

Effets de l'injection de nicotine sur les ARN messagers codants pour des protéines caractéristiques de la transmission dans le système dopaminergique mésostré.

Nicolas Le Novère, Michele Zoli & Jean-Pierre Changeux.

Résumé

Le système dopaminergique mésostré est à la base des phénomènes de récompense et de renforcement. Ce système est sélectivement activé par la nicotine, comme par toutes les drogues à accoutumance. Une étude systématique des effets de la drogue sur l'activité génique a été réalisée.

Des rats Sprague-Dawley sont traités suivant des protocoles chronique intermittent (1 injection journalière durant 14 jours) et Aiguë (1 injection unique). La dose est de 1mg par Kg, dose efficace tant pour les effets comportementaux que neurochimiques. Les animaux sont sacrifiés 4, 12 ou 24 h après la dernière injection. Le taux de différents ARN messagers est mesuré par hybridation in situ à l'aide de sondes oligodéoxyribonucléotidiques marqué au [³⁵S]-dATP. L'analyse des résultats est effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image. La densité moyenne ainsi que l'étendue du marquage dans chaque structure sont mesurées. Les tests portent sur des neuromédiateurs, des enzymes de biosynthèse et des récepteurs.

Dans le mésencéphale les messagers des sous-unités du récepteur nicotinique $\alpha 4$ et $\beta 2$ ne sont pas affectés par les traitements. En revanche le traitement aiguë provoque une baisse de la quantité d'ARN messenger de la tyrosine hydroxylase dans la substance noire. Dans le noyau accumbens, seul l'ARN messenger de la substance P subit un accroissement alors que l'on note dans le Caudate-putamen un accroissement du messenger de la substance P et des récepteurs dopaminergiques D1 ainsi qu'une baisse des ARN messagers de la proenkephaline et du récepteur dopaminergique D2.

Summary

The mesostriatal dopaminergic system is the neuronal substrate of the reward and reinforcement phenomena. This pathway is activated by nicotine, as well as other drugs of addiction. In this study, the effect of nicotine on the transcription of several genes expressed in these structures was examined.

Sprague-Dawley rats were treated with nicotine either intermittent chronic (daily injection for 14 days) or acute (one injection only). The dose used was 1 mg/Kg of nicotine, which is known to be sufficient to alter both behavioral and neurochemical parameters in the rat. Animals were sacrificed either 4, 12, or 24 h after the final injection. The level of messenger RNA is evaluated using in situ hybridization with [³⁵S]-ATP labeled oligodeoxyribonucleotidic probes. Analysis of the results was performed using image analyser software. Mean density and labeling extension were determined for each brain structure. Experiments were led on neurotransmitters, biosynthetic enzymes and receptors.

In the mesencephalon, messengers for nicotinic receptor subunits $\alpha 4$ and $\beta 2$ were not altered by the nicotine treatments. Acute treatment provoked a decrease in the quantity of the tyrosine hydroxylase messenger RNA in the substantia nigra. In the nucleus accumbens, the level of the messenger RNA encoding substance P is decreased, whereas in the caudateputamen we noted an increase in the messenger for substance P and the dopamine D1 receptor as well as a decrease of messenger RNA for proenkephalin and the dopamine D2 receptor.

