

Approches moléculaires de l'action des opiacés

Les effets cellulaires des opiacés sont souvent opposés selon que le traitement est aigu ou chronique : la liaison des opiacés à leurs récepteurs pour une courte durée inhibe l'activité adénylyl cyclasique ; en revanche, la stimulation chronique entraîne un découplage entre les récepteurs des opiacés et les protéines G, avec augmentation paradoxale de l'activité adénylyl cyclasique. Les canaux calcium et potassium et la phosphorylation de protéines (les *morphine cAMP regulated phosphoproteins* ou MARPP, la *cAMP responsive element binding protein* ou CREB, et les synapsines) sont aussi affectés différemment selon que les opiacés sont appliqués de manière aiguë ou chronique. En outre, la stimulation chronique des récepteurs des opiacés produit à long terme des modifications de l'expression d'un grand nombre d'ARN messagers et de protéines. Dans ces phénomènes adaptatifs, l'AMPc et le calcium seraient les seconds messagers aboutissant à la phosphorylation du facteur de transcription CREB par la protéine kinase A et à celle de protéines encore inconnues par la protéine kinase C (troisièmes messagers). Ces modifications convergeraient vers la stimulation de gènes de réponse immédiate, tel *c-fos* (quatrièmes messagers), qui seraient des maîtres-commutateurs des modifications cellulaires profondes et persistantes à la base du phénomène de dépendance aux opiacés.

Florence Noël
Vadim Iourgenko
Yves Pouille
Jacques Hanoune

ADRESSES

F. Noël : *chercheur post-doctoral*. V. Iourgenko : *chercheur post-doctoral*. Y. Pouille : *étudiant en thèse*. J. Hanoune : *directeur de recherche à l'Inserm, directeur de l'U. 99 de l'Inserm*. Inserm U. 99, hôpital Henri-Mondor, 51, avenue du Maréchal-de-Latre-Tassigny, 94010 Créteil, France.

L'usage de l'opium et de ses dérivés, les opiacés, est ancestral. De l'opium, connu depuis plus de 2000 ans, a été isolé un alcaloïde, la morphine qui en constitue l'un des principaux composés actifs. Les opiacés alcaloïdes agissent sur des récepteurs spécifiques au même

titre que les peptides dits opiacés endogènes. Ceux-ci sont répartis en trois familles, les endorphines, les enképhalines et les dynorphines, et sont produits dans des neurones, des cellules nerveuses sécrétrices et des cellules endocrines. Trois grands types de récepteurs des opiacés, δ , μ et κ , ont été décrits en fonction de

leurs propriétés pharmacologiques et de leur localisation. Récemment, les ADNc codant pour ces récepteurs ont été isolés (type δ : [1, 2] ; type μ : [3] ; type κ : [4]). De la séquence en acides aminés a été déduite la structure secondaire comprenant sept traversées membranaires, qui est caractéristique des membres de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G.

Les opiacés exogènes (alcaloïdes ou peptides de synthèse) ainsi que les peptides opiacés endogènes se lient à leurs récepteurs sur la face externe de la membrane cellulaire et activent des protéines G situées sur la face interne de la membrane cellulaire. Les protéines G activent ou inhibent des systèmes effecteurs tels que l'adénylyl cyclase ou divers canaux ioniques. Les agonistes opiacés, exogènes ou endogènes, exercent leurs effets analgésiques en atténuant la libération de neuromédiateurs dans la moelle épinière comme dans le système nerveux central. Cette action, à court terme, des dérivés de la morphine s'accompagne d'un phénomène de tolérance, c'est-à-dire de la nécessité d'une dose plus élevée d'opiacés lors d'administrations répétées pour obtenir le même effet. A plus long

terme apparaît le phénomène de dépendance, c'est-à-dire l'apparition d'un manque, tant psychique que physique, à l'arrêt de l'administration. Ces deux phénomènes, tolérance puis dépendance, ne sont pas forcément reliés de façon causale.

En raison de l'importance clinique et sociale de l'utilisation des morphiniques, de nombreux travaux ont été entrepris, chez l'animal, pour mieux comprendre, et éventuellement contrôler, les phénomènes de tolérance et de dépendance [5, 6]. Les auteurs ont utilisé des lignées cellulaires en culture (hybrides neuroblastome-gliome NG108-15, neuroblastome SH-SY5Y, cellules de la glande pituitaire 7315c), des cellules en culture primaire (cellules de striatum, de moelle épinière ou de ganglion de racine dorsale) ou bien ont porté leur attention sur des structures particulières du cerveau. Au premier rang, le locus coeruleus, principal amas de neurones noradrénergiques du système nerveux central, a fait l'objet des nombreux travaux de Nestler et de ses collaborateurs [7]. Les modifications observées au niveau cellulaire sont multiples et souvent opposées selon que le traitement aux opiacés est aigu ou chronique. De plus, la stimulation chro-

nique des récepteurs produit des changements à long terme tels que des modifications de l'expression de multiples gènes. Ces événements, associés à la plasticité neuronale, permettraient à la cellule de s'adapter à un nouvel environnement. Ils constituent en tout cas un ensemble de modifications profondes de la vie de la cellule, modifications persistantes qui n'ont pas leur équivalent en biologie cellulaire.

Dans cette revue, nous avons choisi de privilégier les effets moléculaires des traitements aigus et des traitements chroniques par les opiacés, puis les effets induits par les opiacés sur l'expression de gènes et sur la synthèse de protéines dans les neurones pour discuter ensuite les mécanismes mis en jeu dans ces événements. Nous n'aborderons pas les aspects comportementaux et le rôle des « systèmes de récompense ».

Les effets des opiacés en traitement aigu et chronique. Leurs oppositions

La liaison des opiacés sur leurs récepteurs, pour une durée de l'ordre de la minute (stimulation aiguë), conduit à l'inhibition de l'activité adénylyl cyclasique, c'est-à-dire à une diminution de la synthèse du second messenger, l'AMP cyclique (AMPc) (figure 1A). En revanche la stimulation des récepteurs pendant une longue durée (12 heures et au-delà) (stimulation chronique) entraîne un emballement de toute la voie de l'AMP cyclique qui s'exprime lorsque la stimulation par les opiacés est interrompue. Les canaux ioniques et la phosphorylation de protéines sont également affectés de manière différente selon que les opiacés sont appliqués de manière aiguë ou chronique.

Le couplage des récepteurs des opiacés aux protéines G

De multiples études utilisant la toxine de *Bordetella pertussis* et la toxine cholérique ont démontré le rôle des protéines G dans la transmission du signal des opiacés. L'utilisation de systèmes reconstitués et d'anticorps sélectifs des différentes sous-unités

Tableau I		
LES EFFETS AIGUS ET CHRONIQUES DES OPIACÉS SUR LES PROPRIÉTÉS DES NEURONES		
	Effets aigus	Effets chroniques
Activité adénylyl cyclase Activité PKA	diminution diminution	augmentation* augmentation
Fréquence d'activation <i>Inward rectifying potassium channels</i> Canaux calcium dépendants du voltage de type-N	diminution ouverture fermeture	niveau de base faible ouverture nd
Phosphorylation de protéines MARPP CREB Synapsines	diminution diminution diminution	augmentation sans effet augmentation

* Dans le locus coeruleus. Observé lors de la précipitation du sevrage dans les cellules NG 108-15.

