

Effet à long terme d'injections intracérébroventriculaires d'anticorps dopaminergiques sur l'hypersensibilité comportementale chez la souris

Oulaya MRABET¹✧, Claude MESSIER², Mohammed Khaled CHOULLI¹,
Claude DESTRADE² & Michel GEFFARD³

(Reçu le 08/09/1994 ; Accepté le 10/11/1994)

فعل لحقن داخل الدماغ لمضادات حيوية ضد الدوبامين

حقن مكررة داخل بطين الدماغ لمضادات حيوية أحادية الميل ضد الدوبامين المقترنة عند فرنان بالب/س تسبب ، خلال 8 أسابيع بعد انتهاء التحقن ، فرطاً في حساسية السلوك. التحليل الإمينو هيسكو كيميائي يبين أن هذا الفرط في الحساسية غير راجع إلى ضياع في خلايا الدوبامين داخل المادة السوداء أو داخل الباحة التيكومونتال البطنية.

الكلمات المفتاحية : مضادات حيوية ضد الدوبامين - حقن مخية بطنية - فرط في حساسية السلوك.

Effet à long terme d'injections intracérébroventriculaires d'anticorps dopaminergiques sur l'hypersensibilité comportementale chez la souris

Des injections intracérébroventriculaires répétées de l'anticorps monoclonal anti-dopamine conjuguée (ACm anti-DAc) chez des souris Balb/c entraînent, pendant 8 semaines après la fin des injections, une hypersensibilité comportementale. L'analyse immunohistochimique montre que cette hypersensibilité ne semble pas liée directement à une perte des cellules DA dans la substance noire et dans l'aire tegmentale ventrale.

Mots clés: Anticorps dopaminergiques- Injections intracérébroventriculaires- Hypersensibilité comportementale- Souris

Effect of repeated Intracerebroventricular injections of conjugated dopamine antibodies on behavioural supersensitivity in mice

In the present study the effect of repeated intracerebroventricular (ICV) of anti-conjugated dopamine antibodies (Acm anti-DAc) was investigated on behavioural supersensitivity and eating behavior. Mice were injected in ICV (with an ICV cannula) with either Acm anti-DAc or no immuns immunoglobulins (IgNI) twice a week for 5 weeks, their behavioural supersensitivity to apomorphine (0.05 mg/kg) were measured. The results showed that Repeated intracerebroventricular injections of anti conjugated dopamine antibodies produced a behavioural supersensitivity to apomorphine. Immunohistochemical analysis showed that the behavioural supersensitivity is not due to DA cell losses in the substantia nigra or the ventral tegmentum area.

Key words: Dopaminergic antibodies-Intracerebroventricular injections-Behavioural supersensitivity - Mice

¹ Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc

² Laboratoire de Neurosciences Comportementale et Cognitives, URA-CNRS 339, Université de Bordeaux I, Avenue des Facultés 33405 Talence cedex, France

³ Laboratoire d'Immunologie et Pathologie, Bat 1B, BP 66, Rue Léo Saignat, 33076 Université de Bordeaux II, Bordeaux cedex France

✧ Auteur correspondant

INTRODUCTION

De nombreux travaux ont montré des modifications comportementales résultant de l'injection intracérébrale de différents anticorps idiotypiques et anti-idiotypiques spécifiques dirigés contre des antigènes cérébraux. Ainsi, Tarrab-Hazdi & Edery (1980) ont montré que l'injection intracérébroventriculaire (ICV) d'anticorps dirigés contre le récepteur nicotinique de l'acétylcholine induit une adipsie et une aphasie. Par ailleurs, il a été montré, chez le rat, que l'injection de sérum anti-insuline, dans le ventricule latéral, entraîne une hyperglycémie, une diminution de la prise alimentaire (associée à une perte de poids corporel) et une réduction de la durée du sommeil lent (Danguir *et al.*, 1984). Ces auteurs ont également observé une perturbation du sommeil paradoxal induit par le carbachol, à la suite de l'injection de sérum anti-somatostatine dans le noyau du tractus solitaire.

