

**THESE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Par Pierre Bredeloux**

-----  
*Présentée et soutenue publiquement le 25 Octobre 2004*

**LES RECEPTEURS NTS2 DE LA NEUROTENSINE ET L'ANALGESIE**  
**INTERACTION AVEC LES SYSTEMES OPIOIDERGIQUES**

**Président :** Mme Nicole GRIMAUD, Maître de Conférences de Pharmacologie

**Membres du Jury :** M. Jean-Yves PETIT, Professeur de Pharmacologie  
M. Jérôme BARRAUD, Pharmacien

**A Madame Nicole Grimaud,**

Je tiens à vous exprimer ma respectueuse reconnaissance pour l'honneur que vous me faites en présidant ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Jean Yves Petit,**

Je tiens à vous remercier pour avoir accepté de diriger ce travail, pour vos précieux conseils et votre disponibilité. Soyez assuré de toute ma reconnaissance.

**A Monsieur Jérôme Barraud,**

Il m'est particulièrement agréable de vous remercier pour avoir bien voulu participer au jury de cette thèse. Soyez convaincu de ma sincère considération.

**A Monsieur le Professeur Jean Costentin,**

Je vous remercie sincèrement pour avoir accepté de m'accueillir au sein du laboratoire de Neuropsychopharmacologie Expérimentale que vous dirigez à Rouen.

**A mademoiselle Isabelle Dubuc,**

Je vous remercie pour l'aide et les conseils prodigués au cours de ces deux premières années passées au laboratoire de Neuropsychopharmacologie Expérimentale.

**A tous les étudiants (passés et présents) du laboratoire de Neuropsychopharmacologie, en particulier Guillaume, Erwan, Elisabeth, Nico, Annelise, Julien ainsi que les « internationaux » Alice et Jakub,**

Je vous remercie pour votre accueil chaleureux, votre aide et vos encouragements qui m'ont permis de m'intégrer rapidement dans mon nouvel environnement rouennais. Je souhaite que vous trouviez la réussite (que vous méritez tous !) sur votre chemin et que nous passions encore de très bons moments ensemble.

# SOMMAIRE

*Table des illustrations*

*Abréviations*

<b>INTRODUCTION :</b>	<b>1</b>
<b>I. LA DOULEUR :</b>	<b>3</b>
<b>I.1 DEFINITION :</b>	<b>3</b>
<b>I.2 PHYSIOLOGIE DU CIRCUIT DE LA DOULEUR :</b>	<b>3</b>
I.2.1 Au niveau périphérique :	3
I.2.2 Le relais médullaire :	6
I.2.3 Voies nociceptives ascendantes :	8
I.2.4 Intégration corticale de la douleur :	10
<b>I.3 CONTROLE DE LA DOULEUR :</b>	<b>12</b>
I.3.1 Le contrôle médullaire : La théorie du portillon ou « gate control » :	12
I.3.2 Contrôle des centres supérieurs du SNC :	13
<b>II. LE SYSTEME ENDORPHINERGIQUE :</b>	<b>14</b>
<b>II.1 INTRODUCTION :</b>	<b>14</b>
<b>II.2 Les endorphines :</b>	<b>14</b>
II.2.1 Les différentes familles :	14
II.2.2 Localisation :	18
<b>II.3 Les récepteurs :</b>	<b>19</b>
II.3.1 Structure moléculaire :	20
II.3.2 Répartition anatomique :	21
II.3.3 Fonction :	22
<b>III. LE SYSTEME NEUROTENSINERGIQUE :</b>	<b>24</b>
<b>III.1 Découverte :</b>	<b>24</b>
<b>III.2 Biosynthèse et dégradation :</b>	<b>24</b>
III.2.1 Biosynthèse :	24
III.2.2 Dégradation :	26
<b>III.3 Localisation :</b>	<b>26</b>
III.3.1 Localisation périphérique :	26

III.3.2	Localisation cérébrale :	_____	27
<b>III.4</b>	<b>Principaux effets biologiques et pharmacologiques de la neurotensine :</b>	_____	<b>29</b>
III.4.1	Au niveau du système nerveux central :	_____	29
III.4.2	Effets périphériques :	_____	30
<b>III.5</b>	<b>Les récepteurs de la neurotensine :</b>	_____	<b>30</b>
III.5.1	Localisation des récepteurs NTS1 et NTS2 :	_____	33
III.5.2	Fonctions pharmacologiques imparties au NTS1 et NTS2 :	_____	34
<b>IV. Etude des interactions entre les systèmes neurotensinergiques et endorphinergiques centraux :</b>			<b>36</b>
<b>IV.1</b>	<b>Introduction :</b>	_____	<b>36</b>
<b>IV.2</b>	<b>Matériel et méthodes :</b>	_____	<b>37</b>
IV.2.1	Animaux	_____	37
IV.2.2	Substances et préparation des solutions	_____	38
IV.2.3	Voies d'administration des substances	_____	38
IV.2.4	Epreuve d'analgésie :	_____	38
IV.2.5	Autoradiographie quantitative :	_____	38
IV.2.6	Expression et analyse statistique des résultats	_____	39
<b>IV.3</b>	<b>Résultats :</b>	_____	<b>40</b>
IV.3.1	Recherche de l'antagonisme des effets analgésiques du NT1 par la lévocabastine dans l'épreuve de la plaque chaude :	_____	40
IV.3.2	Recherche d'un antagonisme des effets analgésiques de la morphine par la lévocabastine :	_____	41
IV.3.3	Etude de l'effet d'un traitement semi-chronique par la morphine sur l'activité analgésique du NT1 :	_____	42
IV.3.4	Etude de l'effet d'un traitement semi-chronique par le NT1 sur l'analgésie induite par la morphine	_____	43
IV.3.5	Etude des effets de la naloxone sur l'activité analgésique du NT1 :	_____	45
IV.3.6	Recherche d'une modification de la densité des récepteurs de la NT dans des régions du cerveau impliquées dans le contrôle de la douleur après un traitement semi-chronique de souris par la morphine.	_____	46
<b>IV.4</b>	<b>Discussion :</b>	_____	<b>48</b>
<b>CONCLUSION :</b>			<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE :</b>			<b>54</b>

## Table des illustrations

### Figures :

<b>Figure 1 :</b> Sensibilisation périphérique.	5
<b>Figure 2 :</b> Connexions spinales des neurones nociceptifs.	7
<b>Figure 3 :</b> Convergences des informations nociceptives en provenance des viscères et de la peau.	7
<b>Figure 4 :</b> Organisation d'ensemble des deux principales voies sensorielles somatiques ascendantes.	8
<b>Figure 5 :</b> Voies ascendantes de la douleur.	9
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique des voies les plus récemment décrites.	10
<b>Figure 7 :</b> Théorie du gate control de Melzack et Wall.	11
<b>Figure 8 :</b> Voies modulatrices de la douleur.	13
<b>Figure 9 :</b> Précurseurs des peptides opioïdes.	15
<b>Figure 10 :</b> Identité des séquences d'acides aminés parmi les trois principaux récepteurs opioïdes clonés.	20
<b>Figure 11 :</b> Représentation schématique de la transcription du gène codant pour la pro NT-NN de Rat.	25
<b>Figure 12 :</b> Peptidases impliquées dans les coupures primaires de la neurotensine.	26
<b>Figure 13 :</b> Localisation de la NT dans le SNC du Rat.	28
<b>Figure 14 :</b> Représentation schématique des récepteurs NTS1 et NTS2.	31
<b>Figure 15 :</b> Séquence du NTS3/gp95 sortiline.	33
<b>Figure 16 :</b> Antagonisme des effets analgésique du NT1 par la lévocabastine dans l'épreuve de la plaque chaude.	40
<b>Figure 17 :</b> Recherche d'un antagonisme de l'effet analgésique de la morphine par la lévocabastine dans l'épreuve de la plaque chaude.	41
<b>Figure 18 :</b> Effet d'un traitement semi-chronique par la morphine sur l'activité analgésique du NT1 et de la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude.	43
<b>Figure 19 :</b> Effet d'un traitement semi-chronique par le NT1 sur l'analgésie produite par le NT1 et la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude.	44
<b>Figure 20 :</b> Effet de la naloxone sur l'activité analgésique du NT1.	45
<b>Figure 21 :</b> Densité des sites NTS1 et NTS2 dans 2 régions cérébrales chez des souris témoins et chez des souris traitées de façon semi-chronique par la morphine.	46
<b>Figure 22 :</b> Distribution des sites de liaison de [ <sup>3</sup> H]NT dans la substance grise periaqueducule (SGPA) et les colliculi supérieurs de souris.	47
<b>Figure 23 :</b> Hypothèse : la libération de NT dans la SGPA dépend de l'activité des neurones endorphinergiques dans la SGPA.	49

## **Tableaux :**

<b><u>Tableau 1</u></b> : Peptides opioïdes endogènes. _____	17
<b><u>Tableau 2</u></b> : Ligands des trois types de récepteurs opioïdes. _____	19
<b><u>Tableau 3</u></b> : Classification des récepteurs opioïdes et leurs actions, d'après les données chez l'animal. _____	23
<b><u>Tableau 4</u></b> : Caractéristiques comparées des récepteurs couplées aux protéines G de la neurotensine NTS1 et NTS2. _____	32

## Abréviations

<b>A.I.N.S :</b>	Anti-inflammatoire non stéroïdien
<b>A.N.O.VA :</b>	Analyse de variance
<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN :</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP :</b>	Adénosine triphosphate.
<b>B.S.A :</b>	Sérum Albumine Bovine
<b>CGRP :</b>	Calcitonin Gene Related Peptide
<b>D.M.S.O :</b>	Diméthylsulfoxyde (Me <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
<b>DPDPE :</b>	[D-Pen <sup>2</sup> , D-Pen <sup>5</sup> ]jenképhaline
<b>FSRT :</b>	Faisceau spino-réticulo-thalamique
<b>FST :</b>	Faisceau spino-thalamique
<b>GTP :</b>	Guanosine triphosphate
<b>i.c.v. :</b>	Intra-cérébro-ventriculaire
<b>i.v. :</b>	Intra-veineuse
<b>Kd :</b>	Constante de dissociation à l'équilibre
<b>Na<sup>+</sup> :</b>	Ion Sodium
<b>NaCl :</b>	Chlorure de Sodium
<b>NPY :</b>	Neuropeptide Y
<b>NT :</b>	Neurotensine
<b>NTS1, NTS2, NTS3 :</b>	Récepteurs de la NT de type 1, type 2 et de type 3.
<b>O.M.S :</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>ORL1 :</b>	Opioid receptor like 1, récepteur de la nociceptine
<b>PDYN :</b>	Prodynorphine
<b>PENK :</b>	Proenképhaline
<b>POMC :</b>	Proopiomélanocortine
<b>s.c. :</b>	Sous-cutanée
<b>S.E.M :</b>	Erreur standard à la moyenne
<b>S.N.C :</b>	Système nerveux central
<b>SGPA :</b>	Substance grise périaqueducal

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

La douleur est un phénomène physiologique vital. En effet, elle est à l'origine de la mise en jeu des réflexes permettant de nous soustraire aux stimuli nocifs ; elle nous permet ainsi de protéger notre corps des agressions extérieures et nous apprend à éviter certaines situations dangereuses. Cependant, quand la sensation douloureuse par son acuité ou sa persistance devient insupportable, elle est à l'origine de nombre de consultations médicales. La douleur alors pathologique, interfère avec les activités quotidiennes de la vie, diminue les performances au travail, perturbe la vie familiale et finit par altérer l'état psychologique du patient avec l'apparition de phénomènes anxieux et/ou dépressifs.

Pour soulager la douleur, les médecins ont à leur disposition plusieurs médicaments qu'ils choisissent en fonction de l'intensité de la douleur à traiter. Ces médicaments ont été classés par l'O.M.S en plusieurs « paliers », à partir de l'observation de douleurs cancéreuses d'intensité croissante en fonction de l'évolution de l'affection. Cette classification est, bien entendu, applicable à d'autres types de douleurs de même intensité. Sont distingués ainsi : les antalgiques de niveau I ; ce sont les analgésiques non morphiniques, utilisés en 1<sup>ère</sup> intention pour traiter les douleurs peu intenses ou débutantes ; ils regroupent le paracétamol, l'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdien (A.I.N.S) ; les antalgiques de niveau II ; ils correspondent aux analgésiques opiacés faibles comme la codéine et aux morphiniques synthétiques dits « mixtes » (agonistes-antagonistes), comme le dextropropoxyphène, la buprénorphine, la nalbuphine et la pentazocine. Ils sont utilisés seuls ou en association aux analgésiques non morphiniques, avec ou sans adjuvants, pour traiter les douleurs persistantes ou intenses, rebelles aux antalgiques de niveaux I et dues à un excès de stimulation nociceptive. Enfin, les antalgiques de niveau III sont les analgésiques morphiniques « forts » utilisés seuls ou en association aux A.I.N.S pour traiter les douleurs intenses, rebelles aux antalgiques de niveau II. Ils comprennent la morphine administrée par voie orale ainsi que la morphine et les morphiniques de synthèse « forts », administrés par voie parentérale (fentanyl, oxycodone, péthidine.).

Les substances utilisées pour traiter les douleurs de fortes intensités sont donc toutes des opiacés ou des morphiniques de synthèse. Ces molécules très efficaces développent un certain nombre d'effets indésirables (constipation, dépression respiratoire, hypotension, bradycardie,

trouble de l'humeur...); elles entraînent une tolérance qui oblige à augmenter les doses pour demeurer efficace ; elles sont peu actives vis-à-vis de certains types de douleur, telles les douleurs neuropathiques. Ces constats incitent à rechercher de nouvelles substances analgésiques qui soient aussi puissantes mais dépourvues des effets indésirables des morphiniques.

Ainsi parmi les substances endogènes douées de propriétés analgésiques, la neurotensine (NT) et ses récepteurs pourraient constituer le point de départ du développement d'une nouvelle classe thérapeutique à visée analgésique. En effet, la NT génère, une analgésie aussi puissante que celle de la morphine dans différents modèles de douleurs expérimentales ; celle-ci semble, d'après les premières données de la littérature, non modifiée par la naloxone, un antagoniste non sélectif des récepteurs opioïdes. Cela suggère l'indépendance des systèmes neurotensinergique et opioïdiques centraux. Le récepteur impliqué dans l'effet analgésique de la NT ayant été identifié (NTS2), les agonistes sélectifs de ce récepteur pourraient donc être utilisés en thérapeutique, en relais des morphiniques lorsque l'effet analgésique de ces derniers est épuisé. Malgré ces données encourageantes, d'autres résultats de la littérature font état de l'existence d'une diminution significative des effets analgésiques de la NT chez des souris tolérantes à la morphine, établissant par la même occasion l'existence de relation entre ces deux systèmes de neurotransmissions.

Dans le but de développer une nouvelle stratégie analgésique alternative aux opioïdes basée sur les récepteurs de la neurotensine, il nous est apparu important d'approfondir l'étude des relations entre les systèmes opioïdiques et neurotensinergique centraux. En effet l'existence d'interactions trop importantes entre ces deux systèmes rendrait cette stratégie moins attrayante.

Le mémoire évoquera successivement : les grandes étapes de la propagation du message douloureux, de la périphérie jusqu'aux centres supraspinaux où il sera intégré ainsi que les différentes voies physiologiques qui permettent son contrôle ; les principales données concernant le système endorphinergique impliqué dans la nociception ; une présentation de la neurotensine, de ses principaux effets pharmacologiques et de ses récepteurs ; enfin, l'étude des interactions entre les systèmes neurotensinergique et opioïdiques centraux que j'ai réalisé au sein du laboratoire de Neuropsychopharmacologie du Pr. Jean Costentin à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rouen.

# **LA DOULEUR**

# **I. LA DOULEUR :**

## **I.1 DEFINITION :**

La douleur se définit comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle, ou décrite dans des termes évoquant une telle lésion ».

La transmission des informations douloureuses vers les structures cérébrales est un mécanisme complexe qui fait intervenir trois étapes au cours desquelles l'influx nerveux généré au niveau de nocicepteurs est tout d'abord transmis aux fibres nerveuses périphériques. Il est ensuite transmis au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière avant d'être enfin intégré au niveau du cerveau qui le transforme en message conscient, c'est-à-dire en sensation douloureuse avec une composante discriminative (intensité, localisation, durée du stimulus nociceptif) et une composante émotionnelle, affective et désagréable.

## **I.2 PHYSIOLOGIE DU CIRCUIT DE LA DOULEUR :**

### **I.2.1 Au niveau périphérique :**

#### **I.2.1.1 Les nocicepteurs :**

Contrairement à l'organisation des voies sensorielles impliquées dans le toucher, celles qui transportent les informations nociceptives ne font pas intervenir de structures spécifiques histologiquement individualisées pouvant être qualifiées de récepteurs nociceptifs. En effet, les récepteurs à l'origine des messages tactiles sont des structures spécialisées appelées « mécanorécepteurs », tandis que les messages nociceptifs résultent de la mise en jeu de « nocicepteurs ». Ces structures correspondent en fait à des terminaisons libres amyéliniques très nombreuses ( $200/\text{cm}^2$ ) qui forment des arborisations plexiformes au niveau des tissus cutanés, musculaires, articulaires ainsi que dans la paroi des viscères.

Au niveau cutané, deux types de nocicepteurs ont été caractérisés. Les mécanonocicepteurs, qui ne sont activés que par des stimuli douloureux mécaniques (pression, étirement) et qui se prolongent par des fibres  $A\delta$  et les nocicepteurs polymodaux, activés par des stimuli mécaniques,

chimiques (substances algogènes) ou thermiques ( $T > 42^{\circ}\text{C}$ ) qui se prolongent par des fibres de type C.

Ces nocicepteurs ont pour caractéristiques : de ne pas être spontanément actifs ; d'avoir un seuil de réponse élevé nécessitant une stimulation intense ; et de pouvoir être sensibilisés par des stimulations nociceptives répétées.

Il existe aussi des nocicepteurs profonds, que l'on retrouve au niveau de la capsule des organes pleins, du réseau musculaire, des viscères creux, des parois vasculaires, des muscles striés et des structures péri-articulaires. Ce sont également des mécanonocicepteurs, qui sont activés par l'ischémie, la distension ou la contraction.

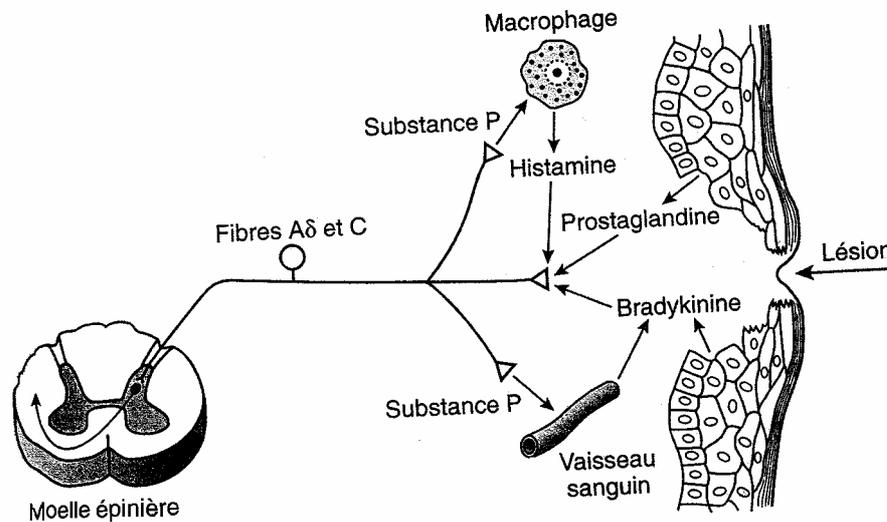
### I.2.1.2 Genèse du message douloureux :

Les lésions tissulaires qui surviennent à la suite d'un traumatisme provoquent une cascade de changements chimiques locaux qui conduisent à l'activation des nocicepteurs. Les nombreuses substances chimiques que l'on retrouve alors dans l'espace extracellulaire ont trois origines possibles : elles peuvent provenir des cellules lésées par le stimulus, elles peuvent être synthétisées sur place par des enzymes à partir de substrats produits par la lésion, ou encore être libérées par les leucocytes attirés par chimiotactisme sur le site de la lésion.

Parmi les neurotransmetteurs ou neuromodulateurs libérés par les tissus lésés et qui vont sensibiliser les nocicepteurs, on distingue le potassium, la sérotonine et l'adénosine triphosphate (ATP). En cas d'inflammation, des prostaglandines et des leucotriènes sont synthétisés sur place respectivement par la cyclo-oxygénase et par la lipoxigénase à partir d'acide arachidonique provenant des membranes des cellules lésées. Ces dérivés favorisent l'hyperalgésie en abaissant le seuil d'activation des nocicepteurs et en les sensibilisant à l'action des autres substances algogènes. Il y a également production de leucotriènes par la lipoxigénase. Les lésions occasionnent aussi la libération de bradykinine, qui outre son activité pronociceptive induit la libération d'autres médiateurs, augmente la perméabilité vasculaire et attire les leucocytes sur les lieux de la lésion. Toutes ces substances concourent donc à l'excitation des fibres nociceptives voisines qui libèrent de la substance P.

