

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR-STRASBOURG I
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

THESE

Présentée par

Muller Arnaud

en vue d'obtenir le grade de

Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg

Etude de la morphine endogène dans le système nerveux de mammifères

Soutenue publiquement le 17 octobre 2008

Membres du jury

Directeur de Thèse : Dr Yannick GOUMON

Rapporteur Interne : Pr Pierrick POISBEAU

Rapporteur Externe : Pr Martine DAOUST

Rapporteur Externe : Dr Jean-Christophe DELOULME

Examineur : Dr Dominique AUNIS

Je tiens à remercier,

Le Dr. Dominique Aunis pour m'avoir accueilli au sein de son unité.

Le Dr. Yannick Goumon pour son m'avoir transmis son amour des Sciences, en espérant avoir un jour sa persévérance. Merci aussi pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir laissé libre dans mes recherches et dans ma soif de nouvelles techniques. Et surtout merci pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble, vivement le prochain congrès de la FENS.....

Le Dr. Marie-Hélène Metz-Boutigue pour le temps et la confiance qu'elle m'a accordé, pour son aide précieuse dans l'obtention de me DEA. En espérant vous recroisez bientôt dans un sommet pyrénéen.

Le Pr. Poisbeau, le Pr. Daoust et le Dr. Deloulme pour avoir évalué ce travail.

L'ensemble du personnel de l'Unité 575 pour son soutien et sa bonne humeur, et plus particulièrement Alexis et Elise pour leur aide précieuse et pour m'avoir supporté si longtemps, Guy, Martine et Monique pour avoir transmis leur savoir et m'avoir presque accueilli dans leur équipe.

Tous mes amis du centre de neurochimie pour les bons moments passés durant ces 4 ans, plus particulièrement Marc, Morgane pour nos virés nocturnes, Peiman pour ta passion de la littérature et ce voyage que je n'oublierai jamais.

Tous mes amis. La liste est trop longue pour vous remercier tous. Meinau forever, on se revoit tous au prochain match du racing...

Wendela. I meet you the week before my thesis in Chamonix, hope to climb lot of other summit with you.

Ma famille, plus particulièrement mes parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont soutenu dans mes choix, mon frère pour son expérience de la morphine et des drogues sans produit, ma mamie, ma mamama et mon papy en espérant qu'il se rétablisse au plus vite.

Sommaire

Sommaire	5
Abréviations	Erreur ! Signet non défini.
Liste des figures	13
Liste des tableaux	16
Rappels bibliographiques	18
1) La morphine: historique de son utilisation.....	20
2) L'utilisation de la morphine et de ses dérivés en milieu hospitalier	22
3) Le catabolisme de la morphine et ses métabolites	22
3.1 Le catabolisme de la morphine.....	22
3.2 Les métabolites dérivés du catabolisme de la morphine	24
4) Les transporteurs de la morphine	25
4.1 Les ABC transporteurs (ATP Binding Cassette).....	25
4.2 Les Organic Anion Transporter Polypeptide (OATPs).....	28
5) Les protéines liant la morphine.....	28
6) Les récepteurs à la morphine	29
6.1 Découverte des récepteurs opioïdes.	29
6.2 Structure du récepteur μ et voie de transduction du signal.	30
6.3 Les différents variants de récepteur μ	31
6.4 Distribution des récepteurs μ	33
6.5 Existe-t-il un récepteur spécifique à la M6G ?.....	34
7) Les effets biologiques de la morphine et de la M6G	35
7.1 Effets analgésiques de la morphine	35
7.2 Effets sur le système respiratoire	38
7.3 Effets sur le système gastro-intestinal	38

7.4 Effets sur le système neuroendocrine.....	39
7.5 Effets sur le système immunitaire	39
7.6 Les effets biologiques de la M6G	40
8) Découverte de la morphine endogène chez les mammifères	40
8.1 Les peptides opioïdes endogènes.	41
8.2 Les premières évidences de l'existence de morphine endogène	44
8.3 La voie de synthèse de la morphine endogène	45
8.4 La localisation tissulaire et cellulaire de la morphine endogène.....	48
9) Quel est le rôle de cette morphine endogène ?	51
9.1 Expression de la morphine endogène lors d'états de stress	51
9.2 Le rôle de la morphine endogène au sein du SNC	52

Matériels et Méthodes..... 64

1) Animaux utilisés pour les expériences.....	64
2) Isolement des protéines solubles de la matrice intragranulaire des cellules chromaffines de bœuf.....	64
3) Préparation d'extraits déprotéinisés des aires cérébrales.....	65
4) Culture de cellules chromaffines	65
5) Stimulation de la sécrétion des cellules chromaffines	66
6) HPLC de phase inverse	66
7) Electrophorèse monodimensionnelle	67
8) Electrotransfert sur membrane de PVDF	68
9) Technique de Western blot	68
10) Chromatographie d'affinité.....	69
11) Co-immunoprécipitation	70
12) Digestion trypsique	70
13) Coloration des protéines au nitrate d'argent	71
14) Spectrométrie de masse.....	71
15) Synthèse de novo de M6G	72
16) Déglycosylation de l'UGT2B	72
17) Extraction du matériel non protéique.....	72
18) Dosage protéique	73
19) Culture primaire de neurones et d'astrocytes.....	73
19.1 Culture primaire de neurones d'hippocampe de souris.....	73

19.2 Culture primaire d'astrocytes de souris.....	74
20) Culture de lignée cellulaire	75
20.1 La lignée cellulaire SH-SY5Y.....	75
20.2 La lignée cellulaire U373-MG	75
20.3 Condition de culture	75
21) Stimulation de la sécrétion des cellules SH-SY5Y	76
22) Extraction du matériel intracellulaire.....	76
23) Immunohistochimie	77
23.1 Préparation des tissus	77
23.2 Immunomarquage.....	77
24) Immunocytochimie	79
24.1 Préparation des cellules	79
24.2 Immunomarquage.....	80
25) Spécificité du marquage de la morphine.....	81
26) Extraction des ARN totaux	82
27) RT-PCR.....	82
28) Electrophorèse des produits de RT-PCR	82
29) Electrophysiologie	83
30) Test ELISA	84
Résultats	88
Publication I: Identification de la morphine-6-glucuronide au sein des granules de sécrétion des cellules chromaffines.	90
Etude de la localisation subcellulaire des composés apparentés à la morphine par microscopie laser confocale	94
Caractérisation biochimique.....	95
Caractérisation d'une protéine intragranulaire liant la M6G	97
Mise en évidence d'un enzyme synthétisant la M6G.....	98
Publication II : Etude de l'implication de la morphine endogène dans les cellules SH-SY5Y et dans le système nerveux central de souris.	102
Localisation subcellulaire de la morphine dans les cellules SH-SY5Y	105
Caractérisation biochimique des alcaloïdes présents dans les cellules SH-SY5Y.....	106

Sécrétion de morphine par les cellules SH-SY5Y	108
Localisation de morphine dans le SNC de souris.....	111
Résultats non publiés	114
Identification des cellules contenant de la morphine dans la zone sous-granulaire du gyrus denté de souris adulte	117
Mise en évidence d'une immunoréactivité à la morphine dans les astrocytes et les neurones en culture primaire: hypothèse d'une capture astrocytaire.....	122
Présence de morphine endogène lors du développement cérébral.....	125
Discussion	130
1) Présence de morphine endogène au sein des cellules chromaffines	130
2) Présence de la morphine endogène dans le système nerveux central	132
2.1) La morphine endogène est-elle un neurotransmetteur ?	132
2.2) Présence de morphine endogène dans le cervelet de souris.....	139
2.3) Présence de morphine endogène dans l'hippocampe de souris	142
Conclusion	146
Bibliographie.....	150
Liste des publications	174
Liste des communications.....	175
Annexe: Publication III (revue)	178

Abbreviations

ABC : ATP Binding Cassette
ATCC : American Type Cell Collection
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
BSA : Albumine Sérique Bovine
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BHE : Barrière HématoEncéphalique
GABA : GAmma Butyric Acid
CA: Corne d'Ammon
CGA : ChromoGranine A
CGB : ChromoGranine B
Cod : Codéine
CTZ : Chemoreceptor Trigger Zone
Da : Dalton
DAMGO : D-Ala²,N-Me-phe⁴,Gly⁵-OL-enkephalin acetate
DAT : DopAmine Transporter
DG: Gyrus Denté
DOPAL : 4-hydroxyphénylacétaldhéhyde
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EC: Cortex Entorhinal
EDTA : Ethylene-Diamine-TetraAcetic Acid
ELISA : Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
GABA : GAmma Butiric Acid
GAD : Glutamic Acid Decarboxylase
GAPDH : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DéHydrogénase
GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein
GMPc : Guanosine Mono Phosphate cyclique
GTP γ S : Guanosine Tri-Phosphate gamma S
HPLC : High Performance Liquid Chromatography

HRP : Horse Radish Peroxydase
HHS : axe Hypotalamo-Hypophyso-Surrénalien
IgG : Immunoglobuline Gamma
kDa : kilo Dalton
LCR: Liquide Céphalo-Rachidien
LPS : LipoPolySaccharide
LTP : Long Term Potentiation
M3G : Morphine-3-Glucuronide
M6G : Morphine-6-Glucuronide
MA : Morphine Acetate
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight
MM : masse moléculaire
MOR : Mu Opioid Receptor
MRP : Multidrug Resistant associated Protein
MS : Mass Spectrometry
OATP : Organic Anion Transporting Polypeptide
OPRM1 : Opioid Receptor Mu 1
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PBS : Phosphate Buffer Saline
PEA : proenképhaline-A
PEBP : PhosphatidylEthanolamine Binding Protein
PFA : ParaFormAldéhyde
PgP : P-GlycoProtein
PM : Poids Moléculaire
PMN : PolyMorphonucléaire Neutrophile
POMC : ProOpioMélanoCortine
PDYN : ProDYNorphine
PGA: Periaqueductal Grey Matter
PSG : Protéines Solubles des Granules chromaffines
PVDF : PolyVinylidène DiFluoride
Q-TOF : Quadripole- Time Of Flight
RIA : RadioImmuno Assay
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
RT-PCR : RetroTranscriptase-Polymerisation Chain Reaction

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SNC : Système Nerveux Central