Plusieurs travaux font état de perturbations amnésiques consécutives à l'injection de sérum anti-arginine-vasopressine dans le ventricule ou l'hippocampe dorsal, chez le rat (Kovacs *et al.*, 1982) ou de sérum anti-vasopressine dans le ventricule chez la souris (Leccese & Isenhour 1983). Par contre, Martinez *et al.* (1985) ont observé une facilitation de l'acquisition après administration de sérum anti-(Leu) Enkephaline. Nous avons préalablement montré que l'injection d'anticorps anti-idiotypes de la dopamine conjuguée dans les noyaux accumbens ou caudé médio-dorsal induisait un comportement de rotation (Mrabet *et al.*, 1991). Des lésions immunologiques spécifiques des neurones noradrénergiques ont été observées à la suite de l'injection intra-ventriculaire d'anticorps anti-dopamine β -hydroxylase (Costa *et al.* 1979).

Le but de ce travail est d'aborder les éventuelles modifications comportementales et histologiques liées à la transmission dopaminergique après administration chronique des anticorps anti-dopamine conjuguée.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Des souris mâles de la lignée BALB/c ont été utilisées. Un guide canule de 8 mm de longueur (diamètre externe : 0,45 mm; diamètre interne : 0,25 mm) est placé unilatéralement à demeure à 0,5 mm au-dessus du ventricule latéral. Les coordonnées stéréotaxiques d'après Lehman (1974)

sont déterminées en prenant le bregma comme point de référence ; pour les coordonnées antéro-postérieures (0,0 mm) et latérale (1,0 mm) et le point de trépanation pour la coordonnée verticale (-2,1 mm). Les injections intracérébroventriculaires (ICV) sont effectuées au moyen d'une canule de 8,5 mm de long qui coulisse dans le guide canule. La longueur de la canule, supérieure de 0,5 mm à celle du guide, permet d'atteindre le ventricule latéral dans lequel est effectuée l'injection.

1. Protocole expérimental

• Injections ICV

Dans un premier temps, les animaux reçoivent des injections ICV répétées soit de l'anticorps monoclonal anti-dopamine conjuguée (ACm anti-DAc, n= 10), soit des immunoglobulines non immunes (IgNI, n= 5), à raison de 2 injections par semaine, pendant 5 semaines. Le volume injecté à chaque fois est de 2 ml (1mg/ml). La production et la purification des ACm anti-DAc et des IgNI ont été décrites par Chagnaud *et al.* (1987) et Mons *et al.* (1987).

• Contrôle du poids corporel et du comportement alimentaire

Le poids corporel et le comportement alimentaire des animaux ont été contrôlés. Ainsi, les souris sont pesées régulièrement avant chaque injection ICV et leur poids est comparé à leur poids de départ, mesuré dans les jours qui précèdent la 1ère injection ICV (moyenne de 3 pesées successives). Le comportement alimentaire est évalué par la façon dont les animaux dispersent et émiettent les biscuits de nourriture dans leur cage.

• Mesure de l'hypersensibilité comportementale consécutive à l'injection d'apomorphine

Une semaine après la dixième et dernière injection ICV d'ACm anti-DAc ou d'IgNI, l'activité déambulatoire des animaux a été mesurée. Après une injection intrapéritonéale d'apomorphine (0,05 mg/kg, Sigma), les souris sont placées dans des allées circulaires et leur activité locomotrice est mesurée pendant une heure. Le même protocole est répété ensuite à différentes périodes (3, 6, 8 et 12 semaines) après la dernière injection ICV d'anticorps ou d'IgNI.

• Étude histologique des cerveaux par immuno-histochimie de la dopamine (DA)

L'étude a été effectuée sur les cerveaux de 4 animaux ayant reçu les injections ICV d'ACm anti-

DAC et de 3 animaux ayant reçu les IgNI. Un mois après la dernière mesure de l'activité locomotrice, l'immunohistochimie de la DA a été réalisée selon la méthode décrite par Geffard *et al.* (1984). Brièvement, les souris sont perfusées. Les cerveaux sont ensuite prélevés. Des coupes frontales (40 μ m) sont réalisées à l'aide d'un vibratome (Lancer, USA). La technique de révélation utilisée est celle de la peroxydase anti-péroxydase ou PAP d'après Sternberger *et al.* (1970). Les coupes sont incubées dans l'anticorps monoclonal anti-DA conjuguée (dilué au 1/5000e). Après rinçage, les coupes sont transférées dans l'anticorps secondaire (lapin anti-souris, DAKO) dilué au 1/100e. Les coupes sont alors incubées en présence du complexe PAP souris dilué au 1/5000e, pendant 1 heure à 37°C. Finalement, l'activité peroxydasique est révélée par addition d'H₂O₂ (Merck, 0,04%) et de la 3,3' diaminobenzidine (DAB, Sigma)(0,025%).