PKA: cAMP dependent protein kinase

MARPP: morphine and cAMP regulated phosphoproteins

CREB: cAMP responsive element binding protein

nd: non déterminé

RÉFÉRENCES

1. Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992 ; 258 : 1952-5.
2. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. The δ opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 12048-52.
3. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1993 ; 44 : 8-12.
4. Meng F, Xie G-X, Thompson RC, et al. Cloning and pharmacology characterization of a rat κ opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 9954-8.
5. Childers SR. Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci* 1991 ; 48 : 1991-2003.
6. Nestler EJ. Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 1992 ; 12 : 2439-50.
7. Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL. Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 1993 ; 11 : 1-20.
8. Cox BM. Molecular and cellular mechanisms in opioid tolerance. In: Basbaum AI, Besson JM, eds. *Towards a new pharmacotherapy of pain*. New York: John Wiley and sons Ltd, 1991 : 137-56.
9. Puttfarcken PS, Werling LL, Cox BM. Effects of chronic morphine exposure on opioid inhibition of adenylyl cyclase in 7315c cell membranes: a useful model for the study of tolerance at μ opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1988 ; 33 : 520-7.
10. Ho IK, Loh HH, Way EL. Cyclic AMP antagonism of morphine analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 1973 ; 185 : 340-6.
11. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975 ; 72 : 3092-6.
12. Yu VC, Sadée W. Efficacy and tolerance of narcotic analgesics at the μ opioid receptor in differentiated human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Therap* 1988 ; 245 : 350-5.
13. Attali B, Saya D, Vogel Z. κ -opiate agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord. *J Neurochem* 1989 ; 52 : 360-9.
14. Hanoune J. Les adénylyl cyclases des mammifères. *médecine/sciences* 1994 ; 10 : 444-7.
15. Haber N, Stengel D, Defer N, Roeckel N, Mattei MG, Hanoune J. Chromosomal mapping of human adenylyl cyclases type III, V and VI. *Hum Genet* 1994 ; 94 : 69-73.
16. Iyengar R. Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 1993 ; 7 : 768-75.

des protéines G ont permis d'identifier les sous-unités α_i et α_o , dans la transmission du signal inhibiteur des récepteurs vers l'adénylyl cyclase (voir [8] pour une revue).

La stimulation aiguë des trois types de récepteurs conduit à l'inhibition de l'adénylyl cyclase. Cet effet s'atténue au cours du temps (tolérance) et deux mécanismes peuvent l'expliquer: (1) le découplage des récepteurs aux protéines G, la phosphorylation des récepteurs et la modification de protéines impliquées dans la désensibilisation des récepteurs (β -arrestin et β -adrenergic receptor kinase) seraient responsables de ce découplage des récepteurs des opiacés (voir [7] pour une revue). (2) La diminution du nombre de récepteurs serait due soit à un phénomène d'internalisation, soit à un changement de synthèse ou de taux de dégradation. Ces deux événements, découplage et internalisation, sont distincts dans le temps. Le découplage semble prendre place avant la diminution du nombre de récepteurs. L'événement initial de tolérance aux opiacés pourrait donc être le découplage des récepteurs et des protéines G et non la diminution du nombre de récepteurs [9].

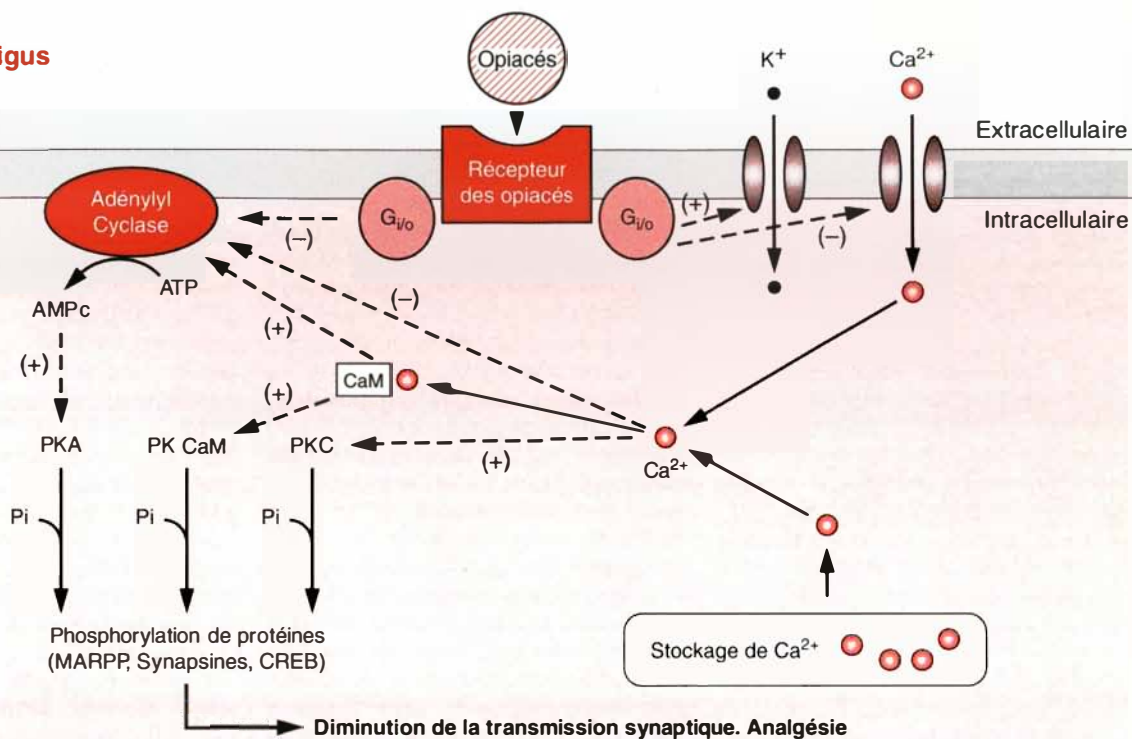
L'activité adénylyl cyclasique

Dès 1973, Ho *et al.* [10] ont montré que l'AMPc inhibait les effets analgésiques de la morphine et accélérerait le développement de la tolérance et de la dépendance physique chez le rat. La modulation du taux de formation d'AMPc par les opiacés a été proposée comme le mécanisme responsable de la réponse cellulaire et des changements métaboliques adaptatifs conduisant à la tolérance et à la dépendance [11]. Des études pharmacologiques détaillées ont montré que les trois types de récepteurs des opiacés sont couplés négativement avec l'adénylyl cyclase (voir [5] pour une revue). La première étude moléculaire des effets de la morphine sur la synthèse d'AMPc a été effectuée par Sharma *et al.* [11] sur les cellules hybrides neuroblastome-gliome NG108-15, une lignée cellulaire exprimant exclusivement le récepteur de type δ , au moins au stade actuel de nos connaissances. Un traitement aigu