S: Subiculum

TBE : Tris Borate EDTA

TBS : Tris Buffer Saline

TFA : TriFluoroacetic Acid

UGT : UDP-GlucuronosylTransférase

ZSG : Zone Sous Granulaire

ZSV : Zone Sous Ventriculaire

Liste des figures

Figure 1: <i>Papaver Somniferum</i>	20
Figure 2: <i>Schéma d'une molécule de morphine.</i>	21
Figure 3: <i>Schéma d'une molécule d'héroïne.</i>	21
Figure 4: <i>Formation de M3G et de M6G à partir de la morphine catalysée par l'UGT2B7 dans le foie.</i>	23
Figure 5: <i>Métabolisme et transport de la morphine et de ses dérivés dans les hépatocytes.</i> ..	26
Figure 6 : <i>Schéma représentant la structure du récepteur.</i>	29
Figure 7: <i>Différents épissages du gène OPRM1 décrits chez l'homme.</i>	33
Figure 8: <i>Voies ascendantes spinoréticulaire et spinothalamique de la transmission nociceptive</i>	xx
Figure 9: <i>La voie bulbospinale.</i>	xx
Figure 10: <i>Résumé simplifié de la voie de synthèse de la morphine chez les mammifères.</i>	47
Figure 11: <i>Distribution cérébrale de morphine endogène après un jeûne chez le rat et le chien.</i>	48
Figure 12: <i>Voie de synthèse simplifiée des catécholamines.</i>	50
Figure 13: <i>Evolution des concentrations plasmatiques de morphine suite à un pontage coronarien</i>	51
Figure 14: <i>Effet de la dose de morphine sur la latence de retrait de la patte dans un test de plaque chaude.</i>	53
Figure 15: <i>Représentation schématique d'une cellule chromaffine de la médullo-surrénale.</i> 92	
Figure 16: <i>Analyse par microscopie laser confocale de la localisation subcellulaire de l'immunoréactivité apparentée à la morphine dans les cellules chromaffines bovines en culture primaire.</i>	94
Figure 17: <i>Purification par HPLC de phase inverse d'un standard d'alcaloïdes et du matériel intragranulaire.</i>	95
Figure 18: <i>Analyse MS-MS par Q-TOF de la M6G présente dans la fraction HPLC isolée à partir de la matrice intragranulaire.</i>	95

Figure 19: Identification de la M6G dans les sécrétions des cellules chromaffines bovines..	96
Figure 20: Caractérisation de la M6G liée à la PEBP dans la matrice intragranulaire des cellules chromaffines bovines.....	98
Figure 21: Analyse par microscopie laser confocale de la localisation subcellulaire des enzymes de la famille UGT2B dans les cellules chromaffines bovines en culture primaire. ..	99
Figure 22: Synthèse de novo de M6G.....	100
Figure 23: Schématisation du système « morphinergique » présent au sein des cellules chromaffines.....	101
Figure 24: Localisation subcellulaire de la morphine et de ses dérivés dans les cellules SH-SY5Y.....	106
Figure 25: Caractérisation de morphine et de M6G présentes dans un extrait de cellule SH-SY5Y.....	107
Figure 26: Mise en évidence de l'UGT2B7 dans les SH-SY5Y par Western blot.....	108
Figure 27: Quantification de la morphine sécrétée par les cellules SH-SY5Y.....	109
Figure 28: Etude électrophysiologique des effets de la morphine et de la M6G sur les cellules SH-SY5Y.....	110
Figure 29: Etude de la présence de morphine dans le cerveau de souris adulte.....	111
Figure 30: Immunodétection de morphine dans le cervelet de souris.....	112
Figure 31: Visualisation de l'immunomarquage de la morphine dans le cervelet en microscopie électronique.....	113
Figure 32: Schéma de l'hippocampe de souris.....	116
Figure 33: Immunoréactivité pour la morphine dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte.....	117
Figure 34: La zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe.....	118
Figure 35: Etude de microscopie confocale de la localisation de la morphine et de la GFAP dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte.....	120
Figure 36: Etude de microscopie confocale de la colocalisation morphine-GFAP-Nestine et morphine-GFAP-Tuj-1 dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte.....	121
Figure 37: Etude par microscopie confocale de la présence d'une immunoréactivité à la morphine dans une coculture primaire d'astrocytes et les neurones d'hippocampe de souris.....	122

Figure 38: Observation au microscope confocal d'un astrocyte marqué avec l'anticorps anti-morphine (coculture de neurones et d'astrocytes d'hippocampe de souris).	123
Figure 39: Présence d'une immunoréactivité à la morphine dans des neurones primaires d'hippocampe de souris.	123
Figure 40: Etude par microscopie optique de l'immunomarquage GFAP-morphine-DAPI présent dans une culture primaire d'astrocytes de souris et dans une culture de cellules U373-MG.	125
Figure 41: Immunomarquage d'une coupe d'embryon de souris E15 réalisé à l'aide d'un anticorps anti-morphine.	126
Figure 42: Sécrétion de morphine par des coupes de cerveau de rat.	134
Figure 43: Cinétique de capture de la ³ H-morphine sur les U373-MG et les astrocytes de souris.	137
Figure 44: Schéma de l'organisation cellulaire au sein du cervelet.	140
Figure 45: Marquage au BrdU de neurones néoformés dans la ZSG du gyrus denté de souris.	144

Liste des tableaux

<i>Tableau 1: Comparaison des affinités de la morphine et de la M6G pour les récepteurs opioïdes .</i>	34
<i>Tableau 2: Les différents peptides opioïdes.</i>	43
<i>Tableau 3: Anticorps utilisés pour les Western blots.</i>	69
<i>Tableau 4: Anticorps utilisés pour les expériences d'immunohistochimie.</i>	78
<i>Tableau 5: Anticorps utilisés pour les expériences d'immunocytochimie.</i>	81
<i>Tableau 6: Principaux constituants de la matrice des granules chromaffines.</i>	93

Rappels bibliographiques

Rappels bibliographiques

Les recherches présentées dans ce rapport ont été réalisées au sein de l'Unité Inserm 575 intitulée Physiopathologie du Système Nerveux, dirigée par le Dr. Dominique Aunis, sous l'encadrement du Dr. Yannick Goumon dans l'équipe Neuropeptides Bioactifs du Dr. Marie-Hélène Metz-Boutigue.

1) La morphine: historique de son utilisation

L'opium, suc extrait de la capsule du pavot (*Papaver Somniferum*, figure 1), est certainement le plus vieux remède connu par l'homme pour lutter contre la douleur puisque des tablettes datant de l'époque sumérienne (4500-5000 ans avant notre ère) décrivent déjà son utilisation. Depuis, l'opium a été utilisé durant des siècles pour ses propriétés analgésiques, antidiarrhéiques et antitussives comme le montre cet extrait de manuel thérapeutique "Le Manuel des dames de la charité" écrit à Rouen en 1789 : «L'opium convient à tous les cas où les malades souffrent de violentes douleurs qui ne leur donnent point de relâche car il les apaise presque à l'instant, en calmant l'agitation des esprits, et en faisant succéder un doux sommeil à de longues souffrances» (Dictionnaire des drogues et des dépendances, Larousse, 2004). Cependant, ce n'est qu'en 1803 que le chimiste allemand Friedrich Sertüner isola pour la première fois le principal composé actif de l'opium, baptisé morphine en référence à Morphée, le dieu des rêves dans la mythologie grecque (figure 2). La morphine, qui est un des 40 alcaloïdes trouvés dans l'opium, fut le premier médicament injecté par voie intraveineuse et inaugura l'ère moderne de la pharmacologie et de la médecine.



Figure 1: *Papaver Somniferum*

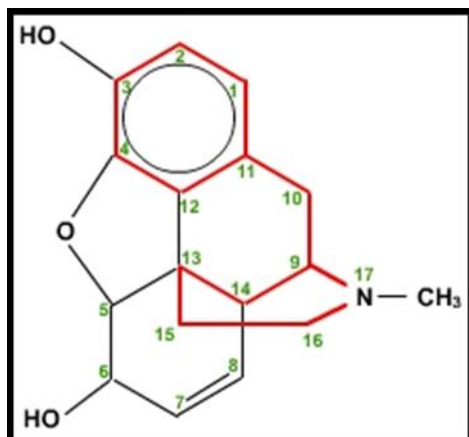


Figure 2: Schéma d'une molécule de morphine.

Dès lors, la morphine fut utilisée massivement contre la douleur, tant à l'hôpital que sur les champs de bataille. C'est son usage sur les champs de bataille (utilisée pour la première fois durant la guerre de Sécession aux Etats-Unis entre 1861 et 1865), notamment pour les amputations, qui va être à l'origine des premiers cas d'addiction que l'on appela alors morphinisme ou morphinomanie. Les premiers signalements de morphinomanie apparaissent dès 1871, époque où la morphine est en vente libre dans de nombreuses préparations pharmaceutiques artisanales.

La morphine est alors utilisée pour tout et par tous, surtout dans le milieu médical où se développe le morphinisme. En 1877, le Dr Levinstein et le pharmacologue Louis Lewin décrivent pour la première fois ce que l'on appellera la toxicomanie aux opiacées. C'est devant cette montée de toxicomanie que le corps médical amalgama propriétés thérapeutiques et toxicomanie, en condamnant d'un seul bloc l'utilisation de morphine. L'héroïne, ou diacétylmorphine, développée en 1898 par Heinrich Dreser, un chimiste de l'entreprise pharmaceutique Bayer à la base pour ses effets analgésiques, est un de ces dérivés de morphine qui est encore à l'heure actuelle utilisé comme stupéfiant (figure 3). Une fois injectée, l'héroïne passe très rapidement la barrière hématoencéphalique et est clivée en morphine dans le système nerveux central (SNC). C'est une des drogues les plus addictives connues de nos jours. Selon *l'Observatoire français des drogues et des toxicomanies*, on comptait au moins de 160000 héroïnomanes en France en 2005).

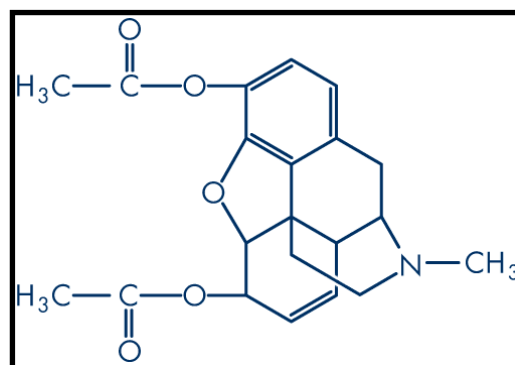


Figure 3: Schéma d'une molécule d'héroïne.