La substance P provoque alors la dégranulation des mastocytes présents sur le site de la lésion. Les mastocytes libèrent à leur tour de l'histamine qui participe avec la substance P à la

dilatation locale des capillaires sanguins, à la formation d'un œdème et à une nouvelle libération de bradykinine (fig.1).



**Figure 1 : Sensibilisation périphérique. (D'après Neurosciences médicales, les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques ; Pritchard T.C et Allaway K.D).**

Le message nociceptif ainsi créé peut être ensuite amplifié par des mécanismes d'hyperalgésie. Deux types d'hyperalgésie ont ainsi été décrits.

On distingue tout d'abord l'hyperalgésie primaire qui concerne les tissus lésés. Elle se traduit par une modification des réponses aux stimuli avec un seuil d'activation plus bas des fibres nociceptives, une latence diminuée et des réponses exagérées aux stimulations normalement non douloureuses, comme par exemple le simple fait de toucher la blessure : c'est le phénomène appelé allodynie.

L'autre type d'hyperalgésie concerne quant à elle les tissus sains péri-lésionnels. Les fibres nociceptives adjacentes sont alors sensibilisées par le biais du réflexe d'axone ou « inflammation neurogène » qui correspond en fait à la libération de neuropeptides algogènes (substance P, CGRP, neurokinine A) présents dans le ganglion rachidien, au niveau du site lésionnel mais aussi à sa périphérie et qui gagne ensuite progressivement l'ensemble des tissus sains environnants. C'est l'hyperalgésie secondaire ou encore hyperalgésie « en tâche d'huile ».

### I.2.1.3 Transmission du message douloureux à la moelle épinière :

Le message nociceptif généré au niveau des nocicepteurs est ensuite véhiculé jusqu'à la corne postérieure de la moelle épinière par des fibres nociceptives de deux types qui se distinguent par leur diamètre et leur vitesse de conduction.

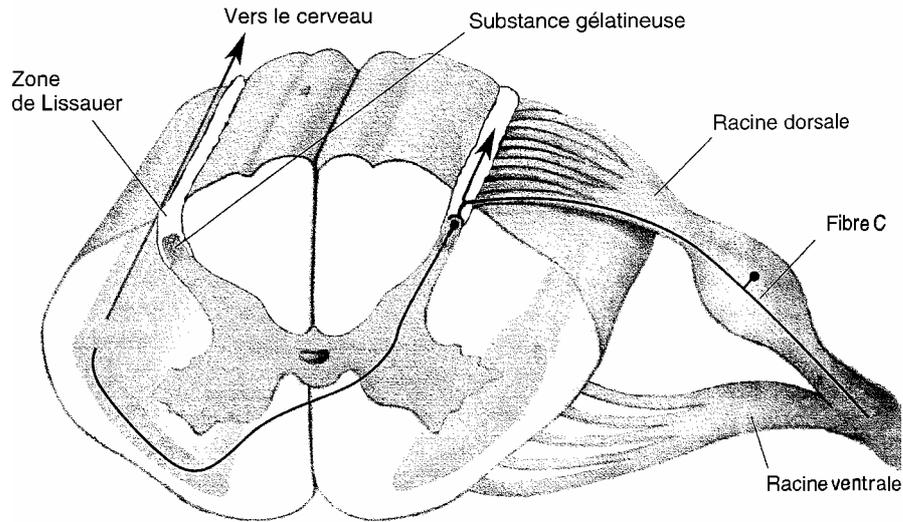
Les fibres A $\delta$ , faiblement myélinisées, de diamètre compris entre 1 et 5  $\mu\text{m}$ , ont une vitesse de conduction de 10 à 40 m/s. Elles transportent les sensations douloureuses rapides à caractère aigu, bien localisées et à type de piqûre encore appelées douleur primaire.

Les fibres C, non myélinisées, de diamètre compris entre 0,3 et 1,5  $\mu\text{m}$ , ont une vitesse de conduction plus lente de l'ordre de 1 à 2 m/s. Elles transportent les sensations de douleurs lentes, plus diffuses de type brûlure ou à caractère lancinant. Ce dernier type de douleur est appelé douleur retardée car elle survient après un certain délai.

## I.2.2 Le relais médullaire :

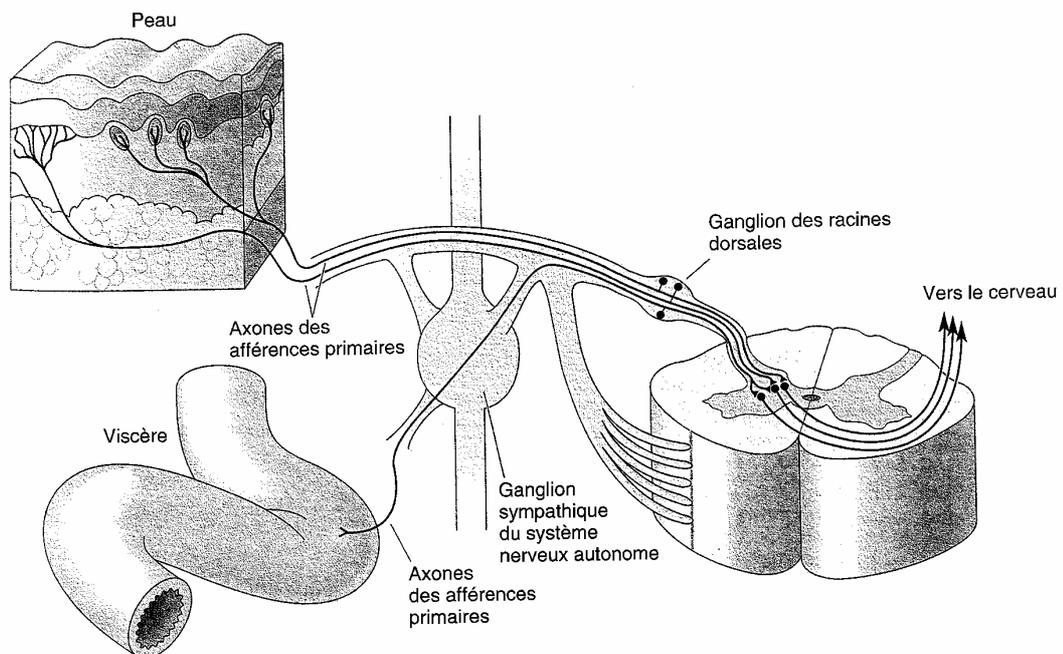
Les fibres fines A $\delta$  ou C qui conduisent les messages nociceptifs ont leur corps cellulaire situé au niveau des ganglions des racines dorsales et pénètrent au niveau des couches superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (couche I, II, V). Ces fibres émettent sur plusieurs segments une branche ascendante et une branche descendante qui constitue la zone de Lissauer puis se termine dans la région externe de la corne dorsale dénommée « substantia gelatinosa » ou substance gélatineuse. A partir de cette région, elles font synapse avec les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière.

Ces neurones sont de deux types : les neurones nociceptifs spécifiques qui ne véhiculent que des stimuli douloureux et qui sont localisés au niveau des couches superficielles de la moelle et les neurones nociceptifs non spécifiques ou « convergents » qui peuvent véhiculer à la fois des informations nociceptives ou non et qui sont situés dans les couches plus profondes. Ces neurones émettent ensuite des axones qui croisent par la commissure blanche et montent dans la moelle épinière dans la région ventro-latérale du cordon latéral (fig. 2).



**Figure 2 : Connexions spinales des neurones nociceptifs. (D'après Neurosciences, à la découverte du cerveau, Bear M.F, Connors B et Paradiso M.A.)**

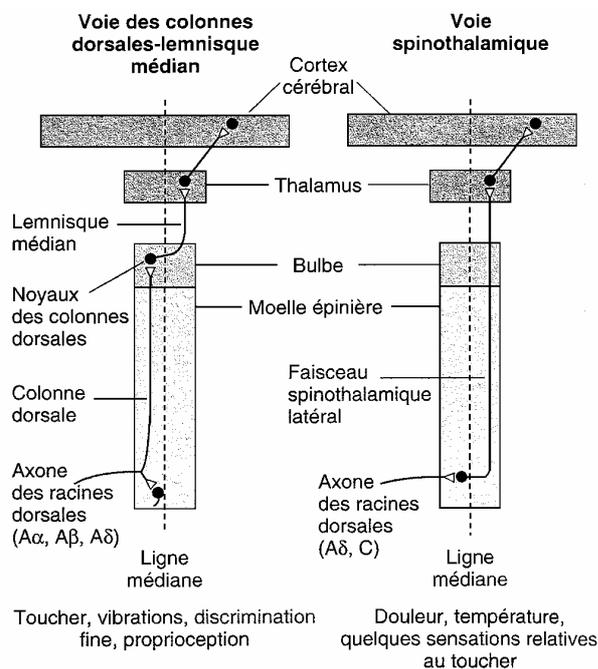
Les fibres nociceptives en provenance des viscères pénètrent dans la moelle épinière par la même voie que celle empruntée par les fibres cutanées. Le cerveau ne peut donc pas identifier l'origine précise de la douleur ce qui donne lieu au phénomène de douleur projetée qui semble provenir de régions environnantes. En effet, la douleur viscérale ainsi générée est alors perçue comme une sensation cutanée. C'est ce qui se passe par exemple lors des crises d'angor ou angine de poitrine. Lorsque le cœur vient à manquer d'oxygène, la douleur est perçue au niveau de la partie supérieure de la poitrine et irradie jusque dans le bras gauche (fig.3).



**Figure 3 : Convergence des informations nociceptives issues des viscères et de la peau. (D'après Neurosciences, à la découverte du cerveau, Bear M.F, Connors B et Paradiso M.A.)**

### I.2.3 Voies nociceptives ascendantes :

Les axones des neurones de la corne dorsale de la moelle épinière qui transportent les messages tactiles cheminent de façon ipsilatérale dans la moelle épinière en empruntant les faisceaux dits des « colonnes dorsales » ou lemnisque médian. Les informations relatives à la douleur sont quant à elles transmises au cerveau par le cordon antéro-latéral qui regroupe plusieurs fibres dont les principales sont les fibres constituant le faisceau spino-thalamique (FST) (fig.4) et les fibres constituant le faisceau spino-réticulo- thalamique (FSRT).

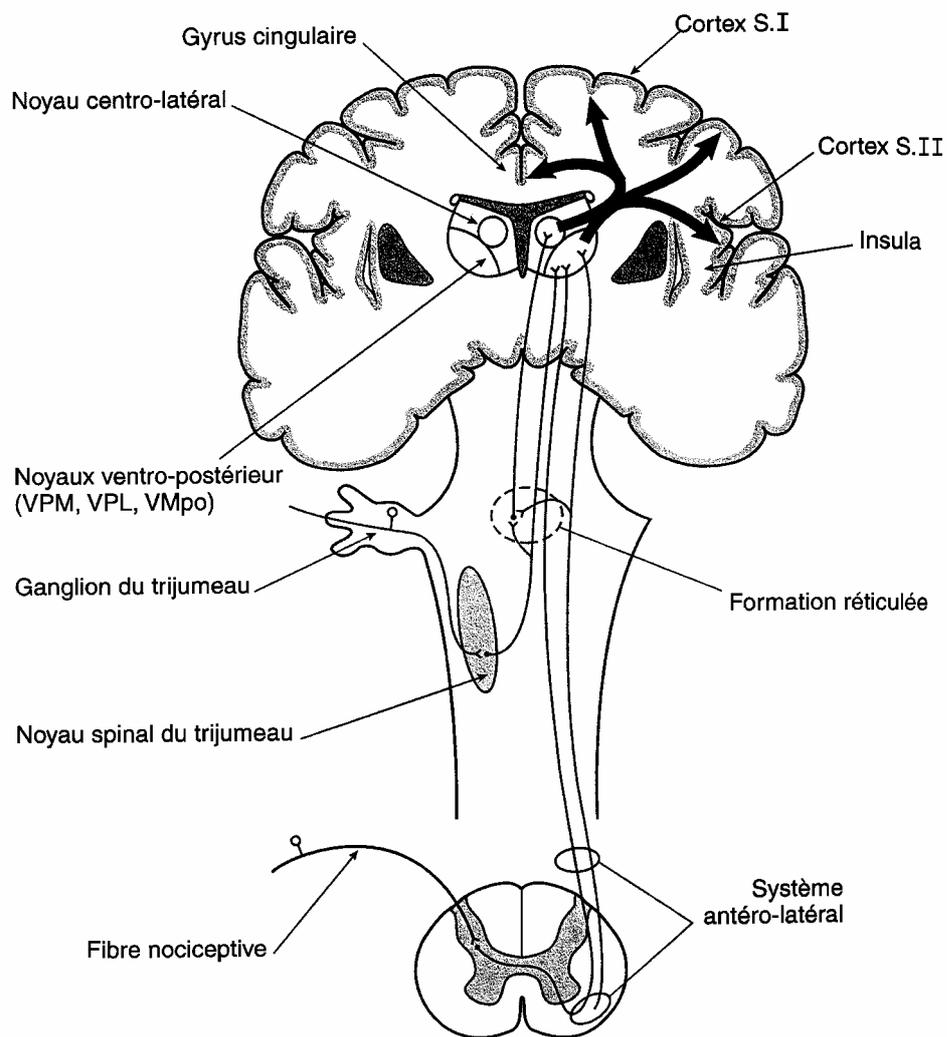


**Figure 4 : Organisation d'ensemble des deux principales voies sensorielles somatiques ascendantes. (D'après Neurosciences, à la découverte du cerveau, Bear M.F, Connors B et Paradiso M.A.)**

Lorsque le système antéro-latéral traverse la partie latérale du tronc cérébral, de nombreuses fibres se détachent du faisceau principal pour se terminer dans la formation réticulée, dans la substance grise périaqueducale (SGPA) ou au niveau des colliculi supérieur, c'est le faisceau spino-réticulothalamique (FSRT). Les fibres restantes se terminent dans le noyau ventro-postéro-latéral (VPL) du thalamus puis dans le cortex sensitif (voie de la sensation). C'est ce dernier groupe de fibres qui correspond au FST et qui transporte les informations nociceptives en provenance des fibres Aδ responsables de la douleur rapide et bien localisée. La plupart des informations en provenance des fibres C sont adressées à la formation réticulée via le FSRT qui envoie ensuite des projections aux noyaux intralaminaires du thalamus puis dans les structures limbiques et le cortex

frontal avec intégration émotionnelle, mémorisation et adaptation comportementale (fuite, anticipation).

Les informations nociceptives en provenance de la face et de la tête sont transmises au thalamus par un système similaire à celui précédemment décrit au niveau de la moelle épinière. Les fibres sensorielles présentes au niveau du nerf trigéminal font d'abord synapse sur des neurones du noyau spinal trigéminal du tronc cérébral. Les axones de ces cellules croisent la ligne médiane et montent vers le thalamus par le lemnisque trigéminal. (fig.5)



**Figure 5 : Voies ascendantes de la douleur. (D'après Neurosciences médicales, les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques ; Pritchard T.C et Allaway K.D).**

D'autres voies ont été récemment décrites, comme le faisceau spino-parabrachio-amygdalien qui semble impliqué dans l'aspect affectif et émotionnel de la douleur et les faisceaux

spino-brachio-hypothalamique et spino-hypothalamique qui pourraient être impliqués dans les composantes végétatives et endocriniennes de la douleur (fig 6).

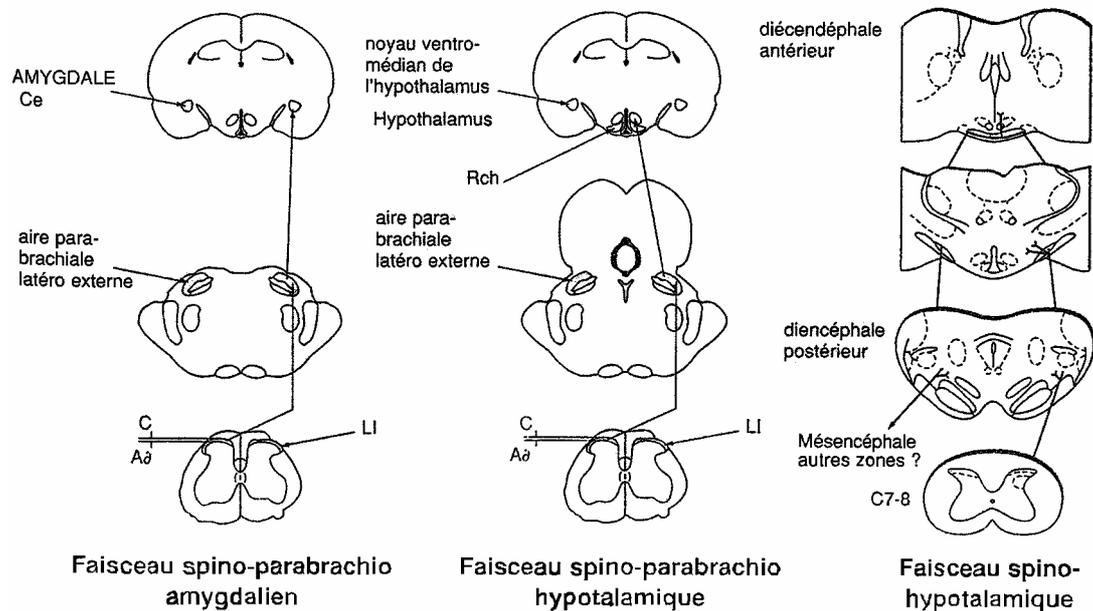


Figure 6 : Représentation schématique des voies les plus récemment décrites : de gauche à droite : les faisceaux spino-parabrachio-amygdalien, spino-parabrachio-hypothalamique, spino-hypothalamique. (d'après Bernard et Besson, 1990 ; Bester et coll., 1995. ; Giesler et coll., 1994).

#### I.2.4 Intégration corticale de la douleur :

A partir du thalamus, les informations relatives à la douleur sont transmises à diverses aires corticales. En effet, des études anatomiques ont montré que les régions ventrobasales et intralaminaires du thalamus se projettent sur les parties antérieures du gyrus cingulaire tandis que la partie postérieure du noyau ventro-médial (VMpo) se projette sur le cortex insulaire. Ces deux structures font partie du système limbique et leur activation par la douleur indique leur implication dans les composantes affectives de celle-ci. D'autre part, le gyrus cingulaire est aussi impliqué dans l'attention aux stimuli douloureux.

Les cortex somesthésiques I et II sont également activés par des stimulations nociceptives mais à un moindre degré que les régions précédemment citées. Ils reçoivent des projections directes ou indirectes du complexe ventro-basal du thalamus qui font intervenir les aspects discriminatifs de la perception douloureuse (fig. 5).

***1.3***

## CONTROLE DE LA DOULEUR :

### I.3.1 Le contrôle médullaire : La théorie du portillon ou « gate control » :

Au niveau périphérique, la perception de la douleur peut être atténuée par l'activation de mécanorécepteurs sensoriels de type A $\beta$ . Ainsi, on constate que le simple fait de se frotter la peau après une contusion permet de diminuer l'intensité de la stimulation douloureuse.

Pour expliquer ce phénomène Melzack et Wall ont émis la théorie du portillon ou « gate control ». D'après cette hypothèse, les neurones de la corne dorsale qui transmettent les informations nociceptives au cerveau via le système antéro-dorsal sont activés à la fois par des afférences sensorielles de gros diamètre ainsi que par des fibres amyéliniques nociceptives. Ces neurones de projections sont inhibés par des interneurones spinaux qui seraient quant à eux activés par les fibres sensorielles de gros diamètre et inhibés par les axones des fibres nociceptives (fig.7).

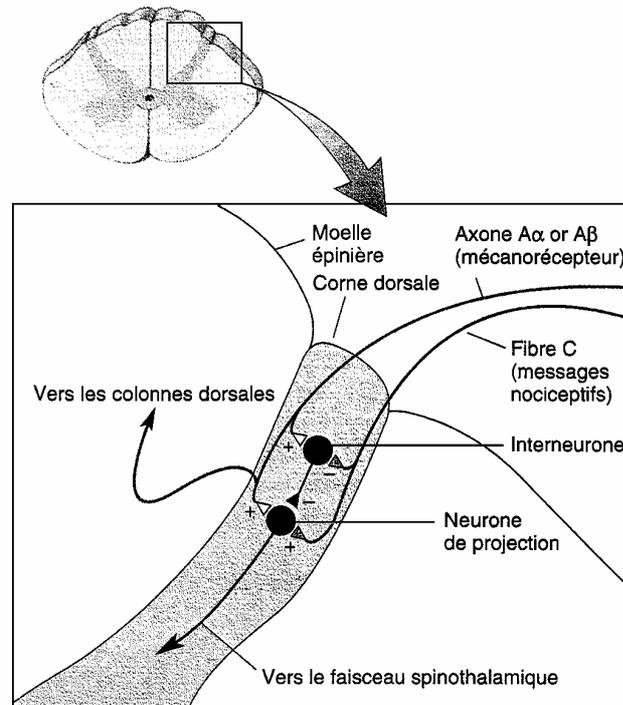


Figure 7 : Théorie du gate control de Melzack et Wall : les fibres sensorielles A $\alpha$  et A $\beta$  ainsi que les fibres amyéliniques nociceptives activent les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière qui transmettent les informations douloureuses au cerveau. Ces neurones nociceptifs ou neurones de projections seraient inhibés par des interneurones spinaux qui seraient activés par les fibres sensorielles A $\alpha$  et A $\beta$  et inhibés par les axones des fibres nociceptives. (D'après Neurosciences, à la découverte du cerveau, Bear M.F, Connors B et Paradiso M.A.)

