

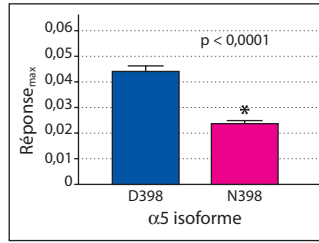
2.3.3. Conséquences fonctionnelles de la mutation SNP $\alpha 5$ sur les cellules

Certaines études se sont déjà employées à caractériser les conséquences fonctionnelles pour la cellule de cette mutation. Pour cela, on peut faire exprimer cette mutation sur différents types de cellules. Toutes les études s'accordent à montrer que cette mutation induit une perte de fonction partielle des récepteurs nicotiques. On a pu observer notamment, en présence de cette mutation, une diminution de la perméabilité au calcium (Figure 10), une augmentation de la désensibilisation induite par l'acétylcholine qui rend le récepteur dans un état qui n'est plus activable, ainsi qu'une diminution de l'amplitude des courants en présence de nicotine.

3 Influence de la mutation SNP $\alpha 5$ sur la dépendance nicotinique

Nous avons cherché à identifier les conséquences de cette mutation *in vivo*, donc sur des organismes entiers. La méthodologie consiste à étudier un certain nombre de processus dont on sait qu'ils sont associés au développement de la dépendance chez des souris transgéniques, qui sont dites « knockout » et qui ne contiennent plus le gène codant pour la protéine de la sous-unité nicotinique $\alpha 5$.

Une fois que l'on a identifié une altération de certains de ces processus associés à la dépendance chez ces souris, on va utiliser des vecteurs



lentiviraux⁹ (Figure 11) pour induire la réexpression de ce gène chez ces souris qui en sont dépourvues dans une région particulière du cerveau. On va ensuite évaluer les conséquences de la réexpression de ce gène, soit dans sa version sauvage, soit dans sa version mutée, sur ces processus associés à la dépendance.

Quand on s'intéresse à la dépendance aux drogues, plusieurs approches sont possibles et complémentaires. D'une part, on cherche à identifier la réponse de l'individu directement à la nicotine, par exemple sa sensibilité aux effets hédoniques de celle-ci mais également la sévérité du syndrome de sevrage. En parallèle, on essaye de voir si ces souris pourraient présenter certains traits comportementaux dont on sait qu'ils prédisposent à la dépendance avant toute exposition à la drogue. Il a été montré que c'est notamment le cas pour la recherche de nouveauté, le comportement impulsif, mais

9. Vecteur lentiviral : ce type de vecteur est dérivé d'un virus humain mais totalement sécurisé. Il est capable de modifier génétiquement des cellules au repos, ouvrant ainsi des possibilités de manipuler des neurones, des cellules hépatiques.

Figure 10

Diminution de la perméabilité au calcium dû à la mutation SNP $\alpha 5$.

Source : Bierut et coll. (2008).

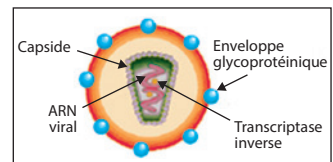


Figure 11

Un vecteur lentiviral, capable de modifier génétiquement des cellules au repos.

également pour la présence de certains troubles affectifs ou cognitifs.

3.1. Réexpression intracérébrale de récepteurs nicotiques

Nous avons développé il y a quelques années une méthodologie permettant de faire exprimer à nouveau des récepteurs nicotiques en utilisant des vecteurs lentiviraux dans des régions ciblées du cerveau de souris transgéniques n'exprimant plus ces récepteurs nicotiques (**Figure 12**). Pour cela, on utilise des virus dérivés du virus du sida que l'on a transformés et rendus inoffensifs. On insère la séquence du gène que l'on souhaite faire exprimer au sein de ces lentivirus, puis on injecte ces lentivirus par des techniques de microchirurgie dans une région localisée du cerveau de l'animal que l'on aura déterminée à l'avance. Cette technique permet d'induire la réexpression stable de récepteurs nicotiques fonctionnels *in vivo*.