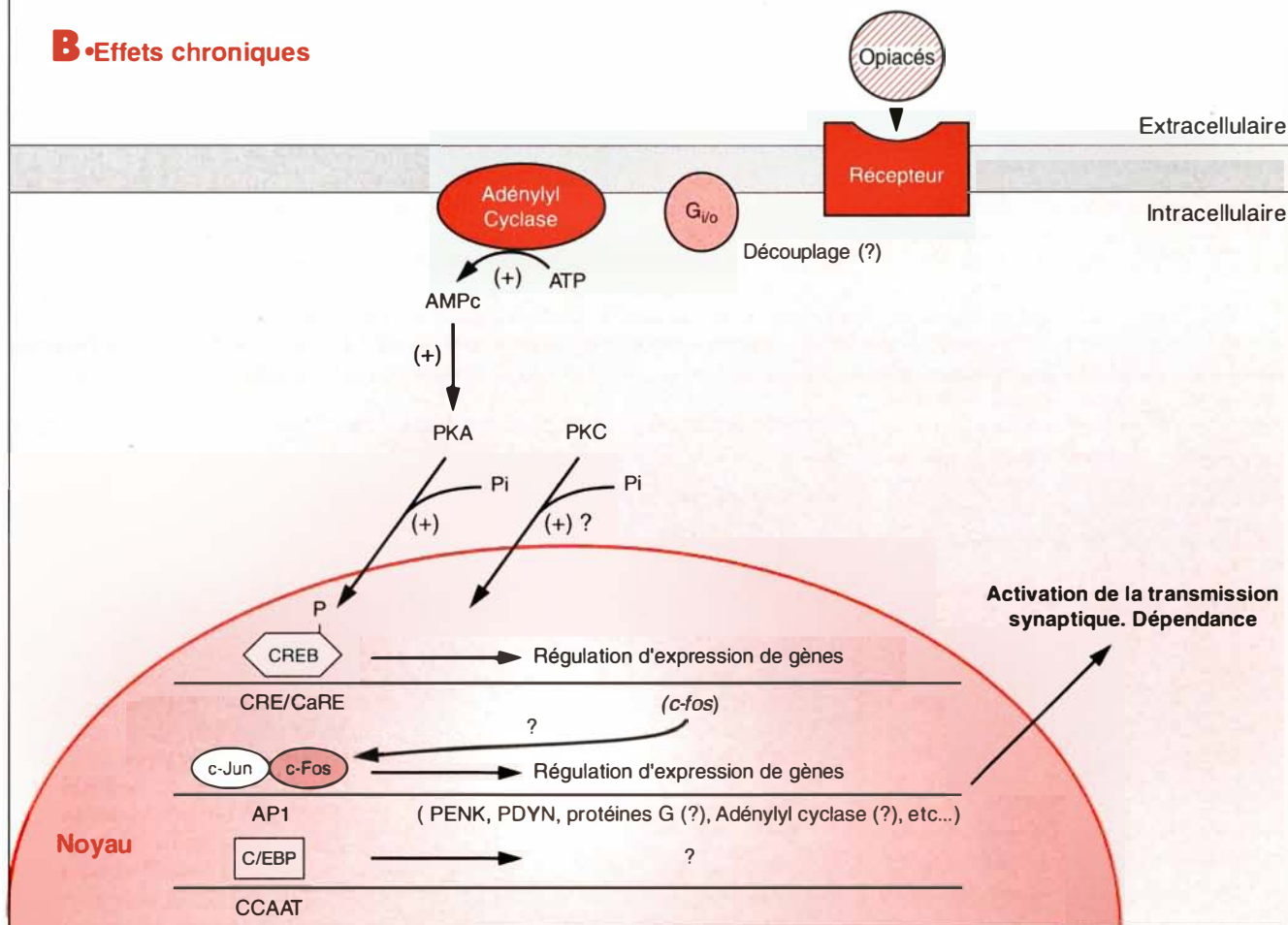
Figure 1. Les effets des opiacés en traitements aigu et chronique. A.

Effets aigus. Le récepteur opiacé, présent à la surface des cellules, est activé par la fixation de son ligand. Les protéines G relaient un signal négatif vers l'adénylyl cyclase et les canaux ioniques. L'activité adénylyl cyclasique peut également être réglée, en théorie, par l'ion calcium ou le complexe calcium-calmoduline. La régulation des protéines-kinases PKA, PKC et peut être PK CaM conduit à des modifications de la phosphorylation de protéines cibles. **B. Effets chroniques.** Le récepteur opiacé est découplé des protéines G et l'activité adénylyl cyclasique augmente. La régulation de la protéine-kinase PKA par l'AMPc, et peut-être celle de la protéine kinase PKC par le calcium, conduiraient à des modifications de l'expression de gènes. Le facteur de transcription CREB se lie à une séquence CRE localisée dans la région promotrice d'un gène. Sa phosphorylation change la conformation de CREB et augmente ainsi l'activité du promoteur. Le calcium, et peut être la protéine-kinase PKC, sont impliqués dans la régulation de la transcription via l'élément CaRE. La transcription du gène c-fos, lui-même sous le contrôle d'éléments CRE et CaRE, pourrait être réglé par l'AMP cyclique et le calcium. La protéine c-Fos forme un hétérodimère avec un autre produit d'un immediate early gene tel que c-Jun. La liaison du dimère à une séquence AP1 localisée dans la région promotrice d'un gène augmente l'activité de ce promoteur. La protéine C/EBP se fixe sur un site spécifique de liaison et active la transcription de certains gènes. AMPc : AMP cyclique ; CaM : calmoduline ; CaRE : calcium responsive element ; CRE : cAMP responsive element ; CREB : cAMP responsive element binding protein ; Gi/o : protéine G inhibitrice ou zéro ; PKA : protéine-kinase dépendante de l'AMPc ; PKC : protéine-kinase dépendante du diacylglycérol et du calcium ; PK CaM : protéine-kinase dépendante du complexe calcium-calmoduline ; PENK : pro-enképhaline ; PDYN : pro-dynorphine ; MARPP : morphine cAMP regulated phosphoproteins.

A • Effets aigus



B • Effets chroniques



RÉFÉRENCES

17. Duman RS, Tallman JF, Nestler EJ. Acute and chronic opiate-regulation of adenylate cyclase in brain: specific effects in Locus Coeruleus. *J Pharmacol Exp Ther* 1988 ; 246 : 1033-9.
18. North RA. Opioid actions on membrane ion channels. In : Hertz A, ed. *Opioid I*, vol. 104/I. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 1993 : 773-97.
19. Shen KZ, Surprenant A. Mechanisms underlying presynaptic inhibition through α_2 -adrenoceptors in guinea pig submucosal neurones. *J Physiol (Lond)* 1990 ; 431 : 609-28.
20. Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA. Dual excitatory and inhibitory effects of opioids on intracellular calcium in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 1992 ; 42 : 1083-9.
21. Okajima F, Kondo Y. Synergism in cytosolic Ca^{2+} mobilization between bradykinin and agonists for pertussis toxin-sensitive G-protein-coupled receptors in NG108-15 cells. *FEBS Lett* 1992 ; 301 : 223-6.
22. Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA. Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells. *J Neurosci* 1994 ; 14 : 1920-9.
23. Stiene-Martin A, Mattson MP, Hauser KF. Opiates selectively increase intracellular calcium in developing type-I astrocytes: role of calcium in morphine-induced morphologic differentiation. *Dev Brain Res* 1993 ; 76 : 189-96.
24. Nestler EJ, Tallman JF. Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Mol Pharmacol* 1988 ; 33 : 127-32.
25. Louie AK, Bass ES, Zhan J, Law PY, Loh HH. Attenuation of opioid receptor activity by phorbol esters in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1990 ; 253 : 401-7.
26. Guitart X, Nestler EJ. Identification of morphine and cyclic AMP-regulated phosphoproteins (MARPPs) in the locus coeruleus and other regions of the rat brain: regulation by acute and chronic morphine. *J Neurosci* 1989 ; 9 : 4371-87.
27. Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ. Regulation of CREB phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 1992 ; 58 : 1168-71.
28. Childers SR, Fleming L, Konkoy C, et al. Opioid and cannabinoid receptor inhibition of adenyl cyclase in brain. *Ann NY Acad Sci* 1992 ; 654 : 33-51.
29. Nah SY, Saya D, Barg J, Vogel Z. Opiate receptor agonists regulate phosphorylation of synapsin I in cocultures of rat spinal cord and dorsal root ganglion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4052-6.

par la morphine diminue la synthèse d'AMPc, effet qui diminue lors d'un traitement chronique. De plus le sevrage à la morphine après un traitement chronique produit un « effet de rebond », c'est-à-dire une nette augmentation de l'activité adényl cyclase lors du retrait de la morphine. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux de Sharma *et al.* (V. Iourgenko *et al.*, non publié ; voir *Tableau II*).

