

Rôle des récepteurs A2A de l'adénosine et CB1 des endocannabinoïdes dans les réponses comportementales et les neuroadaptations à l'alcool.

Par Mickaël Naassila

L'unité Inserm ERI 24 développe une recherche pluridisciplinaire associant la Faculté de Pharmacie et l'Unité Mobile d'Alcoolologie du Centre Hospitalier Universitaire Nord d'Amiens. Sa problématique de recherche concerne l'étude des bases neurobiologiques et génétiques de l'alcoolodépendance et de ses troubles associés. L'axe principal de recherche de cette équipe est l'étude de l'impact de la précocité d'exposition sur la vulnérabilité à développer l'alcoolodépendance et plus particulièrement pendant les périodes critiques du développement cérébral que sont les périodes *in utero* et de l'adolescence. L'équipe développe des modèles d'exposition précoce chez le rat pour mieux comprendre les bases neurobiologiques (neurochimiques et électrophysiologiques) impliquées dans la vulnérabilité aux drogues dont l'alcool. Un versant génétique est aussi abordé chez l'animal avec l'utilisation de souris mutantes nulles pour des récepteurs impliqués dans la neurotransmission et chez l'homme avec une étude de pharmacogénomique visant à identifier des mutations génétiques associées avec une meilleure réponse aux différents traitements ou une vulnérabilité à développer une hépatopathie.



L'addiction ou dépendance

L'addiction ou dépendance correspond à un état psychopathologique au cours duquel l'obtention, la prise répétée et l'impossibilité de s'abstenir représentent une perte de contrôle sur la prise de substances psychoactives à risque d'abus (substances d'abus, drogues); comportement qui se développe au détriment de nombreuses autres activités et malgré l'apparition de nombreux effets délétères sur la santé et l'équilibre social du sujet.

Les modèles animaux

Le développement de modèles animaux de la dépendance à l'alcool qui permet une interprétation des processus neuropharmacologiques impliqués dans cette pathologie, a donné des éléments de réponse pour la compréhension des mécanismes d'action et des circuits neuroanatomiques associés à l'action de l'alcool. Différents modèles animaux de consommation d'alcool et de souches sélectionnées génétiquement pour leur réponse comportementale à l'alcool ont été développés depuis longtemps. Comme pour d'autres pathologies, le modèle « parfait » est celui qui est aussi proche que possible de la pathologie humaine; ce qui est rarement le cas sauf pour les maladies monogéniques. Cependant, les modèles sont utilisés parce qu'ils représentent certains aspects de la pathologie et finalement, pour la dépendance à l'alcool, il est pratiquement nécessaire d'avoir recours à différents types de modèles en fonction des paramètres à étudier: consommation, sevrage, pathologies associées à la consommation d'alcool et/ou à son arrêt, influence de l'environnement, etc...

Des gènes et des traits physiologiques ou comportementaux (également appelés endophénotypes) ont été identifiés et semblent jouer un rôle important dans la prédiction du risque de développer l'alcoolodépendance. De nombreux modèles génétiques ont été développés chez le rongeur pour identifier les influences génétiques sur différents aspects de la pathologie dont les plus communément étudiés sont la sensibilité aux effets aigus de l'alcool, la tolérance observée après des administrations répétées, la consommation d'alcool et le sevrage. La consommation d'alcool et le sevrage qui sont deux traits clairement transposables en clinique, sont les phénotypes de choix dans les études de pharmacogénétique. Chacun de ces modèles présente des points forts et également des limitations. Ces modèles comprennent : les lignées consanguines (homozygotes et génétiquement identiques), les lignées consanguines recombinantes, les lignées sélectionnées (génétiquement) pour un phénotype particulier, les transgéniques (insertion d'un segment codant, le segment pouvant être introduit via un virus), les mutants nuls (ou «knockout»), les QTLs, les populations ségrégatives, les congéniques, la mutagenèse aléatoire,

l'administration d'oligodéoxynucléotides antisens ou d'ARN d'interférence et enfin le profilage d'expression génique.

