

## Sous-unité $\beta 2$ du récepteur nicotinique et apprentissage

Les effets de la nicotine sur les processus cognitifs sont bien connus, spécialement des fumeurs. On sait que la nicotine améliore les capacités d'attention, d'apprentissage et de mémoire. Mais la manière dont la nicotine produit ces effets dans le cerveau n'est pas encore très bien comprise. Le récepteur de la nicotine a été initialement isolé et identifié au niveau moléculaire, à partir de l'organe électrique de poisson : torpille ou gymnote [1]. Il a également été étudié de manière intensive à la jonction neuromusculaire chez les mammifères où il est engagé dans la traduction en signal électrique de la liaison de l'acétylcholine. Plus récemment, des clones codant pour les sous-unités du récepteur musculaire ont été utilisés comme sondes pour identifier les membres d'une famille distincte mais voisine de sous-unités du récepteur nicotinique dans le tissu nerveux [2, 3]. A ce jour, onze sous-unités différentes ont été caractérisées chez les rongeurs et la plupart d'entre elles existent également chez l'homme. Les gènes qui codent pour ces diverses sous-unités s'expriment de manière différente dans les ensembles de neurones qui composent les systèmes nerveux périphérique et central. Notre but a été d'exploiter cette connaissance de la biologie moléculaire de la famille des récepteurs nicotiques pour élucider les mécanismes d'action de la nicotine sur l'apprentissage et la mémoire.

Ce projet a été mis en œuvre en inactivant par recombinaison homologue le gène codant pour la sous-unité  $\beta 2$ , qui est la plus largement exprimée dans le cerveau [4]. Les récepteurs fonctionnels de l'acétylcholine dans la

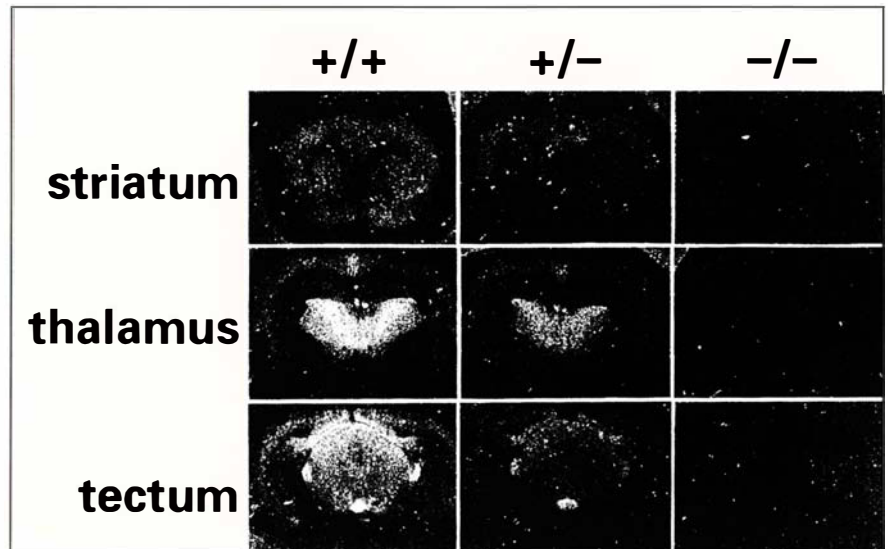


Figure 1. **Liaison de la nicotine dans le cerveau.** Les sites de liaison à forte affinité pour la nicotine sont distribués dans l'ensemble du cerveau. La densité de ces sites diminue de 50 % chez les souris ayant un des deux allèles  $\beta 2$  inactivé (+/-) et disparaissent chez les souris mutantes homozygotes qui n'expriment plus  $\beta 2$  (-/-).

cellule nerveuse sont formés par l'association en pentamère hétérologue d'au moins un type de sous-unité  $\alpha$  et d'un type de sous-unité  $\beta$ . Comme la sous-unité  $\beta 2$  est la seule sous-unité  $\beta$  exprimée dans l'ensemble des régions du cerveau, nous nous attendions à ce que les souris chez lesquelles manquait cette sous-unité présentent un déficit majeur dans le système nicotinique cérébral. Nous avons analysé à trois niveaux les souris recombinantes dont le gène codant pour la sous-unité  $\beta 2$  était invalidé : au niveau moléculaire, au niveau cellulaire (en utilisant des méthodes électrophysiologiques sur tranches de cerveau) et au niveau du comportement.