Des effets comparables, moins spectaculaires, ont été décrits dans d'autres lignées cellulaires. Les neuroblastomes humains SH-SY5Y qui expriment en plus grande quantité les récepteurs de type μ que de type δ , présentent une moindre inhibition de l'activité adényl cyclasique après un traitement chronique à la morphine comparé à un traitement aigu [12]. Les cellules de glande pituitaire 7315c qui expriment une population homogène de récepteurs μ ne présentent plus d'inhibition après un traitement chronique [9]. Dans des cocultures de cellules de moelle épinière et de ganglion de racine dorsale, un traitement chronique avec des agonistes des récepteurs de type κ conduit à une diminution de la réponse à ces agonistes [13].

Qu'il s'agisse de l'inhibition de l'adényl cyclase par un traitement aigu, ou de l'augmentation lors du phénomène de rebond, les pourcentages de variation sont de faible amplitude et n'atteignent jamais 100 %. Cela pourrait être dû à l'exis-

tence de plusieurs types d'adényl cyclase. On en connaît actuellement au moins huit types [14] codés par des gènes différents [15] et dont les régulations cellulaires sont variées et spécifiques (sensibilité au calcium, au complexe calcium-calmoduline, aux protéine-kinases, et aux sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G [16]). On peut raisonnablement penser qu'un type d'adényl cyclase est préférentiellement couplé aux récepteurs des opiacés et que seul ce type réagit aux traitements ; les autres adényl cyclases, ne variant pas, constitueraient un « bruit de fond » stable. Aucune étude détaillée des différents types d'adényl cyclase et de leur proportion dans les différentes lignées cellulaires utilisées n'a été faite à ce jour.

Il est en tout cas des plus vraisemblables qu'une augmentation vraie de l'expression de l'adényl cyclase contribue à l'augmentation de son activité de base. Le sevrage de la cellule fait apparaître ce rebond, qui n'est plus freiné, de l'activité de synthèse de l'AMPc. Dès lors, l'activation de la voie de signalisation de l'AMPc, à l'origine du phénomène de dépendance, expliquerait de manière simple la nécessité d'une administration réitérée d'opiacés pour maintenir la dépression de l'activité cyclasique.

En utilisant des préparations de membranes de cerveau, Duman *et al.* [17] ont montré qu'un agoniste opiacé, le peptide de synthèse DADLE (D-Ala-D-Leu-enképhaline),

Tableau II
LES EFFETS AIGUS ET CHRONIQUES DE LA MORPHINE
SUR L'ACTIVITÉ DE L'ADÉNYL CYCLASE
DANS DES CELLULES NG108-15

Activité adényl cyclasique de base			
Traitement aigu	témoin 24 \pm 2	morphine 16 \pm 1	% - 32
Traitement chronique et sevrage	témoin 20 \pm 1	naloxone 27 \pm 2	% + 33

L'activité adényl cyclasique dans les cellules NG108-15 est inhibée par un traitement aigu à la morphine (10 μ M). L'activité adényl cyclasique est augmentée lors de la précipitation du sevrage (application de naloxone, 10 μ M) sur les cellules prétraitées à la morphine (10 μ M pendant 24 heures). La naloxone, un antagoniste de la morphine, déplace la morphine de son site de liaison sur le récepteur, imitant ainsi le sevrage. L'activité adényl cyclasique a été déterminée dans des homogénats de cellules NG-108-15. Les résultats sont exprimés en pmoles d'AMP cyclique formés/minute/milligramme de protéine \pm SEM.

en application aiguë et *in vitro*, inhibe l'activité adénylyl cyclasique dans les quatre structures étudiées, le locus coeruleus, le raphé dorsal, le cortex frontal et le néostriatum. L'agoniste DADLE inhibe aussi l'activité adénylyl cyclasique dans le locus coeruleus provenant d'un animal préalablement traité à la morphine. L'inhibition de l'activité adénylyl cyclasique induite par la stimulation des récepteurs des opiacés ne semble donc pas désensibilisée par un traitement chronique aux opiacés. Ces résultats suggèrent que la tolérance aux opiacés ne serait pas due à une perte de la capacité d'inhiber l'adénylyl cyclase (désensibilisation et internalisation des récepteurs), mais plutôt au fait que les opiacés auraient une action paradoxale sur la voie de signalisation de l'AMP cyclique: inhibition aiguë de la cyclase *via* une protéine G, et augmentation chronique de sa synthèse.

Les canaux potassium

Les opiacés ont une action inhibitrice sur l'activité électrique des neurones. Les opiacés induisent une augmentation de la conductance au potassium, en agissant sur les *inward rectifying potassium channels*, qui provoque une hyperpolarisation de la membrane de la cellule [18]. Le couplage des récepteurs des opiacés aux canaux potassium s'effectue par l'intermédiaire de protéines G ; ce couplage est bloqué par la toxine de *Bordetella pertussis* et restauré par l'addition de protéines G purifiées. L'hypothèse de ce mécanisme est renforcée par le fait que le couplage n'est pas affecté par la forskoline ou par des analogues de l'AMPc. Chez des rats traités de manière chronique, les effets des opiacés sur les canaux potassium sont moins marqués que chez des rats témoins. Ces résultats ont été expliqués par une diminution de l'efficacité du couplage des récepteurs des opiacés aux protéines G et par la diminution du nombre de récepteurs [19].

Les canaux calciques et le métabolisme du calcium

Par sa fonction dans la transmission de signal, le calcium est considéré comme un second messenger, au

même titre que l'AMPc. La concentration intracellulaire de calcium dépend à la fois de son propre influx à travers la membrane plasmique et de sa libération ou capture par les compartiments de stockage intracellulaire. La modulation de la concentration intracellulaire de calcium pourrait représenter un élément critique dans les effets des opiacés. La conductance du calcium (à travers la membrane plasmique) est réduite par l'activation des récepteurs des opiacés. En analysant des canaux calciques isolés, à l'aide de la technique du *patch clamp*, sur des neurones de plexus sous-muqueux, Shen *et al.* [19] ont déterminé que les opiacés agissent sélectivement sur les canaux de type N dépendants du voltage. La fermeture de ces canaux s'effectue par l'intermédiaire de protéines G, mais ne nécessite aucun second messenger diffusible [18]. L'effet inhibiteur des opiacés sur les courants calciques dépendants du voltage réduirait la concentration de calcium dans les terminaisons synaptiques. Cette réduction serait responsable de l'inhibition présynaptique de la libération de neurotransmetteurs, l'action des opiacés la plus largement décrite. Pour deux raisons cette hypothèse n'est pas entièrement satisfaisante. Tout d'abord, l'inhibition du courant calcium par les opiacés n'est jamais totale alors que la libération des neurotransmetteurs est complètement bloquée par les opiacés. Ensuite, la libération présynaptique des neurotransmetteurs n'est pas sensible à la toxine de *pertussis* alors que l'inhibition du courant calcium l'est [18].

De récents travaux ont montré que les opiacés induisent une augmentation de la concentration intracellulaire globale de calcium. Ces résultats sont contradictoires avec l'inhibition par les opiacés des canaux calciques de type N dépendants du voltage. L'application sur des cellules NG108-15 du peptide endogène, leucine-enképhaline, ou du peptide de synthèse DADLE, induit une large augmentation de la concentration intracellulaire du calcium [19-23].

Les effets des opiacés sur la concentration intracellulaire de calcium sont différents selon que les cellules ont été préalablement traitées par la

morphine (effet chronique) ou non (effet aigu). A l'aide d'une technique de microfluorimétrie utilisant la sonde fura-2 comme un indicateur de la concentration intracellulaire de calcium, nous avons montré que l'addition de morphine à des cellules NG108-15 conduisait à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Cette augmentation est plus prononcée lorsque les cellules sont prétraitées avec la morphine pendant 24 heures (*figure 2*). La provenance du calcium et le mécanisme mis en jeu sont encore inconnus. Cependant il se pourrait qu'une augmentation du calcium intracellulaire dans des cellules traitées par la morphine représente un mécanisme additionnel de sensibilisation aux opiacés.