On compare ensuite le comportement d'un groupe d'animaux qui aura reçu des lentivirus contenant la version sauvage du gène $\alpha 5$ avec un groupe d'animaux ayant reçu des lentivirus contenant la version mutée de ce gène qui représente la mutation identifiée comme associée au tabagisme chez l'homme.

3.2. Conséquences de la mutation SNP $\alpha 5$ sur les effets renforçants de la nicotine

L'objectif était de connaître les conséquences de l'expression de cette mutation sur le comportement de prises volontaires de nicotine chez ces souris, que l'on appelle également l'auto-administration intraveineuse de nicotine. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec l'Institut de neuroscience de Cagliari (Italie) et le Laboratoire de neurobiologie des processus adaptatifs dirigé par Philippe Faure (Paris VI).

Au cours de cette procédure, une souris est placée dans

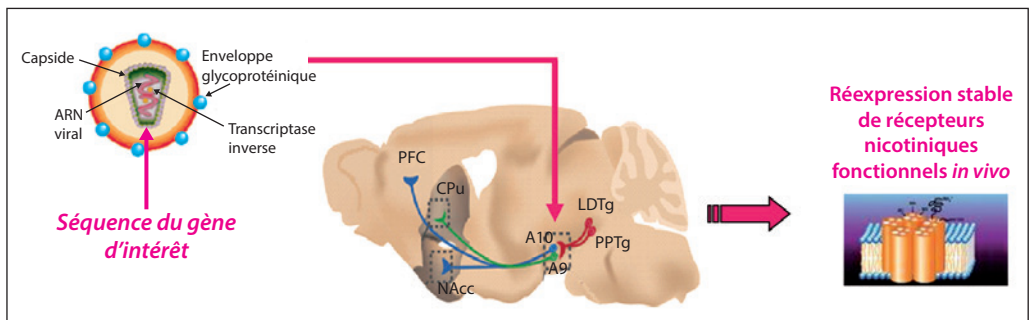


Figure 12

Injection des vecteurs lentiviraux sur un endroit spécifique du cerveau.

Source : Maskos et coll. (2005). *Nature*.

une boîte où elle a accès à un trou dans l'un des murs. Spontanément, la souris va aller placer son nez dans ce trou par comportement très fort d'exploration chez le rongeur. Au préalable, on aura inséré un cathéter dans la veine située sur la queue de la souris. Ce cathéter est lui-même relié à une seringue connectée à un poussoir connecté à un ordinateur. À chaque fois que l'animal va placer son nez dans ce trou, cela est détecté par l'ordinateur et le poussoir sur la seringue est enclenché, ce qui a pour conséquence que l'animal reçoit une dose contrôlée et précise de nicotine (**Figure 13**).

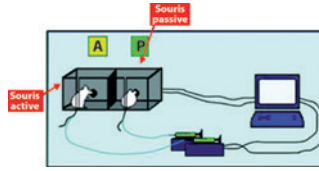


Figure 13

Schéma de l'expérience de prise volontaire de nicotine par auto-administration intraveineuse chez la souris.

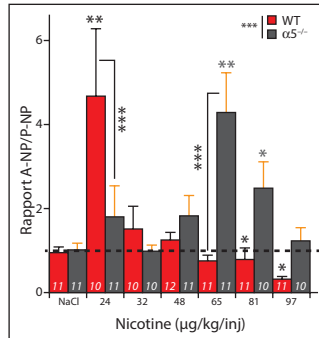


Figure 14

Auto-administration comparée de nicotine chez des souris ayant le gène $\alpha 5$ (en noir) et des souris dépourvues de ce gène (en rouge). A-NP = active nose-poke ; P-NP = passive nose poke.

Source : d'après Morel et coll. (2014). Molecular Psychiatry.

Cela peut également être réalisé avec d'autres drogues. On constate que si un animal est sensible aux effets hédoniques ou renforçants de nicotine, il augmente ce comportement consistant à mettre son nez dans ce trou.

