, indépendamment des récepteurs de la dopamine [26].

Conclusions

Paul Greengard a contribué de manière significative au tournant qu'ont connu les Neurosciences au cours des années 1970 et 1980. Les deux approches principales des neurosciences à la fin des années 1960 étaient la description anatomique des circuits neuronaux et l'étude de leurs propriétés électrophysiologiques. Les travaux de Greengard, ainsi que ceux d'autres chercheurs dans des domaines complémentaires de la biochimie et de la pharmacologie, ont permis l'élucidation des mécanismes moléculaires menant de la fixation des neurotransmetteurs

sur leurs récepteurs aux réponses physiologiques qui expliquent leurs actions. Sa principale contribution a été de montrer que les réactions de phosphorylation/déphosphorylation jouent un rôle fondamental et universel dans ce cadre. Ces réactions de phosphorylation/déphosphorylation ont une cinétique souvent lente par comparaison avec l'ouverture des canaux réglés directement par des ligands ou par le potentiel de membrane, encore que les travaux récents montrant l'association de kinases et de phosphatases avec des canaux ioniques dans les régions post-synaptiques révèlent que ces enzymes peuvent avoir des effets rapides sur la transmission synaptique. Dans tous les cas, les effets des changements de phosphorylation de protéines peuvent être prolongés, sous-tendant

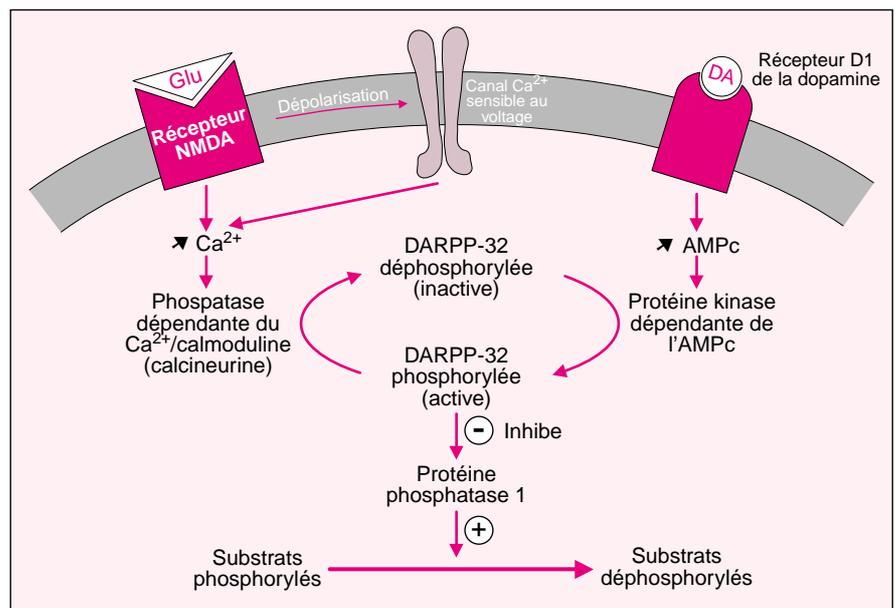


Figure 2. **Régulation bidirectionnelle de la phosphorylation et de l'activité de la DARPP-32 par deux systèmes de neurotransmetteurs.** La DARPP-32 est abondamment exprimée dans les neurones épineux de taille moyenne du striatum. La dopamine est libérée par les neurones venus de la substance noire dont la dégénérescence est responsable de la maladie de Parkinson. La dopamine active la production d'AMPc et la phosphorylation de la DARPP-32 par l'intermédiaire de la protéine kinase dépendante de l'AMPc. La DARPP-32 phosphorylée est un puissant inhibiteur de la protéine-phosphatase 1, une phosphatase ayant de nombreux substrats. Le glutamate libéré par les fibres nerveuses venant du cortex cérébral active les récepteurs NMDA perméables au Ca^{2+} . Il peut aussi entraîner indirectement l'ouverture de canaux calciques sensibles à la dépolarisation. L'influx calcique active la calcineurine (ou phosphatase 2B), une phosphatase directement sensible au Ca^{2+} et au complexe Ca^{2+} /calmoduline. La calcineurine déphosphoryle la DARPP-32, levant ainsi l'inhibition de la phosphatase 1 (d'après [22]).

directement, ou par l'intermédiaire de la régulation de l'expression de gènes, de nombreuses adaptations à court, moyen et long termes des propriétés des neurones responsables des phénomènes de neuromodulation et de plasticité synaptique au sens le plus large du terme. Les multiples travaux réalisés au cours des dernières années dans d'innombrables laboratoires montrent à la fois l'importance de ces réactions et leur complexité puisque, dans les cellules vivantes, de multiples voies de signalisation peuvent être mises en jeu de manière intriquée. Un des défis à relever est de développer de nouveaux outils, et peut-être de nouveaux concepts pour tenir compte de cette complexité, et permettre la compréhension du fonctionnement des circuits neuronaux et gliaux, et de leurs modifications au cours du temps, en termes moléculaires et cellulaires. Au-delà de ses multiples découvertes fondamentales évoquées brièvement ici, la capacité qu'a eu Paul Greengard de dégager des lignes directrices simples, à forte valeur heuristique, représente à mon sens un modèle pour le développement futur de ce domaine de recherche ■

