

Neurobiologie

Mécanisme d'action de la morphine

L'opium, extrait du pavot, est utilisé depuis des millénaires en vertu de son action analgésique extrêmement puissante. C'est également une drogue à l'action psychotrope euphorisante. L'ingrédient le plus actif de l'opium est la morphine (figure 1), un composé isolé au début du siècle dernier [1]. Depuis, la morphine a été couramment utilisée pour le traitement des douleurs sévères et représente encore aujourd'hui le médicament antidouleur le plus efficace dont dispose le médecin. L'administration de morphine s'accompagne malheureusement d'une pléthore d'effets secondaires indésirables, dont l'un des plus redoutés est la dépression respiratoire. Les traitements morphiniques produisent également des problèmes gastro-intestinaux sérieux et une administration prolongée peut s'accompagner de l'apparition d'accoutumance (baisse d'efficacité du composé) et de dépendance (apparition d'un syndrome de manque à l'arrêt du traitement). La toxicomanie, par ailleurs, représente un autre aspect des effets de l'action biologique des opiacés et l'usage illégitime d'héroïne, un dérivé proche de la morphine, constitue un grave problème de santé publique au niveau mondial. On n'a pas encore réussi à développer des analgésiques aussi puissants que la morphine mais dépourvus d'effets secondaires, ni à mettre au point des traitements efficaces de la toxicomanie, malgré les efforts conjugués de nombreux laboratoires académiques et de l'industrie pharmaceutique. La compréhension du mode d'action de la morphine au niveau moléculaire apparaît indispensable au développement de thérapies nouvelles.

Les opiacés produisent leur action biologique en se fixant de manière

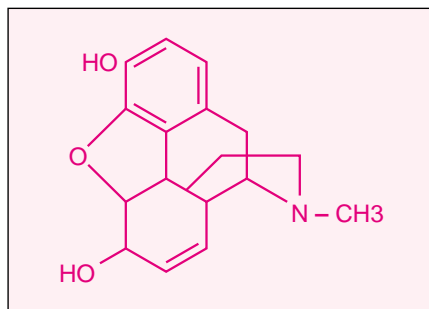


Figure 1. **Structure de la morphine.**

réversible et spécifique à des récepteurs membranaires du système nerveux. L'existence de ces récepteurs a d'abord été démontrée indirectement en 1973, par une approche pharmacologique [2-4] : on a pu, en effet, montrer la fixation spécifique et saturable de composés opiacés radiomarqués sur des préparations membranaires de cerveaux. Par la suite, l'utilisation d'un grand nombre d'analogues dans ces expériences de liaison a permis de distinguer trois classes de récepteurs, que l'on a appelés μ , δ et κ . Ces trois récepteurs sont largement distribués dans le système nerveux et sont particulièrement abondants sur les voies neuronales qui véhiculent les stimulations douloureuses et dans les régions limbiques qui contrôlent les émotions. L'existence de peptides opioïdes endogènes a été démontrée en 1975 [5] et l'on sait aujourd'hui qu'il existe une vingtaine de ces peptides et qu'ils dérivent de trois gènes distincts dont les produits sont nommés proenkephaline, prodynorphine et proopiomélanocortine [6]. Ces peptides et leurs récepteurs forment un système neurotransmetteur qui module plusieurs fonctions du système nerveux dont les principales

sont la réponse à la douleur et au stress, ainsi que le contrôle des émotions. Ils sont impliqués également dans la modulation de fonctions autonomes, endocrines et immunitaires.

Les trois récepteurs des opiacés constituent les éléments-clés dans l'action des opiacés exogènes. Ils sont tous trois médiateurs d'analgésie. Toutefois, le fait qu'ils soient rarement localisés sur les mêmes neurones et que chacun d'eux présente des propriétés de liaison des opiacés distinctes laisse supposer qu'ils contribuent, chacun de manière spécifique, aux différentes réponses pharmacologiques des opiacés. Cette hypothèse est corroborée par des expériences *in vivo* qui ont démontré une implication majeure du récepteur μ dans l'analgésie supraspinale alors que les trois récepteurs semblent capables de relayer l'action antinociceptive des opiacés au niveau spinal [7, 8]. Il a également été démontré que seuls les récepteurs μ et δ sont à l'origine de l'action euphorisante des opiacés alors que l'activation de κ est génératrice de troubles de l'humeur, un effet opposé à ceux de μ et δ [9]. Enfin, il semble que les récepteurs μ et δ sont assez spécifiquement impliqués dans le développement de la dépendance physique, avec toutefois une participation majeure du récepteur μ [10]. L'ensemble de ces conclusions, accumulées au cours d'une vingtaine d'années, dérive de résultats obtenus par l'utilisation d'agonistes ou d'antagonistes supposés spécifiques de chacun des récepteurs. Cependant, la preuve directe d'un rôle différentiel de ces récepteurs n'avait pu être apportée jusqu'à présent.