2) L'utilisation de la morphine et de ses dérivés en milieu hospitalier

Ce n'est qu'au début des années 1950 que les hôpitaux anglais redécouvrent les bienfaits thérapeutiques de la morphine. Aujourd'hui encore la morphine est l'analgésique le plus utilisé en milieu hospitalier. D'après l'Office International du Contrôle des Stupéfiants, plus de 137500 doses de morphine ont été administrées quotidiennement en France en 2002. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la morphine est à utiliser pour traiter la douleur aiguë, notamment après une opération, mais aussi la douleur chronique résistante aux autres antalgiques.

L'administration de morphine peut se faire par voie orale, en injection sous-cutanée ou intraveineuse, le plus souvent par systèmes de perfusion prolongée. Une fois injectée, sa demi-vie plasmatique est de l'ordre de 3 heures. Pour les douleurs chroniques en cancérologie, la posologie classique quotidienne est de 30 mg/j chez l'adulte en perfusion continue. Cependant, il n'y a pas de dose maximale recommandée et le traitement peut être augmenté jusqu'au soulagement des douleurs tant qu'il n'y a pas d'apparition d'effets secondaires. Les effets indésirables les plus fréquents aux doses habituelles administrées sont la constipation, la somnolence, les nausées et les vomissements. Les autres troubles assez fréquemment rencontrés sont la confusion, des cauchemars et surtout la dépression respiratoire pouvant conduire à l'apnée et à la mort si la morphine a été surdosée (voir chapitre 7.2).

3) Le catabolisme de la morphine et ses métabolites

3.1 Le catabolisme de la morphine.

Une fois administrée chez l'homme, la morphine, comme de nombreuses drogues et substances toxiques, est principalement catabolisée dans le foie par une famille d'enzymes appelée UDP-glucuronosyltransférase (UGT). Ces enzymes sont liées à la membrane interne du réticulum endoplasmique de certaines cellules, incluant les hépatocytes. Les UGTs possèdent des spécificités de substrats distinctes mais chevauchantes. A ce jour, 28 gènes d'UGTs ont été identifiés et classifiés en deux familles et 3 sous-familles (UGT1, UGT2A et UGT2B) sur la base de leur divergence au cours de l'évolution (pour revue Mackenzie et al., 1997). Cependant, à l'heure actuelle, seulement 15 des UGTs humaines connues semblent catalytiquement actives: UGT1A1, 1A3, 1A4, 1A5, 1A6, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2A1, 2B4,

2B7, 2B15, 2B17 et 2B28 (Ohno et al, 2008; Mackenzie et al., 2005). Dans le foie, la glucuronidation de la morphine est réalisée par les UGTs en liant un groupement glucuronide (provenant du cofacteur acide UDP-glucuronique) sur les groupements hydroxyles des carbones 3 ou 6 de la morphine, aboutissant respectivement à la formation de la morphine-3-glucuronide (M3G) et de la morphine-6-glucuronide (M6G, figure 4) qui sont des composés très hydrophiles, rapidement excrétés dans l'urine et la bile (Coffman et al., 1997).

Chez l'homme, la formation de M6G et de M3G est principalement catalysée par l'UGT2B7. Cependant, l'UGT1A1 et 1A8 ont également été décrites comme contribuant de façon plus minoritaire à la formation de M6G (Ohno et al., 2008), tandis que les UGT1A3, 1A6, 1A9 et 1A10 ne catalysent que la formation de M3G (Radomska-Pandya et al., 2001). La famille des UGTs est principalement exprimée dans le foie, mais quelques UGTs possèdent également une localisation extrahépatique. L'UGT1A6 et l'UGT2B7 sont par exemple exprimées dans le cerveau humain et le cerveau de rat (King et al., 1999). L'UGT1A6 est également exprimée à la fois par des neurones et des astrocytes de rat en culture primaire (Suleman et al., 1998).

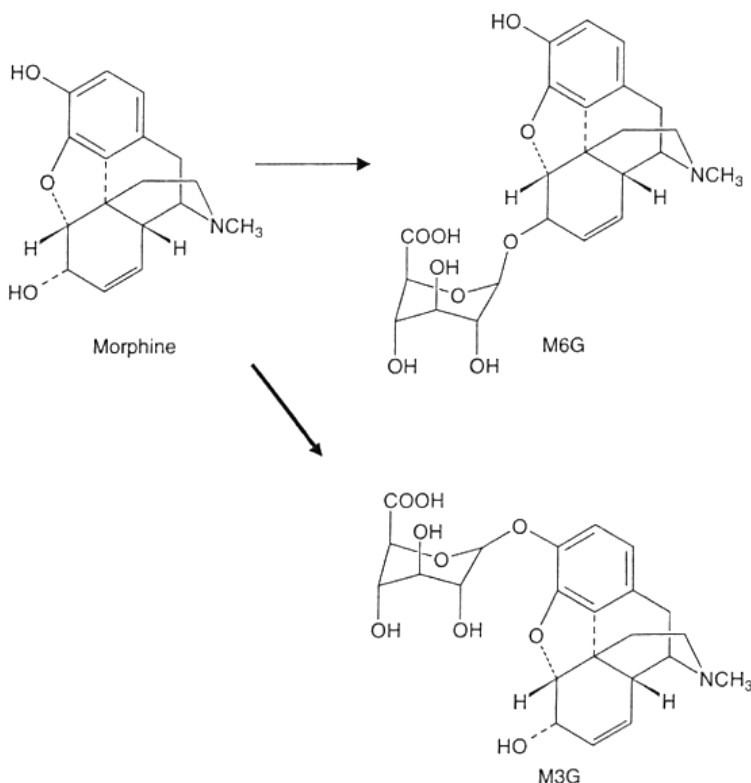


Figure 4: Formation de M3G et de M6G à partir de la morphine catalysée par l'UGT2B7 dans le foie (d'après Lötsch et Geisslinger, 2001).

3.2 Les métabolites dérivés du catabolisme de la morphine

La M3G, qui représente chez l'homme environ 55% des produits du catabolisme, n'a pas d'affinité pour les récepteurs opioïdes et ne possède aucune activité analgésique. Par contre, la M6G, qui représente 10% des produits du catabolisme de la morphine dans le foie, est quant à elle décrite comme possédant une activité analgésique supérieure de 1 à 600 fois à celle de la morphine, selon le modèle d'étude et le mode d'administration (pour revue Lötsch et Geisslinger, 2001). Des autres métabolites de la morphine (35% restant) sont également trouvés en quantités plus faibles dans l'urine : la morphine 3,6-diglucuronide, la normorphine, la normorphine-6-glucuronide et la morphine-3-sulfate. Ces dernières sont décrites comme possédant peu ou pas d'effets physiologiques (Yeh et al., 1977, Zheng et al., 1998).

Les effets centraux des opiacés nécessitent un passage de la barrière hématoencéphalique (BHE). Par rapport à la morphine, le passage de la M6G au niveau de cette barrière est de 32 à 57 fois moins efficace (Wu et al., 1997). La M6G induit surtout une forte analgésie suite à une injection intrathécale ou intracérébroventriculaire. Chez l'homme, les études sur l'efficacité de la M6G ont donné des résultats controversés: une étude montre qu'une injection intrathécale de M6G est 4 à 5 fois plus efficace qu'une injection de morphine pour des douleurs postopératoires (Grace et Fee, 1996), tandis que plusieurs études indiquent que pour des injections intraveineuses, seules des fortes quantités de M6G entraînent une analgésie (pour revue Lötsch et Geisslinger, 2001). En effet, la M6G passant mal la BHE, seules des fortes doses intraveineuses (de l'ordre de 0,3 mg/kg) permettent d'atteindre une concentration de M6G cérébrale suffisante pour induire un effet analgésique. Cependant, l'analgésie observée perdure pendant un délai plus long que la morphine. Plusieurs essais cliniques sont en cours car pour une efficacité analgésique équivalente à la morphine lors du traitement de douleurs post-opératoires, la M6G entraîne moins d'effets secondaires comme les vomissements et la dépression respiratoire (pour revue Dahan et al., 2008). En effet, la M6G se lie préférentiellement aux récepteurs opioïde μ_1 (impliqués dans les effets analgésiques) et plus faiblement aux récepteurs μ_2 et μ_3 (impliqués respectivement dans la dépression respiratoire, le vomissement et l'immunodépression, voir chapitre 6). De plus, l'analgésie induite par la M6G est efficace de 6 à 8h, alors que la morphine n'est efficace que de 2 à 4h (Dahan et al., 2008). La durée d'action supérieure de la M6G, ainsi que ses effets secondaires moindres par rapport à la morphine suggèrent que dans un futur proche, la M6G va remplacer la morphine pour le traitement des douleurs sévères et des douleurs post-opératoires.

4) Les transporteurs de la morphine

La morphine et ses conjugués sont des composés très hydrophiles qui nécessitent la présence de transporteurs pour leur capture et efflux qui se déroule principalement dans le foie, mais aussi pour assurer leur passage au travers de la BHE et ainsi accéder au SNC. Les super familles des ABC transporteurs (ATP Binding Cassette) et des Organic Anion Transporter Polypeptide (OATP) sont décrites comme étant impliquées dans la capture de la morphine et l'efflux de M3G inactive.

4.1 Les ABC transporteurs (ATP Binding Cassette)

Les transporteurs de la super famille des ABC transporteurs sont des protéines transmembranaires impliquées dans le transport de nombreuses molécules au travers la membrane plasmique *via* un mécanisme consommant de l'énergie par hydrolyse d'ATP. Elles comprennent les sous-familles ABC de A à G. Parmi ces sous-familles, certains membres des ABCC et ABCB1 (ou Pgp) sont capables de transporter la morphine ou des composés glucuronidés (pour revue Choudhuri et Klaassen, 2006).

4.1.1 ABCC. La sous-famille ABCC (aussi nommée MRP/CFTR) compte 12 membres regroupant les MRP de 1 à 9 (Multidrug Resistant associated Proteins), le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) et le SUR (Sulfonyleurea Receptor). Parmi les MRPs, seuls MRP2 et MRP3 sont impliquées dans la sortie de M3G et de M6G des cellules (van de Wetering et al., 2007). Ces transporteurs sont des pompes à efflux ATP-dépendantes qui sont impliquées dans l'élimination des médicaments et de leurs catabolites au niveau extracellulaire. Ils sont fortement surexprimés au niveau des tumeurs, conférant à ces dernières une résistance aux traitements anticancéreux, ce qui leur a valu leur nom de MRP (Ambudkar et al., 2003).