RÉFÉRENCES

- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* 1968; 243: 3763-5.
- Kuo JF, Greengard P. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969; 64: 1349-55.
- Miyamoto E, Kuo JF, Greengard P. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. 3. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. *J Biol Chem* 1969; 244: 6395-402.
- McAfee DA, Schorderet M, Greengard P. Adenosine 3',5'-monophosphate in nervous tissue: increase associated with synaptic transmission. *Science* 1971; 171: 1156-8.
- Siggins GR, Hoffer BJ, Bloom FE. Studies on norepinephrine-containing afferents to Purkinje cells of rat cerebellum. III. Evidence for mediation of norepinephrine effects by 3',5'-adenosine monophosphate. *Brain Res* 1971; 25: 535-53.
- McAfee DA, Greengard P. Adenosine 3',5'-monophosphate: electrophysiological evidence for a role in synaptic transmission. *Science* 1972; 178: 310-2.
- Greengard P, Kuo JF, Miyamoto E. Studies on the mechanism of action of cyclic AMP in the nervous and other tissues. In: Weber G, ed. *Advances in enzyme regulation*, vol. 9. New York: Pergamon, 1971: 113-25.
- Kaczmarek LK, Jennings KR, Strumwasser F, Nairn AC, Wilson FD, Greengard P. Microinjection of catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase enhances calcium action potentials of bag cell neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7487-91.
- Castellucci VF, Kandel ER, Schwartz JH, Wilson FD, Nairn AC, Greengard P. Intracellular injection of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of transmitter release underlying behavioral sensitization in *Aplysia*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7492-6.
- Kuo JF, Greengard P. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. VI. Isolation and partial purification of a protein kinase activated by guanosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem* 1970; 245: 2493-8.
- Schulman H, Greengard P. Stimulation of brain membrane protein phosphorylation by calcium and an endogenous heat-stable protein. *Nature* 1978; 271: 478-9.
- Greengard P. Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* 1978; 199: 146-52.
- Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T. The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13603-10.
- Greengard P, Valtorta F, Czernik J, Benfenati F. Synaptic vesicle phosphoproteins and regulation of synaptic function. *Science* 1993; 259: 780-5.
- Johnson EM, Ueda T, Maeno H, Greengard P. Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation of a specific protein in synaptic membrane fractions from rat cerebrum. *J Biol Chem* 1972; 247: 5650-2.
- Kebabian JW, Petzold GL, Greengard P. Dopamine-sensitive adenylylase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the «dopamine receptor». *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69: 2145-9.
- Clement Cormier YC, Kebabian JW, Petzold GL, Greengard P. Dopamine-sensitive adenylylase in mammalian brain: a possible site of action of antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 1113-7.
- Miller RJ, Horn AS, Iversen LL. The action of neuroleptic drugs on dopamine-stimulated adenosine cyclic 3', 5'-monophosphate production in rat neostriatum and limbic forebrain. *Mol Pharmacol* 1974; 10: 759-66.
- Clement Cormier YC, Parrish RG, Petzold GL, Kebabian JW, Greengard P. Characterization of a dopamine-sensitive adenylylase in the rat caudate nucleus. *J Neurochem* 1975; 25: 143-9.
- Walaas SI, Nairn AC, Greengard P. Regional distribution of calcium- and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-regulated protein phosphorylation systems in mammalian brain. II. Soluble systems. *J Neurosci* 1983; 3: 302-11.
- Hemmings Jr. HC, Greengard P, Tung HYL, Cohen P. DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1. *Nature* 1984; 310: 503-5.
- Halpain S, Girault JA, Greengard P. Activation of NMDA receptors induces dephosphorylation of DARPP-32 in rat striatal slices. *Nature* 1990; 343: 369-72.
- Greengard P, Nairn AC, Girault JA, et al. The DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration. *Brain Res Rev* 1998; 26: 274-84.
- Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein PG, et al. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 1998; 281: 838-9.
- Bibb JA, Snyder GL, Nishi A, et al. Protein kinase and protein phosphatase regulation by distinct phosphorylation sites within a single molecule. *Nature* 1999; 402: 669-71.
- Mani SK, Fienberg AA, O'Callaghan JP, et al. Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 2000; 287: 1053-6.
- Nestler EJ, Greengard P. *Protein phosphorylation in the nervous system*. New York: John Wiley and Sons Inc, 1984.

Jean-Antoine Girault

Inserm U. 536, 17, rue du Fer-à-Moulin, 75005 Paris, France. Adresse actuelle: Collège de France, 11, place Marcellin-Berthelot, 75231 Paris Cedex 05, France.