L'ADNc du récepteur δ des opiacés a été cloné récemment (*m/s* n° 10,

vol. 8, p. 1115) [11, 12]. Cela a permis le clonage, par homologie, des ADNc des récepteurs μ et κ [13]. L'analyse de leur séquence et de la structure primaire déduite des protéines indique que les récepteurs des opiacés font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G, qui présentent une topologie à sept domaines transmembranaires [14]. La possession des gènes des récepteurs des opiacés ouvre la voie à des études fonctionnelles chez l'animal, dans le but d'analyser le rôle respectif de chacun des récepteurs dans l'effet analgésique des opiacés et dans l'apparition du phénomène de dépendance.

Par l'utilisation de la méthode de recombinaison homologue [15] nous avons inactivé le gène codant pour le récepteur μ chez la souris [16] et vérifié que les allèles ainsi modifiés ne code plus pour un récepteur fonctionnel: les cerveaux des souris $\mu^{-/-}$ présentent deux fois moins de sites μ que celui des souris $\mu^{+/+}$ et on ne détecte plus aucune liaison du ligand μ dans les cerveaux de souris $\mu^{-/-}$.

Les souris homozygotes pour la mutation ($\mu^{-/-}$) naissent sans anomalie anatomique évidente, grandissent normalement et se reproduisent à la même fréquence que les souris de type sauvage. Il semblerait donc que les récepteurs μ ne soient pas indispensables à la survie des animaux dans des conditions normales d'élevage.

Une deuxième étape a consisté à analyser la distribution et les niveaux d'expression des autres composants du système opioïde: les techniques de cartographie par autoradiographie et d'hybridation *in situ* ont montré que l'absence de récepteurs μ ne semble affecter ni le nombre et la répartition des récepteurs δ et κ , ni la distribution et le niveau d'expression des gènes codant pour la proenkephaline, la prodynorphine ou la proopiomélanocortine, précurseurs des peptides opioïdes. Au cours du développement de la souris mutante, aucun phénomène compensatoire majeur ne semble s'être développé dans le système opioïde lui-même afin de pallier l'absence de l'un des partenaires du système.

L'analyse comportementale de ces souris mutantes allait donc nous per-

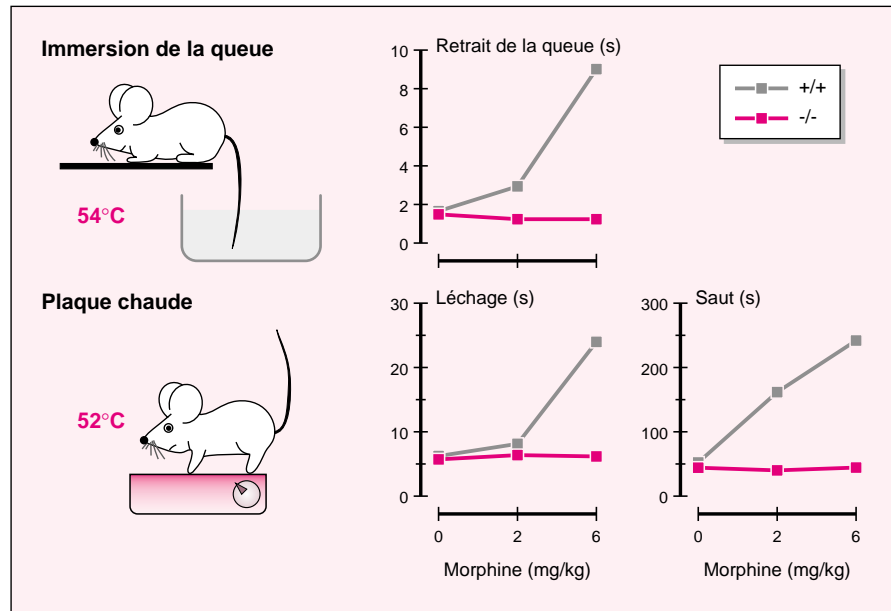


Figure 2. **Analgésie morphinique chez les souris de type sauvage $\mu^{+/+}$ et les souris dépourvues de récepteur μ ($\mu^{-/-}$).** Les animaux sont soumis à une stimulation douloureuse de type thermique. Les graphiques montrent les temps de réaction au stimulus nociceptif en fonction de la dose de morphine injectée. On observe une analgésie dépendante de la dose chez les animaux $\mu^{+/+}$ alors que la morphine reste sans effet chez les animaux $\mu^{-/-}$.