Introduction

Nombre d'études ont clairement indiqué que plusieurs actions de la nicotine dans le cerveau passent par l'activation de la transmission dopaminergique centrale. Des études comportementales ont montré que les effets stimulants de la drogue pourraient être liés à une activation des neurones dopaminergiques mésostriés (Besson 1992, White 1989). Le système dopaminergique mésostrié a été caractérisé du point de vue anatomique, neurochimique et fonctionnel. Il est constitué globalement de deux grandes voies dopaminergiques: l'une, appelée ici nigrostriée, relie la substance noire au neostriatum tandis que l'autre, appelée mésolimbique, relie l'aire tegmentale ventrale (VTA) au noyau accumbens. Les deux réseaux fonctionnent en parallèle et de manière semblable. Le circuit a été précisé dans le neostriatum. En bref, la décharge dopaminergique, par l'intermédiaire de deux classes de récepteurs D1 et D2, active ou inhibe respectivement deux populations de neurones striaux distinctes, à savoir les neurones à GABA-substance P-Dynorphine et ceux à GABA-Enképhaline (figure 1). L'action de la dopamine (DA) sur ces deux populations entraîne l'activation des réseaux extrapyramidaux facilitant globalement l'activité corticale. Les neurones dopaminergiques se différencient par leur localisation, leurs projections et les neuropeptides qu'ils contiennent (Björklund & Hökfelt 1984, Gerfen et coll 1987, Gerfen 1992). L'activation du système mésolimbique semble être une cible commune de différents types de récompense, y compris les satisfactions artificielle (alcool, opiacés, amphétamine, cocaïne) (Koob & Bloom 1988, Le Moal 1991, Nestler 1992, Koob 1992). Ce système ne semble pas nécessaire à la régulation normale des comportements reliés aux satisfactions naturelles (nutritive, sexuelle) mais son activation accroît ces comportements (Willner & Scheel-Krüger 1991). La localisation des récepteurs nicotiques cérébraux commence à être connue (Clarke et coll 1985, Hill et coll 1993 et pour une revue Le Novère et coll 1993) ainsi que les effets neurochimiques de la nicotine sur la voie mésostriée. La prise de nicotine affecte les neurotransmetteurs du système comme leurs récepteurs. A l'instar d'autres drogues à accoutumance, la nicotine augmente transitoirement la quantité de DA extracellulaire dans le noyau accumbens (DiChiara & Imperato 1988, Brazell et coll 1990). Cet effet est bloqué par la mécamylamine, antagoniste des récepteurs nicotiques cérébraux. De plus, l'administration chronique de nicotine augmente la synthèse de DA de manière persistante (augmentation encore significative après plusieurs semaines de manque) dans l'accumbens et l'hippocampe, effet également supprimé par la mécamylamine (Mitchell et coll 1989). L'administration chronique de nicotine modifie également l'activité de certains récepteurs du système. Dans le striatum par exemple, elle entraîne la désensibilisation des récepteurs dopaminergiques présynaptiques D2 (situés sur les terminaisons en provenance de la substance noire) (Harsing 1992 et coll)(pour une revue sur la désensibilisation Ochoa et coll 1992). Quant aux sites nicotiques, ils subissent une augmentation dans un grand nombre de régions du cerveau, dont le système mésostrié. On n'observe cependant pas d'augmentation significative du taux de transcription des sous-unités $\alpha 2,3,4,5$ et de $\beta 2$ ce qui implique le recrutement d'une réserve de récepteurs antérieurement intracellulaires ou inactifs (Marks et coll 1992). Plusieurs drogues à accoutumance ont un effet marqué sur les taux d'ARN messagers dans le cerveau notamment dans le système mésostrié (Mackler & Eberwine 1992). En revanche, les effets au niveau génique de la nicotine sur ce circuit, qui jouent vraisemblablement un rôle dans la pérennité de l'action de la drogue, restent à étudier.

Afin de démêler l'écheveau de l'action de la nicotine dans le système mésostrié, nous traitons des rats suivant plusieurs protocoles, chroniques ou aigus. Les animaux sont ensuite sacrifiés et leur cerveau débité en tranches. Le taux de différents ARN messagers est alors mesuré par hybridation in situ avec des sondes oligodeoxyribonucléotidiques.

Matériel et méthodes

Les rats Sprague-Dawley sont soumis à des injections sous-cutanées de nicotine de 1 mg par Kg, valeur efficace tant pour les effets comportementaux que neurochimiques. Les animaux sont sacrifiés 4, 12 ou 24h après la dernière injection. Deux expériences ont été réalisées:

exp1 : contrôles salins (n=4-6), aigus sacrifiés à 4h (n=4-5), à 12h (n=4-5) ou à 24h (n=4-6) et chroniques sacrifiés à 24h (n=3-6).

exp2 : contrôles aigus sacrifiés à 4h (n=3-4), 12h (n=3-4) ou 24h (n=4), traités aigus sacrifiés à 4h (n=6), 12h (n=5-6) ou 24h (n=5-6), contrôles chroniques (n=4-5) et traités chroniques (n=7).

La synthèse des oligodéoxynucléotides est effectuée sur un synthétiseur automatique Cyclone (Biosearch Inc). L'hybridation in situ est adaptée de Young 1990. Après dissection, le cerveau frais est congelé dans de la carboglace. Des sections de 14 μ m sont découpées au cryostat et collées sur des lames recouvertes de polylysine. Les coupes sont fixées dans une solution de paraformaldehyde 4% puis acétylées. Les oligodéoxynucléotides sont marqués au [³⁵S]-dATP selon le protocole de Boehringer-Mannheim. Après préhybridation, les coupes sont mises à hybrider 20h avec l'oligodéoxynucléotide marqué (8,5 pg par coupe). Les lames sont exposées une semaine à un film (par exemple Amersham Hyperfilm-³H) ou un mois à une émulsion photographique (par exemple Kodak NTB2). L'analyse des résultats est effectuée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image Kontron et d'un microscope Olympus. La densité moyenne ainsi que l'étendue du marquage dans chaque structure sont mesurées. Le test statistique utilisé est l'analyse de la

variance, les seuils de significativité étant $p < 0,05$ et $p < 0,01$.