L'activation des fibres nociceptives seules aurait donc pour conséquence d'activer au maximum les neurones de la corne dorsale ainsi que la transmission du message douloureux au

cerveau. Cependant lorsque les fibres sensorielles sont également activées, il y aurait activation des interneurons spinaux ce qui contribuerait à la réduction des signaux nociceptifs ascendants.

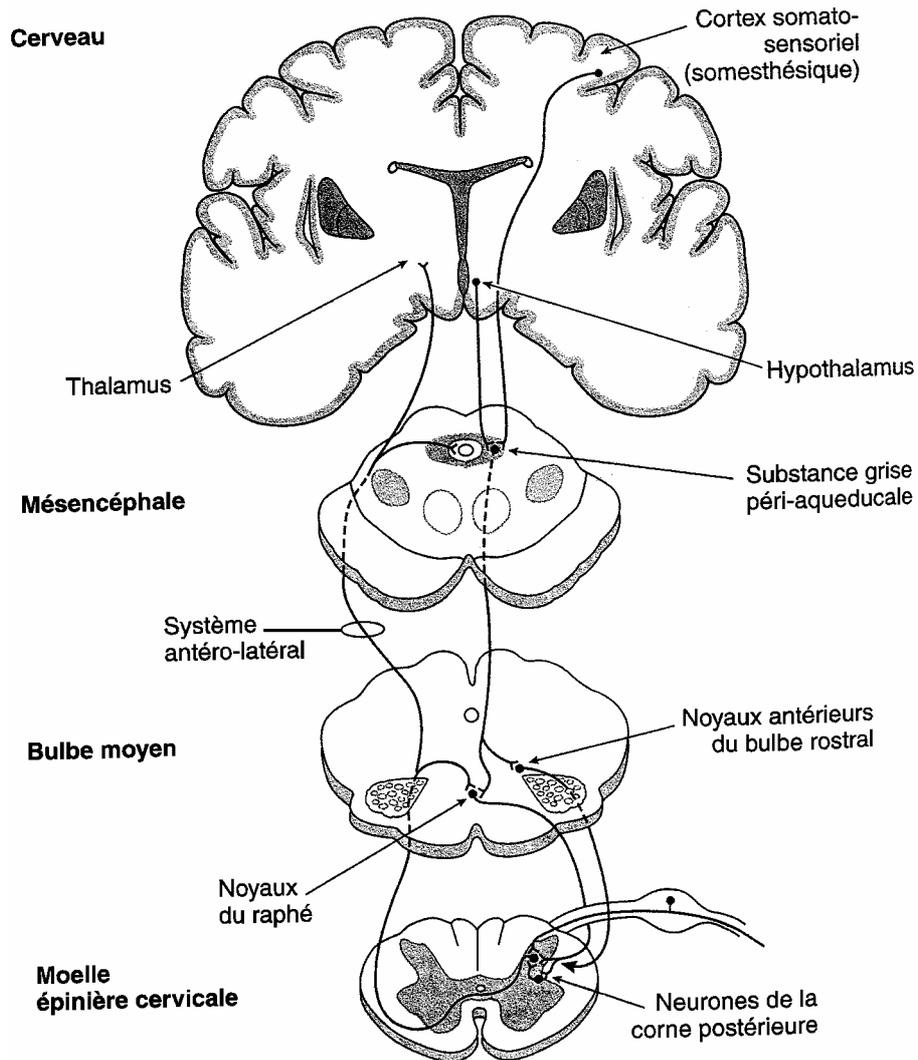
### **I.3.2 Contrôle des centres supérieurs du SNC :**

Il existe plusieurs voies descendantes originaires du tronc cérébral et du cerveau antérieur qui permettent de bloquer la transmission des informations nociceptives en provenance de la périphérie. Ainsi, des fibres sérotoninergiques qui naissent du raphé magnus et des fibres noradrénergiques en provenance du noyau paragigantocellulaire de la formation réticulée descendent par le cordon dorsolatéral de la moelle épinière et se terminent dans la corne dorsale où elles activent les interneurons enképhalinergiques de la substance gélatineuse.

Les voies sérotoninergiques en provenance du raphé magnus sont activées par des projections descendantes en provenance de la substance grise périaqueducale (SGPA) du mésencéphale. Cette région, très riche en récepteurs opiacés et en peptides opioïdes, joue un rôle important dans la modulation de la douleur.

La SGPA peut être activée par les fibres du système ascendant antérodorsal qui se terminent dans cette région. D'autre part, la région périventriculaire de l'hypothalamus envoie des projections enképhalinergiques dans la SGPA ; l'activation de cette voie est impliquée dans la suppression de la douleur dans les situations d'urgence. Enfin, les aires corticales préfrontales et somesthésiques envoient également des projections descendantes qui peuvent aussi recruter la SGPA. Bien que l'importance de ces voies ne soient pas encore totalement déterminée, on sait tout de même que la perception de la douleur est influencée par les expériences sociales, la personnalité ou par d'autres facteurs psychologiques (Fig. 8) .

Enfin, il est à noter que l'inhibition des informations nociceptives en provenance de la tête et de la face est réalisée par des projections sérotoninergiques qui se terminent dans le noyau spinal du trijumeau où sont également activés des neurones enképhalinergiques.



**Figure 8 : Voies modulatrices de la douleur.** (D'après Neurosciences médicales, les bases neuroanatomiques et neurophysiologiques ; Pritchard T.C et Allaway K.D). La substance grise péri-aqueducule peut être activée par les voies ascendantes constituées des fibres du système antéro-dorsal et/ou par les fibres descendantes en provenance de l'hypothalamus et du cortex somesthésique. Les projections qui partent de la SGPA vont à leur tour activer les neurones sérotoninergiques du raphé magnus et/ou les neurones adrénérgiques du noyau paragigantocellulaire. Les neurones enképhalinergiques de la corne dorsale de la moelle épinière sont ensuite activés par les projections descendantes en provenance du raphé magnus et/ou du noyau paragigantocellulaire.

# **LE SYSTEME ENDORPHINERGIQUE**

## **II. LE SYSTEME ENDORPHINERGIQUE :**

### **II.1 INTRODUCTION :**

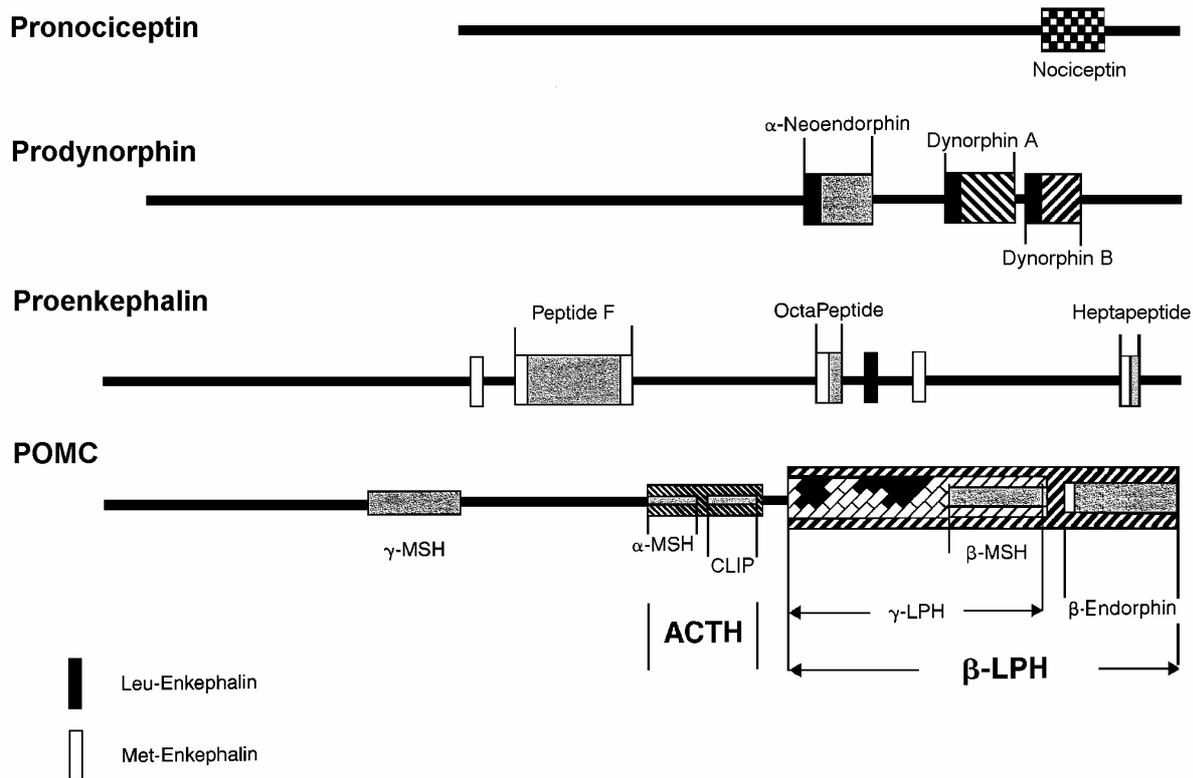
Le suc qui s'écoule des incisions pratiquées dans la capsule du pavot (*Papaver somniferum*) et se concrète est utilisé pour ses propriétés euphorisantes antitussives et antidiarrhéiques depuis plusieurs millénaires. La découverte et l'isolement de la morphine, qui en est le principal composant actif, ne date que du début du XIXème siècle. Cet alcaloïde, très employé dans le traitement des douleurs intenses, constitue de nos jours le chef de file des antalgiques opioïdes qui rassemblent entre autre des opiacés (naturels) tels les morphine et codéine ; des opioïdes semi-synthétiques tels l'hydromorphone, la buprénorphine et des opioïdes synthétiques, tels la péthidine ou la pentazocine de structure chimique assez différente des précédents avec cependant certains motifs communs et un même mode d'action.

Au début des années 70, il a été suggéré que la morphine et ses dérivés pourraient agir par l'intermédiaire de sites spécifiques les "récepteurs des opiacés". La preuve de l'existence de tels récepteurs fut apportée en 1973 lors de la mise en évidence d'une liaison de haute affinité, saturable et stéréospécifique de morphiniques tritiés à des membranes cérébrales. Les premiers ligands endogènes de ces récepteurs, la [Leu<sup>5</sup>]-enképhaline et la [Met<sup>5</sup>]-enképhaline, deux pentapeptides, furent découverts en 1975 par Hughes et Kosterlitz à partir de cerveaux de porcs. Par la suite, de nombreux autres ligands endogènes ( $\beta$ -endorphine, dynorphine A, endomorphine I et II), tous de nature peptidique, furent identifiés.

### **II.2 Les endorphines :**

#### **II.2.1 Les différentes familles :**

Actuellement, 3 grands groupes d'endorphines ont été caractérisés : les enképhalines, les endorphines et les dynorphines. Ces peptides dérivent de précurseurs différents : la proopiomélanocortine (POMC) ; la proenképhaline (PENK) ; la prodynorphine (PDYN). Ils ont des distributions anatomiques caractéristiques.



**Figure 9 : Précurseurs des peptides opioïdes (d'après Akil et coll., 1998.)**

**POMC : proopiomélanocortine ; ACTH : hormone adrenocorticotrope ; β-LPH : β-lipotropine**

Ces précurseurs soumis à des processus de clivage complexes, suivis de régulation postraductionnelle, conduisent ainsi à la synthèse des différents peptides biologiquement actifs. Ces peptides opioïdes comportent tous le même motif amino-terminal Tyr-Gly-Gly-Phe (Met ou Leu) qui se poursuit par différentes séquences pouvant comporter de 5 à 31 résidus.

Le premier précurseur des peptides opioïdes identifié dans le système nerveux central fut la POMC (Mains et coll., 1977). Ce précurseur, après avoir été hydrolysé par protéolyse au niveau de doublets d'acides aminés basiques, génère plusieurs hormones ou neurotransmetteurs : l'adrénocorticotropine (ACTH), les hormones mélanotropes ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -MSH), la  $\beta$ - et  $\gamma$ - lipotropine ( $\beta$ - et  $\gamma$ - LPH) ainsi que la  $\beta$ -endorphine (fig.9) qui est le seul peptide opioïde porté par la POMC (tableau 1). La séquence de la PROENK a été déterminée par analyse de l'ADN complémentaire de l'ARN messager obtenu à partir de médullosurrénale de Boeuf (Noda et coll., 1982) et de phéochromocytomes humains (Comb et coll., 1982). Elle contient quatre copies de [Met<sup>5</sup>]-

enképhaline, une copie de [Leu<sup>5</sup>]-enképhaline (tableau 1), une copie de [Met<sup>5</sup>]-enképhaline-Arg-Phe (heptapeptide) et une copie de [Met<sup>5</sup>]-enképhaline-Arg-Gly-Leu (octapeptide). De la même façon, la [Met<sup>5</sup>]-enképhaline constitue également la partie N-terminale de la  $\beta$ -endorphine (fig.9). Les dynorphines A et B ainsi que les  $\alpha$ - et  $\beta$ -néoendorphine, dérivent de la PDYN et présentent à leur extrémité N-terminale la séquence de la [Leu<sup>5</sup>]-enképhaline (tableau 1).

En 1995, un nouveau peptide opioïde a été identifié (Meunier et coll., 1995; Reinscheid et coll., 1995), et dénommé nociceptine ou orphanin FQ (tableau 1) parce qu'il est hyperalgésiant sous certaines conditions. Ce peptide, possède plusieurs similitudes avec la dynorphine A. En effet, ces deux peptides ont le même nombre d'acides aminés (17) et une séquence carboxy-terminale identique. Cependant, la nociceptine possède une séquence amino-terminale légèrement différente par rapport à celle des opioïdes classiques (Phe-Gly-Gly-Phe au lieu de Tyr-Gly-Gly-Phe) qui lui confère sa sélectivité envers le récepteur ORL1 et l'empêche d'interagir avec les récepteurs aux opioïdes  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$ .

Plus récemment, un autre groupe, constitué de deux peptides, a été découvert et appelé endomorphines. L'endomorphine I et l'endomorphine II sont deux tetrapeptides de structure atypique (Tableau 1) qui présentent une très forte sélectivité à l'égard des récepteurs  $\mu$ , le précurseur de ces deux peptides n'a pas encore été identifié (Zadina et coll., 1997).

<i>Peptides opioïdes endogènes :</i>	
[Leu <sup>5</sup> ]enképhaline	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
[Met <sup>5</sup> ]enképhaline	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
Dynorphine A	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu</b> -Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Dynorphine B	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu</b> -Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr
$\alpha$ -Néoendorphine	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu</b> -Arg-Lys-Tyr-Pro-Lys
$\beta$ -Néoendorphine	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Tyr-Pro
$\beta$ -Endorphine	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-Met</b> -Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu
<i>« Nouveaux » peptides endogènes apparentés aux opioïdes:</i>	
Nociceptine/ Orphanine FQ	Phe- <b>Gly-Gly-Phe</b> -Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln
Endomorphine I	Tyr-Pro-Trp-Phe
Endomorphine II	Tyr-Pro-Phe-Phe

**Tableau 1 : Peptides opioïdes endogènes**

## **II.2.2 Localisation :**

Les somas des neurones contenant la  $\beta$ -endorphine et les peptides dérivés de la POMC ont été identifiés grâce à des études immunohistochimiques. Ils sont présents principalement au niveau du SNC dans le noyau arqué de l'hypothalamus médiobasal. A partir du noyau arqué, s'étend un réseau de fibres nerveuses diffuses qui se terminent dans différentes régions du cerveau impliquées dans la réponse à la douleur comme par exemple certains noyaux hypothalamiques, les noyaux du raphé, les noyaux du pont, les noyaux du tractus solitaire ainsi que dans la moelle épinière. Les peptides dérivés de la POMC sont également retrouvés dans la partie distale de la glande pituitaire et, à la périphérie, dans les cellules des îlots pancréatiques.

Les enképhalines sont distribuées de façon très hétérogène dans le système nerveux central. On les trouve ainsi dans les régions en relation avec : la perception douloureuse (moelle épinière, noyau trigéminal et substance grise périaqueducale) ; les comportements affectifs (amygdale, hippocampe, locus coeruleus et cortex cérébral) ; le contrôle du système moteur (noyau caudé et globus pallidus) ; la régulation du système nerveux autonome (medulla oblongata) ; ainsi que dans les régions impliquées dans la régulation des fonctions neuroendocriniennes (éminence médiane). Les fibres enképhalinerigiques sont généralement situées dans les mêmes régions que les corps cellulaires dans lesquels ces peptides sont synthétisés. Bien qu'il existe quelques longues fibres enképhalinerigiques, (complexe strio-pallidal et voie hypothalamo-neurohypophysaire) ces peptides sont en premier lieu contenus dans de courts interneurons.

En périphérie, on retrouve des enképhalines dans les neurones du ganglion mésentérique, les cellules endocrines de l'intestin, le pancréas, les poumons, le cœur et la médullosurrénale.

Enfin, on trouve fréquemment les peptides dérivés de la prodynorphine dans les mêmes régions que celles où sont trouvées les enképhalines. Les peptides dérivés de la PDYN sont plus particulièrement retrouvés dans les zones impliquées dans les fonctions motrices telles que la zone réticulée de la substance noire, le pallidum ventral, le noyau accumbens, le cortex, le striatum et l'hippocampe. On en retrouve également dans les régions impliquées dans la transmission des informations douloureuses comme la substance grise périaqueducale, le raphé magnus ainsi que dans la corne dorsale de la moelle épinière.

## **II.3**

### Les récepteurs :

Au début des années 90, trois types de récepteurs des opioïdes ont été clonés: les récepteurs  $\delta$  ou OP1 (Evans et coll., 1992 ; Kieffer et coll., 1992), les récepteurs  $\mu$  ou OP2 (Chen et coll., 1993 ; Fukuda et coll., 1993) et les récepteurs  $\kappa$  ou OP3 (Li et coll., 1993 ; Meng et coll., 1993). Un autre récepteur dénommé ORL1 ou OP4 (Mollereau et coll., 1994) a été plus récemment découvert ; il a pour ligand la nociceptine (Meunier et coll., 1995; Reinscheid et coll., 1995). Ces récepteurs ont été classés en fonction de leur structure moléculaire, de leur répartition dans le système nerveux central et de leur affinité pour les différentes endorphines (tableau 2). Ainsi, la  $\beta$ -endorphine et les endomorphines manifestent une forte affinité pour les récepteurs de type  $\mu$ , les [Met<sup>5</sup>] et [Leu<sup>5</sup>]-enképhalines présentent une forte affinité pour les récepteur de type  $\delta$  et une affinité dix fois moindre pour ceux de type  $\mu$ . Les dynorphines A et B, quant à elle, ont une affinité élevée pour les récepteurs  $\kappa$  mais présentent également une certaine affinité à l'égard des récepteurs  $\mu$  et  $\delta$ .

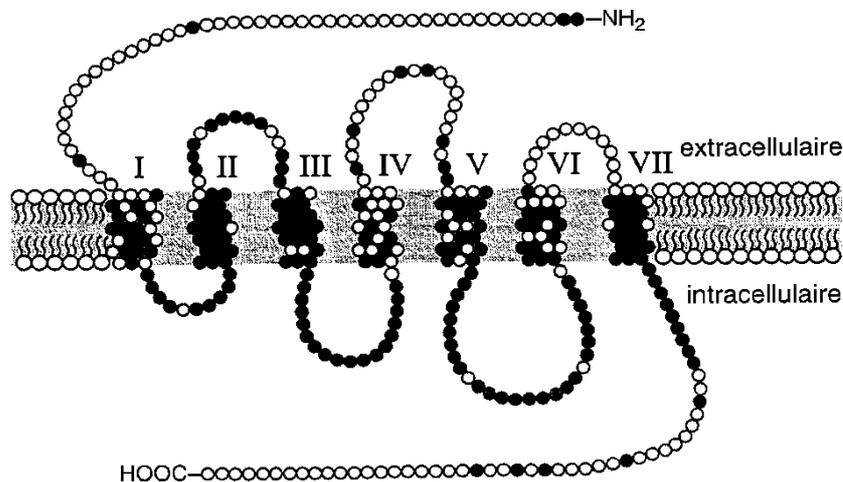
Parmi les substances opiacées exogènes, il est à noter que la morphine est 50 à 80 fois plus affine pour les récepteurs  $\mu$  que pour les récepteurs  $\kappa$  et  $\delta$ . De plus, grâce à des études de modélisation, des agonistes et des antagonistes sélectifs de chaque type de récepteurs ont, par la suite, été synthétisés (tableau 2).