Sur le graphe de la **Figure 14**, les souris sauvages contrôles sont représentées en rouge et les souris qui sont dépourvues du gène $\alpha 5$ sont représentées en noir. On voit que les souris contrôles vont présenter clairement un comportement d'auto-administration de nicotine à une dose particulière relativement faible. Par contre, les souris qui sont dépourvues du gène $\alpha 5$ vont nécessiter des doses beaucoup plus élevées de nicotine pour présenter ce même comportement d'auto-administration. Ces souris sont donc moins sensibles aux effets de la nicotine.

Par la suite, ces auteurs ont induit la réexpression du gène $\alpha 5$ soit dans sa version

sauvage, soit dans sa version mutée dans une région du cerveau qui s'appelle l'aire tegmentale ventrale (précédemment citée), qui est une structure majeure du circuit de la récompense.

On observe chez les souris transgéniques dépourvues de la sous-unité $\alpha 5$, chez qui la version sauvage du gène a été réexprimée dans cette région du cerveau, un comportement d'auto-administration aux doses de nicotine qui avaient été prouvées comme efficaces chez les souris contrôles. Par contre, quand c'est la version mutée du gène qui est exprimée, on observe qu'à nouveau les souris vont nécessiter de beaucoup plus fortes doses de nicotine pour présenter ce comportement d'auto-administration (**Figure 15**).

Il semble donc que cette mutation identifiée chez les fumeurs induise une perte de sensibilité aux effets hédoniques de la nicotine, en tout cas chez la souris.

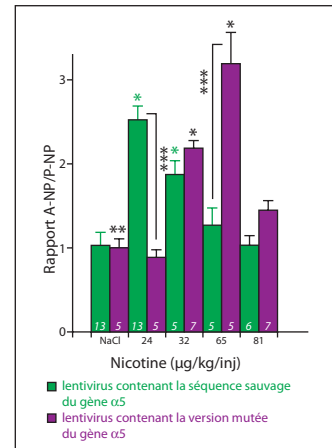


Figure 15

Auto-administration comparée de nicotine chez des souris avec la réexpression du gène $\alpha 5$ dans sa version sauvage (vert), et chez des souris avec la réexpression de ce gène dans sa version mutée (en violet).

Source : d'après Morel et coll. (2014). Molecular Psychiatry.

3.3. Effets de la mutation SNP $\alpha 5$ sur la dépendance à la nicotine

Cette mutation semble donc altérer la sensibilité à la nicotine, ce qui pourrait représenter une première explication à la prédisposition à une forte consommation de tabac. En même temps, il peut paraître un peu contre-intuitif qu'un individu qui est moins sensible aux effets hédoniques d'une drogue la consomme en fortes quantités.

On s'est donc demandé si cette mutation ne pourrait pas aussi entraîner des troubles (qui sont à déterminer) de type affectif ou cognitif, qui seraient d'une part exprimés et observables en amont de toute exposition à la nicotine et qui favoriseraient la consommation ultérieure de tabac lorsque l'individu serait exposé à cette drogue.

Il existe, nous l'avons dit, une forte association entre certains traits psychologiques, voire certaines conditions psychiatriques, et l'addiction, notamment au tabac. Des études cliniques et de plus en

plus d'études précliniques ont identifié certains de ces traits comme de véritables facteurs de prédisposition à l'addiction.

3.4. Conséquences de la mutation SNP $\alpha 5$ sur les facteurs de vulnérabilité à l'addiction

Chez l'animal, ces facteurs de prédisposition sont notamment une forte réactivité locomotrice en environnement nouveau, une forte recherche et préférence de nouveauté, et la manifestation de certains troubles affectifs ou cognitifs particuliers tels que des troubles d'anxiété.