Le calcium pourrait aussi jouer un rôle dans la modulation par les opiacés de l'activité de l'adénylyl cyclase. L'activité de certains types d'adénylyl cyclase est modulée par le calcium. Le complexe calcium-calmoduline stimule l'activité des adénylyl cyclases de type I, III et VIII. A des concentrations micromolaires, le calcium inhibe l'activité des adénylyl cyclases de type V et VI. Il est donc probable que les effets du calcium varient selon le ou les types d'adénylyl cyclase exprimés dans la cellule. Comme les cellules NG108-15 expriment en majorité l'adénylyl cyclase de type VI (V. Iourgenko *et al.*, non publié), l'inhibition de l'activité adénylyl cyclasique induite par un traitement aigu pourrait, au moins en partie, être sous le contrôle du calcium. On ne sait pas quel type d'activité adénylyl cyclasique est augmenté lors du traitement chronique. Dans ce cas, une adénylyl cyclase, sensible au complexe calcium-calmoduline et exprimée essentiellement dans le système nerveux central, pourrait être activée par une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Ces hypothèses nécessitent une meilleure connaissance de la répartition des différents types d'adénylyl cyclase dans les divers types cellulaires et leur implication dans les différentes voies de signalisation. Cette étude est actuellement en cours dans notre laboratoire. Ainsi, une meilleure connaissance des mécanismes d'action des opiacés sur le métabolisme du cal-

RÉFÉRENCES

30. Hayward MD, Duman RS, Nestler EJ. Induction of the *c-fos* protooncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain. *Brain Res* 1990 ; 525 : 256-66.
31. Chang SL, Harlan RE. The *c-fos* protooncogene protein: regulation by morphine in the rat hypothalamus. *Life Sci.* 1990 ; 46 : 1825-32.
32. Stornetta RL, Norton FE, Guyenet PG. Autonomic areas of rat brain exhibit increased *c-fos*-like immunoreactivity during opiate withdrawal in rats. *Brain Res* 1993 ; 624 : 17-28.
33. Mackler SA, Eberwine JH. Cellular adaptation to opiates alters ion-channel mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 385-9.
34. Van Vliet BJ, Van Rijswijk ALCT, Warddeh G, Mulder AH, Schoffelmee ANM. Adaptive changes in the number of G_s - and G_i -proteins underlie adenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 1993 ; 245 : 23-9.
35. Nestler EJ, Terwilliger RZ, Walker JR, Sevarino KA, Duman RS. Chronic cocaine treatment decreases levels of the G protein subunits $G_{i\alpha}$ and $G_{o\alpha}$ in discrete regions of rat brain. *J Neurochem* 1990 ; 55 : 1079-82.
36. Lang J, Schulz R. Chronic opiate receptor activation in vivo alters the level of G-protein subunits in guinea-pig myenteric plexus. *Neuroscience* 1989 ; 32 : 4096-104.
37. Lang J, Costa T. Chronic exposure of NG108-15 cells to opiate agonists does not alter the amount of the guanine nucleotide-binding proteins G_i and G_o . *J Neurochem* 1989 ; 53 : 1500-6.
38. Matsuoka I, Giuli G, Poyard M, Stengel D, Parma J, Guellaën G, Hanoune J. Localization of adenylyl and guanylyl cyclase in rat brain by *in situ* hybridization : comparison with calmodulin mRNA distribution. *J Neurosci* 1992 ; 12 : 3350-60.
39. Parma J, Stengel D, Gannage MH, Poyard M, Barouki R, Hanoune J. Sequence of human brain adenylyl cyclase partial cDNA: Evidence for consensus cyclase specific domain. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 179 : 455-62.
40. Matsuoka I, Maldonado R, Defer N, Noël F, Hanoune J, Roques BP. Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *Eur J Pharmacol* 1994 ; 268 : 215-21.
41. Nah SY, Saya D, and Vogel Z. Long-term opiate exposure leads to increase in synapsin I in rat spinal cord-dorsal root ganglion cocultures. *J Neurochem* 1993 ; 60 : 1147-50.
42. Höllt V. Regulation of opioid peptide gene expression. In : Herz A, ed. *Opioid I*, vol. 104/I. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 1993 : 307-33.
43. Uhl GR, Ryan JP, Schwartz JP. Morphine alters preproenkephalin gene expression. *Brain Res* 1988 ; 459 : 391-7.

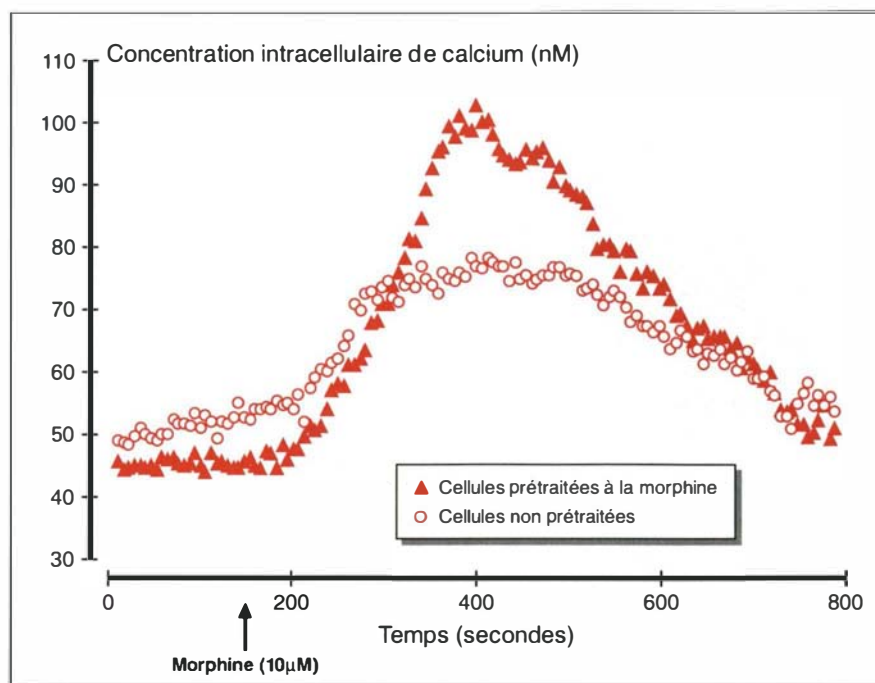


Figure 2. **Comparaison des effets de la morphine (10 μ M)**, en application aiguë sur la concentration intracellulaire de calcium de cellules NG 108-15 « naïves », ou prétraitées pendant 24 heures avec 10 μ M de morphine. On constate que l'effet positif de la morphine en administration aiguë sur la quantité de calcium cytoplasmique, mesuré par une technique de microspectrofluorimétrie utilisant la sonde fluorescente fura-2, est plus important avec les cellules prétraitées.

cium devrait apporter une meilleure compréhension des phénomènes de tolérance et de dépendance aux opiacés.

La phosphorylation des protéines

Les opiacés modifient le taux de phosphorylation de nombreuses protéines (figure 1A). La modulation de l'activité de la PKA, protéine-kinase dépendante de l'AMPc, et de la PKC, protéine-kinase dépendante du diacylglycérol et du calcium, est vraisemblablement responsable de ces effets. Un traitement chronique par la morphine induit une augmentation de l'activité PKA dans le locus coeruleus [24]. L'ester de phorbol, un activateur de la PKC, atténue l'inhibition de l'activité adénylyl cyclasique par l'activation des récepteurs des opiacés [25]. De nombreuses protéines sont phosphorylées de manière différentielle par des traitements aigus ou chroniques.