Au niveau moléculaire, nous avons d'abord vérifié que la sous-unité  $\beta 2$  était absente du cerveau. En utilisant l'hybridation *in situ* et la méthode du transfert de gel (*Western blot*), nous avons pu montrer que l'ARNm codant pour la sous-unité  $\beta 2$ , comme la protéine  $\beta 2$ , étaient absents chez les souris mutantes. De plus, l'expression des autres sous-unités nicotiques étudiées était normale et ne compensait pas la perte de la sous-unité  $\beta 2$ .

Afin de confirmer qu'il n'y avait pas de compensation majeure associée à la perte de sous-unités  $\beta 2$ , nous avons examiné la liaison de forte affinité de la nicotine dans le cerveau (*figure 1*).

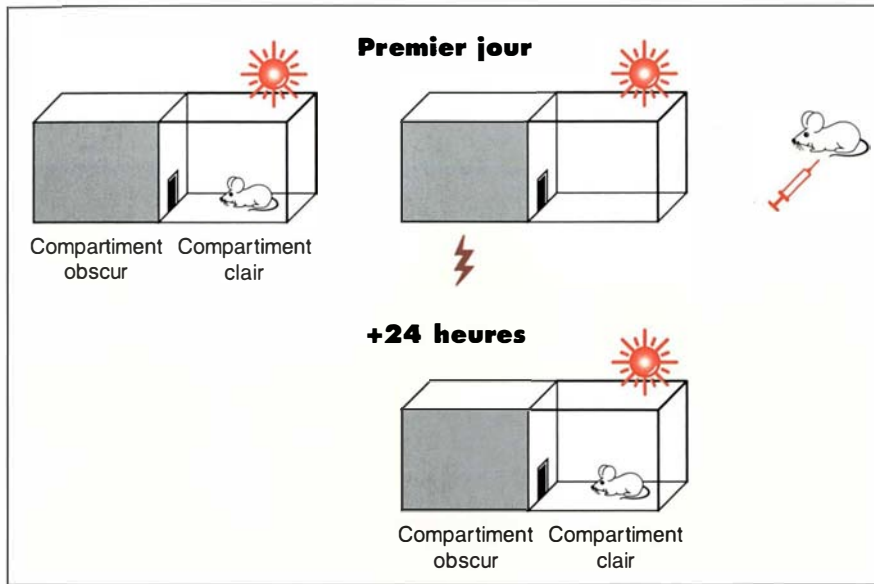


Figure 2. **Le test d'évitement passif.** Le premier jour du test, la souris est placée dans le compartiment clair de l'appareil. On mesure le temps mis par la souris pour se réfugier dans le compartiment obscur. Une fois que la souris est rentrée dans le compartiment obscur, on lui fait subir un léger choc électrique. Tout de suite après le choc, on injecte à la souris une solution de nicotine ou une solution témoin. Vingt-quatre heures plus tard, la souris est réintroduite dans le compartiment clair et on mesure le nouveau temps mis par l'animal pour rentrer dans le compartiment obscur.

Il avait été auparavant montré que la nicotine se lie avec une forte affinité (Kd~nM) à des sites distribués dans l'ensemble du cerveau. Elle peut être mise en évidence par autoradiographie, en incubant des tranches de cerveau avec la nicotine radioactive, puis en exposant la préparation à un film photographique. Le résultat principal de ces expériences de liaison a été la démonstration d'une absence totale de sites de liaison de nicotine de forte affinité. La sous-unité  $\beta 2$  est donc un composant nécessaire à la liaison de forte affinité de la nicotine au récepteur nicotinique. Nous nous sommes ensuite tournés vers l'électrophysiologie pour déterminer les effets de la mutation sur l'action électrogénique de la nicotine sur tranches de cerveau. En utilisant la méthode du voltage imposé sur fragments de membrane (*patch clamp*), nous avons démontré que les neurones du thalamus antérieur présentent une réponse électrique à la nicotine sur les tranches de cerveau de souris de type normal. Cette

réponse disparaît complètement chez les souris  $\beta 2^{-/-}$ . La spécificité de cette réponse a été examinée en effectuant des enregistrements dans des régions définies du cerveau où une autre sous-unité  $\beta$  ( $\beta 4$ ) est exprimée. Dans l'*habenula* médiane, les neurones des souris mutantes continuent de répondre à la nicotine comme les neurones des souris normales, ce qui confirme que la perte de la réponse à la nicotine dans le thalamus était bien due à l'inactivation de la sous-unité  $\beta 2$ .