mettre d'évaluer précisément la participation du récepteur μ dans la réponse de l'animal à un opiacé donné. Une absence totale de réponse à la drogue chez les animaux $\mu^{-/-}$ démontrerait la contribution du récepteur μ exclusivement, alors qu'une réponse résiduelle à la drogue indiquerait une participation des récepteurs δ et κ dans la réponse pharmacologique. Nous avons focalisé notre attention sur la molécule opiacée prototypique: la morphine. L'activité analgésique de la morphine a été mesurée à l'aide des tests classiques de retrait de la queue ou du léchage et du saut à partir d'une plaque chaude (figure 2). Dans ces tests on évalue le temps de réponse de l'animal à une stimulation douloureuse de type thermique. L'administration de morphine aux animaux sauvages provoque, comme attendu, une analgésie marquée et dépendante de la dose. En revanche, et de façon très nette, la morphine injectée aux mêmes doses n'a aucune

action sur les animaux dépourvus de récepteurs μ : ceux-ci réagissent à la douleur thermique de la même manière que les animaux témoins ayant reçu une injection de sérum physiologique.

L'activité euphorisante de la morphine peut être évaluée par l'utilisation du test de préférence de place, un test dans lequel on conditionne l'animal à associer l'injection d'une drogue à un environnement particulier (figure 3). Après une période d'apprentissage, l'animal est autorisé à circuler librement et l'on observe que les souris de type sauvage passent plus de temps dans le compartiment dans lequel on leur a administré de la morphine que dans le compartiment dans lequel elles recevaient des injections de sérum physiologique. Ce comportement indique que la morphine présente des propriétés renforçantes et peut être mesurée de façon très nette chez les animaux $\mu^{+/+}$. Ce n'est pas le cas pour les souris déficientes en récepteur μ : celles-ci ne montrent aucune préférence