Les MARPP (*morphine cAMP regulated phosphoproteins*), identifiées dans le locus coeruleus, présentent une diminution du taux de phosphorylation après un traitement aigu à la morphine et une augmentation après un traitement chronique [26]. De même un traitement aigu à la morphine diminue le taux de phosphorylation de la protéine CREB (*cAMP responsive element binding protein*) dans le locus coeruleus, alors qu'un traitement chronique semble sans effet [27].

Les synapsines constituent un groupe de quatre protéines associées aux petites vésicules synaptiques et jouent un rôle particulièrement important dans la libération des neurotransmetteurs. En effet, quand elles sont phosphorylées sous l'effet de la PKA et des protéine-kinases dépendantes du complexe calcium-calmoduline, elles ne se lient plus aux microtubules, mais peuvent migrer vers la membrane cellulaire et

contribuer à la libération de neuro-médiateurs. La phosphorylation des synapsines, contrôlée par les messagers secondaires (AMPc et calcium), joue donc un rôle clef dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs. Cette phosphorylation est diminuée lors de la stimulation des récepteurs des opiacés. En revanche, l'effet est inversé après une stimulation chronique de ces récepteurs [28, 29]. La modulation de la phosphorylation des synapsines pourrait donc être mise en jeu dans l'action des opiacés sur la libération des neurotransmetteurs.

L'expression des gènes

Un traitement chronique par les opiacés entraîne donc, de manière apparemment paradoxale, une augmentation de l'activité de l'adénylyl cyclase et de la PKA, et donc une augmentation de la phosphorylation dépendante de l'AMPc. Ces changements, qui interviennent à long terme (12 heures et plus), nécessitent la synthèse d'ARN messagers et de protéines. Dès 1975, Sharma *et al.* [11] avaient montré que l'augmentation de l'activité adénylyl cyclasique

consécutive à un traitement chronique par la morphine, était bloquée par un inhibiteur de la synthèse protéique. On sait maintenant que l'expression de plusieurs ARN messagers et protéines est modifiée par un traitement chronique aux opiacés (Tableau III).

Immediate early genes, c-fos

La mise en jeu des IEG (*immediate early genes*) a été suggérée par Hayward *et al.* [30] et par Chang et Harlan [31]. Ces auteurs ont montré qu'un traitement aigu par les opiacés diminuait l'expression de la protéine c-Fos. Le sevrage des animaux dépendants induit une large augmentation de la quantité de cette protéine [32]. Ces effets ont été observés dans des régions précises du cerveau comme le locus coeruleus et l'hypothalamus. Récemment a été observée l'augmentation du taux d'ARN messenger *c-fos* dans le striatum et les cellules NG108-15 à la fois après traitement chronique et après sevrage [33]. Ainsi la modulation de l'expression de la protéine *c-fos* pourrait constituer un élément de la cascade de messagers couplant

les récepteurs des opiacés à l'expression de gènes.

Les protéines G

L'expression des protéines G, l'élément de couplage des récepteurs des opiacés aux systèmes effecteurs, est affectée lors de traitements prolongés par les opiacés. La concentration d'ARN messenger codant pour les protéines G, et la concentration des protéines G elles-mêmes, sont modifiées. Actuellement il n'est pas possible de prédire si les quantités de protéines G seront augmentées, diminuées ou non affectées, selon le type de récepteur stimulé et le tissu étudié. L'addition chronique d'opiacés à des cocultures de neurones de moelle épinière et de ganglions de racine dorsale conduit à une diminution de la concentration des sous-unités α_i de 60 à 70 % alors que la concentration des sous-unités α_o n'est pas modifiée [16]. Dans des neurones de striatum en culture primaire ayant subi un traitement chronique à la morphine, la quantité des sous-unités α_i est légèrement diminuée (16 %) et la quantité des sous-unités α_s est augmentée de plus de 50 % [34]. Des résultats opposés ont été observés dans le locus coeruleus de rats traités à la morphine pendant cinq jours [35] et dans le plexus myentérique de cobaye [36] : la concentration des sous-unités α_o et α_i était augmentée et la concentration des sous-unités α_s était diminuée. En revanche, dans les cellules NG108-15, aucun changement de la concentration des sous-unités α_o et α_i n'a été observé [37]. La quantité de la sous-unité β des protéines G est, elle aussi, augmentée par un traitement chronique aux opiacés [36]. Une telle augmentation pourrait réduire la concentration de la forme libre des sous-unités α , c'est-à-dire la forme active, et ainsi diminuer l'efficacité de couplage entre récepteurs et effecteurs. Des changements des taux d'ARN messenger codant pour les sous-unités α par des traitements chroniques à la morphine ont également été décrits. Bien que contradictoires, ces observations suggèrent que la stimulation chronique des récepteurs des opiacés altère la concentration des différentes sous-unités des protéines G.

Tableau III		
LES EFFETS CHRONIQUES DES OPIACÉS SUR LES TAUX DE PROTÉINES ET DE LEURS ARN MESSAGERS DANS LES NEURONES		
	Taux de protéines	Taux d'ARN messagers
Sous-unités des protéines		
G		
α_o	augmentation	augmentation
α_s	augmentation	augmentation
α_i	diminution	diminution
β	augmentation	nd
Adénylyl cyclase	nd	augmentation
Synapsines	augmentation	nd
c-Fos	diminution localisée*	nd
Proenképhaline	nd	diminution
Prodynorphine	nd	diminution
Récepteurs des opiacés	diminution	nd
OBCAM	diminution	nd
Canaux potassium dépendants du voltage	nd	diminution

*Augmentation localisée lors du sevrage
OBCAM : opioid binding cell adhesion molecule
nd : non déterminé

RÉFÉRENCES

44. Romualdi P, Lesa G, Ferri S. Chronic opiate agonists down-regulate prodynorphin gene expression in rat brain. *Brain Res* 1991 ; 563 : 132-6.
45. Höllt V, Haarmann I. Corticotropin-releasing factor differentially regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in anterior as compared to intermediate pituitary lobes of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1985 ; 124 : 407-15.
46. Roberts JL, Levin N, Lorang JR, Lundblad S, Blum M. Regulation of pituitary proopiomelanocortin gene expression. In : Herz A, ed. *Opioid II*, vol. 104/II. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 1993 : 347-77.
47. Kley N, Loeffler JP, Pittius CW, Höllt V. Proenkephalin A gene expression in bovine adrenal chromaffin cells is regulated by changes in electrical activity. *EMBO J* 1986 ; 5 : 967-70.
48. Waschek JA, Dave JR, Eskay RL, Eiden LE. Barium distinguishes separate calcium targets for synthesis and secretion of peptides in neuroendocrine cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987 ; 146 : 495-501.
49. Hyman SE, Comb M, Pearlberg J, Goodman HM. An AP-2 element acts synergistically with the cyclic AMP- and phorbol ester-inducible enhancer of the human proenkephalin gene. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 321-4.
50. MacArthur L, Koller KJ, Eiden LE. Enkephalin gene transcription in bovine chromaffin cells is regulated by calcium and protein kinase A signal transduction pathways: identification of DNase I-hypersensitivity sites. *Mol Pharmacol* 1993 ; 44 : 545-51.
51. Schofield PR, McFarland KC, Hayflick JS, et al. Molecular characterization of a new immunoglobulin superfamily protein with potential roles in opioid binding and cell contact. *EMBO J* 1989 ; 8 : 489-95.
52. Lane CM, Elde R, Lee NM, Loh HH. Regulation of an opioid-binding protein in NG108-15 cells parallels regulation of δ -opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 11234-8.
53. Govitrapong P, Zhang X, Loh HH, Lee NM. Transfection of NG108-15 cells with antisense opioid-binding cell adhesion molecule cDNA alters opioid receptor- γ -protein interaction. *J Biol Chem* 1993 ; 268 : 18280-5.
54. Montminy MR, Gonzalez GA, Yamamoto KK. Regulation of cAMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci* 1990 ; 13 : 184-8.
55. Sheng M, Dougan ST, McFadden G, Greenberg ME. Calcium and growth factor pathways of *c-fos* transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol Cell Biol* 1988 ; 8 : 2787-96.
56. O'Brien CP. Opioid addiction. In : Herz A, ed. *Opioid II*, vol. 104/II. Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 1993 : 803-23.

