

Neurobiologie

Des souris qui ne bénéficient plus des effets stimulants de la caféine

Le café et le thé sont consommés depuis des millénaires en vertu de leur action psychotrope stimulante. Le principe le plus actif du café est la caféine, qui fut isolée au début du siècle dernier. Il a fallu attendre les travaux du groupe de S.H. Snyder à l'université John Hopkins (Baltimore, MD, USA) il y a une quinzaine d'années pour découvrir que certains effets pharmacologiques provoqués par l'absorption de caféine pouvaient être dus à l'interaction de cet alcaloïde avec des récepteurs membranaires de l'adénosine.

L'adénosine est une molécule ubiquitaire qui participe au métabolisme cellulaire. Ce nucléoside est également un neuromodulateur des systèmes nerveux central et périphérique. L'adénosine est en effet présente dans le milieu extracellulaire et se lie à des récepteurs membranaires spécifiques. Ces récepteurs sont la cible de molécules psychoactives comme la caféine, la théophylline et la théobromine, présentes dans la graine du caféier, la feuille du théier, la cabosse du cacaoyer, la noix du kolatier. L'étude des fonctions imparties à l'adénosine est compliquée par le fait que la molécule est impliquée dans diverses voies du métabolisme cellulaire.

Les actions spécifiques de l'adénosine

Les arguments les plus solides en faveur des actions spécifiques de l'adénosine dans de nombreux systèmes cellulaires sont issus de la caractérisation de ses récepteurs. La

première preuve au niveau moléculaire de l'existence de récepteurs fonctionnels de l'adénosine est venue de la mise en évidence, sur coupes de cerveaux, de son action modulatrice des concentrations d'un second messenger, l'AMP cyclique, et de la différenciation de deux types de récepteurs A1 et A2. A des concentrations nanomolaires, l'adénosine inhibe l'activité de l'adénylyl cyclase (qui convertit l'ATP en AMPc) par la stimulation des récepteurs A1, tandis qu'à des concentrations micromolaires elle active l'adénylyl cyclase en stimulant des récepteurs A2 (*m/s n° 6, vol. 7, p. 634*). Diverses xanthines dont on met à profit les propriétés bronchodilatatrices, par exemple la caféine et la théophylline, sont des antagonistes, non spécifiques, des récepteurs A1 et A2 de l'adénosine. L'adénosine pourrait d'ailleurs jouer un rôle important dans l'asthme. Contrairement aux sujets sains chez lesquels elle est sans effet, les asthmatiques répondent à l'adénosine par une bronchoconstriction. Le blocage des récepteurs adénosinergiques A1, plus nombreux dans les poumons d'asthmatiques que dans ceux de sujets sains, pourrait être à l'origine des effets antibronchoconstricteurs de la théophylline largement utilisée pour le traitement de l'asthme [1].

Les récepteurs de l'adénosine

Les techniques de biologie moléculaire ont permis, au cours de la dernière décennie, de distinguer spécifiquement quatre types et sous-types de récepteurs de l'adénosine : A1, A2a,

A2b et A3. L'analyse de la séquence de leur ADNc et de la structure primaire déduite des protéines indique que les récepteurs de l'adénosine font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, qui présentent une topologie à sept domaines transmembranaires [2, 3]. Le clonage des gènes des récepteurs de l'adénosine a ouvert la voie à des études fonctionnelles chez l'animal. Dans une étude antérieure, un modèle de souris transgéniques surexprimant le gène codant pour le récepteur A2a dans la thyroïde a pu être développé, avec pour conséquence un goitre hyperplasique et hyperfonctionnel. Ces souris constituent un modèle d'hyperthyroïdie héréditaire (*m/s n° 4, vol. 8, p. 389*) [4].

La diversité des récepteurs de l'adénosine conduit à analyser le rôle respectif de chacun d'eux dans les effets physiologiques de cette molécule. Cependant, la caractérisation des fonctions physiologiques imparties à chacun de ces récepteurs a été jusqu'à présent entravée par l'absence de molécules sélectives d'un seul type/sous-type de récepteur. Par exemple, on ne dispose pas d'antagonistes réellement sélectifs et puissants capables de bloquer la stimulation par l'adénosine des récepteurs A2b et A3.