• **Mesure du nombre et de la surface des cellules DA immunoréactives**

Le nombre et la surface des cellules immunoréactives, ont été mesuré par un analyseur d'images BIOCROM 200 (Biocom, Les Ulis, France).

Pour chaque animal, les sections frontales du cerveau situées à 2,6 mm en arrière du bregma (Lehman, 1974) ont été soigneusement choisies. Sur ces coupes de tissu, le nombre des cellules ayant une immunoréactivité DA (DA-positives) a été compté dans l'aire tegmentale ventrale (ATV) et dans la substance noire (SN). Sur la même section, la surface de cellules immunoréactives a été mesurée sur les cellules possédant des noyaux bien délimités. Ces mesures ont été effectuées sur 2 régions de la substance noire et 4 régions de l'aire tegmentale ventrale (de 267 à 197 μ m)

RÉSULTATS

1. Évolution du poids corporel

L'analyse de variance ne montre aucune différence significative entre les deux groupes ($F(1,13)= 0,1$; n.s.). La figure 1 montre que les animaux des 2 groupes perdent approximativement 1 à 5% de leur poids post-opératoire pendant les 5 semaines qui suivent les injections ICV. Ils récupèrent ensuite leur poids de base (6-7 semaines). Leur poids s'accroît alors régulièrement.

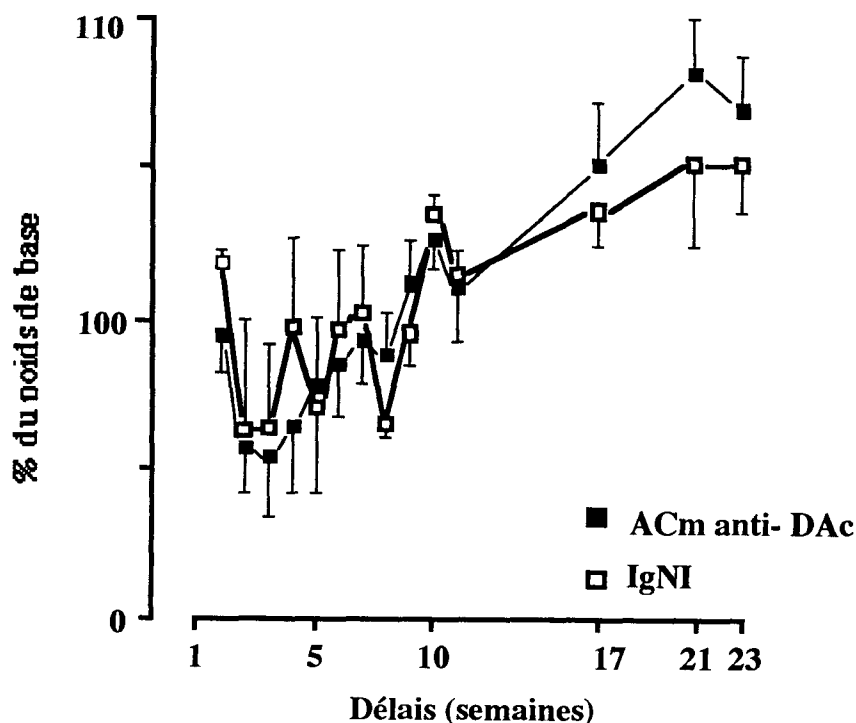


Figure 1. Évolution du poids corporel (valeurs moyennes et erreur standard de la moyenne (e. s. m.)) exprimé en pourcentage du poids de départ à différentes périodes (en semaines) après la 1ère injection de l'ACm anti-DAC

2. Comportement alimentaire

Les animaux ayant reçu les injections ICV d'ACm anti-DAC ont montré les signes d'un comportement alimentaire particulier débutant entre les 2ème et 4ème semaines qui suivent la fin des injections ICV, alors que les animaux IgNI ont un comportement identique à celui des témoins (qui consiste à rassembler les biscuits dans un coin de la cage et à terminer un biscuit avant d'entamer un autre). Les animaux ACm anti-DAC émiettent tous les biscuits disponibles (12 par semaine) et les dispersent dans toute la cage. Ce comportement a persisté jusqu'à la fin de l'expérience.