MRP3 et MRP2 contiennent trois domaines transmembranaires (TMD₀, TMD₁, TMD₂) composés de 5 (TMD₀) ou 6 hélices transmembranaires (TMD₁, TMD₂) (Ballatori et al., 2005). Ce ne sont pas des transporteurs hautement spécifiques. En effet, ils jouent un rôle important dans la détoxification et le transport de molécules anticancéreuses, de glutathion, de composés glucuronidés, sulfatés, d'anions organiques, des leucotriènes (van de Wetering et al., 2007). Parmi les composés liant ces transporteurs, le probénécide et l'indométacine représentent des inhibiteurs plus ou moins spécifiques.

En ce qui concerne la localisation de MRP2 et MRP3, celles-ci sont principalement exprimées dans le foie, les reins et le colon (van Dorp et al., 2006). Au niveau des membranes des cellules polarisées, leur localisation varie selon les MRPs. MRP3 et MRP2 sont exprimées respectivement au niveau basolatéral et apical de la membrane des hépatocytes. Le modèle des souris KO MRP3^{-/-} et MRP2^{-/-} ont permis de mettre en évidence leurs implications lors du transport de morphine et de ses dérivées (*i.e.*, M6G et M3G). En effet, les travaux de Zelcer et coll. ont montré une accumulation de M3G au niveau du foie et de la bile dans les hépatocytes de souris MRP3^{-/-} et MRP2^{-/-} (Zelcer et al., 2005). Ainsi, ces transporteurs de sortie seraient impliqués dans l'élimination de la morphine et de ses dérivés glucuronidés au niveau hépatique par la voie biliaire pour MRP2 et par la voie sanguine pour MRP3 (figure 5).

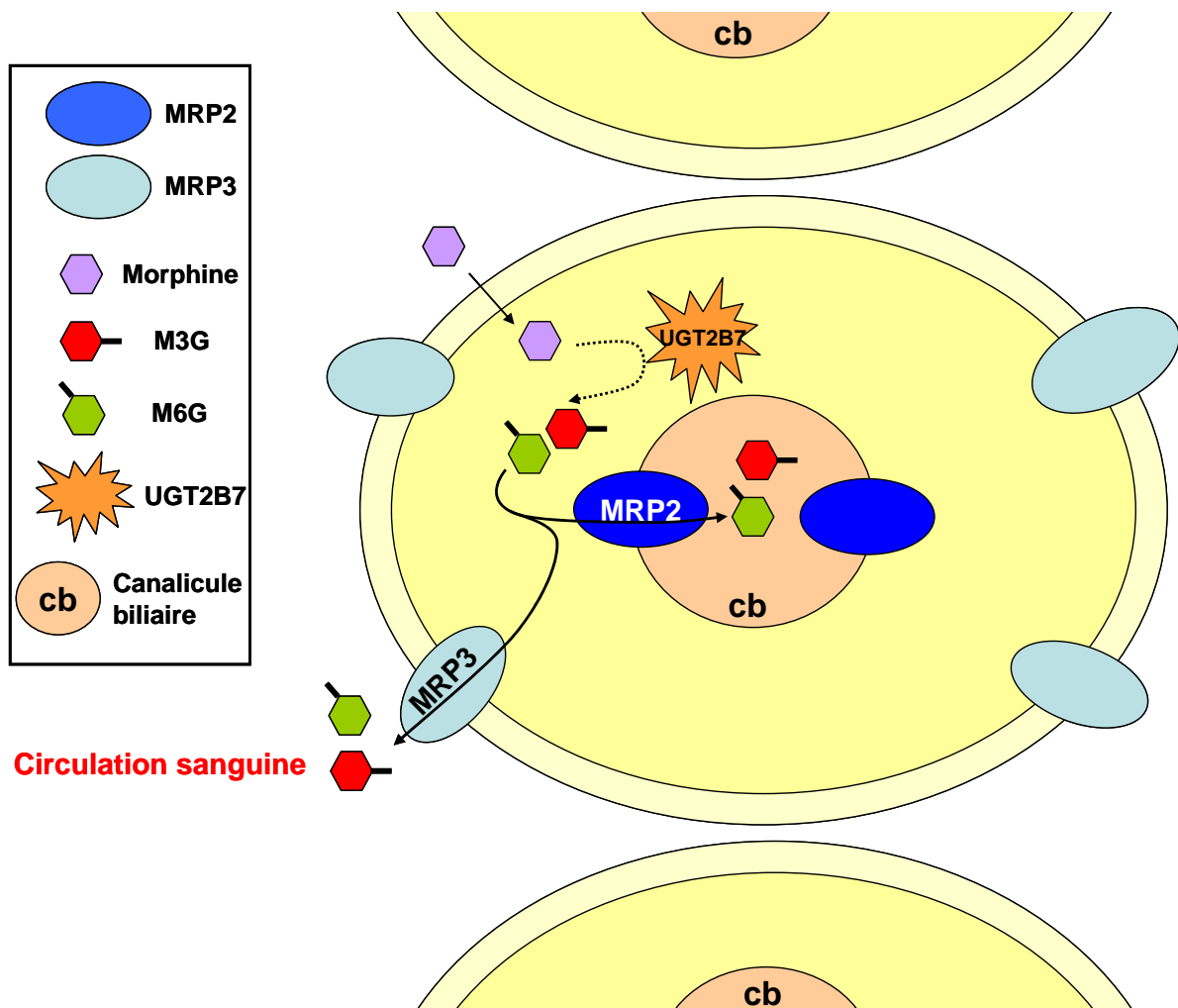


Figure 5: Métabolisme et transport de la morphine et de ses dérivés dans les hépatocytes (modifiée d'après van Dorp et al., 2006). Dans les hépatocytes la morphine est transformée par l'UGT2B7 en M6G et M3G. Ces dérivés sont ensuite transportés vers le sang par MRP3 et vers la bile par MRP2. Les abréviations et symboles sont décrits à gauche du schéma.

En plus de sa présence au niveau hépatique, MRP3 est exprimée par les cellules endothéliales de la barrière hématoencéphalique (BHE) où elle pourrait jouer un rôle lors du passage de la morphine périphérique dans le SNC. D'autres données parcellaires rapportent une présence potentielle de ces transporteurs dans des neurones et des astrocytes de rat en culture primaire (Hirrlinger et al., 2002).

4.1.2 La Pgp (P glycoprotein ou ABCB1). La Pgp est principalement décrite comme étant un transporteur de la morphine au niveau de la BHE (Callaghan et Riordan, 1993; King et al., 2001). En effet, celle-ci est retrouvée au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins, mais également dans des neurones dans un modèle d'épilepsie chez le rat (Lazarowski et al., 2004) et des astrocytes après des injections de kaïnate (Zhang et al., 1999). Elle est impliquée dans l'élimination de la morphine cérébrale vers la circulation sanguine périphérique, limitant ainsi son accumulation au niveau cérébral. Ainsi, l'inhibition de la Pgp par la cyclosporine induit une augmentation de la morphine cérébrale. Une augmentation similaire de morphine est observée dans le SNC de souris Pgp^{-/-} (Dagenais et al., 2000). De plus, chez des rats rendus tolérants à la morphine suite à des injections chroniques, on observe une surexpression de la Pgp cérébrale (Aquilante et al., 2000).

Tout comme MRP2 et MRP3, la Pgp est une pompe à efflux participant au transport actif de différents composés thérapeutiques (van de Wetering et al., 2007). Ainsi, les substrats de la Pgp regroupent un large éventail de molécules : des anticancéreux, des antibiotiques, des antiépileptiques, des antidépresseurs, des corticoïdes, des glycosides cardiaques (digoxine) et la morphine (King et al., 2001). Structurellement la Pgp est composée d'un homodimère de 2 sous-unités contenant chacune 6 hélices transmembranaires (Sharom, 2006).

En ce qui concerne sa localisation, la Pgp est exprimée au niveau des reins, du foie, de l'intestin, du placenta, des glandes surrénales. Au niveau cérébral, l'expression de la Pgp a été démontrée *in vivo* sur l'endothélium capillaire de rat, au niveau du cortex cérébral, du cervelet et de l'hippocampe (Stewart et al., 1996). Des études *in vitro* ont indiqué la présence de la Pgp sur la membrane luminale d'une lignée de cellules endothéliales, ainsi qu'au niveau apical des cellules épithéliales du plexus choroïde (Beaulieu et al., 1997; Virgintino et al., 2002).

4.2 Les Organic Anion Transporter Polypeptide (OATPs)

Les OATPs (notés OATPs pour l'homme et Oatps pour les rongeurs) appartiennent à la super famille des transporteurs indépendants du sodium et à la famille SLC21A (SoLute Carrier 21A) (pour revue Hagenbuch et Meier, 2003). Ce sont des glycoprotéines possédant 12 domaines transmembranaires et des sites potentiels de phosphorylation. Ils sont exprimés principalement par le foie, mais sont également retrouvés au niveau de la BHE, du plexus choroïde, des poumons, du cœur, des reins, du placenta et des testicules.

Comme les MRPs et la PgP, les OATPs présentent un large éventail de substrats. Ils permettent le transport transmembranaire de composés organiques amphipatiques tels que les sels biliaires, les stéroïdes conjugués, les colorants organiques, les hormones thyroïdiennes, ainsi que de nombreux xénobiotiques (pour revue Mikkaichi et al., 2004). Le transport se fait par un mécanisme de couplage impliquant un échange capture/efflux de composés organiques. Ainsi, la localisation de ces transporteurs au niveau de la membrane basolatérale des hépatocytes favorise la capture et la concentration de xénobiotiques, facilitant leur excrétion biliaire *via* d'autres transporteurs (MRP, PgP). Les OATP1A2 et 1B1 ont la capacité de transporter des composés glucuronidés, et la M6G serait un des substrats des OATPs (van Dorp et al., 2006).