Résultats

Les expériences décrites dans les matériels et méthodes sont en cours d'analyse et les résultats présentés sont préliminaires. Ils feront l'objet d'autres analyses et d'autres expériences (c'est-à-dire d'autres traitements) doivent être réalisées.

Neurones mésencéphaliques

Conformément aux résultats précédemment obtenus par d'autres équipes après traitement chronique (Marks et coll 1992), nous n'observons pas de modifications des ARN messagers des sous-unités nicotiques $\alpha 4$ et $\beta 2$. Les ARN messagers de la tyrosine hydroxylase (enzyme limitante de la voie de biosynthèse de la DA) montrent une baisse de près de 40 % à 4 comme à 12 h postinjection dans la substance noire (figure 2). Les effets des traitements sur les messagers de la CCK, présents dans la partie dorsale de la substance noire compacte, dans la substance noire latérale ainsi que dans la VTA (German & Liang 1993) projetant dans la matrice striatale (Gerfen 1987), de la neurotensine, présents dans quelques neurones de la VTA, ainsi que des autorécepteurs dopaminergiques sont en cours d'analyse.

Neurones télencéphaliques

On note un accroissement du messager de la SP à 24 h de environ 10% dans le caudéputamen (figure 3a) et de 13% dans le noyau accumbens (figure 3b) ainsi qu'une diminution de celui de l'Enk à 12 h de 11% dans le Caudé-putamen (figure 3c), ce qui est en accord avec des résultats précédemment obtenus (Gerfen et coll 1991). Ces auteurs avaient montré que l'apomorphine, un agoniste dopaminergique, augmentait le taux de mRNA de la SP alors que la 6-OHDA, une toxine des neurones dopaminergiques, augmentait le mRNA de la proenkephaline. De plus ex vivo la DA diminue la quantité de ce dernier messager (Kowalski & Giraud 1993). Ces résultats suggèrent que l'effet de la nicotine sur le taux des neuropeptides striataux pourrait être dû à son effet sur la libération de DA. Cependant, un effet direct de la nicotine sur les cellules striatales, via la conductance au calcium des récepteurs nicotiques neuronaux (Mulle et coll 1992) n'est pas à exclure. Les transcrits du récepteur dopaminergique D1 montrent une augmentation à 12 (20%) comme à 24 h (15%) dans le Caudé-putamen (figure 4a) alors que le type D2 décroît à 12 h (9%) dans cette même structure (figure 4b). Aucun effet n'a pu être mis en évidence sur les messagers de la somatostatine et de l'acide glutamique décarboxylase (enzyme limitante de la principale voie de biosynthèse du GABA). La cholecystokinine, faiblement présente dans le striatum et dont le messager est affecté par l'atteinte du système dopaminergique (Schiffmann et Vanderhaegen 1992), est en cours d'analyse ainsi que la dynorphine, le neuropeptide Y et la choline acétyltransférase (enzyme de biosynthèse de l'acétylcholine).

Conclusion

Les résultats ci-dessus confirment le rôle central des neurones dopaminergiques dans les effets de la nicotine sur le cerveau. Les modifications observées dans le taux des transcrits pourraient contribuer à la neuroadaptation à la nicotine et par là même à la dépendance des fumeurs.

Références

Besson MJ. Nicotine et systèmes de récompense du cerveau. Sem Hôp Paris 1992 ; 36/37 : 1270-1276.

A Björklund & T Hökfelt. Handbook of chemical neuroanatomy, 1984 volume 2, part I, 55-111, 277-379.

Brazell MP, Mitchell SN, Joseph MH & Gray JA. Acute administration of nicotine increases the in vivo extracellular levels of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and ascorbic acid preferentially in the nucleus accumbens of the rat: Comparison with caudate-putamen. Neuropharmacology 1990 ; 29 : 1177-1185.

Clarke PBS, Schwartz RD, Paul SM, Pert CB & Pert A. Nicotinic binding in rat brain: Autoradiographic comparison of [3H]acetylcholine, [3H]nicotine and [125I]- α -bungarotoxin. J Neurosci 1985 ; 5 : 1307-1315.

DiChiara G & Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. Proc Natl Acad Sci USA 1988 ; 85 : 5274-78.