Récepteurs	Ligands sélectifs		Ligands non sélectifs		Ligands endogènes
	Agonistes	Antagonistes	Agonistes	Antagonistes	
$\mu$	DAMGO	CTOP	Levorphanol	Naloxone	Enképhalines
	Morphine		Etorphine	Naltrexone	
	Méthadone			$\beta$ Funaltrexamine	
	Dermorphine				
$\kappa$	Spiradoline	Nor-BNI	Levorphanol	Naloxone	Dynorphine A
	U50, 488		Etorphine	Naltrexone	Dynorphine B
	Dynorphine A		EKC		
$\delta$	DPDE	Naltrindole	Levorphanol	Naloxone	Enképhalines
	Deltorphine	NTB	Etorphine	Naltrexone	
	DSLET	BTNX			

**Tableau 2 : Ligands des trois types de récepteurs opioïdes.**

### II.3.1 Structure moléculaire :

Les récepteurs des opiacés appartiennent tous à la famille des récepteurs à sept hélices transmembranaires couplés aux protéines G. Ils sont constitués d'environ 400 acides aminés et présentent entre eux une homologie structurale d'environ 60%. Les régions qui présentent la plus haute similitude de séquences sont les séquences amorces pour les sept domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires qui sont impliquées dans le couplage du récepteur aux systèmes effecteurs. Les régions qui divergent sont les domaines amines et carboxyl terminaux ainsi que les deuxièmes et troisièmes boucles extracellulaires qui comportent le domaine de liaison du ligand de chaque récepteur (fig.10).



**Figure 10 : Identité de séquences d'acides aminés parmi les trois principaux récepteurs opioïdes clonés. Les résidus acides aminés identiques entre les récepteurs sont en noirs ceux qui sont différents sont représentés par des cercles ouverts. (D'après Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments, Goodman et Gilman 9<sup>ème</sup> édition.)**

Actuellement plusieurs sous types de récepteurs opioïdes ont été suggérés à partir d'approches pharmacologiques ( $\mu_1$ ,  $\mu_2$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ,  $\kappa_{1a}$ ,  $\kappa_{1b}$ ,  $\kappa_2$ ,  $\kappa_3$ ). Les gènes des récepteurs opioïdes chez l'Homme comportant plusieurs introns, ces sous types pourraient résulter d'un épissage alternatif. Cependant, aucune donnée de la biologie moléculaire n'a permis de confirmer l'existence de tels sous types.

Au niveau neuronal, les récepteurs  $\mu$ ,  $\delta$  et  $\kappa$  sont couplés à des protéines G sensibles à la toxine pertussique ( $G_i/O$ ) et leur activation entraîne l'inhibition de l'adénylcyclase ; l'ouverture de canaux  $K^+$  récepteur-dépendants ; ainsi que la suppression des courants calciques voltage-dépendants. L'accroissement du potentiel de membrane induirait, par l'augmentation de la conductance potassique et par la diminution des courants calciques entrant, une inhibition de la libération de neurotransmetteurs et de ce fait l'inhibition de la transmission de la douleur dans différents réseaux neuronaux.

### **II.3.2 Répartition anatomique :**

La localisation des différents types de récepteurs a été déterminée grâce à différentes techniques de biologie moléculaire. D'importantes densités de récepteurs opioïdes ont été mises en évidence au niveau : du système de récompense ; dans les structures impliquées dans la transmission des informations douloureuses ; dans les voies nigrostriales impliquées dans la coordination de la motricité fine et la coordination motrice extrapyramidale ; dans diverses régions du système limbique impliquées dans l'émotivité telles que l'amygdale et l'hypothalamus ; ou bien encore dans les régions impliquées dans les processus de mémorisation et d'apprentissage comme l'hippocampe.

Ainsi, l'ARN messenger du récepteur  $\mu$  a été mis en évidence par la technique d'hybridation in situ au niveau de la substance grise périaqueducule, du noyau trigeminé, des noyaux cunéiforme et gracile ainsi que dans les régions thalamiques impliquées dans la perception de la douleur. Il a été trouvé également dans le noyau du tractus solitaire, le noyau ambigu et le noyau parabrachial qui sont impliqués dans le contrôle de la respiration ainsi que dans les neurones de l'area postrema.

Au niveau du système nerveux périphérique, on trouve ces récepteurs associés à des ramifications nerveuses présentes au sein de la musculature lisse du tube digestif.

Les récepteurs  $\delta$  sont, quant à eux, principalement localisés sur les interneurons du noyau accumbens ainsi que sur les neurones de projection du néocortex. L'ARN messenger de ce récepteur est également trouvé au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière.

Enfin, les récepteurs  $\kappa$  se concentrent principalement au niveau spinal mais on en trouve également au niveau de certaines régions hypothalamiques.

### II.3.3 Fonction :

Les effets de l'activation ou du blocage des différents types de récepteurs chez l'Homme ont été déduits à partir d'observations cliniques et d'extrapolation à partir de leurs propriétés pharmacologiques chez l'animal (tableau 3).

Ainsi, les effets analgésiques de la morphine sont principalement dus à l'activation des récepteurs  $\mu$ . Ces récepteurs sont également responsables des effets dépressifs de la respiration, du myosis, de la diminution de la motilité intestinale ainsi que des effets euphorisants induit par cet alcaloïde. D'autre part, il a été montré que chez des souris dépourvues de récepteurs  $\mu$  les opioïdes n'entraînent plus de dépendance, suggérant ainsi l'implication de ces récepteurs dans l'apparition de ce phénomène.

Les agonistes des récepteurs  $\kappa$  possèdent également des propriétés analgésiques par action au niveau médullaire. Cette analgésie n'est pas diminuée chez les animaux devenus tolérants aux agonistes des récepteurs  $\mu$ . Ces substances entraînent également, par le biais de l'activation des récepteurs  $\kappa$ , des effets dysphoriques et psychodysléptiques (sensation de désorientation et/ou de dépersonnalisation).

Enfin, les effets de la stimulation des récepteurs  $\delta$  chez l'Homme ne sont pas bien connus. Cependant, chez l'animal, il a été montré que des agonistes sélectifs de ces récepteurs comme la DPDPE, entraînaient une analgésie tant au niveau médullaire que supramédullaire et que l'inhibition de la néprilysine ou endopeptidase 24-11 par le thiorphan, protégeait les enképhalines (ligands endogènes des récepteurs  $\delta$ ) de leur dégradation et induisait par la même occasion une analgésie chez l'animal dont on avait, au préalable, désensibilisé les récepteurs  $\mu$  grâce à un traitement chronique par la morphine (Bousselmame et coll., 1991).

	Sous-types de récepteurs	Agonistes	Antagonistes
<b>Analgésie</b>			
Supraspinale	$\mu, \kappa, \delta$	Analgésique	Pas d'effet
Spinale	$\mu, \delta, \kappa$	Analgésique	Pas d'effet
Fonction respiratoire	$\mu$	Diminution	Pas d'effet
Tractus gastro-intestinal	$\mu, \kappa$	Diminution du transit	Pas d'effet
Effets psychodysléptiques	$\kappa$	Augmentation	Pas d'effet
Alimentation	$\mu, \delta, \kappa$	Augmentation de la prise de nourriture	Diminution de la prise de nourriture
Sédation	$\mu, \kappa$	Augmentation	Pas d'effet
Diurèse	$\kappa$	Augmentation	
<b>Régulation hormonale</b>			
Prolactine	$\mu$	Augmentation de la libération	Diminution de la libération
Hormone de croissance	$\mu$ et/ou $\delta$	Augmentation de la libération	Diminution de la libération
<b>Libération de neurotransmetteurs</b>			
Acétylcholine	$\mu$	Inhibition	
Dopamine	$\mu, \delta$	Inhibition	
<b>Expérimentations sur des organes isolés</b>			
Iléon de cobaye	$\mu$	Diminution	Pas d'effet
Canal déférent de souris	$\delta$	Diminution	Pas d'effet

**Tableau 3 : Classification des récepteurs aux opioïdes et leurs actions, d'après les données chez l'animal.**

**LE SYSTEME  
NEUROTENSINERGIQUE**

### **III. LE SYSTEME NEUROTENSINERGIQUE :**

#### **III.1 Découverte :**

La neurotensine (NT) est un peptide de 13 acides aminés. Elle fut découverte par Carraway et Leeman en 1973 alors qu'ils cherchaient à purifier la substance P à partir d'hypothalami de Bœuf. Cette substance fut dénommée « neurotensine » car son injection par voie intraveineuse produisait une vasodilatation marquée de la face et des oreilles chez le Rat. C'est d'ailleurs grâce à cette simple réaction vasoactive que la purification de ce peptide pu être menée à bien.

La séquence primaire de la NT est la suivante :



Elle a ensuite été isolée à partir d'intestin grêle de Bœuf (Kitabgi et coll., 1976).

La partie carboxy-terminale (8-13) de la NT correspond à sa fraction minimale active, puisqu'elle porte l'essentiel de ses propriétés pharmacologiques. Cette séquence est très conservée chez tous les autres mammifères étudiés y compris chez l'Homme.

Au niveau central, la NT se comporte comme un neurotransmetteur ou comme un neuromodulateur car après avoir été synthétisée dans les neurones et libérée dans la fente synaptique, celle-ci induit de nombreux effets via son interaction avec des récepteurs spécifiques avant d'être plus ou moins rapidement inactivée par différentes enzymes protéolytiques.

#### **III.2 Biosynthèse et dégradation :**

##### **III.2.1 Biosynthèse :**

L'ADN complémentaire codant le précurseur de la neurotensine, la proneurotensine, a été cloné à partir de cellules de muqueuse intestinale de Chien. Ce précurseur, dont la séquence est très conservée d'une espèce à l'autre, est une protéine de 170 acides aminés. Il est clivé en plusieurs peptides, dont la neurotensine située dans sa partie Carboxy-terminale (Fig.11). Un autre peptide de 6 acides aminés est issu de la même région de ce précurseur, il s'agit de la neuromédine N (NN) dont la séquence est : Lys<sup>1</sup>-Ile<sup>2</sup>-Pro<sup>3</sup>-Tyr<sup>4</sup>-Ile<sup>5</sup>-Leu<sup>6</sup>-OH. Cette région carboxy-terminale est également très conservée chez toutes les espèces étudiées.

Ces deux peptides issus du même exon, sont encadrés et séparés par des doublets basiques Lys-Arg qui participent à la maturation du précurseur et qui correspondent aux sites de coupures de prohormones convertases spécifiques (PC). Ils sont donc colocalisés et colibérés.

De par l'organisation de ce précurseur, plusieurs associations peuvent être co-libérées en fonction de l'équipement enzymatique présent dans les tissus considérés. Ainsi, au niveau du cerveau, il y a libération de quantité équivalente de NT et de NN, alors qu'au niveau du tractus gastro-intestinal, il y a libération de NT et d'une forme allongée de la NN car le doublet basique qui la précède n'est peu ou pas clivé.

Chez l'Homme, le gène codant la NT a été mis en évidence sur le chromosome 12.

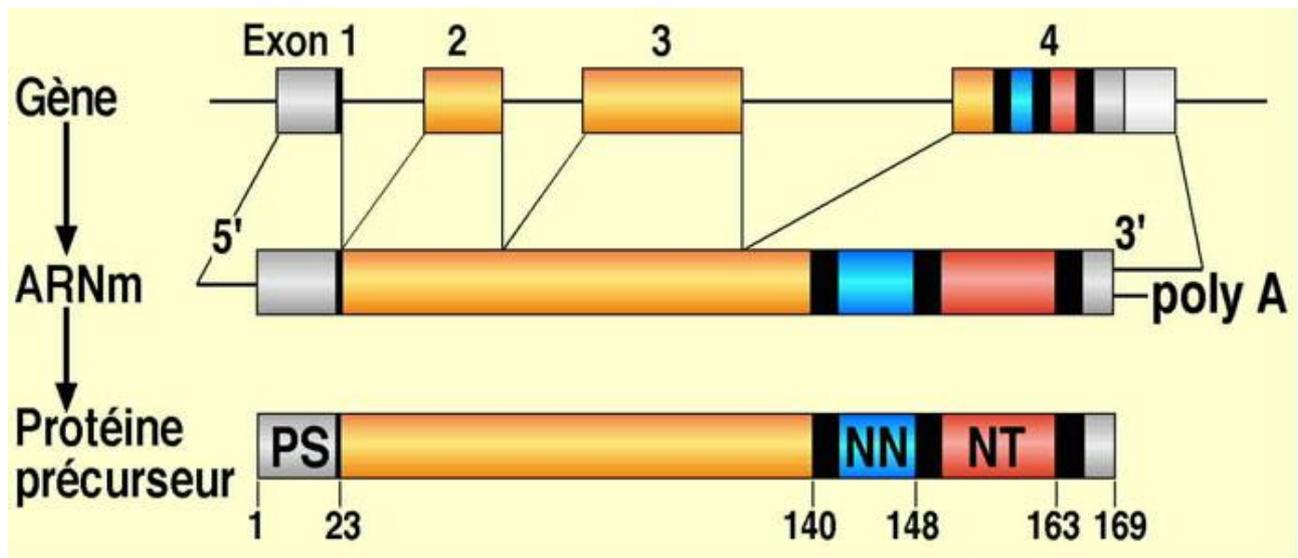


Fig. 11 : Représentation schématique de la transcription du gène codant pour la pro NT-NN de Rat. ■, doublet basique, site de coupure par les prohormones convertases ; PS, peptide signal ; NN et NT, neuromédiine N et neurotensine. D'après Dobner et coll., 1987 ; Kisklauski et coll., 1988.

### III.2.2 Dégradation :

La NT une fois libérée, est rapidement inactivée par des enzymes protéolytiques. Bien que protégée des aminopeptidases grâce à la présence d'un groupement pyro-Glu à son extrémité N-terminale, ce peptide est soumis à l'action de métallo-endopeptidases et de carboxypeptidases, qui agissent principalement au niveau de son pharmacophore en hydrolysant les liaisons Arg<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup>, Pro<sup>10</sup>-Tyr<sup>11</sup>, et Tyr<sup>11</sup>-Ile<sup>12</sup> (fig 12). Ces coupures sont donc inactivantes.

De ce fait, la demi-vie de ce peptide est courte ; elle ne permet pas son passage au travers de la barrière hémato-encéphalique après une administration systémique, qui de ce fait n'induirait pas d'effets centraux.

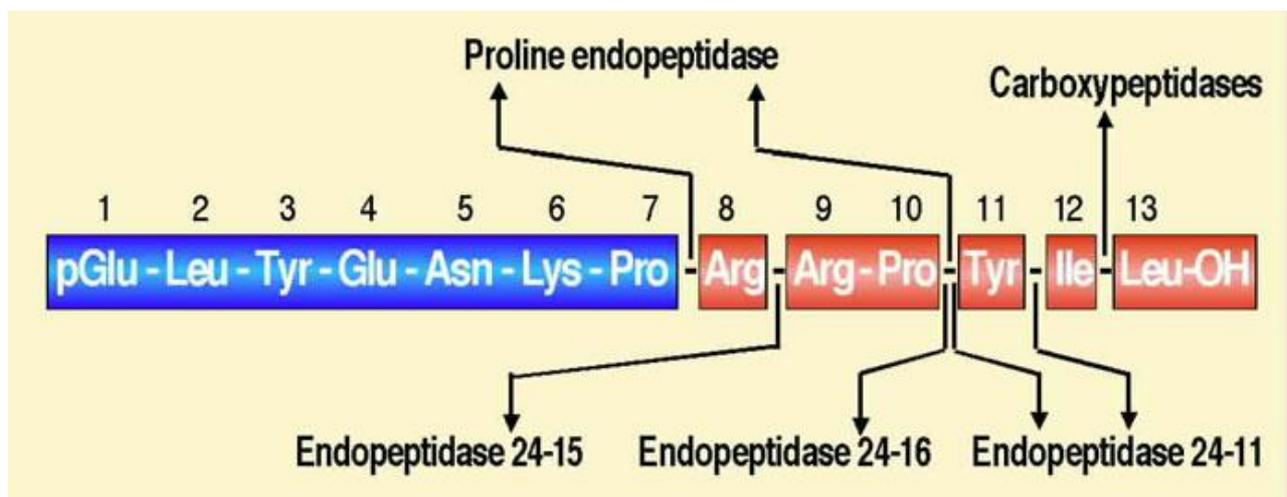


Fig. 12 : Peptidases impliquées dans les coupures primaires de la neurotensine (Checler et coll., 1984, 1985, 1986a, 1986b et 1988).

### III.3 Localisation :

#### III.3.1 Localisation périphérique :

Chez toutes les espèces animales étudiées, la majeure partie de la NT est présente au niveau périphérique et en particulier dans l'intestin : au niveau de l'iléon chez les mammifères ou du duodénum chez des espèces plus primitives. On trouve également de la NT dans le système cardiovasculaire : dans le cœur (ventricule, oreillette, coronaires, sinus carotidien) et dans l'ensemble des veines et des artères (en particulier rénales, pulmonaires, splanchniques et gastro-intestinales).

Au niveau cellulaire, la NT est présente à la fois dans des cellules nerveuses et des cellules endocrines. Ainsi, dans l'intestin, qui est le principal lieu de la synthèse de la NT dans l'organisme, on trouve la neurotensine principalement dans les cellules endocrines N de la muqueuse de l'intestin grêle terminal mais aussi dans les cellules nerveuses de la musculature lisse. Cette double répartition peut être retrouvée dans d'autres organes comme par exemple dans le coeur ou le pancréas exocrine, ce qui suggère que la NT, à la périphérie, peut se comporter à la fois comme un neurotransmetteur ou comme une hormone.

### **III.3.2 Localisation cérébrale :**

Au niveau cellulaire, on trouve la neurotensine au niveau des corps cellulaires et dans les terminaisons nerveuses des neurones au sein de granules de sécrétion à corps dense. A l'inverse, la NT est absente des cellules gliales.

La distribution de la neurotensine dans les différentes régions du cerveau a été étudiée par des techniques radio-immunologiques et immunohistochimiques.

Ces études ont permis de mettre en relation la localisation du peptide et ses différentes propriétés pharmacologiques centrales (fig.13).

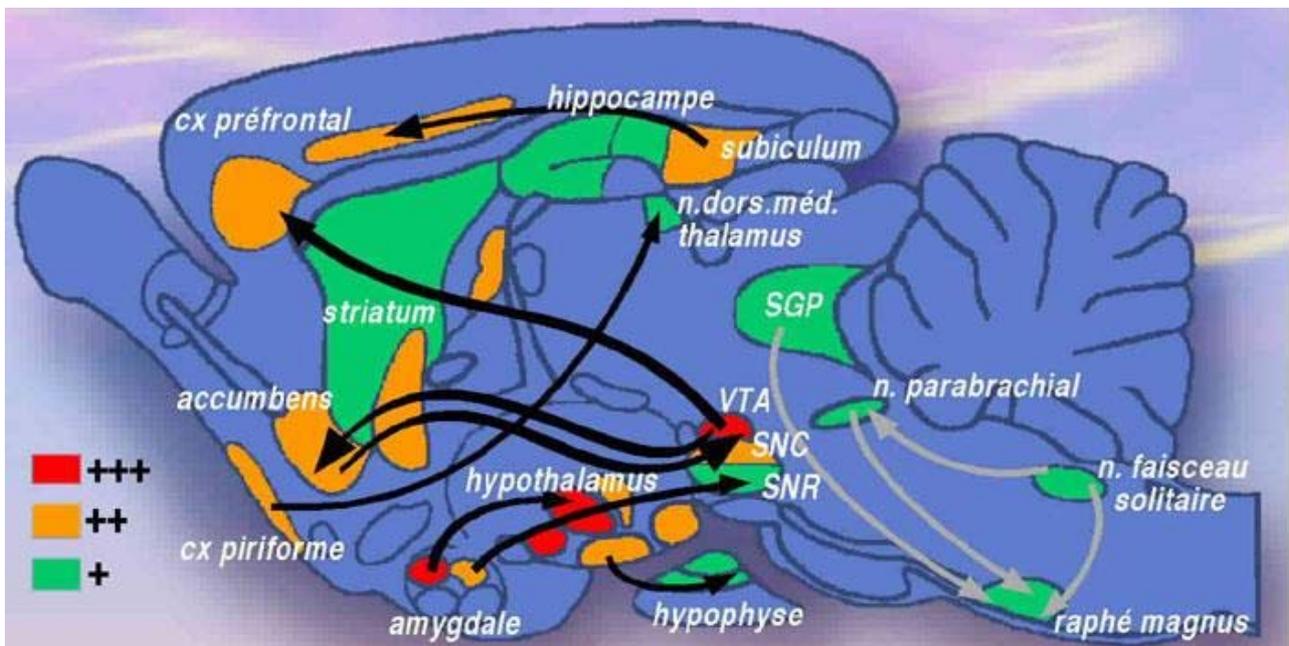
Ainsi, la neurotensine est présente dans des régions impliquées dans le contrôle de la douleur comme les noyaux du raphé magnus, la substance grise périaqueducale, l'aire préoptique ainsi que dans la substance gélatineuse de la moelle épinière.

On trouve également de la neurotensine dans le noyau parabrachial, les noyaux du tractus solitaire ainsi que dans la formation réticulaire ventromédullaire qui sont des régions impliquées dans le contrôle central du système cardiovasculaire.

Enfin, la neurotensine se trouve également dans les régions impliquées dans la thermorégulation comme les noyaux ventromédian de l'hypothalamus et les noyaux dorsomédian du thalamus, l'aire préoptique et les noyaux suprachiasmatiques.