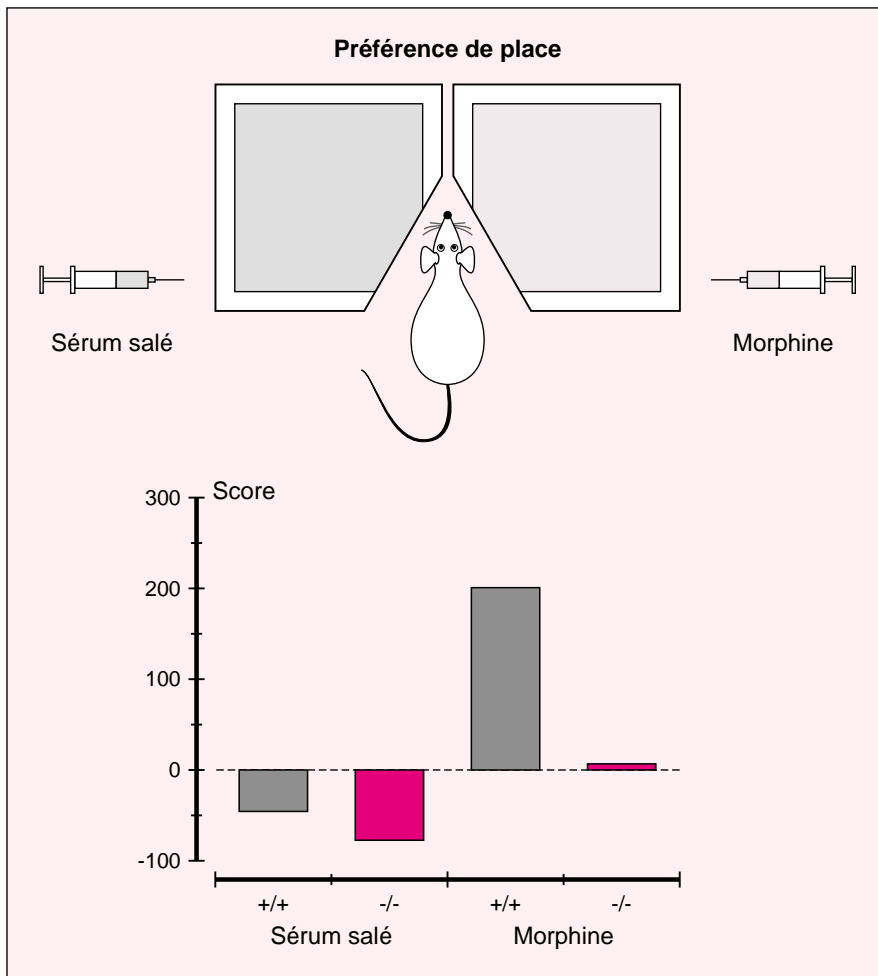


Figure 3. **Effet euphorisant de la morphine chez les souris de type sauvage $\mu^{+/+}$ et les souris dépourvues de récepteur $\mu^{-/-}$.** Dans le test de préférence de place, l'animal est conditionné à associer l'un des compartiments à l'administration de sérum physiologique et l'autre à l'administration de morphine, par des injections alternées pendant une semaine. Les résultats sont exprimés en scores, qui représentent la différence de temps passé dans le compartiment-morphine après et avant le conditionnement. Les animaux témoins $\mu^{+/+}$ et $\mu^{-/-}$, qui ont reçu des injections de sérum salé physiologique dans les deux compartiments, ne sont pas influencés par le conditionnement. La morphine présente clairement une activité autorécompensante chez les animaux $\mu^{+/+}$, qui passent un temps plus long dans le compartiment-morphine après le conditionnement. Aucune préférence de place n'est observée chez les animaux $\mu^{-/-}$.

pour le compartiment associé aux injections de morphine après conditionnement. Cette expérience indique, par conséquent, que la morphine n'a pas de propriétés autorécompensantes lorsque le récepteur μ est absent chez l'animal.

Une troisième propriété de la morphine qui représente l'une des actions biologiques majeure de cette drogue est la capacité d'engendrer une dépendance physique sévère (figure 4). Nous avons injecté des doses croissantes de morphine au

rythme de deux injections par jour pendant 6 jours. Ce traitement est connu pour induire un état de dépendance, qui peut alors être révélé par l'injection de naloxone: l'injection de cet antagoniste opiacé non sélectif, qui bloque presque instantanément l'action de la morphine, déclenche un syndrome de sevrage. Les animaux $\mu^{+/+}$ ainsi traités présentent alors toute une panoplie de symptômes de manque (sauts, renflements, claquements de dents, tremblements, ébrouements, diarrhée, perte de poids, hypothermie) que l'on peut quantifier. Les animaux déficients en récepteurs μ , quant à eux, ne manifestent aucun des symptômes classiques du sevrage et se comportent de la même manière que les animaux traités au sérum physiologique. Nous avons également montré que les cerveaux de ces animaux $\mu^{-/-}$ ne présentent pas l'élévation compensatoire d'activité adénylyl cyclase qui se développe au cours du traitement morphinique chronique chez les animaux $\mu^{+/+}$ (m/s n° 11, vol. 12, p. 1257). Il est donc clair que l'absence de récepteur μ chez les souris mutantes a totalement empêché la mise en place d'un état de dépendance physique à la morphine.

En conclusion, nos résultats démontrent que : (1) l'absence de récepteurs μ ne modifie pas les autres composants du système opioïde ; (2) les souris mutantes homozygotes $\mu^{-/-}$ sont insensibles à l'action de la morphine : l'analgésie, l'euphorie et la dépendance physique, qui sont trois des actions biologiques principales de la morphine, sont totalement abolies chez ces animaux. Nous avons donc identifié sans ambiguïté la cible pharmacologique de la morphine, prouvant ainsi, pour la première fois, que le produit du gène codant pour le récepteur μ représente la cible moléculaire de la morphine.

