

EFFETS D'ANTAGONISTES CHOLINERGIQUES SUR L' HISTOCHIMIE DE LA CYTOCHROME OXYDASE DANS LE CERVEAU D'ABEILLE.

Catherine ARMENGAUD, Jamila AÏT-OUBAH & Monique GAUTHIER

*Laboratoire de Neurobiologie et Comportement, Université Paul Sabatier,
118, route de Narbonne, 31062 Toulouse.*

Résumé: Dans le cerveau d'abeille l'activité de la cytochrome oxydase (CO) a été étudiée en relation avec l'activité neuronale afin d'établir une carte fonctionnelle des structures cérébrales cholinergiques impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. L'histochemie de la CO a été réalisée selon la méthode de Wong-Riley et l'intensité de la coloration quantifiée par un système d'analyse d'images. Nous avons étudié les variations de l'activité CO, 20 ou 30 min après une injection d'un antagoniste cholinergique (hexamétonium, mécamylamine, α -bungarotoxine, scopolamine, pirenzepine), induisant ou pas des effets amnésiants. Pour ces délais nous avons montré en effet que l'hexamétonium, la mécamylamine et la scopolamine perturbent les processus de rappel mis en jeu dans un conditionnement pavlovien. Ces antagonistes induisent bien une baisse (-20% en moyenne) de la coloration du lobe alpha des corps en champignon (structure particulièrement impliquée dans le rappel de l'information). Aucune diminution de la coloration histochemie n'est observée dans cette structure pour les injections d' α -bungarotoxine et de pirenzepine. Ces résultats suggèrent qu'une baisse du métabolisme neuronal dans le lobe alpha est associée à une perturbation des processus mnésiques. Ces résultats préliminaires seront complétés en comparant la cinétique d'action des antagonistes nicotiniques et muscariniques sur le rappel à la cinétique d'action des antagonistes cholinergiques sur l'activité enzymatique.

Mots-clés: Abeille, cerveau, antagonistes cholinergiques, cytochrome oxydase.

Summary: In the honeybee brain cytochrome oxidase (CO) activity was studied in relation to neural activity of the cholinergic brain area involved in learning and memory processes. Cytochrome oxidase histochemistry was performed according to the method of Wong-Riley and the intensity of the staining quantified with a computer image analysis. We studied the variations of CO activity, 20 or 30 min after an injection of a cholinergic antagonist (hexametonium, mecamlamine, α -bungarotoxine, scopolamine, pirenzepine) which induced or not amnesic effects. For these delays we have indeed shown that hexametonium, mecamlamine and scopolamine impair recall processes, of a pavlovian conditioning. These antagonists also induce a decrease (-20% in mean) of the staining in the α -lobe of the mushroom bodies (a structure particularly involved in information retrieval). No reduction of the histochemical staining is observed for α -bungarotoxine and pirenzepine injections. These results suggest that a decrease of neural metabolism in α -lobe is linked to an impairment of memory processes. These preliminary results will be completed in comparing the kinetic of the nicotinic and muscarinic antagonists action on retrieval to the one observed on enzymatic activity.

Key words: *Honeybee, brain, cholinergic antagonists, cytochrome oxidase.*

INTRODUCTION

Nous essayons d'obtenir une carte fonctionnelle du cerveau d'abeille en relation avec un apprentissage olfactif en utilisant le marquage histochimique d'une enzyme mitochondriale de la chaîne respiratoire: la cytochrome oxydase (CO). Lors de la mise au point de la méthode chez l'abeille nous avons montré que l'intensité de la coloration dépend de la concentration en potassium extracellulaire, qu'elle est augmentée par des concentrations croissantes de cytochrome c et qu'elle est inhibée par l'azide de sodium. Nous en avons conclu que l'histochimie de la cytochrome oxydase du cerveau d'abeille constitue un marqueur de l'activité neuronale comme chez le vertébré. Par ailleurs nous avons précédemment montré par des études comportementales, que des antagonistes cholinergiques injectés dans le cerveau induisent une perturbation des processus de rappel. Nous faisons l'hypothèse que ces mêmes antagonistes induisent une diminution de l'activité neuronale et donc de l'activité CO dans les structures impliquées dans le rappel.