5) Les protéines liant la morphine

Plusieurs transporteurs sériques de la morphine ont été décrits jusqu'à présent. La morphine est décrite comme pouvant se lier à l'albumine sérique (Bernier et al., 1986), de même qu'à la gamma globuline (Olsen, 1975) et à l'alpha 1-acid glycoprotein (Leow et al., 1993). De plus, en 1991, lors d'une expérience visant à isoler un récepteur de la morphine à l'aide d'une colonne d'affinité greffée avec de la morphine, Grandy et coll. ont montré que la PhosphatidylEthanolamine Binding Protein (PEBP) représentait une des protéines majeures liant la morphine (Grandy et al., 1990). Au niveau sérique, la PEBP pourrait ainsi représenter un transporteur de la morphine.

6) Les récepteurs à la morphine

6.1 Découverte des récepteurs opioïdes.

Dès le début des années 70, sur la base des effets physiologiques de la morphine sur l'homme, l'hypothèse de l'existence de récepteurs spécifiques liant la morphine a été postulée. Ainsi, les avancées de la biologie (autoradiographie utilisant des ligands radioactifs) ont permis la découverte de plusieurs récepteurs liant les opiacés (incluant la morphine) dans le SNC (Pert et Snyder, 1973). Les opiacés (alcaloïdes) et les opioïdes (peptidiques) agissent principalement sur les récepteurs Mu (μ), Delta (δ) et Kappa (κ) qui sont couplés aux protéines G, la morphine ayant une affinité préférentielle pour le récepteur μ (figure 6), également appelé MOR (Mu opioid receptor) ou MOP (Mu opioid peptide receptor) dans la littérature. La suite de ce chapitre se focalisera sur ce dernier récepteur.

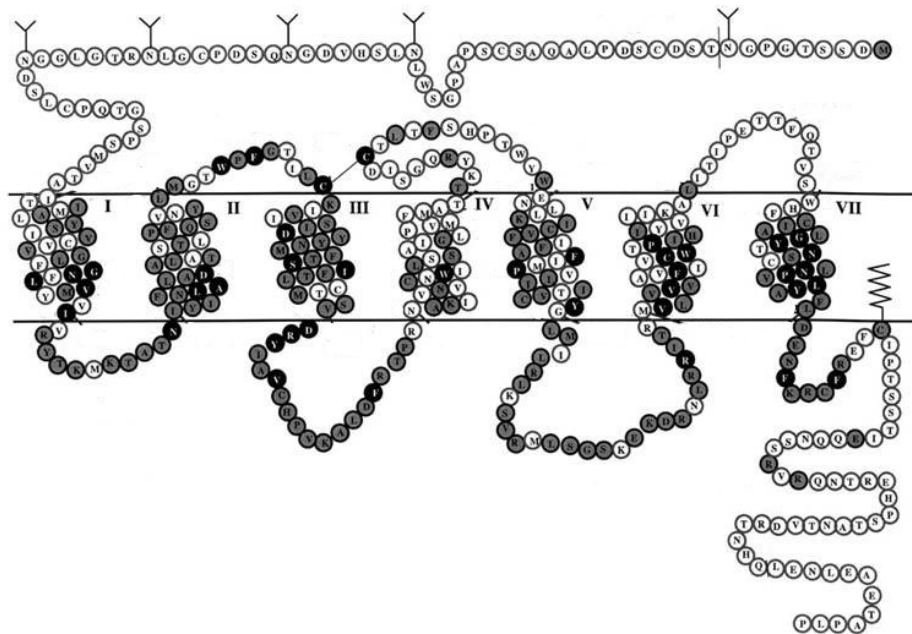


Figure 6 : Schéma représentant la structure du récepteur μ (d'après le "Center For Opioid and Design", www.opioid.umn.edu).

6.2 Structure du récepteur μ et voie de transduction du signal.

Le récepteur opioïde de type μ , qui lie principalement la morphine, appartient à la superfamille de récepteurs à sept segments transmembranaires couplés à des protéines G (Kieffer et Gavériaux-Ruff, 2002). La partie N-terminale extracellulaire correspond au site de liaison des ligands, alors que la partie C-terminale intracellulaire permet la transduction du signal (figure 6), en activant des protéines G de la classe Gi/Go qui vont inhiber l'activité cellulaire grâce à 3 mécanismes principaux:

- une inhibition de l'adénylate cyclase entraînant une diminution de la production d'AMPc, qui est un second messenger important impliqué dans les voies de signalisation intracellulaire (Sharma et al., 1977). Cependant, une exposition répétée à la morphine va au contraire entraîner une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase, mécanisme qui semble contribué à la dépendance aux opiacés (Nevo et al., 2000).
- l'augmentation d'une conductance potassique consécutive à l'ouverture de canaux K^+ entraînant une hyperpolarisation de la cellule (Williams et al., 2001).
- une baisse de la conductance aux ions Ca^{2+} qui se fait *via* le blocage de canaux Ca^{2+} voltage dépendant (Williams et al., 2001).

L'activation des canaux K^+ et le blocage des canaux Ca^{2+} voltage dépendant vont inhiber la libération de neurotransmetteurs par les cellules. L'activation du récepteur μ va par exemple baisser la libération de GABA par des interneurons de l'hippocampe (Cohen et al., 1992) et diminuer la libération de glutamate par des neurones du striatum (Jiang et North, 1992).

En plus de ces 3 mécanismes, des études récentes ont indiquées que l'activation du récepteur opioïde μ peut modifier d'autres cascades de signalisation qui sont dépendantes du type cellulaire :

- Des études réalisées sur des cultures de la lignée SH-SY5Y dérivant d'un neuroblastome humain (Connor et Henderson, 1996), ainsi que sur des cultures primaires de neurones de ganglions rachidiens de souris (Tang et al., 1996), montrent que l'activation du récepteur μ entraîne une libération des stocks de calcium intracellulaire et une augmentation de la concentration cytosolique de calcium. Cependant, l'étude sur les cellules SH-SY5Y a montré que cet effet, qui passe par une production d'IP₃, nécessite la coactivation de récepteurs couplés à la phospholipase C (Connor et Henderson, 1996).

- D'autre part, l'activation du récepteur μ est aussi décrite pour potentialiser les courants postsynaptiques induits par l'activation des récepteurs NMDA par le glutamate (Martin et al., 1997). Cette potentialisation, qui a lieu dans le noyau accumbens et l'hippocampe, est due à une activation de la protéine kinase C (PKC) par le récepteur μ (Williams et al., 2001).
- Dans les cellules endothéliales, l'activation du récepteur μ va entraîner la production et la libération de monoxyde d'azote (NO) *via* un mécanisme activant la PKC (Stefano et al., 2000).
- L'effet immunodépresseur de la morphine sur les lymphocytes et les polymorphonucléaires est dépendant de l'activation de la cascade des MAP kinases par le récepteur μ (Chuang et al., 1997).
- Une étude sur différentes zones du SNC, incluant le locus coeruleus (Schulz et Höllt, 1998), a indiqué que l'activation de la cascade des MAP kinases n'est induite que lors d'un sevrage faisant suite à un traitement chronique à la morphine. La cascade des MAP kinases va entraîner la phosphorylation de nombreuses cibles cytoplasmiques et nucléaires, comme le facteur de transcription CREB qui modifie profondément le fonctionnement cellulaire. Cette cascade serait ainsi impliquée dans les modifications neurobiologiques à long terme pouvant être responsables de la dépendance.

6.3 Les différents variants de récepteur μ .

Dans les années 80, diverses études pharmacologiques, ainsi que des études de liaison de ligands avaient décrit l'existence de plusieurs sous-types de récepteur μ (Pasternak et Wood, 1986) :

- le sous-type μ_1 est principalement exprimé au niveau du SNC. Il possède une forte affinité pour la morphine et est responsable de ses effets analgésiques (Lötsch et Geisslinger, 2001).
- le sous-type μ_2 est exprimé au niveau du SNC, mais également dans le système respiratoire et gastro-intestinal. Il possède une affinité plus faible pour la morphine et est décrit comme étant principalement responsable des effets secondaires tels que les vomissements et la dépression respiratoire (Lötsch et Geisslinger, 2001).
- des études du groupe de Stefano suggèrent l'existence d'un sous-type de récepteur appelé μ_3 qui correspond à un variant d'épissage de μ_1 et qui est localisé sur les monocytes, les granulocytes et les cellules endothéliales humaines (Cadet *et al.* 2003). Ce sous-type n'est sensible qu'aux ligands opiacés (alcaloïdes) et son activation entraîne une libération de monoxyde d'azote (NO) par les cellules immunitaires.

Cependant, l'existence de ces 3 sous-types est maintenant controversée car les récepteurs μ sont tous codés par un seul et même gène appelé *OPRM1* (OPioid Receptor Mu 1) chez l'homme et *Oprm1* chez la souris, et résultent d'un épissage alternatif. Ce gène se situe sur le chromosome 6 avec une taille de 90 kb chez l'homme et sur le chromosome 10 avec une taille de 240 à 250 kb chez la souris. Les études réalisées sur le récepteur μ montrent l'existence de nombreux variants d'épissage (Chen et al., 1993). Ainsi, à l'heure actuelle 27 variants différents ont été décrits chez la souris (Doyle et al., 2007), tandis que 10 ont été caractérisés chez l'homme (figure 7) (Pan et al., 2005). Cependant cette classification est en constante évolution et il est probable que d'autres variants seront trouvés.

La plupart des variants des récepteurs μ isolés contiennent les séquences codées par les exons 1, 2 et 3, suggérant l'importance de ces séquences pour l'activité des récepteurs (Kieffer et Gavériaux-Ruff, 2002). Ces 3 exons codant l'extrémité N-terminale, correspondant au site de liaison des ligands, ainsi que les boucles transmembranaires, l'affinité de la morphine pour les différents variants est très similaire. Cependant, ces variants diffèrent par leurs localisations et par leurs propriétés pharmacologiques. Chez la souris, le variant mMOR-1C est fortement exprimé dans le thalamus, alors qu'on retrouvera en majorité le variant mMOR1-E dans l'hypothalamus et mMOR1-D dans le cortex et le cervelet (Pan, 2005). D'un point de vue pharmacologique, des études *in vitro* ont montré des différences dans l'activation des protéines G et dans l'inhibition de la production d'AMPc (Pan, 2005). Il est intéressant de noter que le variant MOR-1B4 possède une affinité normale pour ses antagonistes (*e.g.*, CTOP, CTAP, naloxone) et une faible affinité pour ses agonistes classiques (*e.g.*, morphine, DAMGO) (Pan et al., 2005).