Il a également été montré que la NT était colocalisée avec d'autres neurotransmetteurs comme par exemple l'adrénaline et la noradrénaline dans les noyaux du tractus solitaire mais aussi avec la dopamine dans le mésencéphale, l'aire tegmentale ventrale (ATV), la substance noire et le noyau arqué de l'hypothalamus. La colocalisation de ces deux neuromédiateurs jointe à de nombreuses données pharmacologiques et comportementales ont ainsi permis d'impartir à la NT le rôle de modulateur du système dopaminergique.

La neurotensine est également colocalisée avec d'autres neuropeptides, tel le neuropeptide Y (NPY) dans les noyaux géniculés et suprachiasmatiques qui contrôlent les rythmes circadiens. Ceci est à rapprocher des propriétés anorexigènes de la NT à l'inverse de celles développées par le NPY qui augmente la prise alimentaire.



**Fig.13 : Localisation de la NT dans le SNC du Rat. Coupe sagittale de cerveau ; les flèches visualisent les voies neurotensinergiques/ dopaminergiques mésocorticolimbiques et tubéro-infundibulaire (en noir) et les voies neurotensinergiques/sérotoninergiques (en gris) d'après Kitabgi et coll., 1992. SGP : substance grise périaqueducale ; VTA : aire ventro tegmentale ; SNC et SNR : substance noire compacte et réticulée.**

### **III.4 Principaux effets biologiques et pharmacologiques de la neurotensine :**

#### **III.4.1 Au niveau du système nerveux central :**

La NT ne franchissant pas la barrière hémato-encéphalique, l'étude de ses propriétés centrales a été réalisée en l'injectant directement dans les ventricules cérébraux. Ces injections centrales de NT entraînent une large variété d'effets qui sont soit strictement centraux ou qui ont des répercussions au niveau périphérique, notamment au niveau du système endocrinien.

Parmi ces nombreux effets, la NT entraîne une analgésie aussi puissante que celle développée par les morphiniques, mais elle semble à priori indépendante des voies opioïdiques endogènes puisqu'elle n'est pas supprimée par la naloxone, un antagoniste des récepteurs opioïdes de types  $\mu$  (Clineschmidt et coll., 1979 ; Osbahr et coll., 1981 ; Coquerel et coll., 1988).

La NT induit aussi chez le rongeur (rat, souris), après son administration centrale une hypothermie. On distingue également des effets en rapport avec une diminution des transmissions dopaminergiques en particulier au niveau des voies mésolimbiques. Ils se traduisent par une diminution de l'activité locomotrice spontanée et par une potentialisation des effets sédatifs de l'alcool et des barbituriques. Cependant, il a aussi été observé des effets de type psychostimulant qui se caractérisent par une augmentation de l'activité locomotrice spontanée lors de l'injection de NT dans l'aire tégmentaire ventrale et par des rotations contralatérales après administration striatale unilatérale suggérant une intensification des transmissions dopaminergiques.

L'injection de NT au niveau central entraîne également des modifications de la sécrétion de certaines hormones hypophysaires. Ainsi, elle diminue la libération de prolactine et d'hormone lutéinisante (LH) tout en augmentant la libération d'hormone de croissance (GH).

Enfin il est à noter que l'injection de NT dans diverses aires centrales induit, chez l'animal soumis au préalable à un jeûne, des effets de types anorexigènes.

### **III.4.2 Effets périphériques :**

En périphérie, la NT suscite de nombreux effets, principalement au niveau du tractus gastro-intestinal. En effet, la NT est libérée chez l'Homme dans la circulation sanguine après la prise de nourriture ; elle est impliquée dans la régulation des fonctions digestives. L'injection intraveineuse de NT conduit donc à une diminution des sécrétions acides de l'estomac ainsi qu'à un ralentissement de la vidange gastrique associé à une augmentation des sécrétions du pancréas exocrine (eau, bicarbonate et protéines), à une hyperglycémie et à une hypercholestérolémie.

Au niveau du système cardiovasculaire, les effets de l'injection i.v. de NT sont variables ; ils dépendent du mode opératoire et des espèces étudiés. Ainsi, selon les espèces, la NT peut induire une hypotension ou une hypertension, une vasodilatation ou une vasoconstriction.

L'injection i.v. de NT peut également conduire à des modifications de la libération d'hormones hypophysaires parfois différentes de celles observées lors de l'administration centrale du peptide. On constate alors une augmentation de la libération de prolactine, d'hormone lutéinisante, d'hormone de croissance et de thyroïdostimuline (TSH).

Enfin, la NT se comporte également comme un facteur prolifératif sur diverses lignées de cellules cancéreuses.

### **III.5 Les récepteurs de la neurotensine :**

L'existence de plusieurs récepteurs de la NT a été initialement suggérée grâce à l'emploi d'un ligand radiomarqué, la  $^{125}\text{I-Tyr}^3\text{-NT}$ , qui a permis la mise en évidence de deux sites de liaison de la NT dans le cerveau de Rat (Sadoul et coll., 1984). Ces expériences de radioligand ont révélé l'existence d'un site dit de « haute affinité » ( $K_d = 0,1-0,3 \text{ nM}$  ;  $B_{\text{max}} = 12 \text{ fmol / mg de protéines}$ ) et d'un site dit de « basse affinité » ( $K_d = 4-5 \text{ nM}$  ;  $B_{\text{max}} = 150 \text{ fmol / mg de protéines}$ ). Ces deux sites présentent une sensibilité différente au  $\text{Na}^+$  et au GTP : l'affinité du site de haute affinité pour la NT diminue en présence de  $\text{Na}^+$  et de GTP alors que celle du site de basse affinité est moins sensible au  $\text{Na}^+$  et complètement insensible au GTP. Pour les deux sites, les capacités maximales de fixation restent inchangées dans ces conditions. Par la suite, il a été montré que la lévocabastine,

qui est un antagoniste des récepteurs histaminergiques H1, déplace sélectivement la NT de ses sites de « basse affinité », sans affecter sa liaison aux sites de « haute affinité » (Schotte et coll., 1986).

De plus, alors que les sites de « haute affinité » sont présents chez les animaux dès la naissance, les sites de « basse affinité » n'apparaissent que chez l'animal adulte (Schotte et Laduron, 1987 ; Kitabgi et coll., 1987).

Actuellement, trois récepteurs, appelés NTS1, NTS2 et NTS3, ont été clonés. NTS1 (Tanaka et coll., 1990) et NTS2 (Mazella et coll., 1996 ; Chalon et coll., 1996) appartiennent à la famille des récepteurs à sept hélices transmembranaires couplés aux protéines G (Fig.14). Ils correspondent respectivement aux sites de « haute » et de « basse » affinité cités précédemment. Les principales caractéristiques des récepteurs NTS1 et NTS2 sont résumées dans le tableau 4.

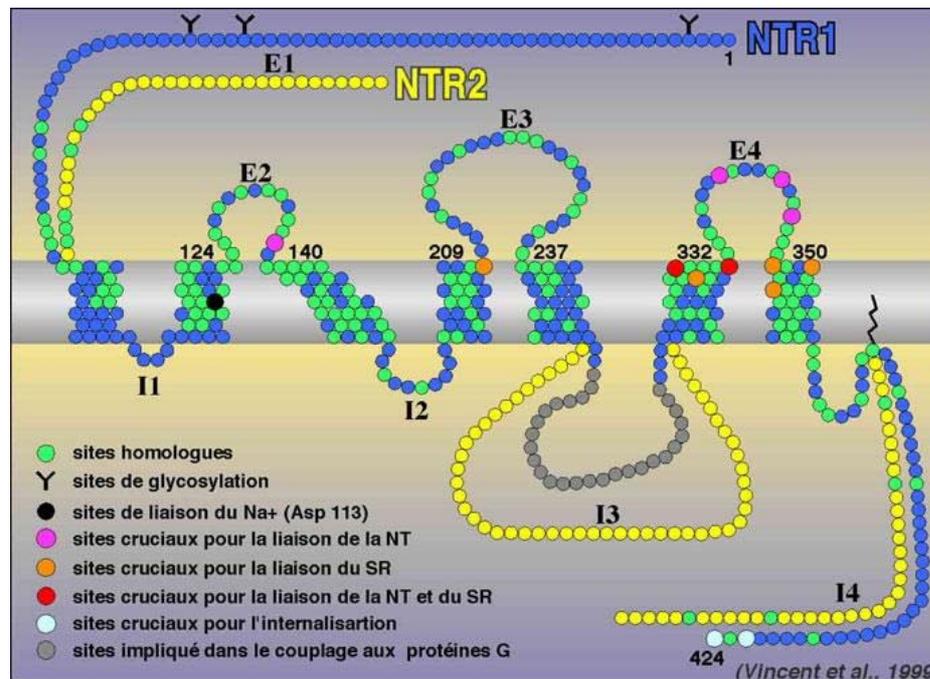


Fig.14 : Représentation schématique des récepteurs NTS1 et NTS2, d'après Vincent et coll., 1999).

	NTS1	NTS2
Clonage	Rat, Souris, Homme	Rat, Homme, Souris
Gène	Chromosome 2 (souris), chromosome 20 (Homme)	Chromosome 12 (souris)
Variant d'épissage	Non	Oui (non fonctionnel)
Pharmacologie :		
Constante de dissociation (Kd)	0,1 à 0,3 nM	1 à 4 nM
Séquence de la NT reconnue	NT (8-13)	NT (8-13)
Sensibilité à la lévocabastine	Non	Oui
Sensibilité aux ions sodium (IC50)	Forte 15-30 mM	Faible 200-300 mM
Sensibilité au GTP	Oui	Non
Mécanismes de transduction	Phospholipase C Adénylate Cyclase GMPc (indirect)	Phospholipase C (oocyte de xénope) MAP kinases (Humain)
internalisation	Oui	Oui Non (cellules gliales)
Recyclage	Non	Oui
Lignée cellulaire exprimant ces récepteurs	Neuroblastome N1-E115, Neurones en culture primaire Nombreuses cellules cancéreuses.....	Cellules gliales en culture primaire
Effets biologiques	Mouvement rotatoire	Analgésie

**Tableau 4 : Caractéristiques comparées des récepteurs couplés aux protéines G de la neurotensine NTS1 et NTS2 .**

Le NTS3 ne comporte qu'un seul domaine transmembranaire et n'est pas exprimé initialement à la surface des neurones. Il est identique à la gp95/sortiline (Petersen et coll., 1997) et ses fonctions sont encore hypothétiques (Fig. 15). Ces trois récepteurs reconnaissent la même séquence 8-13 C-terminale de la NT.

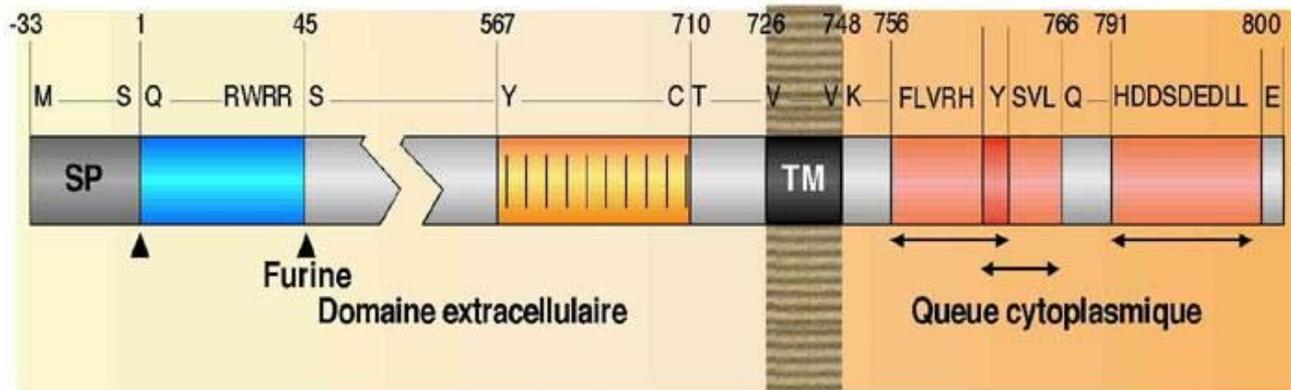


Fig.15 : Séquence du NTS3/gp95 sortiline. SP : peptide signal, en bleu : propeptide 1-44 libéré par la furine, en jaune le domaine riche en cystéines homologues à Vps 10p, TM : domaine transmembranaire, en orange, les trois domaines homologues au récepteur mannose 6-phosphate/IGF-II. D'après Vincent et coll., 1999.

### III.5.1 Localisation des récepteurs NTS1 et NTS2 :

Au niveau central, les récepteurs NTS1 de la neurotensine sont trouvés exclusivement au niveau des neurones tandis que les récepteurs NTS2 sont trouvés à la fois au niveau neuronal et glial. Des études d'immunohistochimie et de radioliation ont montré que la distribution des récepteurs NTS1 au niveau central est limitée à quelques régions dont le bulbe olfactif, le cortex cingulé, la substance noire et l'aire du tegmentum ventral. Des concentrations plus modestes sont trouvées dans le striatum, l'hippocampe, la substance grise périaqueducale et dans les colliculi superior.

La distribution des récepteurs NTS2 a été étudiée de façon indirecte par l'emploi de lévocabastine comme antagoniste des sites de « basse affinité » (Kitabgi et coll., 1987) et de façon plus directe par l'emploi de lévocabastine tritiée (Asselin et coll., 2001). Elle apparaît plus diffuse que celle des récepteurs NTS1. On observe des zones de forts marquages au niveau des aires corticales (cortex préfrontal, pariétal, cingulé, occipital, temporal et insulaire), dans le cortex cérébelleux, dans la formation hippocampique et dans les colliculi supérieur i.e les tubercules quadrijumeaux antérieurs. Les récepteurs NTS2 sont également trouvés dans les régions impliquées dans le contrôle de la douleur : la substance grise périaqueducale, le noyau du raphé magnus, les

noyaux réticulaire gigantocellulaire et paragigantocellulaire latéral. Cependant on ne met pas en évidence de récepteurs NTS2 dans la substance noire ni dans l'aire tégmentaire ventrale.

Au niveau périphérique, les récepteurs NTS1 sont trouvés principalement au niveau du côlon, du foie et du duodénum tandis que les récepteurs NTS2 sont surtout présents dans le tractus gastro-intestinal et dans l'utérus.

### **III.5.2 Fonctions pharmacologiques imparties au NTS1 et NTS2 :**

Les activités pharmacologiques développées par la NT au niveau central et périphérique sont extrêmement variées et dans la plupart des cas on ne sait pas auquel des récepteurs clonés revient l'effet pharmacologique observé. Cela n'a été élucidé partiellement que pour deux de ces effets ; il s'agit de l'effet analgésique et des effets modulateurs des transmissions dopaminergiques de la NT.

En effet, de nombreuses études portant sur les NTS1 ont montré qu'ils étaient impliqués dans la régulation des transmissions dopaminergiques. Les activités hypothermisante et analgésique de la neurotensine ne semblent pas dues à l'activation de ces NTS1, car la capacité d'analogues peptidiques de la NT d'induire une hypothermie et une analgésie n'est pas corrélée avec leur affinité pour les NTS1 (Labbé-Jullié, 1994). De plus, le SR48692 (un antagoniste sélectif des NTS1, non peptidique) est incapable de supprimer ces effets (Dubuc et coll., 1994) suggérant ainsi qu'ils mettraient en jeu d'autres récepteurs non encore identifiés. Plus récemment, l'étude des effets de la NT effectuée chez des souris dépourvues de récepteurs NTS1 générées par deux groupes différents a abouti à des résultats contradictoires en ce qui concerne l'analgésie : en effet, Pettitbone et coll. (2002) ont mis en évidence une disparition des effets analgésiques de la NT dans l'épreuve de la plaque chaude, alors qu'au contraire Remaury et coll. (2002) ont montré que l'effet analgésique de la NT persistait chez ces souris dépourvues de ces récepteurs NTS1 dans l'épreuve des crampes abdominales.

L'implication des récepteurs NTS2 dans l'effet analgésique de la NT a été mis en évidence par l'injection intracérébroventriculaire répétée d'oligodéoxynucléotides antisens dirigés contre l'ARN messager de NTS2 chez la Souris. Une diminution significative du nombre de récepteurs NTS2 et une réduction de l'effet analgésique du peptide ont alors été observées, sans que les récepteurs NTS1 ne soient affectés par ce traitement (Dubuc et coll., 1999). Il a été également montré que l'activité analgésique d'analogues peptidiques de la NT était corrélée avec leur affinité pour les récepteurs NTS2.

En outre, l'injection centrale de lévocabastine induit une analgésie discrète dans l'épreuve des crampes abdominales chez la Souris et ramène à son effet propre l'effet analgésique de la NT lors d'une co-administration (Dubuc et coll., 1999), ce qui sous-entend qu'elle se comporte comme un agoniste partiel de NTS2.

De par la localisation cérébrale des récepteurs NTS2 et leur implication dans l'effet analgésique de la NT qui est aussi puissant que celui produit par la morphine, le développement d'agonistes peptidiques sélectifs des récepteurs NTS2 semble constituer une stratégie intéressante pour développer une nouvelle famille d'agents analgésiques. En effet ces composés pourraient constituer une alternative thérapeutique aux opioïdes dans tous les cas où ceux-ci s'avèrent inefficaces ou insuffisants. Cependant, plusieurs publications récentes font état d'interactions entre les systèmes endorphinergique et neurotensinergique. L'intérêt d'une telle approche dépend pour une bonne part du degré d'interaction entre ces deux systèmes.

**ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES  
SYSTEMES NEUROTENSINERGIQUES ET  
ENDORPHINERGIQUES CENTRAUX**

## **IV. Etude des interactions entre les systèmes neurotensinergiques et endorphinergiques centraux :**

### ***IV.1 Introduction :***

Les premières études portant sur l'analgésie induite par la NT ont montré qu'elle n'était pas inhibée par la naloxone, un antagoniste non discriminant des récepteurs opioïdes, montrant ainsi que la NT agit indépendamment de ces récepteurs opioïdes (Clineschmidt et coll., 1979 ; Osbahr et al., 1981 ; Coquerel et coll., 1988). Cependant, Luttinger et coll. (1983) ont observé que chez des souris rendues tolérantes à la morphine, l'effet analgésique de la NT était fortement diminué.

Des données plus récentes suggèrent aussi l'existence d'une interaction entre les systèmes opioïdiques et la NT. En effet, Stiller et coll. (1997) ont montré que la perfusion au travers d'une sonde de microdialyse d'une solution de morphine (10  $\mu$ M) ou d'un agoniste des récepteurs  $\mu$ , le DAGO (1  $\mu$ M), dans la substance grise périaqueducule (SGPA) de rats, entraîne une augmentation significative de la libération de NT dans cette structure ; cette augmentation étant supprimée par l'administration de naloxone.

Il a ensuite été montré que l'analgésie induite par la micro-injection d'un agoniste des récepteurs opioïdes  $\mu$  dans le noyau basolatéral de l'amygdale pouvait être abolie ou diminuée par l'administration préalable dans la SGPA d'un antagoniste  $\mu$  ou d'un antagoniste partiel de la NT, la [D-Trp11] NT (Tershner et Helmstetter, 2000). L'analgésie produite en réponse à la stimulation de l'amygdale passerait donc par une activation des récepteurs  $\mu$  mais aussi par une libération de NT dans la SGPA.

Enfin, en 2001, Asselin et coll. ont étudié par autoradiographie la localisation des récepteurs NTS2 chez le Rat, en utilisant la lévocabastine tritiée comme radioligand. Ils ont montré que des NTS2 étaient présents au niveau de la SGPA et au niveau des colliculi supérieurs, deux structures impliquées dans le contrôle descendant de la douleur qui comportent des récepteurs opioïdes de type  $\mu$  (Akill et coll., 1998).

Dans le dessein du développement d'une nouvelle stratégie analgésique alternative aux opioïdes et prenant appui sur les récepteurs NTS2, nous nous sommes principalement attachés à l'étude des relations qui existent entre la NT et les systèmes endorphinergiques. En effet, l'intérêt d'une telle approche dépend du degré d'interaction entre ces deux systèmes.

Après avoir montré que la lévocabastine supprimait l'effet analgésique du NT1 (N<sup>α</sup>MeArg-Lys-Pro-Trp-Ile-tLeu-OH), un agoniste des récepteurs de la NT actif par voie systémique, nous avons recherché si la lévocabastine était capable de s'opposer à l'analgésie produite par la morphine.

Ayant constaté que les souris tolérantes à la morphine présentaient une tolérance à l'effet analgésique de la NT, nous avons recherché l'apparition d'une tolérance au NT1, chez des souris traitées de façon chronique par la morphine.

Nous avons aussi étudié, chez la Souris, l'incidence d'un traitement semi-chronique par le NT1 sur l'analgésie produite par la morphine. Au vu de ces résultats nous avons étudié les effets de la naloxone sur l'analgésie produite par le NT1.

Ces études ont été complétées chez les animaux traités par la morphine par une étude d'autoradiographie quantitative nous permettant de visualiser une éventuelle modification de la densité des récepteurs NTS1 et NTS2 dans la SGPA et les colliculi superior, deux régions impliquées dans le contrôle descendant de la douleur.