3. Activité déambulatoire

L'analyse de variance montre qu'il existe une différence globale entre les groupes ($F(1,13) = 5,764$; $P = 0,032$) et entre les séances ($F(5,65) = 5,192$; $P = 0,0005$).

Du fait de l'existence d'une interaction entre groupes et séances ($F(5,65) = 2,45$; $P = 0,0435$), des analyses par le test des effets simples ont été effectuées. Les résultats montrent une différence significative entre les groupes pour les 1ère ($F(1,54) = 8,777$; $P = 0,005$), 3ème ($F(1,54) = 4,48$; $p = 0,039$) et 6ème semaines après la dernière injection ICV ($F(1,54) = 7,59$; $P = 0,008$) (Figure 2).

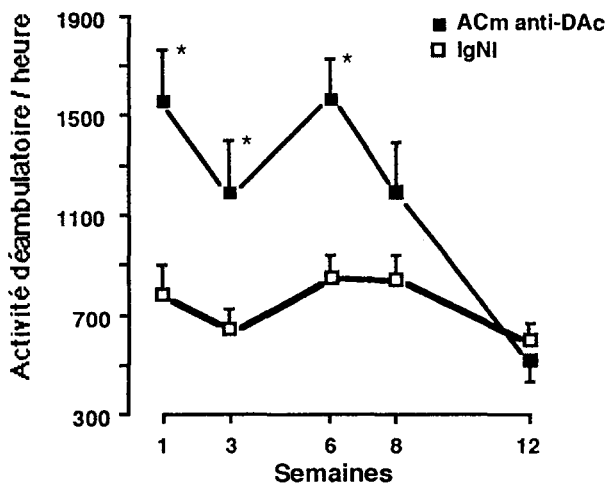


Figure 2. Évolution de l'activité déambulatoire au cours des 12 semaines qui suivent la 10ème injection ICV d'IgNI ou d'ACm anti-DAC

Par contre, aucune différence significative intergroupe n'est mise en évidence pour les 8ème et 12ème semaines.

Par ailleurs, pour le groupe traité avec l'ACm anti-DAC, l'existence d'une interaction entre l'activité locomotrice et les séances successives ($F(5,65) = 10,76$; $P < 0,001$) indique une diminution significative des performances au cours des 12 semaines. Ce phénomène n'existe pas pour le groupe traité à l'aide des IgNI ($F(5,65) = 0,34$; n.s.).

4. Mesure du nombre et de la surface des cellules DA immunoréactives

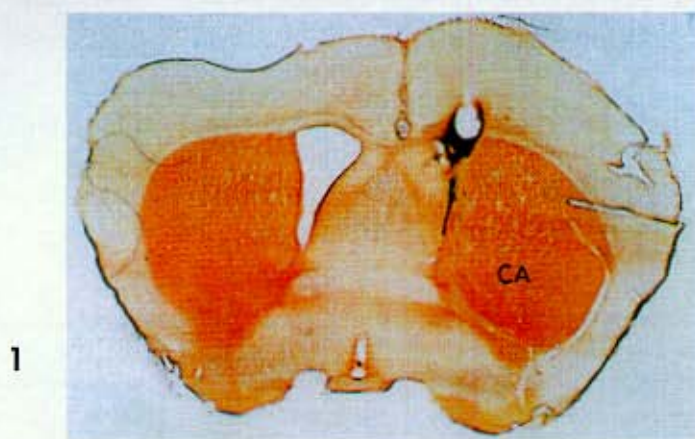
L'analyse de variance à 2 facteurs (groupes versus côté ipsi ou controlatéral au site d'injection) montre qu'il n'existe aucune différence significative entre les 2 groupes en ce qui concerne le nombre total moyen des cellules DA positives et le nombre moyen des cellules retenues (Tableau 1 et Figure 3) pour les mesures des surfaces cellulaires dans la substance noire (SN) ou dans l'aire tegmentale ventrale (ATV).