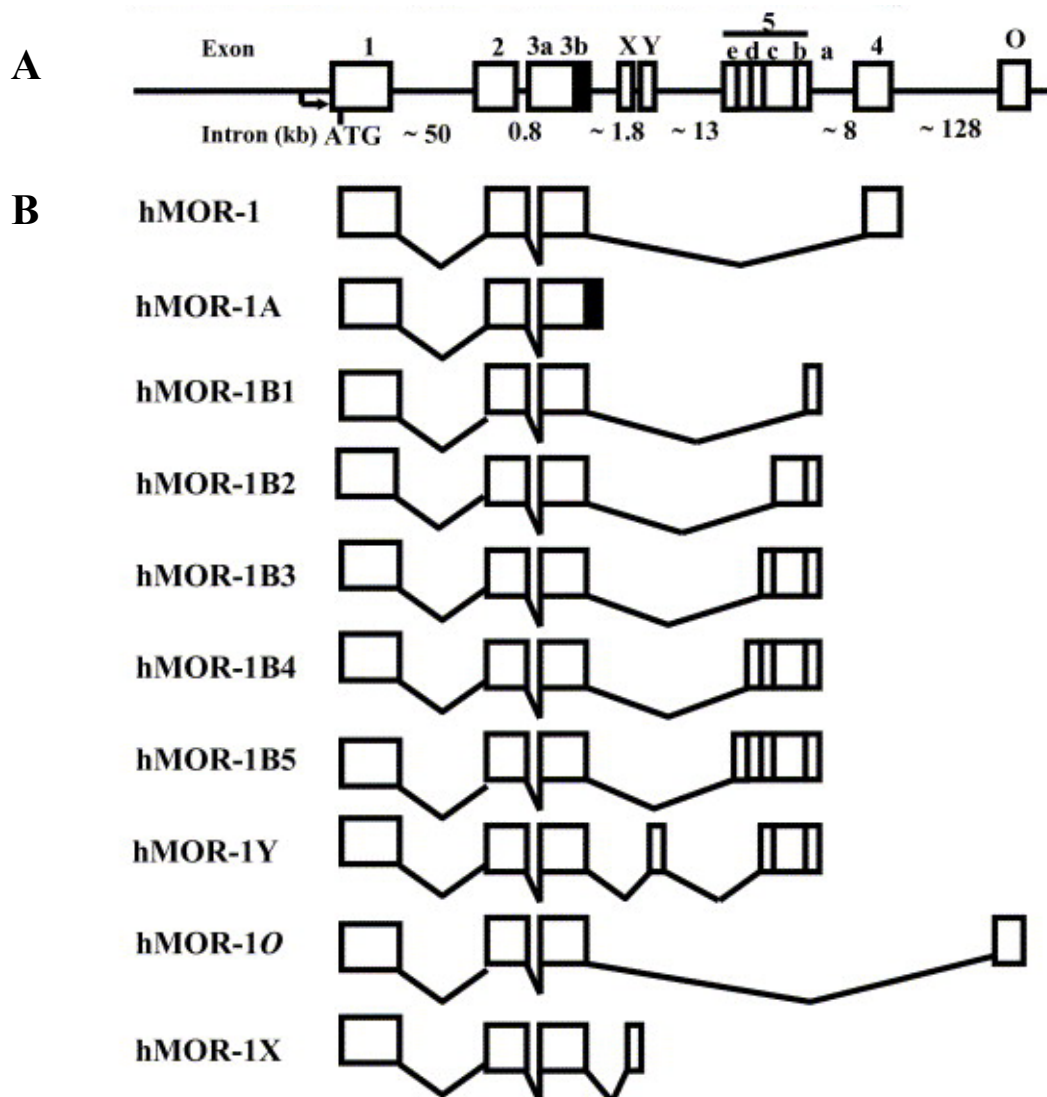


Figure 7: Différents épissages du gène *OPRM1* décrits chez l'homme (d'après Pan et al., 2005). A: Structure du gène *OPRM1*. Les exons sont représentés par des carrés et les introns par des traits noirs verticaux. B: Différents splicing variants du gène *OPRM1*

6.4 Distribution des récepteurs μ

Après la découverte et le clonage des récepteurs opioïdes, diverses équipes se sont focalisées sur leur expression dans le système nerveux central et périphérique. Ces études ont utilisé deux techniques complémentaires: (i) l'autoradiographie des récepteurs, qui indique la localisation des récepteurs grâce à des ligands radiomarqués et (ii) l'hybridation *in situ* qui renseigne sur la présence d'ARNm des récepteurs.

De manière générale, le récepteur μ est largement exprimé dans l'ensemble du SNC, ce qui témoigne de l'implication du système opioïde dans la régulation de nombreuses fonctions nerveuses. Ainsi, dans le cerveau antérieur les récepteurs μ sont principalement exprimés dans le thalamus, le caudé-putamen, la substance noire, le cortex, l'aire tegmentale ventrale, le noyau accumbens et l'amygdale (Mansour et al., 1995; Ding et al., 1996). Les récepteurs μ sont également trouvés dans tout le système anti-nociceptif du tronc cérébral incluant la substance grise périaqueducule, le noyau du raphé et le locus coeruleus.

6.5 Existe-t-il un récepteur spécifique à la M6G ?

La M6G se lie aux récepteurs opioïdes μ , δ et κ avec une affinité plus forte pour le récepteur μ (Lötsch et Geisslinger, 2001). Cependant l'affinité de la M6G pour le récepteur μ est environ quatre fois inférieure à celle de la morphine (Kilpatrick et Smith, 2005) et ce, bien qu'elle soit décrite comme possédant une activité analgésique supérieure (tableau 1)

Study	Agent	μ	μ_1	μ_2	κ	δ
K_i values (nmol/L) in binding studies with rabbit cellular membranes						
	M6G	20.3			62	10 780
	Morphine	5.6			106	181
K_d values (nmol/L) for inhibition of specific ligand binding at guinea-pig cerebral membranes						
	M6G	10.4			29	3
	Morphine	10.7			18.5	2.6
K_i values (nmol/L) in binding studies with rat brain homogenates						
	M6G	0.6				
	Morphine	1.2				
IC₅₀ values (nmol/L) for inhibition of specific ligand binding at receptors						
	M6G	94	211	82		305
	Morphine	13	300	17		365
IC₅₀ values (nmol/L) for inhibition of specific ligand binding at receptors						
	M6G	84	219	60		240
	Morphine	14	291	13		495

IC₅₀ = concentration giving 50% inhibition; K_d = apparent inhibition constant; K_i = apparent dissociation constant.

Tableau 1: Comparaison des affinités de la morphine et de la M6G pour les récepteurs opioïdes (d'après Lötsch et Geisslinger, 2001).

Une telle différence entre les études comportementales (douleurs) et les études de liaison a conduit à l'hypothèse que la M6G possède un effet analgésique qui pourrait passer par un récepteur spécifique de la M6G. Des études sur les différents variants de récepteurs μ

utilisant une stratégie anti-sens et des sondes oligodéoxynucléotidiques dirigées contre les exons de MOR-1 ont révélé des sélectivités différentes pour l'analgésie induite par la morphine ou par la M6G (Rossi et al., 1995; Rossi et al., 1997). L'injection de sondes dirigées contre les exons 1 ou 4 de MOR-1 dans le liquide céphalo-rachidien ou la substance grise périaqueducule diminue l'effet analgésique de la morphine dans un test de tail-flick (retrait de la queue) chez la souris et le rat, mais n'a pas eu d'effet sur l'analgésie induite par la M6G. D'autre part, des sondes anti-sens dirigées contre les exons 2 ou 3 n'ont pas d'effet sur l'analgésie induite par la morphine, mais diminuent celle induite par la M6G. De plus, l'utilisation d'une sonde bloquant la sous-unité $G_{1\alpha_2}$ de la protéine G diminue l'effet analgésique de la morphine mais pas celui de la M6G. D'un autre côté, un blocage de la sous-unité $G_{1\alpha_1}$ induit une baisse de l'analgésie provoquée par la M6G, mais pas celle provoquée par la morphine (Rossi et al., 1995).

Ces études suggèrent que l'analgésie induite par la morphine et la M6G se distinguent par une liaison à des récepteurs différents. Le récepteur de la M6G pourrait correspondre à un variant d'épissage de MOR-1 (Rossi et al., 1997; Pasternak, 2004). Cependant, l'existence d'un récepteur spécifique de la M6G reste à l'heure actuelle toujours extrêmement controversée.

7) Les effets biologiques de la morphine et de la M6G

7.1 Effets analgésiques de la morphine

La morphine est principalement utilisée pour son effet antidouleur (voir chapitre 2). La douleur est une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable, liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle. La nociception est le processus sensoriel à l'origine du message nerveux qui provoque la douleur. La douleur est donc un signal d'alarme qui met en jeu des réflexes de protection nous permettant de nous soustraire aux stimuli nocifs.

Les voies qui transmettent au cerveau les informations nociceptives sont complexes, les principales étant le faisceau spinothalamique pour les afférences provenant du corps et la voie trigéminal pour les afférences de la face (pour revue Willis et Westlund, 1997). Dans la voie spinothalamique, des nocicepteurs, qui sont des neurones sensoriels qui enregistrent les stimuli nociceptifs, font des synapses avec des neurones des couches I, II et V de la moelle épinière (ME). Les neurones de la ME projettent de façon contralatérale sur le thalamus,

celui-ci projetant ses axones dans le cortex (figure 8). Un autre faisceau de fibres, la voie spinoréticulaire, a pour origine des neurones situés également dans la substance grise médullaire. Les régions cibles du faisceau spinoréticulaire sont les noyaux gigantocellulaire et réticulaire latéral, situés dans la formation réticulée du tronc cérébral (figure 8) (pour revue Willis et Westlund, 1997).