Ces dernières années, un nombre impressionnant d'études a analysé l'effet de l'inactivation de l'expression d'un seul gène (knockout ou mutant nul) sur la consommation d'éthanol et / ou ses effets renforçants. Les gènes étudiés codent pour des neurotransmetteurs ou leurs récepteurs, des peptides, des enzymes, des protéines impliquées dans des voies de signalisation cellulaires. Ces études ont mis en évidence soit une augmentation soit une diminution de la consommation d'alcool et de l'alcoolopréférence et les effets de la mutation d'un seul gène a dans quelques cas été montré être dépendante du fond génétique ou du sexe.

Le système cérébral de la récompense

L'administration répétée de drogues crée un déséquilibre dans le système hédonique (ou de récompense), lequel produit une réorganisation de l'activité des circuits neuronaux. Ce système, ancien dans l'évolution des espèces, s'est progressivement mis en place pour récompenser des comportements indispensables à la survie, comme la recherche de nourriture, la reproduction ou les conduites de défense vis à vis des prédateurs. Quand ces conduites sont activées, ils procurent des sensations de plaisir (la "récompense") par la voie dopaminergique mésocorticolimbique, localisée dans l'aire tegmentale ventrale (VTA). Les phénomènes de dépendance sont associés à un accroissement de la libération de dopamine dans le Noyau Accumbens (NAc, striatum ventral). Cette libération de dopamine dans le NAc est commune à tous les agents et toutes les circonstances suscitant un sentiment de plaisir. En agissant directement sur le système de récompense du cerveau, les drogues génèreraient un signal de récompense puissant qu'aucun autre signal de récompenses naturelles (sexe, nourriture) ne pourrait égaler.

De nombreux travaux ont démontré que les effets renforçants des drogues, incluant l'éthanol, sont "médiés" par la voie dopaminergique mésocorticolimbique, constituée principalement par les neurones dopaminergiques de l'ATV qui se projettent dans le NAc. Les principales régions associées à ce circuit de la récompense sont l'ATV, le NAc, le septum, l'amygdale, l'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex préfrontal (voir Figure 1). Le NAc se trouvant véritablement au carrefour de ces différentes régions. Cette transmission dopaminergique est modulée par des afférences glutamatergiques (excitatrices) et GABAergiques (inhibitrices).