Invalidation du gène du récepteur A2a

Par la mise en œuvre de la méthode de recombinaison homologe, le gène codant pour le récepteur A2a a

été inactivé chez la souris [5]. Il a été vérifié que les allèles ainsi modifiés ne codaient plus pour un récepteur fonctionnel : on ne détectait plus aucune liaison du ligand A2a, le CGS 21680 tritié, dans les cerveaux de souris déficientes en récepteur A2a (*RA2a^{-/-}*). Les souris homozygotes pour la mutation naissaient sans anomalie anatomique évidente, grandissaient normalement et se reproduisaient à la même fréquence que les souris de type « sauvages ».

L'analyse comportementale de ces souris mutantes nous a permis d'évaluer la participation du récepteur A2a à divers processus physiologiques. Le gène du récepteur A2a de l'adénosine est exprimé dans de nombreux tissus mais est particulièrement abondant dans les ganglions de la base du cerveau [6] ainsi que dans les vaisseaux et plaquettes sanguines.

• *L'activité exploratoire*

Les noyaux de la base du cerveau constituent un système de contrôle majeur de la motricité mais interviennent également dans le traitement et le filtrage de diverses informations sensorielles. Le récepteur A2a y étant abondamment exprimé, cela nous a incités à rechercher une modification de l'activité motrice des souris dépourvues de récepteur A2a relativement à celle des animaux « sauvages ». De fait, les souris *RA2a^{-/-}* ont une activité exploratoire inférieure à celle des souris sauvages. La caféine, après une administration unique de doses modérées, stimule l'activité motrice exploratoire de souris placées dans un environnement nouveau. C'est d'ailleurs grâce à cette épreuve comportementale que S. Snyder et ses collaborateurs avaient démontré, il y a une quinzaine d'années, que le blocage des récepteurs de l'adénosine était responsable des actions stimulantes et éveillantes de la caféine. Il avait alors été établi que des xanthines bloquaient les récepteurs de l'adénosine en proportion directe de leurs effets stimulants, à des concentrations similaires aux concentrations sanguines observées après la prise de quelques tasses de café [7]. La nature du/des sous-type(s) de récepteur de l'adénosine impliqué(s) dans cette fonction restait l'objet de controverses. L'aug-

mentation de la motricité observée chez des souris « sauvages » traitées par la caféine n'est pas observée chez des souris dépourvues du récepteur A2a. Cela montre clairement que le blocage du récepteur A2a est responsable des effets stimulants de la caféine.

• *L'anxiété*

Une deuxième propriété de la caféine consommée de façon abusive ou par des individus qui y sont anormalement sensibles est sa capacité d'engendrer des troubles anxieux voire des attaques de panique. Cette anxiété peut être évaluée chez la souris par l'utilisation de tests comportementaux comme les classiques épreuves du labyrinthe en croix sur-élevé et du compartiment noir/blanc qui exploitent la phobie naturelle des rongeurs pour les espaces non clos ou très éclairés. Les souris *RA2a^{-/-}* sont apparues plus anxieuses dans les deux épreuves comportementales utilisées. Ce résultat indique que les agonistes des récepteurs A2a devraient pouvoir constituer de nouveaux médicaments anxiolytiques.

• *La transmission de la douleur*

Les effets de l'adénosine sur les voies de la transmission de la douleur sont complexes. La stimulation de récepteurs A2a associés à des fibres sensorielles de la douleur accroît la perception douloureuse. En revanche, le nucléoside a des propriétés analgésiques lorsqu'il est injecté au niveau de la moelle épinière. On a observé que les souris dépourvues du récepteur A2a avaient un seuil nociceptif plus élevé, suggérant que l'absence du récepteur au niveau périphérique a davantage d'impact sur l'adaptation des animaux à la perception de la douleur que l'absence du récepteur au niveau de la moelle épinière. Ces résultats sont, par ailleurs, en accord avec l'utilisation de la caféine comme adjuvant de l'analgésie dans certaines spécialités pharmaceutiques.