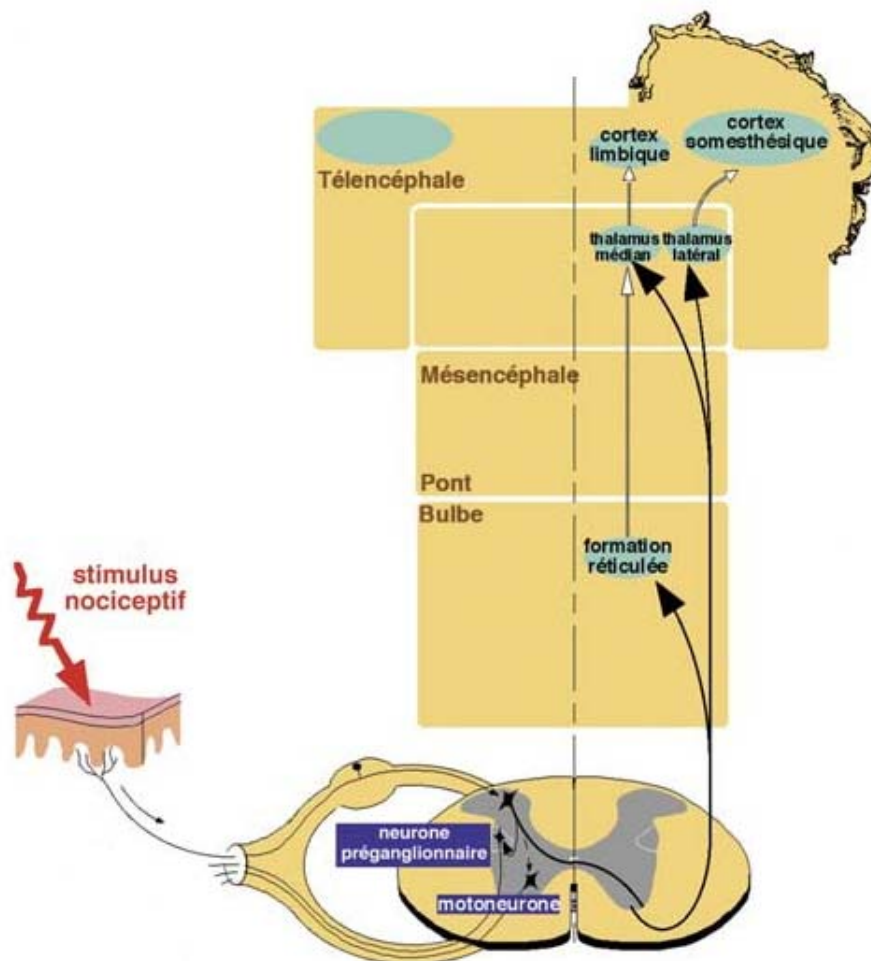


Figure 8: Voies ascendantes spinoréticulaire et spinothalamique de la transmission nociceptive (d'après Le Bars et al., 2004).

La transmission des messages nociceptifs est modulée par de puissants contrôles dès les premiers relais médullaires, à la fois par des mécanismes segmentaires et par des systèmes qui mettent en jeu des structures supraspinales. Une fois les informations sensorielles intégrées, certaines structures supraspinales pourront ainsi moduler les influx nociceptifs et la douleur grâce à des voies descendantes bulbospinales. Une de ces voies a pour origine des neurones de la substance grise périaqueducale qui projettent sur le bulbe rostro-ventro médian et plus particulièrement sur les neurones du raphé. Ces neurones sérotoninergiques du raphé projettent dans la corne dorsale de la moelle épinière et exercent un contrôle inhibiteur tonique sur les neurones spinaux responsables de la transmission des messages nociceptifs (pour revue Millan, 2002). Cette voie bulbospinale est contrôlée par des afférences provenant de l'amygdale et de l'hypothalamus (figure 9).

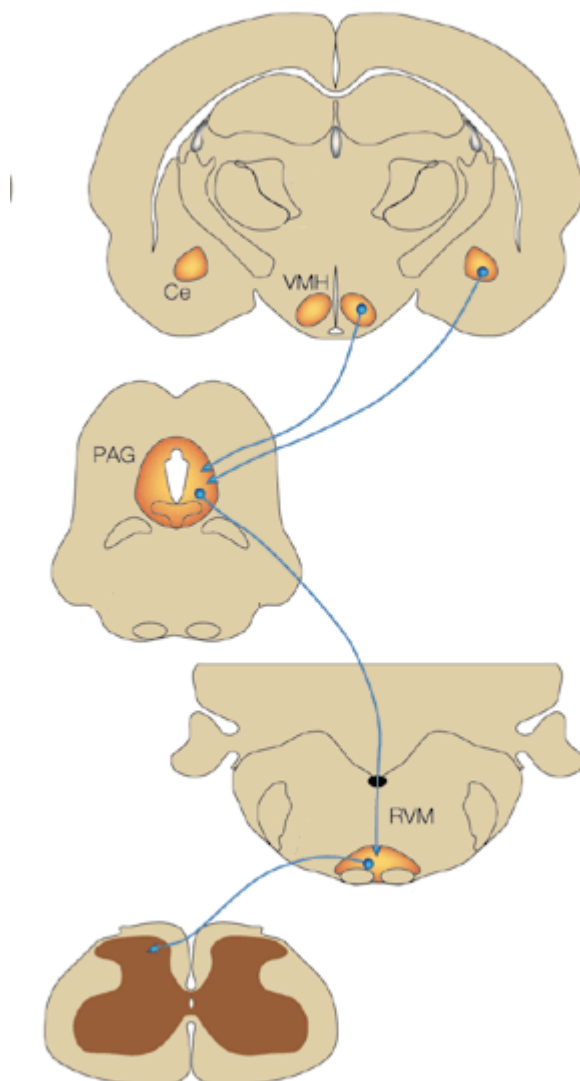


Figure 9: La voie bulbospinale (d'après Hunt et al., 2004). Ce: noyau central de l'amygdale. RVM: bulbe rostro-ventro médian qui contient le noyau du raphé. VMH: noyau ventral médian de l'hypothalamus. PAG: substance grise périaqueducale

Des microinjections de morphine ont montré son action aux différents niveaux de la transmission nociceptive (Dickenson et Le Bars, 1987). De plus, chez la souris, une invalidation du récepteur opioïde μ (KO) diminue très fortement l'effet analgésique induite par la morphine. (Gavériaux-Ruff et Kieffer, 2002). Au niveau spinal, la morphine est décrite pour déprimer la transmission spinale des messages nociceptifs arrivant dans la corne postérieure (Kline et Wiley, 2008). Elle se lie sur des récepteurs μ présents sur la terminaison des nocicepteurs et possède une action présynaptique en diminuant la libération des neurotransmetteurs excitateurs. De plus, la morphine possède une action postsynaptique en hyperpolarisant les neurones de la couche I et II de la moelle épinière qui représentent les premiers relais médullaires des messages nociceptifs (Marker et al., 2006; Kline et Wiley, 2008). Au niveau du tronc cérébral, la morphine va agir sur PAG. Elle inhibe des interneurons GABAergiques présents dans la PAG, augmentant ainsi l'activité des neurones qui projettent sur le noyau du raphé (Vaughan et Christie, 1997). La morphine va ainsi activer les contrôles descendants qui inhibent la transmission des informations nociceptives (Terashvili et al., 2007).

7.2 Effets sur le système respiratoire

La fixation de la morphine sur des centres respiratoires présents dans le tronc cérébral (*e.g.*, le noyau du tractus solitaire) induit une diminution du rythme et de l'amplitude de la respiration (Takita et al., 1997). Son administration en quantité trop importante provoque une dépression respiratoire qui provient d'une diminution de l'adaptation à la pression partielle sanguine de CO₂ au niveau central (Kilpatrick et Smith, 2005). La dépression respiratoire est la cause principale de décès lors d'une overdose de morphine ou d'héroïne.

7.3 Effets sur le système gastro-intestinal

Les effets gastriques de la morphine passent par une liaison à des récepteurs μ centraux et périphériques qui induisent une diminution de la motricité de l'estomac et de la motilité intestinale. La morphine est également décrite pour diminuer les sécrétions hydriques entraînant une constipation (Wood et Galligan, 2004). Ainsi, des dérivés morphiniques (*e.g.*, le lopéramide et le diphénoxilate) sont utilisés pour leurs propriétés antidiarrhéiques (Valle et al., 2000). Les nausées et les vomissements consécutifs à une prise de morphine proviennent de la stimulation d'une structure située dans le tronc cérébral qui est appelée «chemoreceptor

trigger zone» (CTZ). Cette zone, qui n'est pas protégée par la barrière hématoencéphalique et qui exprime des récepteurs opioïdes μ , va pouvoir activer des centres du vomissement également situés dans le tronc cérébral. L'ablation du CTZ ou l'injection de naloxone dans cette zone inhibe les effets vomitifs de la morphine (Bhargava et al., 1981).

7.4 Effets sur le système neuroendocrine

La morphine influence la synthèse et la sécrétion de différentes hormones. En particulier, elle est connue pour activer l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HHS) et augmenter la libération de prolactine, d'hormones de croissance, de GRH (Gonadotropin-releasing hormone), de CRH (CorticoReleasing Hormone) et de glucocorticoïdes (Pechnick, 1993).

7.5 Effets sur le système immunitaire

La morphine possède un effet immunosuppresseur qui est connu depuis les années 1950. Une étude avait alors montré que les personnes dépendantes à la morphine et à l'héroïne étaient plus sensibles aux infections (Hussey et Katz, 1950). Cet effet immunosuppresseur découle de différents mécanismes impliquant la morphine (Sharp et al., 1998) :

(i) une action directe sur les monocytes, les macrophages et les granulocytes, en induisant la production de monoxyde d'azote (NO) (Pasternak, 2007), inhibant ainsi la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, la chimiotaxie et la phagocytose (Dinda et al., 2005).

(ii) l'activation de l'axe HHS et la libération de glucocorticoïdes ayant un effet immunosuppresseur (Mellon et Bayer, 1998).

(iii) une inhibition de la différenciation de cellules souches immunitaires en lymphocytes et une inhibition de la prolifération des lymphocytes T (Mellon et Bayer, 1998).

(iv) une inhibition de l'activité cytolytique des lymphocytes NK (Mellon et Bayer, 1998). Cet effet a été observé après une injection de morphine directement dans le liquide céphalo-rachidien, indiquant qu'il est médié par le système nerveux central.

7.6 Les effets biologiques de la M6G

Nous avons vu que la M6G possède des effets biologiques différents de ceux de la morphine (voir chapitre 3.2). Elle est décrite comme étant de 1 à 600 fois plus analgésique que la morphine suivant les modèles animaux et les sites d'injection (Lötsch et Geisslinger, 2001), cette différence étant la plus forte lors d'injections intrathécales ou intracérébroventriculaires.