## **IV.2 Matériel et méthodes :**

### **IV.2.1 Animaux**

Les expériences ont été réalisées sur des souris, mâles, albinos, de la souche Swiss, CD1 (Charles River, les Oncins, France), pesant de 18 à 20 grammes à leur arrivée au laboratoire.

Les souris étaient groupées par 20 dans des cages de Makrolon (38×24×18 cm), disposées dans une animalerie ventilée, à une température de 21°C ± 1°C. Elles n'étaient utilisées qu'une semaine au moins après leur arrivée dans le laboratoire. Les animaux avaient accès ad libitum à la nourriture (UAR France) et à un biberon rempli d'eau du robinet.

Un éclairage artificiel établissait un cycle jour/nuit (jour entre 7 et 19h). Les expérimentations étaient effectuées entre 9 heures et 18 heures.

## **IV.2.2 Substances et préparation des solutions**

L'analogue de la NT actif par voie systémique, le NT1 a été dissous dans du soluté physiologique (NaCl 0,9 %).

La lévocabastine a été dissoute dans du DMSO, puis diluée dans du soluté physiologique jusqu'à l'obtention de la concentration recherchée. La concentration finale de DMSO était au maximum de 5%.

## **IV.2.3 Voies d'administration des substances**

Voies intrapéritonéale (i.p.) et sous-cutanée (s.c.) : les substances étaient injectées sous un volume de 10 ml par kg de poids corporel.

## **IV.2.4 Epreuve d'analgésie :**

L'activité analgésique a été évaluée par l'épreuve de la plaque chaude (Eddy et coll., 1953) : les animaux étaient placés sur une plaque de cuivre chauffée à  $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Leur déplacement était restreint par un cylindre en plexiglas transparent (diamètre : 14 cm, hauteur : 20 cm) et les latences de lèchement des pattes et de saut des souris ont été mesurées. Afin d'éviter une lésion des tissus, la durée de l'épreuve était limitée à 4 min.

## **IV.2.5 Autoradiographie quantitative :**

Les cerveaux ont été prélevés et immédiatement immergés pendant 2 min. dans l'isopentane refroidi à  $-30^{\circ}\text{C}$  ; ils ont été ensuite conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Des coupes de 14  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à l'aide d'un cryotome Microm (microtome-cryostat, cryo-star.HM 560 MV) à  $25^{\circ}\text{C}$  et déposées sur des lames traitées au préalable par un mélange d'alun de chrome et de gélatine.

La liaison totale était déterminée en incubant les lames 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$  dans un tampon tris base/serum albumine bovine (BSA) (Tris 50 mM, BSA 0,1%, pH 7,4) en présence de [ $^3\text{H}$ ]-neurotensine 4 nM (activité spécifique : 109 Ci/mmmole). La liaison non spécifique était mesurée

dans les mêmes conditions, en présence de neurotensine « froide » ( $10^{-6}$  M), sur des coupes adjacentes. En outre, des coupes adjacentes étaient incubées en présence de lévocabastine ( $10^{-6}$  M).

Les lames étaient ensuite rincées à 4 reprises pendant 2 min., dans le tampon tris base/BSA, puis séchées pendant 20 min. sous un courant d'air froid. Elles étaient ensuite exposées pendant 24 heures dans un  $\beta$ -Imager 2000 (biospace Mesure) qui effectue une analyse en temps réel grâce à la chambre à avalanche à plaques parallèles (pour revue, Coquerel et coll., 1996), afin de vérifier la validité des expériences dans de brefs délais. Les lames étaient ensuite apposées dans des cassettes X-Omatic (Kodak) sur des films Biomax MR (Kodak), pendant 6 semaines, avec des bandes standards tritiées (Amersham) (pour revue, Miller, 1991).

Les films ont été révélés pendant 2 min. dans un révélateur D/19 (Kodak) puis, après passage dans l'eau froide, fixés dans un fixateur AL/4 (Kodak). Les autoradiogrammes ont été placés sur un banc optique, sous une caméra reliée à un système d'analyse d'image informatisé Alcatel TITN Answare (SAMBA).

Une gamme d'étalonnage a été réalisée à partir de la mesure de la densité optique des standards tritiés dont l'activité spécifique est connue. La densité optique était ensuite mesurée dans différentes régions cérébrales, convertie en densité de sites de liaison du ligand en fonction de la gamme d'étalonnage et exprimée en fmol/mg "d'équivalent tissu". La liaison spécifique était obtenue par soustraction de la liaison non spécifique de la liaison totale pour chaque coupe.

#### **IV.2.6 Expression et analyse statistique des résultats**

Les résultats sont exprimés par la moyenne (M) des valeurs individuelles, affectées de l'erreur standard à la moyenne (S.E.M).

La comparaison de 2 moyennes est effectuée par un test t de Student.

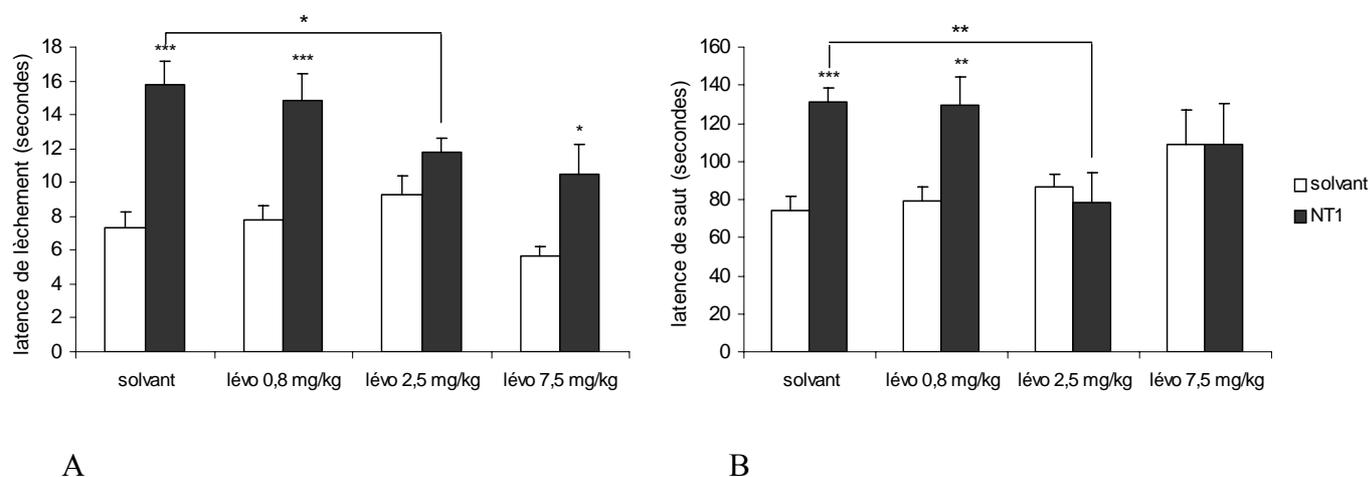
La comparaison de plusieurs moyennes à la moyenne d'un groupe témoin est effectuée par un test de Dunnett.

La comparaison de plusieurs facteurs est effectuée par une analyse de variance (ANOVA à 1 ou 2 facteurs) suivie du test statistique approprié.

### IV.3 Résultats :

#### IV.3.1 Recherche de l'antagonisme des effets analgésiques du NT1 par la lévocabastine dans l'épreuve de la plaque chaude :

Dans cette expérience, la lévocabastine a été administrée chez la Souris, par voie i.p, à dose croissante, 15 min. avant l'injection s.c du NT1, à la dose de 0,3 mg/kg. La mesure de la latence de lèchement des pattes et de saut a ensuite été réalisée 1 heure après l'injection du peptide.



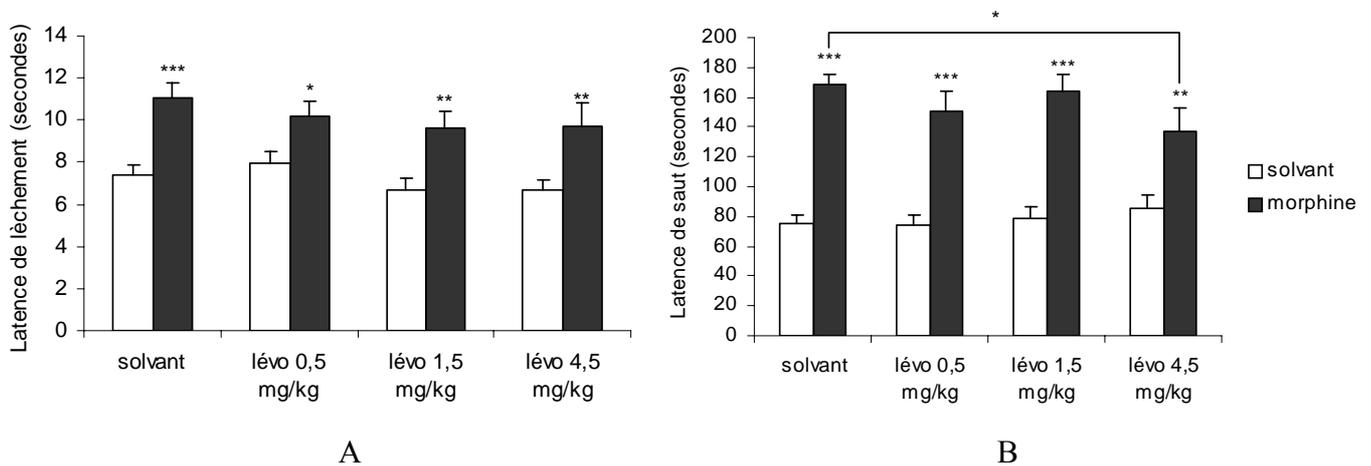
**Fig. 16 : Antagonisme des effets analgésiques du NT1 par la lévocabastine (lévo) dans l'épreuve de la plaque chaude. Les latences de lèchement des pattes (A) et de saut (B) ont été mesurées 1 heure après l'injection de solvant (colonne blanche) ou de NT1 (colonne noire) à la dose de 0,3 mg/kg par voie s.c.  $M \pm SEM$  de 8 animaux par lot ; \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ; \*\*\* :  $P < 0,001$ .**

La lévocabastine à la dose de 2,5 mg/kg a significativement réduit la latence de lèchement des pattes des animaux recevant le NT1 à la dose de 0,3 mg/kg (Fig.16A). Lorsque l'on considère la latence de saut (Fig.16B) des animaux la lévocabastine a antagonisé dès la dose de 2,5 mg/kg l'effet analgésique du NT1. A la plus forte dose testée (7,5 mg/kg), les latences de saut des animaux traités par le NT1 et recevant la lévocabastine tendent à augmenter par rapport à celles des animaux traités par le NT1 et recevant de la lévocabastine à la dose de 2,5 mg/kg. Cependant cette latence de saut n'est pas significativement différente de la latence de saut des animaux recevant la lévocabastine seule à la dose de 7,5 mg/kg, ce qui suggère qu'à cette dose des effets intrinsèques de la lévocabastine commencent à apparaître.

### IV.3.2 Recherche d'un antagonisme des effets analgésiques de la morphine par la lévocabastine :

Stiller et coll. (1997), injectant de la morphine dans la SGPA ont induit une libération de NT établissant ainsi l'existence d'une interaction entre les systèmes neurotensinergique et endorphinergique.

Pour appuyer cette observation par une approche fonctionnelle, nous avons étudié l'effet de la lévocabastine sur l'analgésie induite par la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude. Dans cette expérience, la morphine a été administrée à la dose de 2 mg/kg par voie s.c., à des souris ayant reçu 15 min. auparavant de la lévocabastine, par voie i.p., à des doses allant de 0,5 mg/kg à 4,5 mg/kg.



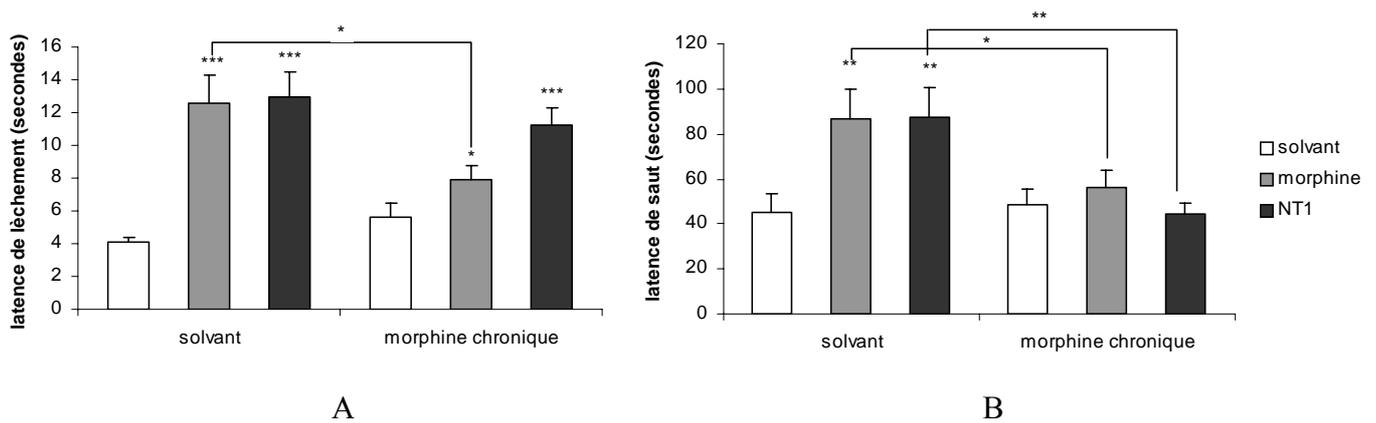
**Fig. 17 : Recherche d'un antagonisme de l'effet analgésique de la morphine par la lévocabastine (lévo) dans l'épreuve de la plaque chaude. Les temps de latence de léchement des pattes (A) et de saut (B) ont été mesurés 20 min. après l'injection de solvant ou de morphine à la dose de 2mg/kg par voie s.c. Sont comparés les lots recevant les différentes doses de lévocabastine avec les lots recevant les différentes doses de lévocabastine et la morphine et enfin le lot recevant la morphine avec les lots recevant les différentes doses de lévocabastine et la morphine. M ± SEM de 16 animaux par lot ; \* : P<0,05 ; \*\* : P<0,01 ; \*\*\* : P<0,001**

A la dose de 4,5 mg/kg, la lévocabastine, intrinsèquement sans effet, diminue la latence de saut des animaux traités par la morphine (Fig. 17B). Cependant, cette réversion n'est pas totale puisque la latence de saut des animaux recevant la lévocabastine et la morphine reste significativement plus élevée que celle du groupe témoin. La lévocabastine inhibe donc partiellement à cette dose l'effet analgésique de la morphine.

### **IV.3.3 Etude de l'effet d'un traitement semi-chronique par la morphine sur l'activité analgésique du NT1 :**

La lévocabastine inhibant partiellement l'effet analgésique de la morphine, nous avons recherché si l'administration de ce composé parvenait à prévenir le développement de la tolérance à l'effet analgésique du NT1 et de la morphine chez des souris traitées de façon semi-chronique par la morphine.

Dans notre protocole, les souris ont été rendues tolérantes à la morphine par l'injection deux fois par jour, pendant 4 jours, de morphine à la dose de 32 mg/kg par voie s.c. Le NT1 ou la morphine ont été administrés le cinquième jour aux doses respectives de 0,3 et 2 mg/kg. Le temps entre leur administration et la mesure de latence du saut est de 1 heure.



**Fig.18 : Effet du traitement semi-chronique par la morphine sur l'activité analgésique du NT1 et de la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude. Le NT1 (0,3 mg/kg) ou la morphine (2 mg/kg) ont été administrés par voie s.c chez des souris prétraitées de façon semi-chronique par la morphine en s.c (2×32 mg/kg/jour pendant 4 jours). Sont mesurés les latences de léchement des pattes (A) et de saut (B). Le lot témoin a été comparé avec les autres lots, le lot recevant le NT1 l'a été avec le lot recevant la morphine en chronique ainsi que le NT1 ; enfin le lot recevant la morphine en aigu a été comparé aux lot recevant la morphine soit de façon aiguë soit de façon chronique. M±SEM de 8 animaux par lot. \* : P<0,05 ; \*\* : P<0,01 ; \*\*\* : P<0,001.**

Le traitement semi-chronique par la morphine à forte dose a rendu les souris tolérantes aux effets analgésiques de la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude à la fois dans l'épreuve du léchement (Fig.18A) et du saut (Fig. 18B). Dans cette dernière épreuve (Fig.18B), chez les animaux ayant développé une tolérance à la morphine, on constate une tolérance totale aux effets analgésiques du NT1.

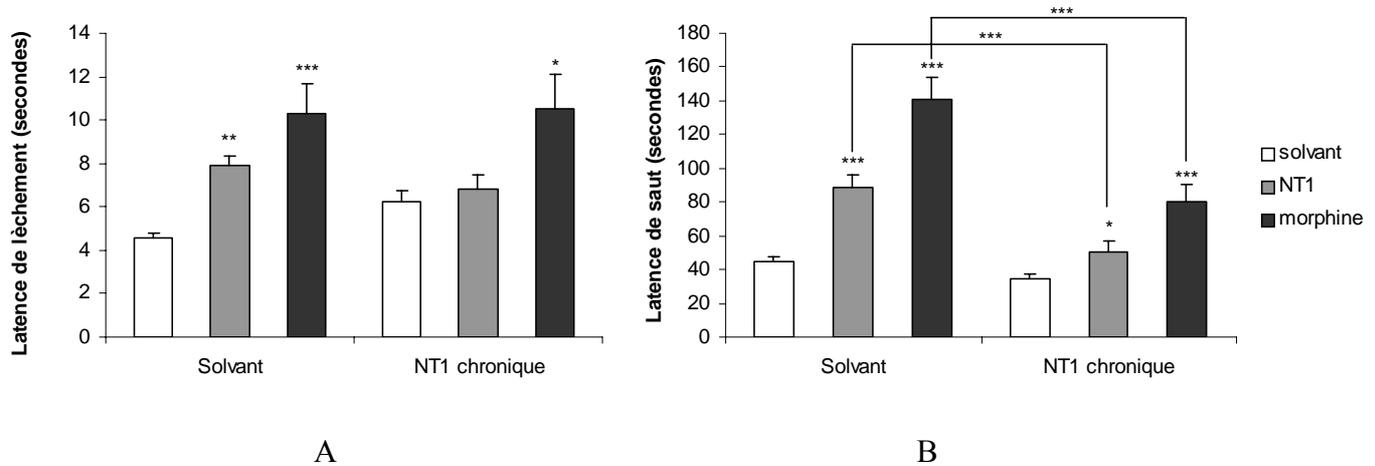
#### **IV.3.4 Etude de l'effet d'un traitement semi-chronique par le NT1 sur l'analgésie induite par la morphine :**

Pour évaluer les effets d'un traitement chronique par un agoniste des récepteurs NTS2 sur l'analgésie produite par la morphine, nous avons utilisé le NT1 dont la dose liminaire active est faible (0,1 mg/kg) et qui présente une longue durée d'action (2 heures) (Sarhan et coll., 1997).

Les souris ont reçu du soluté physiologique (0,20 ml/20g) ou du NT1 à la dose de 0,3 mg/kg par voie s.c. deux fois par jour pendant 4 jours.

Le cinquième jour, chaque groupe d'animaux (traités et témoins) a été divisé en trois sous groupes qui ont reçu respectivement du soluté physiologique, du NT1 (0,3 mg/kg) ou de la morphine (2mg/kg) par voie s.c.

1 heure après l'administration s.c. des produits, les animaux étaient soumis à l'épreuve de la plaque chaude.