Ces effets pourraient refléter une réponse adaptative de la cellule à un traitement prolongé aux opiacés.

L'adénylyl cyclase

Bien que les effets des opiacés sur l'activité de l'adénylyl cyclase aient été largement étudiés, leur influence sur l'expression des adénylyl cyclases n'avait jusqu'alors pas été abordée. Il est concevable que l'augmentation de l'activité de base de l'adénylyl cyclase observée lors de traitements chroniques à la morphine et lors de la précipitation du sevrage soit due, en partie, à une augmentation de l'expression de l'adénylyl cyclase. Une étude récente, faite en collaboration avec le groupe de B. Roques (INSERM U. 266) et utilisant l'hybridation *in situ*, nous a montré qu'un traitement chronique à la morphine chez la souris entraînait une augmentation du taux d'ARN messager codant pour l'adénylyl cyclase de type VIII [38, 39]. Cet effet a été observé dans le noyau basolatéral de l'amygdale, le noyau thalamique et le locus coeruleus [40]. L'augmentation de l'expression de l'adénylyl cyclase de type VIII a été corrélée avec l'apparition des manifestations comportementales du syndrome de sevrage à la morphine. Ces résultats présentent la première preuve expérimentale montrant que le traitement chronique par la morphine induit une augmentation de l'expression du gène d'un type d'adénylyl cyclase. Il sera intéressant d'étendre cette étude aux autres types d'adénylyl cyclase.

Les canaux potassium dépendants du voltage

Les effets inhibiteurs des opiacés sur l'activité neuronale sont induits, au moins en partie, par une augmentation de la conductance au potassium. Une application prolongée d'opiacés produit une moindre augmentation de la conductance. Récemment, Mackler et Eberwine [33] ont rapporté une diminution de l'expression des canaux potassium dépendants du voltage dans le striatum et les cellules NG108-15 lors d'un traitement chronique. Un moindre taux d'ARN messager codant pour les canaux potassium

voltage dépendants conduirait à une réduction du nombre de canaux potassium présents dans la membrane cellulaire. Cette observation pourrait expliquer certaines différences entre un traitement aigu et un traitement chronique.

Les synapsines

La stimulation chronique des récepteurs des opiacés conduit non seulement à l'augmentation du taux de phosphorylation des synapsines, mais également à l'augmentation de la quantité de protéines [41]. Il est probable que les changements d'expression et de phosphorylation des synapsines sont étroitement liés aux effets des opiacés sur la libération de neurotransmetteurs, bien qu'aucune donnée expérimentale directe n'ait conforté cette hypothèse.

Les peptides opiacés

Les peptides opiacés endogènes chez les mammifères sont codés par trois gènes. Le gène pro-opiomélanocortine (*POMC*) est traduit en une protéine, elle-même clivée en plusieurs peptides biologiquement actifs, la β -endorphine et les *melanocyte-stimulating-hormones*. Le gène pro-enképhaline (*PENK*) est traduit en une protéine qui conduit à quatre copies de met-enképhaline et une copie de leu-enképhaline, de l'heptapeptide met-enképhaline-arg-phe et de l'octopeptide met-enképhaline-arg-gly (ou-ser)-leu. Le gène pro-dynorphine (*PDYN*) est traduit en α néo-endorphine et en dynorphine A et dynorphine B [42]. L'expression des gènes codant pour les peptides opiacés endogènes est modifiée lors de traitements par des opiacés (non endogènes). En effet, un traitement chronique réduit le taux d'ARN messager des gènes *PENK* [43], *PDYN* [44] et *POMC* [45]. La transcription des gènes des peptides opiacés est contrôlée par plusieurs facteurs et en particulier par l'AMPc. La concentration en ARN messager des gènes *POMC* et *PENK* est augmentée par activation de l'adénylyl cyclase ou de la PKA [46]. La région en 5' du gène *POMC* contient une séquence CRE (*cAMP responsive element*) qui pourrait expliquer l'induction de l'expression par l'AMPc. La protéine

CREB phosphorylée par la PKA, se lie sur la séquence CRE et stimule l'expression du gène. L'ion calcium est un autre facteur régulateur de l'expression de ces gènes. Il a été montré que des changements de la concentration intracellulaire de calcium affectent l'expression des gènes des peptides opiacés. L'expression du gène *PENK* est diminuée par les inhibiteurs des canaux calciques, alors qu'elle est augmentée par la stimulation de l'activité électrique, induisant un influx de calcium [47, 48]. De plus, l'activation de la protéine-kinase C, dépendante du calcium, augmente l'expression du gène *PENK*.

La stimulation chronique des récepteurs des opiacés qui augmente les concentrations intracellulaires de deux seconds messagers, AMPc et calcium, conduit cependant à l'inhibition de l'expression des gènes codant pour les peptides opiacés. Cette inhibition pourrait être le produit d'une interaction entre les voies de signalisation de l'AMPc et du calcium. Les mécanismes pouvant être mis en jeu dans une telle interaction ne sont pas encore connus; cependant, des éléments régulateurs de la transcription, répondant à la fois à l'AMPc et au calcium, ont été identifiés dans le promoteur du gène *PENK* chez l'homme [49] et du gène *PENK* isolé à partir des cellules chromaffines bovines [50]. Il serait intéressant de déterminer si un traitement à la morphine induit une augmentation d'AMP cyclique et de calcium dans les régions où une diminution de l'expression des gènes des peptides opiacés a été observée.

Les récepteurs des opiacés

La désensibilisation des récepteurs des opiacés observée après un traitement prolongé aux opiacés a été associée à une diminution du nombre de récepteurs. Le mécanisme responsable de la réduction de la densité de récepteurs pourrait impliquer le regroupement et l'internalisation des récepteurs par endocytose. L'existence de modifications du taux de transcription des gènes des récepteurs des opiacés n'a pas encore été démontrée. Le récent clonage des ADNc codant pour les

trois récepteurs [1-4] devrait permettre d'élucider le mécanisme de ces régulations.

Opioid-binding cell adhesion molecule (OBCAM)

Il s'agit d'une nouvelle protéine, liant les opiacés, et dont l'ADNc vient d'être cloné [51]. L'analyse de sa séquence en acides aminés a permis de prédire que la OBCAM serait une glycoprotéine localisée à la surface extracellulaire de la membrane plasmique. Cette protéine possède à son extrémité C-terminale une région hydrophobe caractéristique d'un domaine d'ancrage membranaire. Sa séquence présente des homologies avec les membres de la superfamille des immunoglobulines, et particulièrement avec les molécules d'adhérence cellulaire. Cette protéine pourrait être mise en jeu dans la reconnaissance et l'adhérence cellulaire, et dans la liaison de ligands peptidiques comme les opiacés endogènes. Un traitement chronique à la morphine diminue le taux de protéine OBCAM dans les cellules NG108-15 [52]. De plus, la transfection de ces cellules avec des ADNc antisens anti-OBCAM altère le couplage entre les récepteurs des opiacés, les protéines G et l'adénylyl cyclase [53]. Cette protéine pourrait jouer un rôle dans le couplage des récepteurs aux protéines G. Des variations de son expression pourraient donc constituer un élément régulateur des effets des opiacés.