Enfin, dans le but d'évaluer les conséquences de la perte de la réponse électrophysiologique sur le comportement, nous avons effectué deux groupes d'expériences d'apprentissage. Le test de la piscine de Morris (*Morris water maze*, *m/s n° 2*, vol. 11, p. 287) permet d'évaluer la mémoire spatiale. Dans cette épreuve, la souris est déposée dans un bassin rempli de lait dilué dans l'eau et elle apprend à trouver une plate-forme cachée près de la surface de l'eau mais invisible, en utilisant des repères tridimension-

nels extérieurs au bassin. Les performances des souris  $\beta 2^{-/-}$  dans cette épreuve ne sont pas différentes de celles des souris normales, ce qui indique que l'activité locomotrice, la vision et, au moins, un type d'apprentissage sont intacts chez les animaux mutants.

Le test d'évitement passif (*passive avoidance*) (figure 2) permet, quant à lui, d'évaluer la mémoire associative. Il comporte une étape d'apprentissage au cours de laquelle la souris est placée dans une chambre éclairée. La souris, qui n'aime pas la lumière, va rapidement se déplacer dans une chambre obscure adjacente mais, dès qu'elle entre, elle subit un choc électrique qu'elle « associe » à sa présence dans la chambre obscure. Une solution saline de nicotine est immédiatement injectée à la souris dès qu'elle a reçu le choc électrique ;

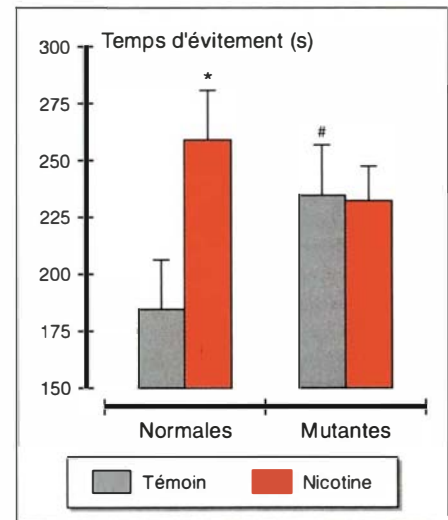


Figure 3. **Résultats du test d'évitement passif.** Les souris normales et les souris mutantes pour  $\beta 2$  ont été testées dans l'appareil décrit dans la figure 2. Les souris normales évitent plus longtemps le compartiment associé au choc électrique lorsqu'elles ont reçu une injection de nicotine. \* : différence significative par rapport au témoin. Les souris mutantes ne répondent plus à la nicotine mais, dans les conditions témoin, elles évitent le compartiment obscur plus longtemps que les souris normales. # : différence significative par rapport à la souris normale témoin.

---

24 heures plus tard, on mesure le temps (désormais plus long) mis par la souris pour entrer dans la chambre obscure. On constate que l'administration de nicotine augmente le délai de retour de la souris dans la chambre obscure et que, chez les souris mutantes, l'administration de la nicotine n'a plus aucun effet (*figure 3*). Ce résultat est bien conforme aux prédictions attendues mais, fait surprenant, en l'absence de nicotine, les souris mutantes évitent d'entrer dans la chambre obscure pendant un temps significativement plus long que celui observé avec la souris normale. En d'autres termes, il semble que les souris mutantes retiennent plus facilement le choc nociceptif.

Les raisons de cette « amélioration » de l'apprentissage consécutive à la mutation ne sont pas connues. Cette étude montre que les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine qui contiennent la sous-unité  $\beta 2$  sont les constituants essentiels de la molécule de récepteur qui lie la nicotine avec une forte affinité, et que ces récepteurs sont engagés dans les changements de performances d'apprentissage (évalués par le test d'évitement passif) provoqués par la nicotine. Ce travail fournit donc les premières preuves au niveau moléculaire du rôle du récepteur nicotinique central dans ce type d'apprentissage.

**Marina Picciotto**

1. Devillers-Thiéry A, Galzi JL, Changeux JP, Bertrand D. Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: a prototype of ligand-gated ion channel. *J Membrane Biol* 1993 ; 136 : 97-112.
2. Role LL. Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptor channels. *Curr Op Neurobiol* 1992 ; 2 : 254-62.
3. Le Novère N, Bessis A, Léna C, Picciotto M, Zoli M. Le récepteur nicotinique neuronal de l'acétylcholine: du gène au tabagisme. *médecine/sciences* 1993 ; 9 : 41-9.
4. Picciotto M, Zoli M, Léna C, Bessis A, Lallemand Y, Le Novère N, Vincent P, Merlo Pich E, Brulet P, Changeux JP. Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature* 1995 ; 374 : 65-7.