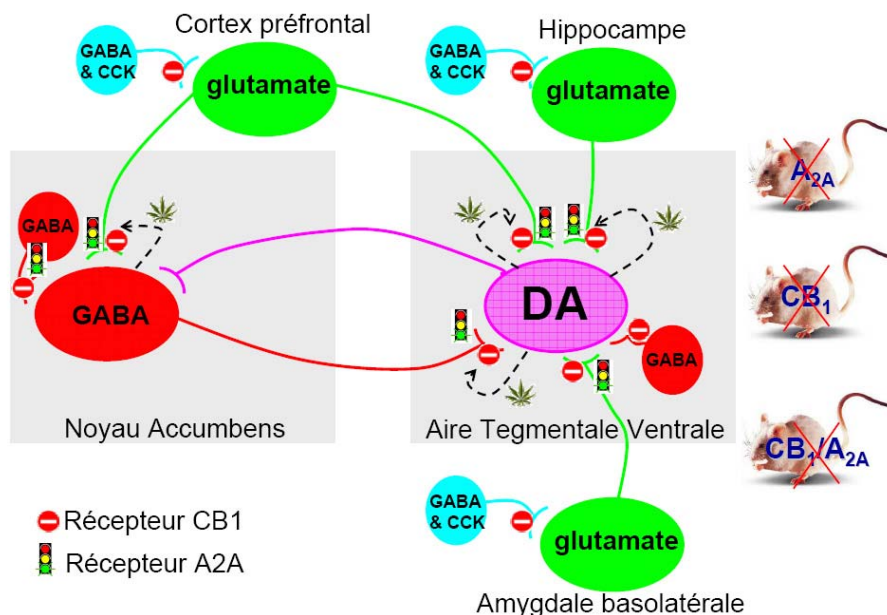


Figure 1: Sites d'action potentiels de l'adénosine et des endocannabinoïdes sur la modulation des effets récompensants des drogues. Les récepteurs A2A et CB1 sont localisés sur les terminaisons glutamatergiques et GABAergiques et modulent la libération de neurotransmetteurs par ces terminaisons. L'activation de ces récepteurs module la libération de glutamate et de GABA et module ainsi le tonus excitateur ou inhibiteur exercé sur la transmission dopaminergique par ces deux neurotransmetteurs.

Les endocannabinoïdes sont des modulateurs de la neurotransmission et agissent de manière rétrograde sur les neurones présynaptiques en activant les récepteurs CB1 couplés négativement à une adénylate cyclase (voir figure 2). La diminution de la production d'AMPc qui en découle a un effet inhibiteur sur la libération de neurotransmetteur. L'adénosine, un autre neuromodulateur, agit également entre autres, sur les neurones présynaptiques, mais à l'inverse des endocannabinoïdes, l'activation des récepteurs A2A entraîne une augmentation des taux d'AMPc et facilite ainsi la libération de neurotransmetteurs.

Les récepteurs A2A et CB1 occupent une place stratégique au sein de ce réseau neuronal constituant le système de récompense et joueraient donc un rôle important sur le tonus inhibiteur ou activateur contrôlant la transmission dopaminergique et donc les effets récompensants des drogues.