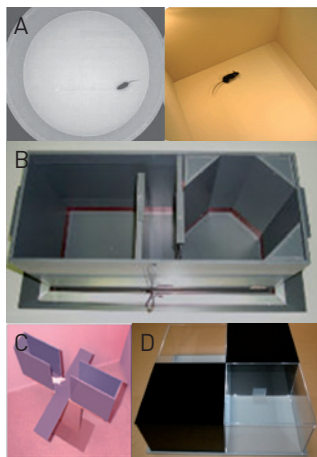
On peut modéliser ces comportements chez le rongeur en utilisant des tests comportementaux adaptés pour voir certains de ces facteurs de prédisposition chez des souris transgéniques. Un ensemble de tests permettant de modéliser ces paramètres comportementaux nous ont permis d'identifier deux phénotypes comportementaux chez ces souris (*Figure 16*).

D'une part, on n'a pas identifié de forte réactivité locomotrice à l'environnement, ni de forte préférence pour un environnement nouveau chez ces souris. Au contraire, on a plutôt observé, par rapport aux souris contrôles, une diminution du comportement exploratoire. Le nombre de redressements permettant la prise d'informations de l'environnement est diminué chez les souris dépourvues de la sous-unité $\alpha 5$.

Le deuxième phénotype étudié est le phénotype de forte anxiété. On utilise pour cela

Figure 16

Montage pour étude comportementale de la souris.
 A) Test de la réactivité locomotrice de la souris dans un environnement nouveau ; B) labyrinthe destiné à tester la capacité de recherche de la souris et sa préférence de nouveauté ; C) labyrinthe en croix surélevé permettant de détecter des troubles affectifs/cognitifs chez la souris ; D) boîte claire/obscur permettant de détecter des troubles affectifs/cognitifs chez la souris.



différents tests sur le rongeur qui sont basés sur le conflit entre la très forte envie pour le rongeur d'explorer un environnement nouveau et la peur que va générer la présence de certains compartiments de l'espace anxiogène.

Dans cet objectif, on utilise ce qu'on appelle un labyrinthe en croix surélevé (voir la *Figure 16C*). Il s'agit d'un labyrinthe surélevé d'environ un mètre par rapport au sol qui possède deux bras fermés possédant des enceintes qui sont rassurantes par rapport à la luminosité et au vide pour l'animal, et deux bras ouverts qui représentent un environnement ressenti comme plus dangereux par l'animal. Mais celui-ci va néanmoins avoir envie d'aller les explorer. Il a été montré que plus un animal est anxieux, moins il passe de temps dans ces bras ouverts. Dans ce test, on a observé que les souris dépourvues du gène $\alpha 5$ passent significativement moins de temps dans ces bras ouverts que les souris contrôles, ce qui suggère une forte anxiété chez ces animaux.

Un deuxième test a été utilisé pour vérifier cette interprétation : le test de la boîte claire/obscur (Figure 16D). Dans ce test, l'animal peut explorer librement une boîte à deux compartiments. L'un des compartiments est très sombre et va représenter un environnement plutôt rassurant pour l'animal. L'autre compartiment va être extrêmement éclairé donc plus anxiogène pour l'animal. Encore une fois, on constate que les souris dépourvues du gène $\alpha 5$ vont

passer beaucoup moins de temps dans le compartiment très illuminé que les souris contrôles.

Ces deux tests mettent en évidence **un phénotype de forte anxiété chez les animaux dépourvus du gène $\alpha 5$** .

La conclusion de ces premières expériences est que les souris dépourvues de la sous-unité $\alpha 5$ ne présentent pas de forte réactivité locomotrice ou de forte préférence pour la nouveauté qui sont pourtant des facteurs de prédisposition à la prise de drogue, et notamment à la nicotine. Par contre, on observe chez ces souris des troubles que l'on pourrait qualifier de motivationnels et émotionnels tels qu'une diminution de l'exploration et une très forte anxiété. De tels troubles chez l'homme, c'est notamment le cas des troubles anxieux, sont également susceptibles de prédisposer à l'addiction, notamment à la nicotine, selon une forme d'automédication.

3.5. Conséquences de la mutation SNP $\alpha 5$ sur le cerveau

L'étape suivante a été de rechercher les régions cérébrales impliquées dans ces phénotypes et quelle serait la conséquence de l'expression de la mutation identifiée chez les fumeurs dans ces régions cérébrales.