CR Gerfen, M Herkenham & J Thibault. The neostriatal mosaic: II. Patch-and Matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic system. J Neurosci 1987 ; 7 : 3915-3934.

CR Gerfen, JF McGinty & WS Young. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P and enkephalin in striatal neurons: In situ hybridization histochemical analysis. J Neurosci 1991 ; 11 : 1016-1031.

- CR Gerfen. D1 and D2 dopamine receptor regulation of striatonigral and striatopallidal neurons. *Sem Neurosci* 1992 ; 4 : 109-118.
- DC German & CL Liang. Neuroactive peptides exist in the midbrain dopaminergic neurons that contain calbindin-D28k. *Neuroreport* 1993 ; 4 : 491-494.
- Harsing LG, Sershen H & Lajtha A. Dopamine efflux from striatum after chronic nicotine: Evidence for autoreceptor desensitization. *J Neurochem* 1992 ; 59 : 48-54.
- Hill JA, Zoli M, Bourgeois JP & Changeux JP. Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: The $\beta 2$ subunit. *J Neurosci* 1993 ; 13 : 1551-1568.
- Koob GF & Bloom FE. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 1988 ; 242 : 715-723.
- GF Koob. Dopamine, addiction and reward. *Sem Neurosci* 1992 ; 4 : 139-148.
- C Kowalski & P Giraud. Dopamine decreases striatal enkephalin turnover and proenkephalin messenger RNA abundance via D2 receptor activation in primary striatal cell cultures. *Neurosci* 1993 ; 53 : 665-672.
- Le Moal M & Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 1991 ; 71 : 155-234.
- N Le Novère, A Bessis, C Léna, M Picciotto, M Zoli. Le récepteur nicotinique neuronal de l'acétylcholine: Du gène au tabagisme. *Medecine-science* 1993 ; 9 : 41-49.
- Mackler SA & Eberwine JH. The molecular biology of addictive drugs. *Mol Neurobiol* 1991 ; 5 : 45-58.
- Marks MJ, Pauly JR, Gross SD, Deneris ES, Hermans-Borgmeyer, Heinemann & Collins AC. Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J Neurosci* 1992 ; 12 : 2765-2784.
- Mulle C, Choquet D, Korn H & Changeux JP. Calcium influx through nicotinic receptor in rat central neurons: Its relevance to cellular regulation. *Neuron* 1992 ; 8 : 135-143.
- Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 1992 ; 12 : 2439-2450.
- Ochoa ELM, LI L & McNamee MG. Desensitization of central cholinergic mechanisms and neuroadaptation to nicotine. *Mol Neurobiol* 1990 ; 4 : 251-287.
- SN Schiffmann & JJ Vanderhaeghen. Lesion of the nigrostriatal pathway induces cholecystokinin messenger RNA expression in the rat striatum. An in situ hybridization histochemistry study. *Neurosci* 1992 ; 50 : 551-557.
- White NM. Reward or reinforcement: what's the difference? *Neurosci Biobehav Rev* 1989 ; 13 : 181-186.
- Willner P & Scheel-krüger J eds. *The mesolimbic dopamine system: from motivation to action*. John Wiley & sons, Chichester, UK.
- Young S. In Situ hybridization histochemistry, in *Handbook of chemical neuroanatomy* Björklund A & Hökfelt T eds, Elsevier, Amsterdam 1990 ; 8 : 481-512.

Figures

Figure 1:

Représentation schématique des caractères neurochimiques de la voie mésostriée. Les neurones mésencéphaliques sont ronds, les neurones de projection du striatum triangles et les interneurons du striatum polygonaux. CCK: cholecystokinine; ChAT: choline acetyltransferase; Dyn: dynorphine; Enk: enképhaline; GAD: acide glutamique decarboxylase; NPY: neuropeptide tyrosine; NT: neurotensine; SP: substance P; SS: somatostatine; TH: tyrosine hydroxylase.

Figure 2:

Effet de la nicotine sur le taux des ARN messagers de la tyrosine hydroxylase dans la substance noire. Expérience 1 (voir matériel et méthodes).

Figure 3:

a-Effet de la nicotine sur les ARN messagers de la substance P dans le caudeputamen. Expérience 2. b-Effet sur les ARN messagers de la substance P dans le noyau accumbens. c-Effet de la nicotine sur l'ARN messager de la proenképhaline. Expérience 2 excepté pour les contrôles aigus communs (n=12).

Figure 4:

a-Effet de la nicotine sur les ARN messagers du récepteur dopaminergique D1 dans le caudeputamen. Expérience 1. b-Effet sur les ARN messagers du récepteur dopaminergique D2 dans le caudeputamen. Expérience 2.