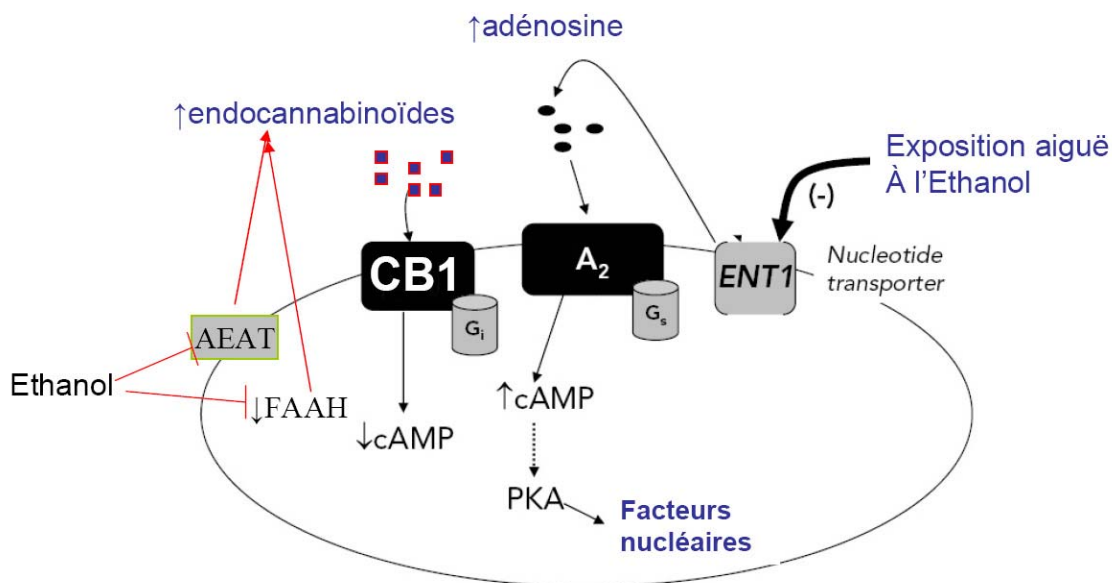


Figure 2 : Effet aigu et chronique de l'éthanol sur le système adénoenergique. L'exposition aiguë à l'éthanol inhibe le transporteur équilibrant de type 1 des nucléosides (ENT1) et augmente donc le taux extracellulaire d'adénosine qui active alors les récepteurs A1 et A2. L'augmentation du taux extracellulaire d'adénosine par l'éthanol entraîne une activation du récepteur A2 de l'adénosine, celle-ci induit une augmentation de la concentration en AMPc via une protéine $G_{s\alpha}$ qui active ensuite deux types de PKA I et II et la translocation de la PKA $C\alpha$ de type II dans le noyau, qui active au final l'expression génique dépendante de l'AMPc. Il existe une désensibilisation de l'effet inhibiteur de ENT1 après exposition chronique à l'éthanol.

Implication des récepteurs A2A de l'adénosine

Des données récentes ont montré l'implication de l'adénosine dans les effets cellulaires et comportementaux de l'éthanol. On sait depuis 20 ans que l'éthanol induit *in vitro* la production d'AMPc et que cette stimulation fait intervenir l'adénosine [1] (voir figure 2). Des expériences *in vitro* ont démontré que l'exposition aiguë à l'éthanol augmente le taux extracellulaire d'adénosine en inhibant de manière sélective le transporteur équilibrant de type 1 des nucléosides (ENT1) [2], alors que l'exposition chronique, quant à elle, diminue l'expression de ce transporteur et le rend moins sensible à l'inhibition par l'éthanol de sorte que l'éthanol n'augmente plus le taux d'adénosine extracellulaire (voir figure 2). Différents travaux ont déjà mis en évidence des similarités entre les actions du neurotransmetteur endogène que constitue l'adénosine et les effets aigus et à long terme de l'éthanol dans le SNC. Comme l'éthanol, les agents qui stimulent le récepteur A1 de l'adénosine sont sédatifs et ces récepteurs A1 pourraient également jouer un rôle dans les effets ataxiques de l'éthanol [3]. Des résultats récents, *in vitro*, suggèrent l'existence d'une synergie de l'activation de la PKA suite à l'activation des récepteurs D2 de la dopamine et A2 de l'adénosine qui sont co-localisés sur les neurones du NAc, par des doses faibles d'éthanol et d'agoniste dopaminergique D2 [4]. Les mêmes auteurs ont montré *in vivo*, que l'administration dans le NAc d'un peptide inhibiteur des dimères $\beta\gamma$ constituant la protéine G couplée au récepteur D2 ou A2, diminue la consommation d'alcool chez le rat.

Si les premières études comportementales sur l'implication des récepteurs de l'adénosine semblaient impliquer prioritairement le type A1, nous avons d'après les résultats obtenus *in vitro* voulu savoir si le

récepteur A2A pouvait lui aussi jouer un rôle dans l'auto-administration d'éthanol ainsi que dans les réponses comportementales à l'éthanol. Nous avons recherché chez les souris mutantes nulles pour ce récepteur (générées par le Dr Catherine Ledent à Bruxelles) si l'absence de récepteurs A2A influence la consommation, la sensibilité et le développement de la tolérance à l'éthanol.

Nos résultats [5] ont montré que les souris mutées qui n'expriment pas ce récepteur (A2A^{-/-}) présentent une plus forte appétence pour les boissons alcoolisées. Cette plus forte appétence est associée à une diminution de leur sensibilité aux effets récompensants de l'alcool mesurés dans le test de préférence de place conditionnée, ce qui indique que les souris A2A^{-/-} ont tendance à boire plus d'alcool pour atteindre le seuil de récompense qui est plus élevé [6]. Les résultats ont aussi démontré que cette plus forte consommation d'alcool est inversement corrélée à leur sensibilité aux effets négatifs de l'alcool (hypothermiques et hypnotiques) et n'est pas due à une modification du métabolisme de l'alcool ou du développement de la tolérance. Par contre, elles sont plus sensibles aux effets psychostimulants de l'alcool observés dans leur réponse à ses effets locomoteurs. D'autres expériences ont montré que l'absence de récepteurs A2A ne modifie pas la sensibilité des souris aux propriétés aversives de l'alcool mesurées dans le test d'aversion gustative conditionnée et ne modifie pas non plus le développement du phénomène de sensibilisation aux effets locomoteurs de l'alcool.