• *L'agressivité*

De façon inattendue, les souris mâles déficientes en récepteur A2a sont spontanément plus agressives envers leurs congénères que les souris « sauvages ». Cette agressivité a été quantifiée dans l'épreuve classique de la confrontation entre un résident isolé

depuis plusieurs semaines et un intrus. Le nombre d'attaques des souris *RA2a^{-/-}* résidentes isolées pendant quelques semaines dans une cage individuelle vis-à-vis d'un intrus introduit pendant cinq minutes dans leur territoire est considérablement plus élevé que celui observé chez les souris « sauvages ». La souris déficiente en récepteur A2a présente donc un phénotype hyperagressif, comparable à celui des souris déficientes en monoamine oxydase A, une enzyme de dégradation des monoamines neuromédiatrices, noradrénaline, sérotonine et dopamine, ou à celui des souris déficientes en récepteur sérotoninergique 5HT1B [8].

Vers des utilisations cliniques ?

La localisation du récepteur A2a dans certaines aires limbiques cérébrales incite à penser que les agonistes du récepteur A2a pourraient être des candidats pour le traitement de la schizophrénie [9], une maladie psychiatrique dans laquelle les comportements agressifs sont assez fréquemment observés. Il reste toutefois à démontrer formellement que les agonistes adénosinergiques A2a possèdent bien chez l'animal des effets anti-agressifs.

L'adénosine exerce des effets physiologiques multiples au niveau du système cardiovasculaire. Elle joue un rôle dans l'hémostase primaire, c'est-à-dire dans les mécanismes physiologiques aboutissant à l'arrêt du saignement par colmatage d'une brèche apparue dans la paroi vasculaire. Les plaquettes interviennent dans cette hémostase primaire pour former un « clou plaquettaire » qui obture le trou de la paroi vasculaire. L'activation de la plaquette constitue une étape majeure du processus d'hémostase primaire. Elle se traduit notamment par l'agrégation des plaquettes entre elles et l'induction du processus de coagulation sanguine. L'augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc inhibe l'activation plaquettaire. L'adénosine, en se fixant sur un récepteur A2a au niveau de la plaquette provoque la synthèse d'AMPc à l'intérieur de la plaquette et inhibe ainsi son activation. Des agonistes du récepteur A2a

pourraient donc être développés comme anti-agrégants plaquettaires tandis que des antagonistes seraient des candidats pour traiter certaines diathèses hémorragiques par exemple. En accord avec cette fonction du récepteur, les souris déficientes en récepteur A2a présentent une agrégation plaquettaire plus élevée que les souris sauvages. Les agonistes de l'adénosine possèdent, en outre, des effets vasodilatateurs. L'inactivation du gène codant pour le récepteur A2a a provoqué une augmentation de la pression artérielle chez ces animaux, ce qui constitue un argument expérimental en faveur d'un tonus vasodilatateur exercé par l'adénosine chez l'animal « sauvage ».

En conclusion

Nous avons confirmé que le récepteur A2a de l'adénosine est une cible biologique majeure de la caféine,

prouvant que ses effets stimulants sont la conséquence d'un blocage de ce récepteur. Nous avons par ailleurs découvert que l'adénosine exerçait un rôle dans des comportements complexes comme l'agressivité. Il est nécessaire maintenant d'évaluer précisément l'impact de la privation de récepteur dès la conception des souris transgéniques sur les fonctions physiologiques étudiées. Les souris déficientes en récepteurs A2a, ainsi que les souris chez lesquelles les récepteurs A1 et A3 auront été inactivés, représentent des outils intéressants pour l'évaluation du mode d'action de la caféine et des autres xanthines présentes dans le café et le thé et pour diverses innovations thérapeutiques.

J.M.-V.
M.Y.
J.C.
C.L.
M.P.