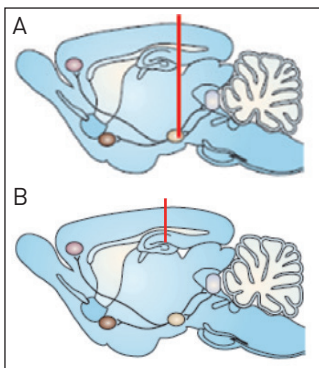


Figure 17

Expression du gène SNP $\alpha 5$ dans l'aire tegmentale ventrale (A) et dans l'hippocampe (B).

On a réalisé toute une série d'expériences au cours desquelles on a induit la réexpression du gène de la sous-unité $\alpha 5$ dans sa version sauvage ou mutée dans l'aire tegmentale ventrale du système de récompense. Cette région cérébrale a été choisie parce qu'il avait été précédemment montré que la présence des récepteurs nicotiques dans cette région du cerveau est impliquée dans la modulation du comportement d'exploration chez la souris.

Lorsque l'on remet ce gène $\alpha 5$ dans l'aire tegmentale ventrale de ces souris, on parvient à restaurer des niveaux d'exploration similaires à ceux des souris contrôles. Par contre, de façon frappante, lorsqu'on induit l'expression de la version mutée du gène, on n'observe pas cette restauration de l'exploration, ce qui suggère que la présence de cette mutation dans cette région entraîne un phénotype similaire à l'absence de ce gène.

Par contre, lorsqu'on a regardé les tests sur les niveaux d'anxiété, on voit que la réexpression de ce gène au sein de cette structure précise du cerveau n'affecte pas les niveaux d'anxiété chez ces souris qui restent très anxieuses par rapport aux souris contrôles.

Ces résultats montrent que les récepteurs nicotiques qui contiennent la sous-unité $\alpha 5$ de l'aire tegmentale ventrale (Figure 17A) semblent impliqués dans le comportement exploratoire mais pas dans le traitement de

l'anxiété et que la présence de la mutation dans cette aire cérébrale confère une diminution du comportement exploratoire.

Pour trouver les régions cérébrales impliquées dans le phénotype d'anxiété chez ces souris, on s'est d'abord intéressé à une autre région du cerveau, l'hippocampe (Figure 17B), qui est bien caractérisée par son implication dans la mémoire. Mais il a également été montré que cette structure est particulièrement impliquée dans les effets de la nicotine sur les processus d'anxiété.

Cela a conduit à une deuxième série d'expériences où l'on a cette fois induit la réexpression du gène $\alpha 5$ au niveau de l'hippocampe. On a pu observer que, contrairement aux expériences de réexpression dans l'aire tegmentale ventrale, on n'observait pas de modification du comportement exploratoire chez ces souris après réexpression de ce gène dans l'hippocampe.

En revanche, lorsqu'on s'intéresse à l'anxiété, on a pu observer une restauration partielle des niveaux d'anxiété chez les souris chez qui on a induit la réexpression de la version sauvage de ce gène $\alpha 5$. Mais encore une fois, lorsque l'on induit la réexpression de la version mutée du gène, on se retrouve avec un phénotype qui ressemble à celui des souris dépourvues du gène $\alpha 5$, à savoir ici de forts niveaux d'anxiété.

Cette seconde série de tests montre que les récepteurs

nicotiniques qui contiennent cette sous-unité $\alpha 5$ au sein de l'hippocampe semblent cette fois impliqués dans le traitement de l'anxiété mais pas dans le comportement exploratoire. Encore une fois, la présence de la mutation de ce gène dans l'hippocampe confère une augmentation des niveaux d'anxiété.

En définitive, les souris dépourvues du gène $\alpha 5$ présentent une perte de sensibilité aux effets de la nicotine, des déficits exploratoires et de forts niveaux d'anxiété. Les expériences des expressions localisées de la mutation suggèrent que la présence de cette mutation entraîne une perte de fonction du récepteur cette fois *in vivo* conférant un phénotype similaire aux souris qui sont dépourvues de ce gène.