On observe, cependant, que le nombre des neurones DA positifs a tendance à être plus faible dans la substance noire des cerveaux d'animaux traités avec l'ACm anti-DAC, alors que ceci n'est pas observé dans l'aire tegmentale ventrale. Par contre, les animaux traités avec l'ACm anti-DAC présentent une surface moyenne plus petite (mais non significative) dans l'aire tegmentale ventrale ipsilatérale au site d'injection.

Tableau 1. Évaluation des cellules DA positives

	ATV		SN	
	ipsi	contro	ipsi	contro
N.t.c.*				
ACm anti-DAC	248,8±21,6	282,5±18,1	117,3±11,6	122,8±20,0
IgNI	260,7±28,0	266,7±16,8	148,3±13,9	157,0±73,2
N.m.c.r.*				
ACm anti-DAC	82,3± 4,0	94,5± 6,8	42,8± 2,0	50,5±4,4
IgNI	87,0± 5,9	97,7± 2,7	50,0± 3,1	60,7±5,6
S.m.c.r.*				
ACm anti-DAC	109,8± 2,2	120,2± 2,4	113,2± 3,0	112,3±3,0
IgNI	124,6± 2,7	120,2± 2,6	113,9± 3,9	113,0±3,0

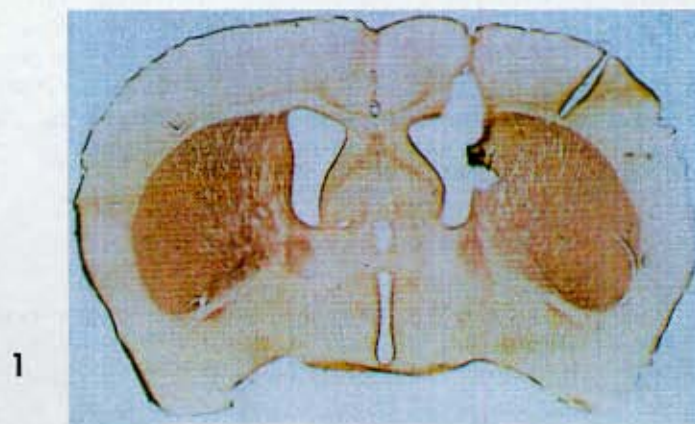
N.t.c. : Nombre total de cellules ; N;m.c.r. : moyen de cellules retenues ; S.m.c.r. : Surface moyenne des cellules retenues

A

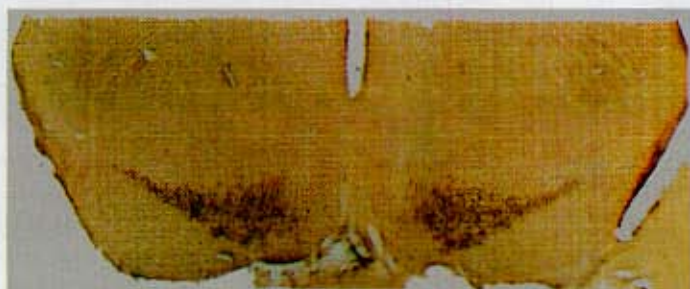
1



2

B

1



2

Figure 2. Immunoréactivité de cellules DA dans le noyau caudé (CA) (1), dans la substance noire (SN) et dans l'air tegmentale ventrale (ATV) (2) pour une souris soumise à l'injection d'ACm anti-DAc (A) et pour une souris témoin ayant reçu les IgNI (B)

À l'inverse, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne la surface moyenne des cellules DA-positives dans la substance noire des deux groupes.

DISCUSSION

Les injections ICV répétées d'ACm anti-DAC entraînent, pendant 8 semaines après la fin des injections, une augmentation significative de l'activité comportementale induite par l'apomorphine à une dose (0,05 mg/kg) normalement inefficace sur des animaux témoins (Staunton *et al.*, 1982), ou dans le cas présent, sur des animaux ayant reçu des injections ICV répétées d'Ig NI.