L'ensemble de ces résultats suggère que le récepteur A2A de l'adénosine pourrait jouer un rôle de frein sur l'auto-administration d'éthanol et semble confirmer que la sensibilité aux effets aigus de l'éthanol est inversement corrélée à la propension à consommer des boissons alcoolisées. Ce dernier point semble concorder avec les observations cliniques d'une moindre sensibilité initiale à l'éthanol dans les populations à risque. Des études pharmacologiques nous ont permis de montrer que la modulation pharmacologique de ces récepteurs A2A entraîne une diminution de la consommation d'alcool chez les souris qui présentent une forte propension à consommer des boissons alcoolisées.

Nous avons continué cette étude avec d'autres souris mutées, elles aussi pour le récepteur A2A de l'adénosine, mais générées dans un fond génétique C57BL/6J considéré comme « alcoolopréférant », pour voir si le phénotype est conservé quel que soit le fond génétique. De manière intéressante, la plus forte propension à consommer de l'éthanol n'est pas retrouvée dans le fond génétique C57BL/6J. Ces résultats obtenus dans le fond génétique C57BL/6J semblent indiquer un « effet plateau » où il paraît d'autant plus difficile d'observer une augmentation de la consommation et/ou de la préférence lorsque le niveau de base est élevé.

L'ensemble de ces données montre que le système adénergique et le récepteur A2A sont impliqués dans la consommation d'éthanol ainsi que dans la sensibilité aux effets comportementaux de l'éthanol et qu'il faut prendre en considération l'influence du phénomène d'épistasie.

Des études récentes ont également suggéré l'implication de ce récepteur dans la réponse comportementale à d'autres drogues tels que les psychostimulants, les opiacés et le THC.

Implication des récepteurs CB1 des endocannabinoïdes

Des travaux récents ont mis en évidence que le système endocannabinoïdique joue un rôle dans la plasticité synaptique et dans les processus d'adaptation impliqués dans l'addiction, non seulement au THC mais aussi à d'autres drogues dont l'éthanol.

Durant les quinze dernières années, la recherche dans le champ des cannabinoïdes a procuré de nombreuses avancées avec notamment l'identification d'un système de neurotransmission à part entière (clonage des récepteurs spécifiques des endocannabinoïdes et identification des ligands endogènes, transmission rétrograde avec une synthèse et une libération « à la demande ») et la synthèse de puissants agonistes et antagonistes. Une étude génétique chez l'homme a montré qu'un polymorphisme du gène *Cnr1*, codant pour le récepteur CB1, serait associé avec la sévérité de l'alcoolodépendance. Les données cliniques préliminaires et précliniques suggèrent que les antagonistes du récepteur CB1, tel que le SR141716A, pourraient constituer une nouvelle pharmacothérapie efficace dans le traitement de plusieurs pathologies comme l'obésité et l'addiction.

Nos études sur les souris mutées pour le récepteur CB1 des endocannabinoïdes ont montré que ces souris présentent un phénotype inverse de celui des souris A2A, c'est-à-dire une plus faible propension à consommer des boissons alcoolisées et une plus forte sensibilité aux effets négatifs de l'alcool (hypothermiques, sédatifs, hypolocomoteurs et sévérité du syndrome de sevrage à l'alcool) [7]. Ce n'est pas une diminution globale de sensibilité aux effets de l'alcool car les souris CB1^{-/-} ne présentent de modification de sensibilité aux effets anxiolytiques de l'alcool [8]. Cette diminution de la consommation est associée à une diminution de leur sensibilité aux effets récompensants de l'alcool [8].