On peut donc émettre une toute première hypothèse selon laquelle les individus qui seraient porteurs de cette mutation pourraient présenter de forts taux de tabagisme par un processus d'auto-médication afin de soulager certains troubles motivationnels ou affectifs qui restent bien évidemment à être déterminés chez l'homme.

3.6. Effets de la nicotine sur les phénotypes comportementaux observés chez les souris dépourvues du gène $\alpha 5$

En guise de premier test de cette hypothèse, les souris

ont été soumises à différents traitements à la nicotine afin de voir si ceux-ci pouvaient améliorer les déficits observés chez ces animaux.

Tout d'abord, en ce qui concerne le comportement exploratoire, nous avons observé que l'administration de fortes doses de nicotine chez les souris contrôles entraîne des déficits de ce comportement exploratoire. Elles explorent beaucoup moins l'environnement et se mettent à ressembler aux souris qui sont dépourvues du gène $\alpha 5$. Par contre, chez les souris dépourvues du gène $\alpha 5$, qui sont constitutivement dans un déficit d'exploration de l'environnement, une certaine dose de nicotine parvient à restaurer des niveaux contrôles de ce comportement exploratoire. On observe donc des effets opposés de la nicotine entre les souris contrôles et les souris dépourvues de ce gène $\alpha 5$.

En ce qui concerne l'anxiété, on a observé que l'exposition à de fortes doses de nicotine entraîne une augmentation très forte de l'anxiété chez les souris contrôles, ce qui était déjà bien caractérisé dans la littérature. En revanche, chez les souris dépourvues du gène $\alpha 5$, on a observé de façon plus nette, dans l'un des deux tests utilisés, une restauration des niveaux d'anxiété contrôles donc similaire à celle observée chez les souris contrôles. Donc encore une fois, on observe des effets opposés d'une exposition à la nicotine entre les souris contrôles et les souris dépourvues de ce gène.

La mutation du gène $\alpha 5$ et l'addiction à la nicotine

On a donc pu montrer que des souris dépourvues du gène nicotine $\alpha 5$ présentent une perte de sensibilité aux effets de la nicotine. Ces souris présentent également des troubles motivationnels, émotionnels, tels qu'une perte de comportement exploratoire que l'on a vu comme dépendant de l'aire tegmentale ventrale et une augmentation de l'anxiété qui, elle, dépend au moins en partie de l'hippocampe. L'expression de la mutation sur le gène $\alpha 5$, qui a été identifiée chez les fumeurs dans ces régions cérébrales, induit un phénotype de type souris « knockout », ce qui suggère que cette mutation entraîne une perte de fonction des récepteurs *in vivo*. L'exposition à de fortes doses de nicotine, qui induit des déficits chez les souris contrôles, soulage au contraire les troubles observés chez les souris dépourvues de ce gène. Par ailleurs, on a également identifié chez ces animaux des altérations dans les neurotransmissions dopaminergiques et sérotoninergiques, notamment en réponse à la nicotine, qui corrélerent avec les résultats comportementaux présentés.

Ainsi l'ensemble de ces données conduit à suggérer que les individus porteurs de cette mutation pourraient présenter de forts taux de tabagisme, d'une part parce qu'ils sont moins sensibles aux effets hédoniques de la nicotine, et d'autre part parce qu'ils pourraient présenter certains troubles qui les prédisposeraient à l'addiction selon un processus d'automédication pour soulager ces troubles par la prise de fortes doses de nicotine.

Évidemment, cette analyse doit maintenant être vérifiée chez l'homme, et pour cela, on a développé des collaborations avec des psychiatres afin d'avoir accès à des cohortes de fumeurs présentant d'autres types de pathologies, afin

de voir s'il est possible de retrouver ces phénotypes chez l'homme.

L'ensemble de ces résultats, dans les années à venir, devrait permettre de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques, peut-être plus personnalisées, d'aide à l'arrêt du tabac.