L'hyperactivité locomotrice, induite chez les souris ACm anti-DAC par une faible dose d'apomorphine, est similaire à celle observée chez des rats après lésion par la 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) de la substance noire, de l'aire tegmentale ventrale et du faisceau médian du télencéphale (FMT) (Ungerstedt, 1971) ou des noyaux caudé et accumbens (Kelly *et al.*, 1975). Elle est généralement attribuée à une hypersensibilité fonctionnelle du système dopaminergique, consécutive à une dénervation présynaptique (Staunton *et al.*, 1982).

En nous appuyant sur ces travaux, on suggère donc que l'hyperactivité temporaire induite par l'apomorphine sur les souris ACm anti-DAC pourrait dépendre du développement d'une hypersensibilité fonctionnelle du système dopaminergique central.

Cette hypothèse est renforcée par le fait que les perturbations du comportement alimentaire mises en évidence chez les souris ACm anti-DAC (émiettement de la nourriture) sont à rapprocher de celles observées chez le rat après lésion de la région tegmentale ventrale, soit par courant à haute fréquence, soit par la 6-OHDA (Stinus *et al.*, 1978; Herman *et al.*, 1988).

D'autres travaux (Burunat *et al.*, 1988) ont montré que la réponse comportementale induite par l'apomorphine, après lésion 6-OHDA de la substance noire ou du FMT, peut être conditionnée par installation d'une association entre les stimuli extéroceptifs et l'injection d'apomorphine. Il est, cependant, peu probable qu'un tel conditionnement secondaire soit compatible avec nos données expérimentales.

Ainsi, l'hyperactivité des animaux ACm anti-DAC est très élevée dès la première séance du test, alors qu'aucun traitement préalable à l'apomorphine n'a été effectué.

En outre, l'intervalle temporel entre les séances est long (2 à 4 semaines) et l'effet comportemental disparaît totalement 12 semaines après le début du test.

Par ailleurs, l'analyse immunohistochimique des cerveaux traités avec l'ACm anti-DAC montre que cette hypersensibilité ne semble pas liée directement à une perte des cellules dopaminergiques dans la substance noire et dans l'aire tegmentale ventrale.

On peut avancer l'hypothèse que les injections ICV répétées de l'ACm anti-DAC entraînent un blocage immunopharmacologique chronique des récepteurs dopaminergiques suite à la production *in situ* d'anticorps anti-idiotypes de la dopamine conjuguée (AIDA).

Ce blocage serait responsable de l'hypersensibilité comportementale. Cette hypothèse a été avancée par Abramsky & Litvin (1978); elle est confortée par certains travaux qui ont montré que des injections ICV répétées d'antigènes cérébraux induisent la production d'anticorps détectés en périphérie (Mrabet *et al.*, 1990; 1992). Ces AIDA sont capables de reconnaître les récepteurs DA *in vitro* (Mons *et al.*, 1991) et *in vivo* (Mrabet *et al.*, 1991).

CONCLUSION

Les résultats obtenus montrent que des injections ICV répétées d'anticorps dopaminergiques induisent une hypersensibilité comportementale qui semble être due à un blocage immunopharmacologique.

RÉFÉRENCES CITÉES

- Abramsky O. & Litvin Y. (1978) Autoimmune response to dopamine-receptor as a possible mechanism in the pathogenesis of Parkinson's disease and schizophrenia. *Perspect. Biol. Med.* 22: 104-114
- Burunat E., Diaz Palarea M.D., Castro R. & Rodriguez M. (1988) Conditioning of the early behavioral response to apomorphine in the rotational model of Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 145 : 323-327