MATERIEL ET METHODES

Injection des antagonistes

Pour chaque antagoniste testé, les expériences ont compris un groupe d'abeilles témoins (Ringer) et un groupe traité (7 à 9 individus par groupe). Des abeilles butineuses sont placées individuellement en contention et reçoivent des injections intracrâniennes (0,5 µl) d'antagonistes nicotiniques et muscariniques ou de Ringer. Les concentrations des drogues et le délai entre l'injection de la drogue et le sacrifice de l'abeille sont choisis en fonction des effets comportementaux précédemment observés. Au bout de 20 ou 30 min les abeilles sont décapitées, les cerveaux prélevés et fixés par le paraformaldéhyde (PAF 4%) puis cryoprotégés (sucrose 25%, une nuit). Le cerveau est congelé dans les vapeurs d'azote puis coupé avec un microtome à congélation.

Histochimie de la CO

L'histochimie de la CO développée par Wong-Riley (1989) chez le vertébré a été adaptée au cerveau d'abeille. Les coupes de cerveau (16 µm) sont lavées avec du PB 0,1M puis incubées à 33°C pendant 30 min dans une solution de PB (0,1M) pH 7,4 contenant de la DAB (0,06%), du cytochrome c (0,02%) et du saccharose (4,5%). Les lames deshydratées dans des bains successifs d'éthanol sont montées dans de l'Eukitt.

L'intensité de la coloration est quantifiée grâce à un logiciel d'analyse d'images (Visilog 5, Noesis) sur 255 niveaux de gris; puis les résultats exprimés en niveaux de gris sont comparés à ceux obtenus après injection de Ringer. Les résultats sont également exprimés en pourcentage, la référence 100% correspond au niveau de gris des contrôles (Ringer) de chaque expérience.

RESULTATS

Effets des antagonistes nicotiniques.

Un fort marquage est présent dans les glomérules des lobes antennaires et le lobe alpha des corps en champignon. Après comparaison (Mann-Whitney) de la moyenne des niveaux de gris correspondant aux coupes de cerveaux traités par les antagonistes à celle des groupes Ringer, une diminution significative de la coloration est observée pour les bandes B1 (p=0,01) et B3 (p=0,05) du lobe alpha 20 min après l'injection de mécamylamine (10⁻³M) ou 30 min après l'injection d'hexaméonium (10⁻⁶M) pour la bande B3 uniquement (p=0,09). Par contre 20 min après l'injection d'α-bungarotoxine

(10^{-3} M) une augmentation significative de la coloration est observée pour les bandes B1 ($p=0,02$) et B3 ($p=0,03$). Ces effets, exprimés en pourcentage par rapport au lot Ringer, sont représentés par la figure 1.

Effets des antagonistes muscariniques.

L'injection de scopolamine ($6 \cdot 10^{-4}$ M), induit une baisse significative du marquage du lobe α ($p=0,04$) mais aussi de la couche interne des glomérules ($p=0,04$, Mann-Whitney). Après 20 min et 2h les injections de pirenzepine (10^{-2} M) n'ont provoqué aucune modification de la coloration dans les structures analysées (Fig2).

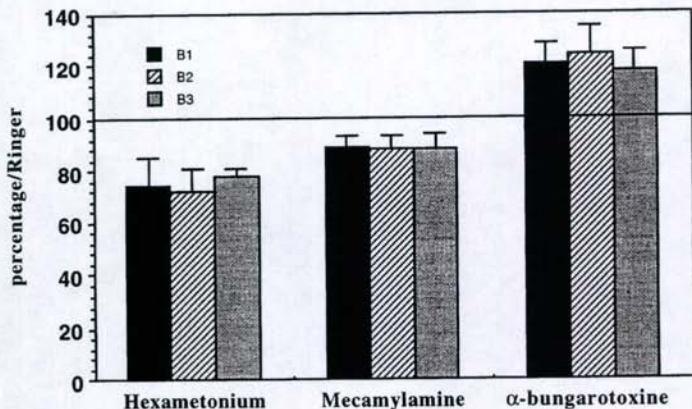


Figure 1: Effets des injections d'hexametonium de mécamylamine et d' α -bungarotoxine sur l'histochimie de la CO dans les 3 neuropiles B1, B2, B3 du lobe α . Pour chaque expérience les résultats ont été exprimés en pourcentage/Ringer; les valeurs représentées sont les moyennes (+erreur standard) de ces pourcentages.

Figure 1: Effect of hexametonium, mécamylamine or α -bungarotoxine injection on CO histochemistry in the 3 neuropiles B1, B2, B3 of the α -lobe. For each experiment results were calculated as the percentage/Ringer; the values shown are means (+sem) of these percentages.