Enfin, nous avons récemment évalué la participation des récepteurs CB1 dans les neuroadaptations des systèmes glutamatergiques et GABAergiques induites par l'exposition chronique à l'alcool [9]. En effet, l'alcool qui est un inhibiteur des récepteurs NMDA et activateur des récepteurs GABAA, lors d'une exposition aiguë, entraîne une adaptation inverse de ces deux récepteurs après une exposition chronique. La diminution du nombre et du fonctionnement des récepteurs NMDA et l'effet opposé sur le récepteur GABAA sont responsables de l'hyperexcitabilité neuronale qui est observée lors du sevrage à l'alcool. Nous avons donc quantifié les variations de ces deux récepteurs après une exposition chronique à l'alcool chez les souris n'exprimant pas le récepteur CB1. Nos résultats ont montré comme attendu chez les souris sauvages (exprimant le récepteur CB1) que l'exposition chronique à l'alcool augmente le nombre de récepteurs NMDA dans le cortex cérébral et l'hippocampe alors qu'aucune variation n'est observée chez les souris CB1^{-/-}. De la même manière, alors que l'exposition chronique à l'alcool diminue comme attendu le nombre de récepteurs GABAA dans le cortex cérébral, aucune variation n'est observée dans le cortex cérébral des souris mutées. Ces études de radioliation ont également mis en évidence une diminution du nombre de récepteurs NMDA et GABAA chez les souris mutées comparativement aux souris sauvages montrant ainsi une adaptation à la baisse du taux de ces récepteurs induite par l'absence de l'expression du récepteur CB1 pendant le développement des souris. Cette adaptation développementale est fonctionnelle puisque les souris mutées sont beaucoup plus sensibles aux effets hypothermiques de deux modulateurs allostériques positifs du récepteur GABAA que sont le diazépam et le pentobarbital. Les souris mutées sont aussi moins sensibles aux effets hyperlocomoteurs du MK-801 (dizocilpine) antagoniste non compétitif du récepteur NMDA. Cette différence de sensibilité au MK-801 se retrouve également après l'exposition chronique à l'alcool puisque l'augmentation de la sensibilité des souris sauvages aux effets locomoteurs du MK-801 après l'exposition chronique à l'alcool n'est pas retrouvée chez les souris mutées. Enfin nous avons recherché l'éventuelle modification d'expression de certaines sous unités composant ces deux récepteurs et nos résultats ont montré que les souris mutées présentent des modifications importantes des taux d'ARNm codant pour les sous unités NR1 et NR2B du récepteur NMDA et $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\gamma 2$ du récepteur GABAA.

Au final, les résultats obtenus sur les souris CB1^{-/-} indiquent que ce récepteur est impliqué dans les réponses comportementales à l'alcool et les neuroadaptations induites par l'exposition chronique à l'alcool. Ils font apparaître également le problème d'adaptations présentes chez les souris dont l'expression d'un gène a été invalidée tout au long de la vie. Deux des récepteurs qui ont été analysés et qui sont des cibles privilégiées de l'alcool sont modifiés chez les souris mutées et cette modification participe très probablement au phénotype observé dans la réponse à l'alcool. Nous avons déjà montré que le taux de récepteur D2 de la dopamine était augmenté dans le striatum des souris mutées [8] et cette élévation serait au moins en partie responsable de la faible appétence pour l'alcool.

Nous avons à l'issue de ce travail, initié une autre série d'expériences sur les souris double mutantes CB1/A2A ce qui de manière originale nous permettra d'analyser l'influence des deux systèmes sur les réponses comportementales à l'alcool.