- Chagnaud J.L., Mons N., Tuffet S., Gradier-Vazeilles X. & Geffard M. (1987) Monoclonal antibodies against glutaraldehyde-conjugated dopamine. *J. Neurochem.* 49 : 487-494
- Costa A., Geffen L.B., Rush R.A., Bridges D., Blessing W.W. & Heat J.W. (1979) Immune lesions of central noradrenergic neurons produced to dopamine-b-hydroxylase. *Brain Res.* 173 : 65-78
- Danguir J. & Nicolaïdis S. (1984) Chronic intracerebroventricular infusion of insulin causes selective of slow wave sleep in rats. *Brain Res.* 306 : 97-103
- Danguir J. & De Saint-hilaire-kafi S. (1988) Somatostatin antiserum blocks carbachol-induced increase of paradoxical sleep in the rat. *Brain Res. Bull.* 20 : 9-12
- Geffard M., Buijs R.M., Seguela P., Pool C.W. & Le Moal M. (1984) First demonstration of highly specific and sensitive antibodies against dopamine. *Brain Res.* 294: 161-165
- Herman J.P., Choulli K., Abrous N., Dulluc J. & Le moal M. (1988). Effects of intra-accumbens dopaminergic grafts on behavioral deficits induced by 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens of A10 dopaminergic neurons : a comparison. *Behav. Brain Res.* 29 : 73-83
- Jerne N.K. (1974) Towards a network theory of the immune response. *Ann. Immunol.* 125 : 373-389
- Kelly P.H., Seviour P.W. & Iversen S.D. (1975) Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain Res.* 94 : 507-522
- Kovacs G.L., Buijs R.M., Bohus B., Tjeerd B. & Van Wimmersma G. (1982) Microinjection of arginine 8-vasopressine antiserum into the dorsal hippocampus attenuates passive avoidance behavior in rats. *Physiol. Behav.* 28 : 45-48
- Leccese A.P. & Isenhour J.L. (1983) Intraventricular administration of anti-vasopressine serum inhibits retention in mice. *Peptides* 4 : 265-267
- Lehman A. (1974) Atlas stéréotaxique du cerveau de la souris.
- Martinez J.L.Jr, Degaaf J., Chaukin C. & Dana R.C. (1985) Leu-enkephaline actions on avoidance conditioning are mediated by a peripheral opioid receptor. *Life Science* 37 : 2345-2353
- Mons N. & Geffard M. (1987) Specific antisera against catecholamines: 3,4 dihydroxyphenylalanine, dopamine, noradrenaline and octopamine tested by an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Neurochem.* 48 : 1626-1633
- Mons N., Dubourg P., Messier C., Chiavori C., Calas A. & Geffard M. (1991) Polyclonal anti-idiotypiques antibodies as internal images of dopamine. Applications for biochemical and morphological studies of DA receptors in the rat brain. *J. Hirnforschung* 32: 617-625.
- Mrabet O., Messier C., Mons N., Destrade C. & Geffard M. (1990) Repeated intracerebroventricular (ICV) injections of conjugated dopamine (DA-G-BSA) produce peripheral antibodies. 20th Annual Meeting, ST Louis, Missouri, 28 Oct- 2 Nov. *Society for Neurosciences Abstracts* 16, 1208
- Mrabet O., Messier C., Mons N., Geffard M. & Destrade C. (1991), Locomotor bias produced by intra-accumbens and intracaudate injection of polyclonal dopamine anti-idiotypic antibodies. *J. Für Hirnforschung* 32 (5): 627-633
- Mrabet O., Messier C., Mons N., Destrade C. & Geffard M. (1992) Comparaison of the peripheral immune response (PIR) obtained by repeated intracerebroventricular (ICV) and intravenous (IV) injections of conjugated dopamine (DA-G-BSA). *Ibro-Unesco Conference/ Workshop on Recent Advances in Neurosciences in Africa*. Agadir, Morocco 20-22 fev. 39.
- Staunton D.A., Magistretti P.J., Koob G.F., Shoemaker W.J. & Bloom F.E. (1982) Dopaminergic supersensitivity induced by denervation and chronic receptor blockade is additive. *Nature* 299 : 72
- Stenberger L.A., Hardy P.H., Cuculis J.J. & Meyer H.G. (1970) The unlabelled antibody enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase/anti peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18 : 315-335

Stinus L., Gaffori O., Simon H. & Le Moal M.(1978) Disappearance of hoarding and disorganization of eating behavior after ventral mesencephalic tegmentum lesions in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92 : 289-296

Tarrab-hazdi R. & Edery H.(1980.) Adipsia and aphagia elicited by intracerebroventricular injections of anti-acetylcholine receptors antibodies. *Exper. Neurol.* 67: 670-675

Ungerstedt U.(1971) Post-synaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration revealed by rotational behaviour. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 367 : 49-68