DISCUSSION

Chez le vertébré il a été montré que les traitements par les inhibiteurs de la CO (azide de sodium) provoquent des déficits cognitifs (Bennett et al. 1992). De plus des perturbations de la fonction mnésique, induites par des traitements pharmacologiques ou liées à une pathologie, pouvaient s'accompagner de modifications de l'activité cytochrome oxydase (Mutisya et al. 1994, Rubio et al. 1996). L'objectif de ce travail était de vérifier si les antagonistes cholinergiques connus pour leurs propriétés amnésiantes, pouvaient induire une diminution du marquage histochimique de la CO dans le cerveau d'abeille. Cette hypothèse s'est vérifiée pour l'hexametonium et la mécamylamine (antagonistes nicotiniques) et pour la scopolamine (antagoniste muscarinique). Par contre les drogues

(α -bungarotoxine et pirenzepine) n'ayant entraîné aucun effet sur l'apprentissage et la mémoire n'ont pas provoqué de baisse de l'intensité de coloration. De plus la diminution de l'activité CO est particulièrement marquée dans le lobe α et donc l'hypothèse de l'implication de cette structure dans le rappel est renforcée. Cependant il faut noter que l'injection d' α -bungarotoxine semble induire une augmentation de l'activité CO sans pour autant s'accompagner, à la dose et au délai utilisés, d'effets visibles sur l'apprentissage. Il semble donc nécessaire de suivre au cours du temps l'évolution du rappel et de l'histochimie de la CO; ceci nous permettra entre autres d'observer d'éventuels décalages entre les effets comportementaux et biochimiques.

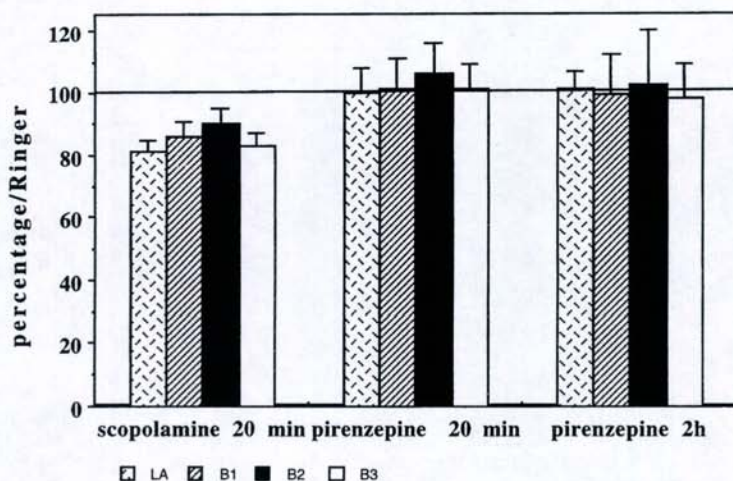


Figure 2: Effet des injections de scopolamine et de pirenzepine sur l'histochimie de la CO dans les 3 neuropiles du lobe alpha. Pour chaque expérience les résultats ont été exprimés en pourcentage/Ringer; les valeurs représentées sont les moyennes (+erreur standard) de ces pourcentages.

Figure 2: Effect of scopolamine and pirenzepine injection on CO histochemistry in the 3 neuropiles of the α -lobe. For each experiment results were calculated as the percentage/Ringer; the values shown are means (+sem) of these percentages.

REMERCIEMENTS

Ce travail a pu être réalisé grâce à une subvention de la région Midi-Pyrénées (N°9609592).

RÉFÉRENCES

BENNETT M.C., DIAMOND D.M., STRYKER S.L., PARKER W.D.JR 1992, Cytochrome oxidase inhibitor: a novel animal model of Alzheimer disease. *Geriatr. Psychiatry* 5, 93-101.

- CANO LOZANO V., BONNARD E., GAUTHIER M., RICHARD D.** 1996, Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee. *Behavioural Brain Research*, 81,215-222.
- CANO LOZANO V., GAUTHIER M.** 1998, Effects of the muscarinic antagonists atropine and pirenzepine on olfactory conditioning in the honeybee. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 59,903-907..
- GAUTHIER M., CANO LOZANO V., ZAOUJAL A., RICHARD D.** 1994, Effects of intracranial injections of scopolamine on olfactory conditioning retrieval in the honey bee. *Behavioural Brain Research*, 63, 145-149.
- MUTISYA E.M., BOWLING A.C., FLINT BEAL M.**1994, Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.*63,2179-2184.
- RUBIO S., BEGEGA A., SANTIN L.J., ARIAS J.L.**1996 Ethanol-and diazepam-induced cytochrome oxidase activity in mammillary bodies. *Pharmacol Biochem Behav* 55(2) 309-314.
- WONG-RILEY M.T.T.** 1989, Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker of neuronal activity. *Trends Neurosci.* 12, 94-101