1. Richardson PJ. Blocking adenosine with antisense. *Nature* 1997; 385: 684-5.
2. Parmentier M, Libert F, Vassart G. La famille des récepteurs couplés aux protéines G et ses orphelins. *Med Sci* 1995; 11: 222-31.
3. Olah ME, Stiles GL. Adenosine receptor subtypes: characterization and therapeutic regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 581-606.
4. Ledent C, Parma J, Van Sande J, Vassart G. Génétique moléculaire des affections thyroïdiennes. *Med Sci* 1995; 11: 215-21.
5. Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaegen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M. Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997; 388: 674-8.
6. Schiffmann SN, Vanderhaegen JJ. Implications de l'adénosine dans les noyaux de la base : interactions avec le système dopaminergique. *Med Sci* 1995; 11: 169-76.
7. Snyder SH. Knockouts anxious for new therapy. *Nature* 1997; 388: 624.
8. Tecott LH, Barondes SH. Genes and aggressiveness. *Curr Biol* 1996; 6: 238-40.
9. Rimodini R, Ferré S, Ogren SO, Fuxe K. Adenosine A2a agonists: a potential new type of atypical antipsychotic. *Neuropsychopharmacology* 1997; 17: 82-91.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Câlins maternels et réponse au stress: les molécules témoignent d'une relation étroite!** Si ce n'était qu'une intuition, c'est devenu aujourd'hui un fait expérimental: plus le nouveau-né a bénéficié d'affection maternelle, mieux réagit-il au stress à l'âge adulte! Traduite en terme d'activité de l'axe hypothalamus-hypophyse-surrénale (axe HHS), la réponse au stress diminue: la sécrétion d'ACTH hypophysaire (appelée aussi corticotropine, elle stimule la synthèse et la libération des glucocorticoïdes par les glandes surrénales) est réduite, la libération de corticostérone surrénalienne moindre, et le rétrocontrôle négatif de cet axe est plus sensible aux glucocorticoïdes, comme en témoigne la diminution de synthèse de CRF

(*corticotropin releasing factor*) hypothalamique. La manipulation quotidienne (*handling*) des nouveau-nés a déjà été décrite, chez le rat, comme facteur modifiant l'activité de l'axe HHS en réponse au stress [1]. Aujourd'hui, c'est la composante affective qui apparaît déterminante dans cette plasticité neuroendocrinienne: la diminution de l'ACTH plasmatique et de la corticostérone libérée en réponse au stress est d'autant plus marquée que la fréquence et la qualité de l'interaction mère-nouveau-né (léchage et soins) sont importantes [2]. En outre, la sensibilité aux glucocorticoïdes du mécanisme de rétrocontrôle négatif est elle aussi quantitativement directement corrélée à l'intensité affective maternelle: des variations de

l'augmentation des ARNm codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes dans l'hippocampe, et de la baisse des ARNm codant pour le CRF dans l'hypothalamus sont détectées en fonction du comportement maternel. Chez le rat est ainsi confirmée la très grande plasticité de l'axe HHS lors de la réponse au stress, et, en particulier sa relation fonctionnelle étroite avec le témoignage affectif maternel reçu dans les premiers jours de la vie. La notion d'empreinte maternelle ne retrouve-t-elle pas alors son sens originel?

[1. Walker CD, *et al. Med Sci* 1997; 13: 509-18.]

[2. Liu D, *et al. Science* 1997; 277: 1659-62.]

Nous informons nos lecteurs que le livre de souvenirs de déportation de Jean-Claude Dreyfus, qui jusqu'au dernier jour de sa vie fut très impliqué dans notre revue *médecine/sciences*, vient de faire l'objet d'une réédition, préfacée par Axel Kahn. Les *Souvenirs lointains de Buchenwald et Dora* vous rappelleront la pudeur, l'intensité – et aussi l'humour – de Jean-Claude Dreyfus, disparu en mai 1995.

Son prix de vente est de 70 francs.
Pour toute commande, vous pouvez contacter:
– Madame Colette Dreyfus-Brisac, 30, rue Berthollet, 75005 Paris.
– Martine Lévy ☎ 01 45 05 17 05.

voir page 1446 de ce numéro.