La recherche sur l'alcool avec les modèles génétiques chez l'animal continue de progresser. Cette recherche chez l'animal a dépassé maintenant le niveau d'analyse d'un risque attribuable à des gènes anonymes pour se focaliser sur des gènes candidats spécifiques. Même si il semble clair que le génotype pour un seul gène est insuffisant pour prédire l'effet du gène sur un comportement aussi complexe que celui de l'alcoolodépendance, l'utilisation des souris knockout demeure importante parmi les premières étapes qui visent à identifier l'implication d'une protéine dans un comportement, ou ici la réponse à une drogue à mécanisme d'action complexe comme l'alcool. Ces études ont contribué à ouvrir de nouvelles pistes thérapeutiques et à envisager l'utilisation d'agents pharmacologiques ciblant les récepteurs CB1 et A2A dans le traitement de l'alcoolodépendance.

Contact : Mickaël Naassila (<mailto:mickael.naassila@u-picardie.fr>)

ERI 24 Inserm, [Groupe de Recherche sur l'Alcool et les Pharmacodépendances](http://www.u-picardie.fr/decouverte/sante/pagesliees/grap/accueilgrap.html) (GRAP), (<http://www.u-picardie.fr/decouverte/sante/pagesliees/grap/accueilgrap.html>)

Faculté de Pharmacie,

INSERM ERI 24 - GRAP, 1 rue des Louvels, France

Tél. : +33(0)322827758 / Fax: +33(0)322827672

L'équipe comprend des étudiants en master (2) et en doctorat ès sciences (7), ainsi que maîtres de conférence (MCU : 2), des professeurs d'université (PU : 3), un praticien hospitalier (PH) et un PU-PH.

Bibliographie

[1] Gordon AS, Collier K, Diamond I. Ethanol regulation of adenosine receptor-stimulated cAMP levels in a clonal neural cell line: an in vitro model of cellular tolerance to ethanol. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986 ;83, 2105–8.

[2] Nagy LE, Diamond I, Casso DJ, Franklin C, Gordon AS. Ethanol increases extracellular adenosine by inhibiting adenosine uptake via the nucleoside transporter. *J Biol Chem* 1990;265, 1946– 51.

[3] Meng ZH, Dar MS. Possible role of striatal adenosine in the modulation of acute ethanol-induced motor incoordination in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995 Aug;19(4):892-901. Meng ZH, Pennington SN, Dar MS. Rat striatal adenosinergic modulation of ethanol-induced motor impairment: possible role of striatal cyclic AMP. *Neuroscience.* 1998;85(3):919-30. Phan TA, Gray AM, Nyce JW. Intrastratial adenosine A1 receptor antisense oligodeoxynucleotide blocks ethanol-induced motor incoordination. *Eur J Pharmacol.* 1997;323(2-3):R5-7. Nyce JW. Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches. *Trends Pharmacol Sci.* 1999;20(2):79-83.

[4] Yao L, Arolfo, MP, Dohrman, DP, Jiang Z, Fan P, Fuchs S, Janak, PH, Gordon AS & Diamond I. Betagamma dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption. *Cell* 2002;109, 733– 43.

[5] Naassila M, Ledent C, Daoust M. Low ethanol sensitivity and increased ethanol consumption in mice lacking adenosine A2A receptors. *J Neurosci.* 2002;22(23):10487-93.

[6] Houchi H, Warnault V, Barbier E, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M and Naassila M. Altered behavioral responses to ethanol in mice lacking the adenosine A2A receptor. Article en préparation.

[7] Naassila M, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M. Decreased alcohol self-administration and increased alcohol sensitivity and withdrawal in CB1 receptor knockout mice. *Neuropharmacology.* 2004;46(2):243-53.

[8] Houchi H, Babovic D, Pierrefiche O, Ledent C, Daoust M, Naassila M. CB1 receptor knockout mice display reduced ethanol-induced conditioned place preference and increased striatal dopamine D2 receptors. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(2):339-49.

[9] Warnault V, Houchi H, Barbier E, Pierrefiche O, Vilpoux C, Ledent C, Daoust M, Naassila M. The lack of CB1 receptors prevents neuroadaptations of both NMDA and GABA(A) receptors after chronic ethanol exposure. *J Neurochem.* 2007, sous presse.