**Fig.19 : Effet d'un traitement semi-chronique par le NT1 sur l'analgésie produite par le NT1 et la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude. Le NT1 (0,3mg/kg) ou la morphine (2mg /kg) ou leur solvant ont été administré par voie s.c. à des souris témoins ou des souris prétraitées de façon chronique par le NT1 (2 x 0,3 mg/kg /jour pendant 4 jours) par voie s.c. Les temps de latence de léchage des pattes (A) ou de saut (B) ont été mesurés 1 heure après l'injection aiguë de NT1, de morphine ou de leur solvant. Sont comparés le lot témoin avec les lots recevant la morphine en aigu et le NT1 en aigu, le lot témoin avec le lot recevant le NT1 en chronique, le lot recevant à la fois le NT1 en aigu et le NT1 en chronique avec le lot recevant le NT1 en aigu et le lot recevant à la fois le NT1 en chronique et la morphine en aigu. Sont également comparés le lot recevant la morphine en aigu avec le lot recevant à la fois le NT1 en chronique et la morphine en aigu. M ± SEM de 10 animaux par lot. \* : P< 0,05 ; \*\* : P< 0,01 ; \*\*\* : P< 0,001.**

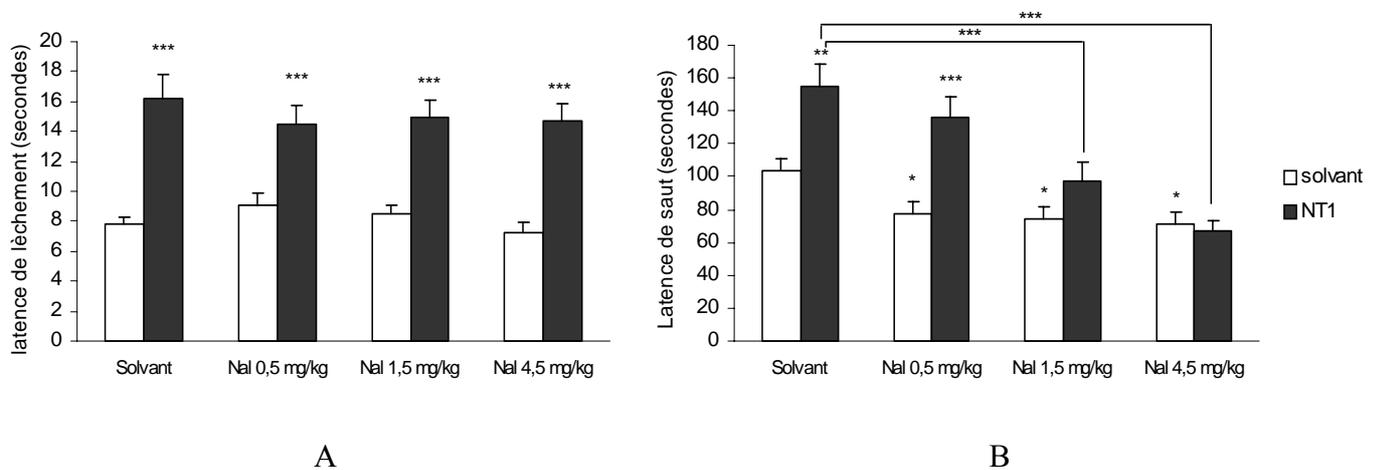
Le traitement semi-chronique par le NT1 (0,3 mg/kg 2 fois par jour pendant 4 jours) a induit une tolérance à l'effet analgésique de ce peptide puisque l'on observe une diminution significative de la latence de saut chez les animaux traités de façon semi-chronique par le NT1 par rapport aux animaux témoins lorsqu'on leur administre une dose de NT1 (0,3 mg/kg) (Fig. 19B).

De la même façon, les animaux prétraités par le NT1 et recevant une administration unique de morphine (2 mg/kg) présentent une latence de saut significativement réduite par rapport aux animaux témoins recevant la morphine. Cependant, cette tolérance partielle n'est pas retrouvée quand on considère la latence de léchage (Fig. 19A).

### IV.3.5 Etude des effets de la naloxone sur l'activité analgésique du NT1 :

Ayant montré qu'un traitement semi-chronique par le NT1 entraînait chez la Souris une tolérance partielle aux effets analgésiques de la morphine, nous avons ensuite voulu évaluer les effets de la naloxone, un antagoniste non discriminant des récepteurs opioïdes dans l'épreuve de la plaque chaude sur l'analgésie produite par le NT1.

Pour cela, les souris ont été traitées par la naloxone à différentes doses (0,5 mg/kg ; 1,5 mg/kg ; 4,5 mg/kg) par voie s.c puis, 15 min. après elles reçoivent une injection s.c de NT1 à la dose de 0,3 mg/kg. Une heure après l'administration du peptide ou de son solvant, sont mesurées les latences de lèchement des pattes et de saut.



**Fig.20 : Effet de la naloxone sur l'activité analgésique du NT1. Les latences de lèchement des pattes (A) et de saut (B) ont été mesurées 1 heure après l'injection de solvant (colonne blanche) ou de NT1 (colonne noire) à la dose de 0,3 mg/kg par voie s.c. Sont comparés le lot témoin avec les autres lots et le lot d'animaux recevant le NT1 avec les lots d'animaux recevant le NT1 et les différentes doses de naloxone. M± SEM de 16 animaux par lot ; \* : P< 0,05 ; \*\* : P< 0,01 ; \*\*\* : P< 0,001.**

Quand on considère la latence de lèchement (Fig. 20A), on constate que quelque soit la dose, la naloxone n'a pas modifié l'effet analgésique du NT1. Cependant, la naloxone à la dose de 1,5 mg/kg et de 4,5 mg/kg a supprimé totalement l'effet analgésique du NT1 lorsque l'on considère la latence de saut (Fig. 20B). D'autre part, on constate que la naloxone a un effet hyperalgésiant sur la latence de saut (Fig. 20B).

### IV.3.6 Recherche d'une modification de la densité des récepteurs de la NT dans des régions du cerveau impliquées dans le contrôle de la douleur après un traitement semi-chronique de souris par la morphine.

Après avoir montré que l'administration semi-chronique de morphine, à forte dose, entraînait une tolérance à l'effet analgésique du NT1, nous avons recherché, par la liaison de la [<sup>3</sup>H]NT, une éventuelle modification de la densité des sites NTS1 et NTS2, chez les souris traitées chroniquement par la morphine, dans deux structures cérébrales connues pour être impliquées dans le contrôle descendant de la douleur : la substance grise periaqueducale (SGPA) et les collicules supérieurs.

Pour cela, les souris ont été rendues tolérantes à la morphine par l'injection, deux fois par jour, pendant 8 jours, de morphine, à la dose de 32 mg/kg par voie s.c. . Les cerveaux ont été prélevés au plus tard 24 heures après la dernière injection de morphine.

Pour distinguer la part de la liaison totale de la [<sup>3</sup>H]NT correspondant aux récepteurs NTS2, nous avons utilisé la lévocabastine comme ligand froid, cette dernière étant capable de se lier aux sites NTS2 sans affecter la liaison de la NT aux sites NTS1 (Schotte et coll., 1986).

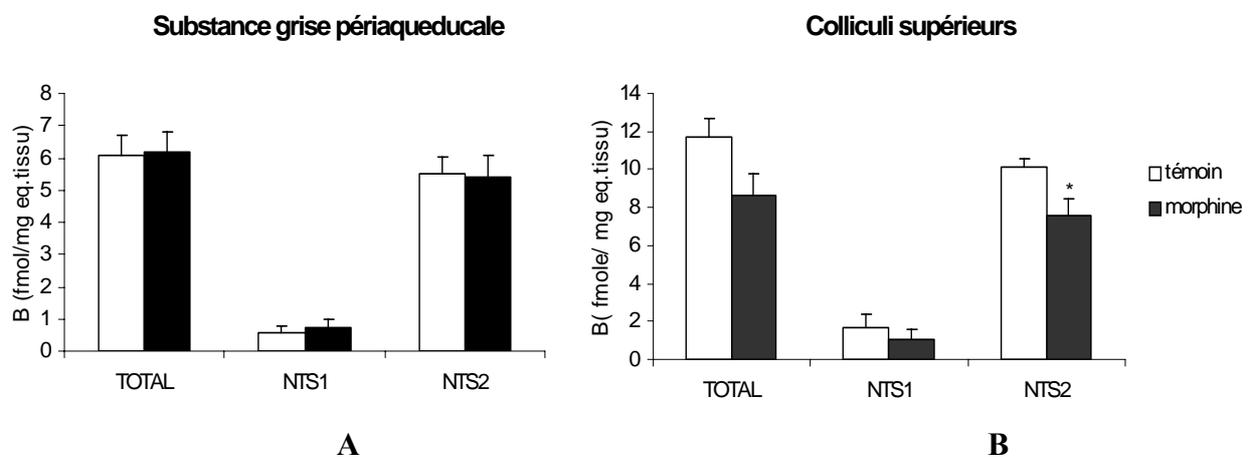
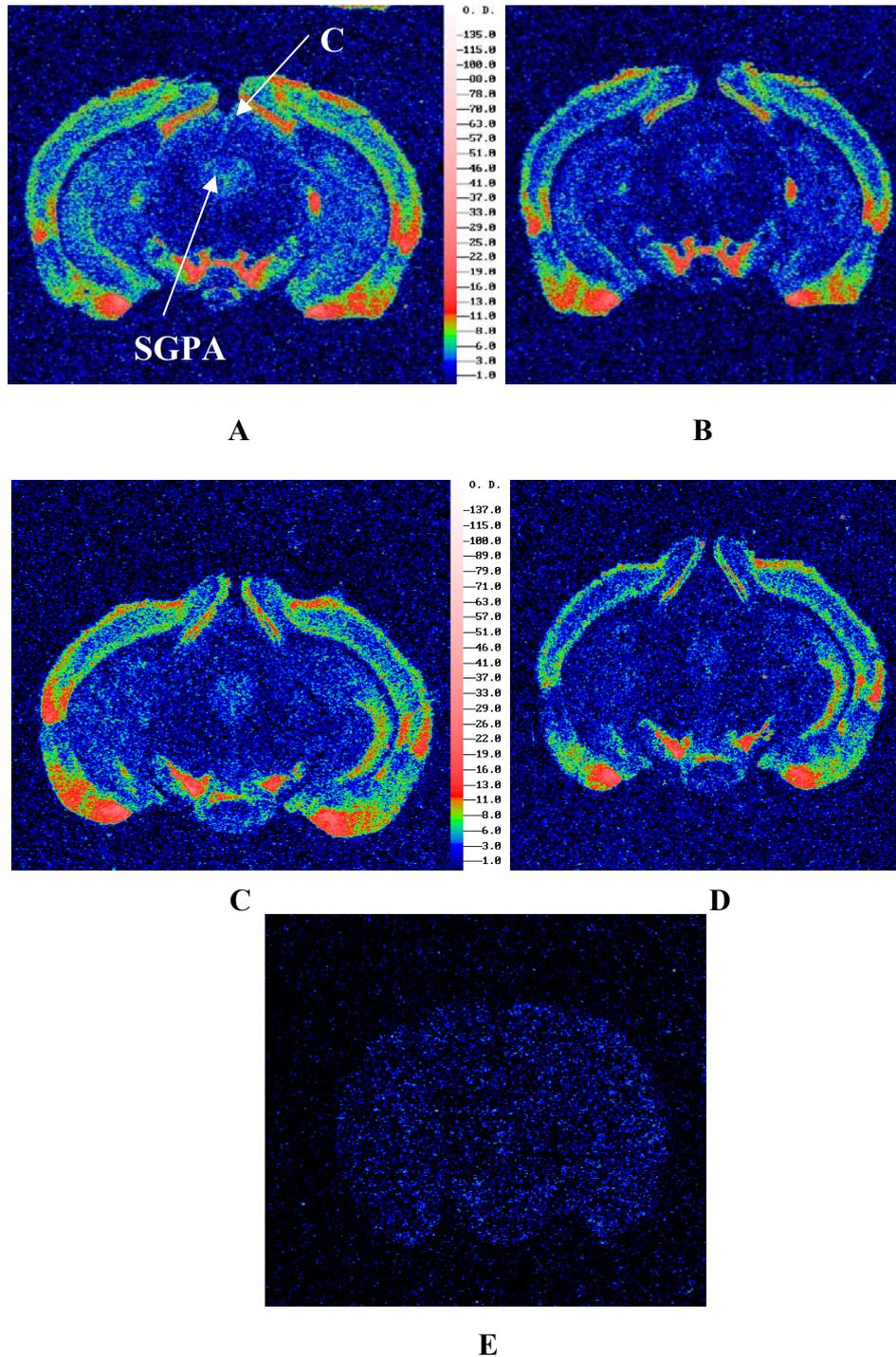


Fig. 21. : Densité des sites NTS1 et NTS2 dans 2 régions cérébrales chez des souris témoins (colonnes blanches) et chez des souris traitées de façon semi-chronique par la morphine (2×32 mg/kg /j pendant 8 jours) (colonnes bleues). M ± SEM de 8 animaux par lot.\* : P<0,05.

Après un traitement semi-chronique par la morphine, aucune variation de la densité des sites NTS1 et NTS2 n'a été observée dans la SGPA (Fig.21A). Dans les collicules supérieurs, on note par contre une diminution significative de la densité des sites NTS2 (environ 25 %) sans modification de la densité des sites NTS1 (fig.21B).



**Fig. 22 : Distribution des sites de liaison de la  $[^3\text{H}]$  NT dans la substance grise periaqueducule (SGPA) et les collicules supérieures (C) de souris (coupes frontales ; position par rapport au Bregma : - 4,24 mm). La section A représente la liaison de la  $[^3\text{H}]$ NT aux récepteurs NTS1 et NTS2 chez les souris témoins, la section B représente la liaison de la  $[^3\text{H}]$ NT aux récepteurs NTS1 après déplacement des récepteurs NTS2 par la lévocabastine chez les souris témoins. Les sections C et D représentent respectivement le même marquage chez les souris traitées de façon semi-chronique par la morphine. La section E représente la liaison non spécifique.**

#### **IV.4 Discussion :**

Nous avons montré que l'administration semi-chronique de morphine, à la dose de 32 mg/kg, 2 fois par jour, pendant 4 jours, outre qu'elle entraînait l'apparition d'une tolérance à l'effet analgésique de la morphine, induisait également une tolérance à l'effet analgésique du NT1 (un analogue de la NT actif par voie systémique) dans l'épreuve de la plaque chaude. Ce résultat est en accord avec celui obtenu par Luttinger et coll. (1983), qui montraient une diminution des effets analgésiques de la NT chez des souris rendues tolérantes à la morphine à la suite de l'implantation s.c., pendant 3 jours, de pellets de morphine.

Pour expliquer ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse d'un relais fonctionnel entre les neurones opioïdergiques et neurotensinergiques, les neurones opioïdergiques pourraient se situer en amont des neurones neurotensinergiques et la libération d'opioïdes susciterait une libération de NT .

Cette hypothèse est soutenue par deux publications relativement récentes. En effet, Stiller et coll. (1997) ont montré que la perfusion de morphine (10  $\mu$ M) ou d'un agoniste  $\mu$ , le DAGO (1 $\mu$ M) dans la SGPA entraîne, dans cette structure une libération de NT ; cette libération étant prévenue par l'administration de naloxone. De plus, Tershner et Helmstetter (2000) ont montré, dans l'épreuve du « tail-flick », que l'analgésie produite par l'injection de DAGO, dans le noyau basolatéral de l'amygdale était diminuée, à la suite de l'administration dans la SGPA, d'un antagoniste des récepteurs  $\mu$ , le CTAP, ou de la [DTrp11] NT, un antagoniste partiel de la NT.

Nous avons ici apporté un élément nouveau en faveur de cette hypothèse, en montrant que l'administration de lévocabastine, à la dose de 4,5 mg/kg réduisait significativement la latence de saut des animaux traités par la morphine à la dose de 2 mg/kg. Cependant, la réduction observée est faible ; ceci pourrait s'expliquer par le fait que les antagonistes des récepteurs H1 sont capables de potentialiser les effets analgésiques de la morphine (Mobarakeh et coll., 2002). Dans ces conditions, l'antagonisme de l'effet analgésique de la morphine par la lévocabastine, bloquant les récepteurs NTS2, pourrait être supérieur à ce qu'il paraît.

Il a été montré au sein de notre laboratoire que l'administration semi-chronique, 2 fois par jour pendant 4 jours de NT1, à la dose de 0,3 mg/kg, par voie sous cutanée, entraînait une tolérance à l'effet analgésique de ce peptide dans l'épreuve de la plaque chaude. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet d'un tel traitement sur l'effet analgésique de la morphine afin de rechercher une éventuelle tolérance croisée qui pourrait rendre moins attractive l'utilisation d'agonistes neurotensinergiques comme analgésiques. Pour ce faire, nous avons utilisé le NT1 car ce peptide

est actif à faible dose et sa durée d'action est longue, ce qui permet de limiter le nombre d'injections à 2 par jour (Sarhan et coll., 1997). Dans notre expérience, le traitement chronique par le NT1, dans les mêmes conditions que celles citées précédemment, a permis de rendre les souris tolérantes à l'effet analgésique de ce peptide et de les rendre partiellement tolérantes à l'effet analgésique de la morphine dans l'épreuve de la plaque chaude. Ceci confirme l'existence d'une participation de la NT aux effets analgésiques de la morphine.

L'inhibition par la lévocabastine ou par le traitement chronique par le NT1 de l'effet analgésique de la morphine n'étant que partielle, on peut supposer que la morphine a d'autres relais fonctionnels comme par exemple les enképhalines. C'est ainsi que Williams et coll. (1995), qui étudiaient la libération basale de Met-enképhaline et de NT dans la SGPA, ont montré que l'administration systémique de morphine entraînait une libération de Met-enképhaline dans cette structure. Pour ces auteurs, la libération de Met-enképhaline qu'ils observent correspondrait en fait à la suppression par la morphine d'un rétro-contrôle négatif exercé par les interneurons GABAergiques sur les neurones enképhalinergiques de la SGPA.

Cette hypothèse est illustrée par le schéma suivant :

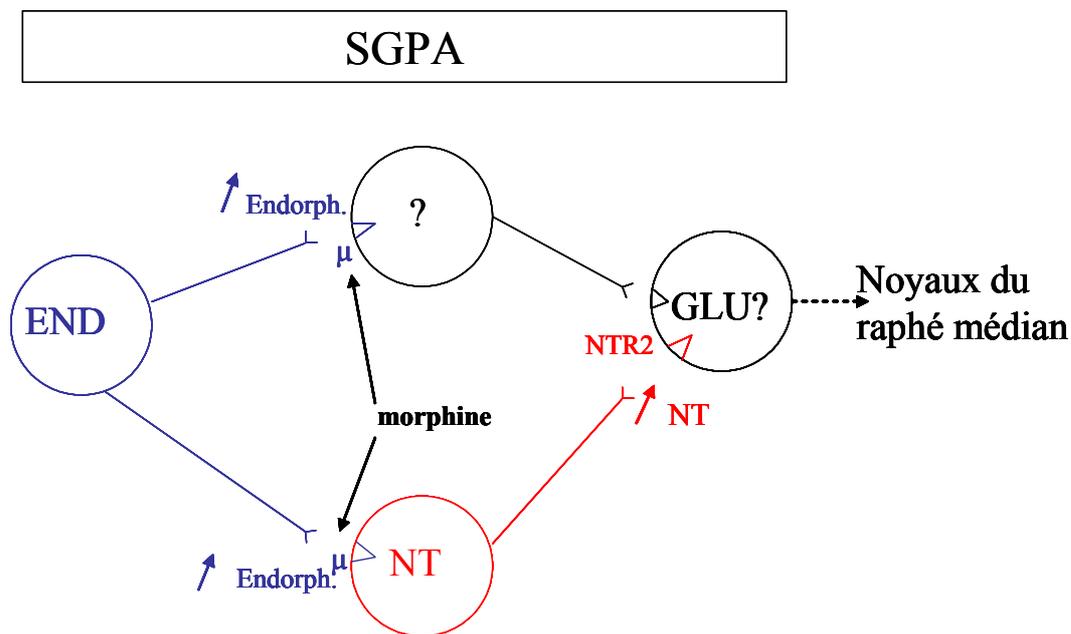


Fig. 23 : Hypothèse : la libération de NT dans la SGPA dépend de l'activité des neurones endorphinergiques (end) de la SGPA.

Ce schéma ne nous permet pas d'expliquer les effets de la naloxone que nous avons mis en évidence sur l'activité analgésique du NT1. Nous rechercherons ultérieurement si le NT1 ne peut se lier aux récepteurs opioïdes, en tentant de déplacer la liaison de [<sup>3</sup>H]naloxone sur des membranes cérébrales riches en ces récepteurs. Cependant, des résultats similaires ont été obtenus par Hylden et Wilcox (1983) qui ont montré, dans un modèle de douleur chimique, que la naloxone pouvait s'opposer aux effets analgésiques de la NT aux doses où elle exerce une activité hyperalgésiante.

D'autre part, ces interactions n'ont été mises en évidence que dans l'épreuve du saut et non sur la latence de léchement des pattes de nos animaux. Ceci suggère que ces deux comportements mettent en jeu des voies neuronales différentes et concernent des niveaux d'intégration différents (spinal et supraspinal).

En 2001, Asselin et coll., ont mis en évidence la présence de NTS2 dans deux structures impliquées dans le contrôle descendant de la douleur : la SGPA et les collicules supérieurs. En effet, il a été montré que la stimulation électrique de la SGPA inhibait la réponse des neurones de la corne dorsale de la moelle à une stimulation douloureuse (Basbaum et coll., 1984) et que l'injection de NT dans cette structure augmentait la latence d'évitement dans l'épreuve de la plaque chaude ou celle du « tail-flick », en augmentant l'excitabilité des neurones de la SGPA (Behbehani et coll., 1984). Des études électrophysiologiques montrent que les collicules supérieurs reçoivent des informations en relations avec des stimuli douloureux ; elles transitent dans la moelle par la voie somatosensorielle antérodorsale et projettent vers la SGPA. Ils constituent donc une structure importante dans la transmission ascendante du message douloureux mais sont également impliqués dans le contrôle descendant de la douleur (Larson et coll., 1987 ; Mc Haffie et coll., 1989).

Ayant clairement observé qu'un traitement chronique par la morphine entraînait une tolérance à l'effet analgésique des agonistes des récepteurs NTS2, nous avons recherché une éventuelle adaptation de la densité de ces récepteurs dans la SGPA et les collicules supérieurs chez des souris rendues tolérantes à la morphine.