Les changements d'expression de l'ensemble de ces protéines, correspondant à une adaptation de la cellule à la stimulation chronique des récepteurs des opiacés, pourraient impliquer différents mécanismes tels que la régulation de la demi-vie des ARN messagers et des protéines. Mais c'est la régulation de la transcription des gènes qui a été plus particulièrement étudiée.

Les mécanismes de régulation de la transcription mis en jeu par les opiacés

Un traitement chronique aux opiacés induit des changements de l'expression de nombreux gènes. A l'heure actuelle, on implique des

modifications de la concentration en AMPc à l'origine de toutes ces régulations, en plus ou en moins, et cela par l'intermédiaire de trois familles de facteurs de transcription: les protéines CREB, IEG et les protéines de la famille C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein). Mais les données existantes sont encore bien fragmentaires.

La liaison d'un dimère de la protéine CREB sur une séquence CRE, localisée dans la région promotrice d'un gène, est nécessaire à la régulation de l'activité de ce promoteur, mais n'est pas suffisante. La phosphorylation de la protéine CREB change la conformation de la molécule permettant son interaction avec le complexe d'initiation de la transcription et ainsi l'activation de la transcription [54]. La phosphorylation de la protéine CREB dépend de la PKA qui est elle-même activée par une augmentation de la concentration en AMPc. Toute variation de l'activité adénylyl cyclasique pourrait donc diminuer ou augmenter l'expression des gènes contrôlés par la protéine CREB (*figure 1B*). Il est intéressant de rappeler que la région localisée en 5' des gènes *POMC* et *PENK*, contient des séquences CRE et que l'expression de *PENK* est inhibée par les opiacés [46-49]. La localisation de séquences CRE dans les régions promotrices de certains gènes apporte d'importants arguments à l'hypothèse d'une régulation de l'expression de ces gènes par les opiacés.

L'expression de l'*IEG c-fos* est sous le contrôle d'éléments CRE. L'expression de *c-Fos* augmentée par l'activation de la protéine CREB représente un élément de la cascade intracellulaire pouvant coupler les récepteurs des opiacés aux régulations de l'expression de multiples gènes. La protéine c-Fos forme des hétérodimères avec d'autres proto-oncogènes tels que c-Jun. Les dimères se lient aux sites AP1 localisés dans les domaines promoteurs des gènes régulés, augmentant ainsi l'activité de ces promoteurs (*figure 1B*). L'expression de *c-fos* est également contrôlée par le calcium. Une séquence d'ADN, le CaRE (*calcium responsive element*), proche de la séquence consensus CRE, et peut être même confondue avec CRE, est

impliquée dans l'activation de la transcription de *c-fos* après stimulation de canaux calcium dépendants du voltage [55]. L'élément CaRE est localisé en position - 60 du site d'initiation de transcription de *c-fos* dans les cellules PC12. Fonctionnellement, CaRE et CRE sont équivalents dans leur capacité à contrôler l'expression de gènes en présence de calcium.

Une diminution de l'expression de *c-fos* a été décrite dans deux structures du système nerveux central, le locus coeruleus et l'hypothalamus [30, 31], lors de traitements aigus et chroniques. On peut spéculer que cet effet est dû aux diminutions successives de l'activité adénylyl cyclasique, de la concentration d'AMP cyclique, de l'activation de la protéine CREB et enfin de la transcription du gène *c-fos*. L'effet opposé intervient lors du sevrage aux opiacés durant lequel la synthèse d'AMPc augmente de même que l'expression de *c-fos*.

Enfin, la mise en jeu de protéines de la famille des facteurs de transcription C/EBP, éléments de la cascade de transduction de signal de l'AMP cyclique, a été récemment proposée [8]. Un traitement chronique à la morphine augmente l'activité de liaison du site C/EBP dans le locus coeruleus. Ce résultat suggère que la quantité d'un ou plusieurs facteurs de transcription de la famille C/EBP est augmentée après un traitement de longue durée à la morphine.

Les connaissances actuelles sur les mécanismes régulateurs mis en jeu par les opiacés sont peu développées. La découverte de nouveaux facteurs de transcription répondant à l'AMP cyclique et le décryptage des mécanismes d'action de ces facteurs conduiront à une meilleure compréhension des phénomènes de tolérance et de dépendance aux opiacés.

Conclusions

La modulation de l'expression de gènes induite par les opiacés implique de nombreux facteurs de transcription (CREB, c-Fos, c-Jun). L'AMPc et le calcium constituent les « seconds messagers » de l'action des opiacés, la phosphorylation par la PKA de la protéine CREB, ou la

phosphorylation par la PKC d'éléments encore inconnus, seraient les troisièmes messagers, et les gènes de réponse immédiate (IEG), comme *c-fos*, constitueraient les quatrièmes messagers (figure 1). Ce sont en effet les modifications à long terme de l'expression de nombreux gènes qui joueraient un rôle critique dans les phénomènes de dépendance. L'emballage chronique de nombreux éléments responsables de la libération de neuromédiateurs (synapsines, PKA, adénylyl cyclases, etc.) rend compte du besoin absolu des effets inhibiteurs aigus des morphiniques pour revenir à un fonctionnement normal du neurone. Ce modèle est la généralisation de celui de Sharma, Klee et Nirenberg (1975) [11] proposé initialement pour la seule activité adénylyl cyclasique. La compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces phénomènes nécessitera l'étude des promoteurs impliqués dans la régulation de l'expression de tous ces gènes. On n'est, à présent, qu'au tout début d'une analyse moléculaire détaillée d'un phénomène cellulaire, adaptatif, global de plasticité neuronale. Parmi les questions qui se posent à l'heure actuelle, on peut citer : (1) La diminution aiguë du taux d'AMPc suffit-elle à rendre compte de la cascade d'événements à long terme ? (2) Si les trois types de récepteurs conduisent tous à une diminution de ce taux, leurs effets à long terme sont-ils les mêmes ? (3) Quel est le rôle des modifications du Ca^{2+} intracellulaire ? (4) Les opiacés endogènes et exogènes ont-ils les mêmes effets à long terme ? De la découverte d'une étape réellement cruciale et limitante dans la mise en jeu des effets des opiacés sur la cellule, on peut espérer la mise au point d'une thérapeutique appropriée, spécifique des états de dépendance, qui pourrait remplacer les traitements actuels [56] qu'ils soient substitutifs (méthadone) ou palliatifs (clonidine) ■

Summary

Recent advances in the molecular effects of opiates

Acute and chronic stimulation of opiate receptors induce multiple cellular modifications. Depending on the duration of the stimulation, acute or chronic, the effects are often diametrically opposed. Binding of opiates on their receptors for a short period of time, (acute stimulation), leads to inhibition of adénylyl cyclase activity. On the other hand, binding of opiates on their receptors for a long period of time, (chronic stimulation), induces an increase in adénylyl cyclase activity. Calcium and potassium channels as well as protein phosphorylation (morphine cAMP regulated phosphoproteins or MARPPs, cAMP responsive element binding protein or CREB and synapsins) are also differently affected depending on the duration of the stimulation. Chronic stimulation leads to long-term changes such as modifications of messenger RNA and protein levels. The modulation of gene expression induced by opiates requires the transcription factors CREB and c-Fos in order to maintain cellular adaptation to opiates. Cyclic AMP and calcium would act as second messenger, phosphorylation of CREB by protein kinase A or of unknown proteins by protein kinase C as third messenger and immediate early genes such as *c-fos* would function as fourth messenger. These modifications would allow the cell to adapt to a new environment and play a key role in the dramatic, protracted cellular modifications involved in dependence to opiates.

TIRÉS A PART

J. Hanoune