Plus surprenante a été la constatation que ce récepteur est non seulement la cible principale mais semble être la cible unique de la morphine. L'aspect remarquable de ces résultats est qu'en l'absence du récepteur μ , les récepteurs δ et κ ne relaient pas les actions biologiques principales de la morphine. Il est nécessaire à pré-

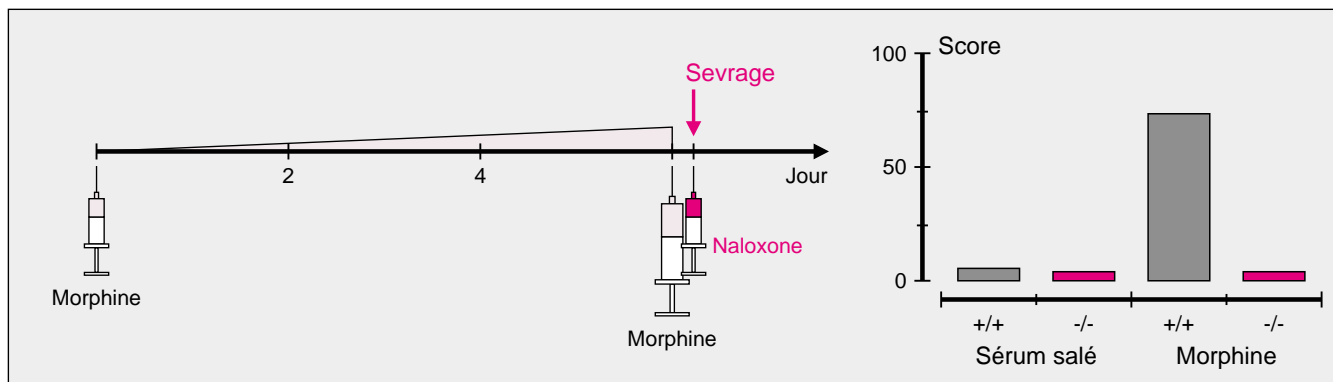


Figure 4. **Dépendance physique à la morphine chez les souris de type sauvage $\mu^{+/+}$ et les souris dépourvues de récepteur $\mu^{-/-}$.** Les animaux sont soumis à des doses bi-quotidiennes et croissantes de morphine pendant 6 jours puis à une dose unique de naloxone (antagoniste opiacé) afin de précipiter un syndrome de sevrage. Celui-ci est exprimé sous forme d'un score qui représente l'ensemble des signes de manque que l'on a observés (sauts, reniflements, tremblements, tremblements des membres, ébrouements, claquements de dents, ptose et diarrhée). Les animaux témoins $\mu^{+/+}$ et $\mu^{-/-}$ traités au sérum salé physiologique ne présentent aucun des symptômes. Le traitement morphinique chronique induit un syndrome de sevrage très marqué chez les animaux $\mu^{+/+}$ alors qu'aucun signe de dépendance physique à la morphine n'est observé chez les animaux $\mu^{-/-}$.

sent d'évaluer précisément l'état fonctionnel des récepteurs δ et κ chez ces souris afin de pouvoir interpréter de façon tout à fait claire la suppression complète de l'action de la morphine chez les animaux mutants.

Les souris déficientes en récepteurs μ , ainsi que les souris chez lesquelles les récepteurs δ et κ auront été inactivés, représentent des outils spécifiques pour la réévaluation du mode d'action des drogues opiacées classiques et la mise au point de nouvelles drogues de type non- μ dont le potentiel thérapeutique dans le traitement des douleurs sévères est très prometteur ■

RÉFÉRENCES

1. Brownstein MJ. A brief history of opiates, opioid peptides and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5391-3.
2. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; 179: 1011-4.
3. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic ^3H etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70: 1947-9.

4. Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol* 1973; 32: 317-9.

5. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258: 577-9.

6. Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JJ. Endogenous opioids: Biology and function. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 223-55.

7. Heymann JS, Vaught JL, Raffa RB, Porreca F. Can supraspinal δ -opioid receptors mediate antinociception? *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9: 134-8.

8. Millan MJ. κ -opioid receptors and analgesia. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 70-6.

9. Di Chiara G, North A. Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 185-93.

10. Maldonado R, Negus S, Koob GF. Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective antagonists. *Neuropharmacology* 1992; 31: 1231-41.

11. Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a δ opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258: 1952-5.

12. 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.

13. Kieffer BL. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15: 615-35.

14. Bockaert J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires: physiologie et pathologie de la transduction. *Med Sci* 1995; 11: 382-94.

15. Lemarchandel V, Montagutelli X. La recombinaison homologue. De nouvelles perspectives pour la transgénèse chez les mammifères. *Med Sci* 1990; 6: 18-29.

16. Matthes HWD, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid receptor gene. *Nature* 1996; 383: 819-23.

Brigitte Kieffer
Hans Matthes
Rafael Maldonado

Université de Strasbourg 1, ESBS-UPR
9050, rue Sébastien-Brant, 67400
Illkirch, France.

TIRÉS À PART

B. Kieffer.