Alors que Asselin et coll.(2001) ont utilisé, pour marquer les récepteurs de la NT de type NTS2, la [<sup>3</sup>H] lévocabastine , nous avons préféré utiliser, comme radioligand la [<sup>3</sup>H] NT, ce qui nous a permis de suivre l'évolution de la densité des récepteurs NTS1 et NTS2 dans les deux structures étudiées.

En effet, l'emploi de lévocabastine froide, en ne déplaçant que la [<sup>3</sup>H]NT des NTS2 permet de mesurer la densité des récepteurs NTS1. Par différence avec les valeurs obtenues pour le marquage total, on obtient aussi la valeur de la densité des récepteurs NTS2.

Asselin et coll.(2001) dans leurs conditions expérimentales ont trouvé des quantités beaucoup plus importantes de NTS2 dans la SGPA (31 fmol/mg éq. tissu) et dans les collicules (51 fmol/mg éq. tissu) que celles que nous avons : 6 fmol/mg éq. tissu et 10 fmol/mg éq. tissu dans la SGPA et dans les collicules respectivement. Ces discordances pourraient s'expliquer par un très fort taux de récepteurs NTS2 internalisés. En effet, la lévocabastine, très lipophile, est capable de diffuser à travers les membranes neuronales et de se lier aux récepteurs intracellulaires ce qui n'est pas le cas de la NT. Ainsi, nos résultats sont en accord avec une autre étude autoradiographique réalisée par Kitabgi et coll.(1987) qui utilisaient la [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>3</sup>] NT qui ne permettait pas non plus la liaison aux sites intracellulaires.

Dans notre étude nous montrons que le traitement de 8 jours par la morphine, à forte dose, n'induit pas de modification de la densité des récepteurs NTS2 dans la SGPA alors que l'on observe une diminution marquée et statistiquement significative de la densité de ces récepteurs dans les collicules (25%). Aucune modification significative de la densité des récepteurs NTS1 n'a été observée dans chacune des deux structures étudiées. Ces résultats suggèrent qu'une désensibilisation (diminution du nombre) des récepteurs NTS2 pourrait sous-tendre l'apparition de la tolérance aux effets analgésiques de la NT et des agonistes NTS2 chez les animaux rendus tolérants à la morphine. Ces résultats devraient être étendus en étudiant notamment la variation de la densité des NTS2 dans d'autres régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la douleur, ainsi que de leur couplage aux protéines G à la suite d'un traitement chronique par la morphine.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

L'effet analgésique des morphiniques utilisés dans les douleurs de fortes ou de très fortes intensités s'accompagne de nombreux effets secondaires (dépression respiratoire, dépendance physique et psychique) et donne lieu à un phénomène de tolérance.

Le recours à des agonistes des récepteurs NTS2 traversant la barrière hémato-encéphalique, pourrait constituer une alternative thérapeutique aux opioïdes. Cependant, l'intérêt d'une telle approche dépend du degré d'interaction, et optimalement de l'indépendance entre les systèmes endorphinergiques et neurotensinergique.

Alors que les premières études portant sur l'analgésie produite par la neurotensine suggérait son indépendance à l'égard des systèmes opioïdiques centraux (Clineschmidt et coll., 1979 ; Osbahr et coll., 1981 ; Coquerel et coll., 1988), nos résultats sont en faveur de l'existence d'interactions assez étroites entre ces deux systèmes de neurotransmissions confirmant les résultats obtenu par d'autres équipes (Luttinger et coll., 1983 ; Stiller et coll., 1997 ; Tershner et Helmstetter, 2000).

Dans ces conditions, le développement d'agonistes sélectifs des récepteurs NTS2, dans le cadre d'une stratégie analgésique alternative aux opioïdes, paraît donc moins intéressant que ce à quoi on s'attendait au départ. En effet, si l'emploi d'agonistes des récepteurs NTS2 de façon chronique, en plus d'entraîner une tolérance aux effets analgésiques de ces composés, diminue l'activité analgésique des morphiniques et inversement, il n'est pas logique en pratique, de procéder à leur substitution l'un par rapport à l'autre lorsque l'activité analgésique d'un de ces composés vient à s'épuiser.

Cependant, le développement d'agoniste NTS2 dans le cadre d'une stratégie analgésique d'association aux morphiniques pourrait être envisagée. Ainsi, l'emploi de faibles doses d'agonistes des récepteurs NTS2 pourrait potentialiser les effets analgésiques de faibles doses de morphiniques. Cette association pourrait permettre idéalement de retarder l'apparition des phénomènes de tolérances et de s'affranchir des effets indésirables des morphiniques et des agonistes des récepteurs NTS2, ce qu'il faudra explorer.

Dans la suite de nos travaux nous allons donc rechercher l'existence d'une telle synergie. Si elle existe nous étudierons ensuite les effets de l'association à long terme de faibles doses de morphine et d'agoniste des récepteurs de la neurotensine sur la survenue de la tolérance aux effets analgésiques de la morphine.

Nous rechercherons également si la lévocabastine est susceptible d'induire un phénomène de sevrage chez les souris dépendantes à la morphine, de la même façon nous regarderons si la naloxone est capable d'entraîner un syndrome de sevrage chez les souris traitées de façon chronique par les agonistes des récepteurs de la NT.

Malgré l'existence d'interaction entre les systèmes opioïdiques et neurotensinergiques centraux qui semblent assez importantes, le développement d'agoniste des récepteurs NTS2 à visée analgésique reste toujours d'actualité notamment dans le cadre de l'administration conjointe d'agoniste des récepteurs NTS2 et de morphiniques. Une telle stratégie, si elle devait aboutir pourrait présenter un certain nombre d'avantages, non négligeables pour le confort et la sécurité du patient.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## **BIBLIOGRAPHIE :**

**Akil H., Owens C., Gutstein H., Taylor L., Curran E., and Watson S. (1998)** Endogenous opioids : overview and current issues. *Drug and alcohol dependence.* 51 : 127-140.

**Asselin M-L., Dubuc I., Coquerel A. and Costentin J. (2001)** Localization of neurotensin receptors in rat brain. *Neuroreport* 17 : 1087- 1091.

**Basbaum A.I. and Fields H.L. (1984)** Endogenous pain control systems : brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Ann. Rev. Neurosci.* 7 : 309-323.

**Behbehani MM. and Pert A. (1984)** A mechanism for the analgesic effect of NT as revealed by behavioral and electrophysiological techniques. *Brain Res.* 324 : 35-42.

**Bernard J.F., Besson J.M. (1990)** The spino(trigemino)-pontoamygdaloid pathway : electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.*, 63 : 473-490.

**Bester H., Menendez L., Besson J.M., Bernard J.F. (1995)** Spino(trigemino) parabrachiohypothalamic pathway electrophysiological evidence for an involvement in pain processes. *J. Neurophysiol.*, 73 : 568-585.

**Bousselmame R., Michael Titus A., Costentin J. (1991)** Desensitization of mu-opioid receptors does not modify the analgesia induced by an enkephalinase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 203(2) : 295-297.

**Carraway R. and Leeman S.E. (1973)** The isolation of a new hypotensive peptide, neurotensin, from bovine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 248 : 6855-6861.

**Chalon P., Vita N., Kaghad M., Guillemot M., Bonnin J., Delpech B., Le Fur G., Ferrara P. and Caput D. (1996)** Molecular cloning of a levocabastine-sensitive neurotensin site. *FEBS Lett.* 386 : 91-94.

**Checler F., Amar S., Vincent J.P. and Kitabgi P.** (1986a) Catabolism of neurotensin by neural (neuroblastoma clone N1E115) and extraneural (HT29) cell lines. *Peptides* 7 (6) : 1071-7.

**Checler F., Barelli H., Vincent J.P. and Kitabgi P.** (1988) Neurotensin metabolism in various tissues of central and peripheral origins : ubiquitous involvement of a novel neurotensin degrading metalloendopeptidase. *Biochimie* 70 (1) : 75:82;

**Checler F., Emson P.C., Vincent J.P. and Kitabgi P.** (1984) Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes. Cleavage at the Pro10-Tyr11 bond by endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and a peptidase different from proline-endopeptidase, *J. Neurochem.* 43 (5) : 1295-301.

**Checler F., Vincent J.P. and Kitabgi P.** (1985) Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg8-Arg9 peptide bond by a metalloendopeptidase. *J. Neurochem.* 45 (5) : 1509-13.

**Checler F., Vincent J.P. and Kitabgi P.** (1986b) Purification and characterization of a novel neurotensin-degrading peptidase from rat brain synaptic membranes, *J.Biol. Chem.* 261 (24) : 11274-81.

**Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J.A., Yu L.** (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44 : 8-12.

**Clineschmidt B.V. et McGuffin J.C.** (1979) Neurotensin administered intracisternally inhibits responsiveness of mice to noxious stimuli. *Eur. J. Pharmacol.* 46 : 395-396.

**Coquerel A., Dubuc I., Kitabgi P. and Costentin J.** (1988) Potentiation by thiorphan and bestatin of the naloxone-insensitive analgesic effects of neurotensin and neuromedin N. *Neurochem. Int.* 12 : 361-366.

**Coquerel A., Chevallier F. and Zsürger N.** (1996) Imagerie in vitro par les radioimageurs : de nouveaux outils de quantification pour une nouvelle biologie. *Revue de l'ACOMEN* 4 : 369-389.

**Comb M., Seeburg P., Adelman J., Eiden L., Herbert E.** (1982) Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA, *Nature* 295 : 663-666.

**Dobner P.R., Barber L., Villa-Komaroff L. and McKiernan C.** (1987) Cloning and sequence analysis of cDNA for the canine neurotensin/neuromedin N precursor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (10) : 3516-20.

**Dubuc I., Costentin J., Terranova J-P., Barnouin M-C., Soubrié P., Le Fur G., Rostène W. and Kitabgi P.** (1994) The non peptide neurotensin antagonist SR 48692 as a tool to reveal neurotensin receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 112 : 352- 354.

**Dubuc I., Sarret P., Labbé-Jullié C., Botto J-M, Honoré E., Bourdel E., Martinez J., Costentin. J., Vincent J-P., Kitabgi P and Mazella J.** (1999) Identification of the receptor subtype involved in the analgesic effect of neurotensin. *J. Neurosci.* 19 : 503-510.

**Dubuc I., Remande S. and Costentin J.** (1999) The partial agonist properties of levocabastine in neurotensin-induced analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 381 : 9-12.

**Eddy W., and Leimbach D.** (1953) Synthetic analgesic (II) Dithenylbutenyl and dithenylbutylamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 107 : 385-393.

**Evans C.J., Keith Jr. D.E., Morrison H., Magendzo K., Edwards R.H.** (1992) Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258 : 1952-1955.

**Fukuda K., Kato S, Mori K., Nishi M., Takeshima H.** (1993) Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta and mu subtypes. *FEBS Lett.* 327 : 311-314.

**Giesler G.J., Katter J.T., Dado R.J.** (1994) Direct spinal pathways to the limbic system for nociceptive information. *Trends Neurosci.* 17 : 244-250.

**Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R.** (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258 : 577-579.

**Hylden J.L.K, Wilcox G.L.**(1983), Antinociceptive action of intrathecal Neurotensin in mice. *Peptides* 4 : 517-520.

**Kieffer B.L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C., Hirth C.G.** (1992) The delta-opioid receptor : isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 : 12048-12052.

**Kislauskis E., Bullock B., McNeil S. and Dobner P.R.** (1988) The rat gene encoding neurotensin and neuromedin N. Structure, tissue-specific expression, and evolution of exon sequences, *J. Biol. Chem.* 263 (10) : 4963-8.

**Kitabgi P., Carraway R., Leeman S.E.** (1976) Isolation of a tridecapeptide from bovine intestinal tissue and its partial characterization as neurotensin. *J. Biol. Chem.* 251 : 7053-7058.

**Kitabgi P., Rostène W., Dussailant M., Schotte A., Laduron P-M. and Vincent J-P.** (1987) Two populations of neurotensin binding sites in murine brain : discrimination by the antihistamine levocabastine reveals markedly different radioautography distribution. *Eur. J. of Pharmacol.* 140 : 285- 293.

**Kitabgi P., De Nadai F., Rovere C. And Bidard J.N.** (1992) Biosynthesis, maturation, release and degradation of neurotensin and neuromedin N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 668 : 30-42.

**Labbé-Jullié C., Dubuc I., Brouard., Doulut S., Bourdel E., Pelaprat D., Mazella J., Martinez J., Costentin J. and Kitabgi P.** (1994) In vivo and in vitro structure-activity studies with peptide and pseudopeptide neurotensin analogs suggest the existence of distinct central neurotensin receptor subtypes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 268 : 328-336.

**Larson MA., Mc Haffie JG., and Stein BE.** (1987) Response properties of nociceptive and low threshold mechanoreceptive neurons in the hamster superior colliculus. *J. Neurosci.* 59 : 299-316.

**Li S., Zhu J., Chen C., Chen Y.W., Deriel J.K., Ashby B., Liu-Chen L.Y.** (1993) Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor. *Biochem. J.* 295 : 629-633.

**Luttinger D., Burgess S.K., Nemeroff C.B. and Prange Jr. A.J.** (1983) The effects of chronic morphine treatment on neurotensin-induced antinociception. *Psychopharmacol.* 81 : 10-13.

**Mc Haffie JG., Kao CQ., and Stein BE.** (1989) Nociceptive neurons in rat superior colliculus : response properties, topography and functional implications. *J. Neurophysiol.* 62: 510-525.

**Mains R.E., Eipper B.A., Ling N.** (1977) Common precursor to corticotropins and endorphins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74 : 3014-3018.

**Mazella J., Botto J-M., Guillemare E., Coppola T., Sarret P. and Vincent J-P.** (1996) Structure, functional expression and cerebral localization of levocabastine-sensitive neurotensin/neuromedin N receptor from mouse brain. *J. Neurosci.* 16 : 5613-5620.

**Meng F., Xie G.X., Thompson R.C., Mansour A., Goldstein A., Watson S.J., Akil H.** (1993) Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 : 9954-9958.

**Meunier J.C., Mollereau C., Toll C., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Montsarrat B., Mazargill H., Vassart G., Parmentier M and Costentin J.** (1995) Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377 : 532- 535.

**Miller J.A.** (1991) The calibration of <sup>35</sup>S or <sup>32</sup>P with <sup>14</sup>C-labeled brain paste or <sup>14</sup>C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrafilm or Amersham hyperfilm. *Neurosci. Lett.* 121 : 211-214.

**Mobarakeh J.I., Sakurada S., Hayashi T., Orito T., Okuyama K., Sakurada T., Kuramasu A., Watanabe T., Wanatabe T., Yanai K.** (2002) Enhanced antinociception by intrathecally-administered morphine in histamine H1 receptor gene knockout mice. *Neuropharmacology* 42 : 1079-1088.

**Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalo P., Caput D., Vassart G. and Meunier J.C.** (1994) ORL1, a novel member of the opioid receptor family : cloning, functional expression localization. *FEBS Lett.* 341 : 33-38.

**Noda M., Furuta Y., Takahashi H., Toyosato M., Hirose T., Inayama S., Nakanishi S., Numa S.** (1982) Cloning and sequence analysis of cDNA for bovine adrenal preproenkephalin, *Nature* 295 : 202-206.

**Osbahr A.J., Nemeroff C.B., Luttinger D., Mason G.A. and Prange Jr. A.J.** (1981) Neurotensin-induced antinociception in mice : antagonism by thyrotropin-releasing hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217 : 645-651.

**Petersen C.M., Nielsen M.S., Nykjaer A., Jacobsen L., Tommerup N., Rasmussen H.H., Roigaard H., Gliemann J., Madsen P. and Moestrup S.K.** (1997) Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 272 : 3599-3605.

**Pettibone D.J., Hess J.F., Hey P.J., Jacobson M.A., Leviten M., Lis E.V., Mallorga P.J., Pascarella D.M., Snyder M.A., Williams J.B., Zeng Z.** (2002) The effects of deleting the mouse neurotensin receptor NTS1 : central and peripheral responses to neurotensin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 : 305-313.

**Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma Jr. F.J., Civelli O.** (1995) Orphanin FQ : a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270 : 792-794.

**Remaury A., Vita N., Gendreau S., Jung M., Arnone M., Poncelet M., Culouscou J.M., Le Fur G., Soubrié P., Caput D., Shire D., Kopf M. and Ferrara P.** (2002) Targeted inactivation of the neurotensin type 1 receptor reveals its role in body temperature control and feeding behavior but not in analgesia. *Brain Research* 953 : 63-72.

**Sadoul J.L., Mazella J., Amar S., Kitabgi P. and Vincent J.P.** (1984) Preparation of neurotensin selectivity iodinated on the tyrosine 3 residue. Biological activity and binding properties on mammalian neurotensin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 : 812-819.

**Sarhan S., Hitchcock J.M., Grauffel C.A. and Wettstein J.G.** (1997) Comparative antipsychotic profiles of neurotensin and a related systemically active peptide agonist. *Peptides* 18 (8) : 1223-1227.

**Schotte A. and Laduron P.M.** (1987) Different post-natal ontogeny of two [<sup>3</sup>H] NT binding sites in rat brain. *Brain Res.* 408 : 326-328.

**Schotte A., Leysen J-E. and Laduron P-M.** (1986) Evidence for displaceable non specific [<sup>3</sup>H] neurotensin binding in rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 333 : 400-405.

**Stiller C-O., Gustafsson H., Fried K. and Brodin E.** (1997) Opioid-induced release of neurotensin in the periaqueductal gray matter of freely moving rats. *Brain Res.* 774 : 149- 158.

**Tanaka K., Masu M., and Nakanishi S.** (1990) Structure and functional expression of the rat neurotensin receptor. *Neuron* 4 : 847-854.

**Tershner S.A. and Helmstetter F.J.** (2000) Antinociception produced by mu opioid receptor activation in the amygdala is partly dependent on activation of mu opioid and neurotensin receptor in the ventral periaqueductal gray. *Brain Res.* 865 : 17-26.

**Vincent J.P., Mazella J. And Kitabgi P.** (1999) Neurotensin and neurotensin receptors . *Trends Pharmacol Sci.* 20 (7) : 302-9.

**Williams F.G., Mullet M.A. and Beitz A.J.** (1995) Basal release of Met-enkephalin and neurotensin in the ventrolateral periaqueductal gray matter of the rat : a microdialysis study of antinociceptive circuits. *Brain Res.* 690 : 207-216.

**Zadina J.E., Hackler L., Lin-Jun G., Kastin A.J.** (1997) A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$  opiate receptor. *Nature* 386 : 499-502.

**Nom - Prénoms: BREDELOUX - Pierre**

**Titre de la Thèse : Les récepteurs NTS2 de la neurotensine et l'analgésie:  
Interaction avec les systèmes opioïdiques**

---

**Résumé de la Thèse :**

L'étude des interactions entre les systèmes neurotensinergiques et opioïdiques a été réalisée chez la Souris au moyen de l'épreuve de la plaque chaude. Nous avons ainsi mis en évidence que la lévocabastine, un antagoniste des récepteurs H1 et des récepteurs NTS2 de la neurotensine (NT) diminuait partiellement l'effet analgésique de la morphine. Ceci suggère qu'une partie au moins de l'activité analgésique de la morphine s'effectue via une libération de NT au niveau central. D'autre part, nous avons montré, l'existence d'une tolérance croisée entre la morphine et le NT1, un analogue peptidique de la NT actif par voie systémique. En effet, le traitement semi-chronique par la morphine à forte dose a permis de rendre des souris tolérantes au NT1. De la même façon, le traitement semi-chronique par le NT1 a permis de rendre des souris partiellement tolérantes à la morphine. Enfin, nous avons observé que la naloxone diminuait de façon dose dépendante la latence de saut des animaux traités par le NT1. Par contre, ces interactions n'ont pas été observées si on se base sur la latence du temps de léchement des animaux.

Afin de déterminer les mécanismes de survenue de la tolérance à la NT après un traitement chronique par la morphine, une étude d'autoradiographie a été réalisée au moyen de [<sup>3</sup>H]NT sur des coupes de cerveaux de souris dans deux régions impliquées dans le contrôle supraspinal de la douleur, la substance grise périaqueducule (SGPA) et les collicules supérieurs. Nous avons observé, chez les souris traitées de façon semi-chronique par la morphine, une diminution d'environ 25% de la densité des récepteurs NTS2 dans les collicules supérieurs sans modification de la densité des récepteurs NTS1. Nous n'avons en revanche pas mis en évidence de modification de la densité des deux types de récepteurs neurotensinergiques dans la SGPA.

---

**MOTS CLES : NEUROTENSINE, MORPHINE, ANALGESIE, RECEPTEURS NTS2, PLAQUE  
CHAUDE, AUTORADIOGRAPHIE**

---

**JURY**

**PRESIDENT : Mme Nicole GRIMAUD, Maître de Conférences de Pharmacologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes**

**ASSESEURS : M. Jean Yves PETIT, Professeur de Pharmacologie  
Faculté de Pharmacie de Nantes  
M. Jérôme BARRAUD, Pharmacien  
Pharmacie Enfrein, 5 quai Rivière 85800 St Gilles-Croix de Vie**

---

**Adresse de l'auteur : 4 et 6 place du marché 44770 Préfailles.**