Différentes études cliniques ont également montré que la M6G entraînait moins de dépression respiratoire et de nausée chez des volontaires sains et des patients traités aux opiacés (pour revue Kilpatrick et Smith, 2005; Dahan et al., 2008). La M6G est à l'heure actuelle en cours d'essais cliniques (phase III) par le laboratoire Paion AG et l'utilisation de la M6G pour le traitement des douleurs postopératoires (i.v.) a montré un apport significatif par rapport à la morphine (Joshi, 2008). Cette différence d'effets biologiques par rapport à la morphine est en partie due à un passage plus faible de la BHE et à une affinité différente pour les récepteurs opioïdes (voir chapitre 3.2).

8) Découverte de la morphine endogène chez les mammifères

Suite à la découverte de récepteurs opioïdes centraux pouvant lier la morphine et ses analogues de synthèse, l'existence de ligands endogènes capables d'interagir avec ces récepteurs fut rapidement suggérée. Ainsi, dès 1975, les ligands endogènes des récepteurs opioïdes ont été découverts. Il s'agit dans un premier temps de pentapeptides, les Leu- et Met-enképhalines (Hughes et al., 1975). Puis, par la suite, d'autres ligands endogènes ont été caractérisés. Cependant, aucun de ces peptides n'a autant d'affinité que la morphine végétale pour le récepteur opioïde μ . De plus, les opioïdes sont peptidiques, alors que les opiacés sont des alcaloïdes. C'est pourquoi, dès la fin des années 1970, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que la morphine était également synthétisée par les animaux. Ainsi, au milieu des années 80, de la codéine et de la morphine, identiques à celles trouvées dans le pavot, ont été identifiées dans le SNC de mammifères (Goldstein et al., 1985).

8.1 Les peptides opioïdes endogènes.

Au début des années 1970, Liebeskind et coll. démontrèrent que la stimulation électrique de la PAG créait une analgésie similaire à celle obtenue avec une microinjection de morphine (Mayer et Liebeskind, 1974), effet qui s'est avéré être inhibé par la naloxone (Akil et al., 1976). Ces études suggéraient pour la première fois l'existence d'un système opioïde/opiacé endogène et différentes équipes recherchèrent les ligands endogènes de ce système.

8.1.1 Les enképhalines. Les premiers opioïdes endogènes furent découverts grâce à un test mesurant l'activité de la morphine et des agonistes opioïdes sur l'inhibition de la constriction du canal déférent de souris suite à une stimulation électrique (Hughes, 1975). Les deux premiers agonistes endogènes des récepteurs opioïdes caractérisés en 1975 furent deux pentapeptides baptisés Leu-enképhaline (YGGFL) et Met-enképhaline (YGGFM), en référence au terme grec « en kephalos » signifiant « dans la tête » (Hughes et al., 1975). Ces molécules, qui dérivent de la maturation de la proenképhaline-A, possèdent une conformation spatiale proche de la morphine (Roques et al., 1976). Elles sont distribuées de manière hétérogène dans le cerveau, les régions cérébrales les plus riches étant le globus pallidus, le caudé putamen, l'amygdale, l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale. Elles sont également retrouvées à plus faible concentration dans l'hippocampe, le cortex ou le cervelet (Miller et Pickel, 1980). Au niveau périphérique, les enképhalines ont été caractérisées dans la médullo-surrénale, au niveau du système gastro-intestinal et dans des cellules immunitaires (lymphocytes B et T, macrophages et PMN (North et Egan, 1983). Les enképhalines se lient de façon préférentielle aux récepteurs opioïdes δ .

8.1.2 La β -endorphine. Après la découverte des enképhalines, différents groupes cherchèrent d'autres peptides avec une homologie de séquence. La β -endorphine est un peptide de 31 acides aminés contenant en N-terminale la séquence YGGFM identique à la Met-enképhaline (Corbett et al., 2006). Ce peptide dérive de la maturation d'une autre protéine précurseur, la proopiomélanocortine (POMC). La β -endorphine se lie de façon équivalente aux récepteurs μ et δ , mais possède peu d'affinité pour le récepteur κ .

8.1.3 Les dynorphines. Toujours grâce à des analogies de séquence, Goldstein et coll. identifèrent une 3^{ème} famille de peptides opioïdes, les dynorphines (Goldstein et al., 1979). Cette famille est composée de la dynorphine A, de la dynorphine B et des néoendorphines α et β , provenant toutes de la maturation d'un précurseur protéique baptisé prodynorphine. Elles possèdent le motif YGGFL de la Leu-enképhaline et ont entre 8 et 17 acides aminés (tableau 2). Les dynorphines se lient de façon préférentielle aux récepteurs opioïdes κ .

8.1.4 Les endomorphines. Les endomorphines 1 et 2 sont des tétrapeptides amidés en C-terminal. Elles ont la particularité d'avoir, comme la morphine, une forte affinité pour le récepteur μ , alors qu'elles possèdent peu d'affinité pour les récepteurs δ et κ (Zadina et al., 1997). Elles sont principalement trouvées dans le thalamus, l'hypothalamus, le striatum, le cortex et la moelle épinière, régions où l'on a une forte densité de récepteur μ . A l'heure actuelle, on ne connaît pas le précurseur de ces peptides.

8.1.5 Les autres opioïdes endogènes. Au cours des dernières années, de nombreux autres opiacés endogènes ont été identifiés et caractérisés dans le système nerveux. Les peptides opioïdes sont maintenant regroupés en famille selon leur précurseur (voir tableau 2). Un nouveau sous-type de récepteur ayant 70% d'homologie de séquence avec les récepteurs opioïdes a également été caractérisé et nommé orphan opioid-like receptor (ORL1). Les ligands endogènes de ce nouveau récepteur sont la nociceptine et l'orphanine-FQ (Meunier, 1997).

<i>Precursor</i>	<i>Opioid peptide product</i>	<i>Amino acid sequence</i>
Pro-enkephalin	[Met]-enkephalin	YGGFM
	[Leu]-enkephalin	YGGFL
		YGGFMRF
		YGGFMRGL
	Peptide E	YGGFMRRVGRPEWWMQDYQKRYGGFM
	BAM 22P	YGGFMRRVGRPEWWMQDYQKRYG
	Metorphamide	YGGFMRRVNH ₂
Pro-opiomelanocortin	β -Endorphin	YGGFMTSEKSQTPLVTLFKNAIKNAYKKGE
Prodynorphin	Dynorphin A	YGGFLRRIRPKLKWQ
	Dynorphin A(1-8)	YGGFLRRI
	Dynorphin B	YGGFLRRQFKVVT
	α -Neoendorphin	YGGFLRKYPK
	β -Neoendorphin	YGGFLRKY
Pronociceptin/orphanin-FQ	Nociceptin/orphanin-FQ	FGGFTGARKSARKLANQ
	Endomorphin-1	YPWF-NH ₂
	Endomorphin-2	YPPF-NH ₂
Prodermorphin and prodeltorphin*	Dermorphin	Y(D)AFGYPS-NH ₂
	Deltorphin	Y(D)MFHLMQ-NH ₂
	Deltorphin I	Y(D)AFDVVG-NH ₂
	Deltorphin II	Y(D)AFEVVG-NH ₂

Tableau 2: Les différents peptides opioïdes, d'après (Corbett et al., 2006)

8.1.6 Le rôle physiologique des peptides opioïdes. Les peptides opioïdes sont considérés comme des neurotransmetteurs. Ils sont cosécétrés avec d'autres neurotransmetteurs et se lient aux différents récepteurs opioïdes avec plus ou moins de spécificité. Ils sont exprimés fortement dans des régions impliquées dans la nociception (PAG, moelle épinière, thalamus, cortex) et de nombreuses études indiquent leurs implications dans ce processus. Il a été montré que la stimulation intense de fibres nociceptives entraînait une libération d'enképhaline cérébrale (Cesselin, 1991). De plus, l'inhibition de l'hydrolyse des enképhalines induit une analgésie dépendante des récepteurs μ au niveau cérébral et δ au niveau spinal. En ce qui concerne les endomorphines, une injection intrathécale ou intracérébroventriculaire induit une analgésie dose-dépendante comparable à la celle obtenue avec de la morphine (Zadina et al., 1997). Une lésion du noyau arqué de l'hypothalamus, région où est synthétisée la POMC, réduit l'analgésie induite par une stimulation électrique de la PAG où arrivent des afférences β -endorphinergiques. En périphérie, lors d'une inflammation, des cellules immunitaires vont libérer des opioïdes endogènes directement dans le site de l'inflammation (Goumon et al., 1998), ceux-ci se liant à la terminaison périphérique des nocicepteurs et exercent leur effet anti-nociceptif (Herz, 1995). Cependant, le rôle du système opioïde endogène ne se limite pas à l'analgésie. En effet, la distribution neuroanatomique des peptides opioïdes et de leurs récepteurs laissent

supposer leur implication dans de nombreuses fonctions cérébrales, ce qui a été démontré dans divers processus tels que l'apprentissage, la dépendance, le stress ou la respiration (pour revue, Bodnar, 2007).

8.2 Les premières évidences de l'existence de morphine endogène

En 1903, un scientifique français, le Dr Mavrojanis, remarqua qu'en injectant de la morphine à des rats, ces animaux présentaient des symptômes similaires à ceux observés pendant une crise de catalepsie. Il postula alors pour la première fois que la morphine était présente de façon endogène dans le cerveau de rat. Cependant, il fallut attendre l'évolution des techniques de détection et les années 1970 pour qu'une expérience de RIA (radioimmunoassay) montre la présence de morphine dans le cerveau de souris, de lapin et de chat. La substance, une fois isolée, avait les mêmes propriétés pharmacologiques que la morphine. Cette molécule se liait à des récepteurs opioïdes et était insensible aux peptidases. Elle fut baptisée MLC pour morphine-like compound (Gintzler et al., 1976). Ce composé fut ensuite isolé chez l'homme dans le liquide céphalorachidien (LCR), l'urine ou dans des extraits de cerveau de patients qui n'avaient jamais reçu de morphine (Shorr et al., 1978). Par la suite, cet alcaloïde fut purifié en grande quantité à partir d'épiderme de lapin, de rat et de crapaud (*Bufo marinus*) (Oka et al., 1985). En 1985, le groupe de Goldstein et coll. purifia un composé apparenté à la morphine à partir d'extrait d'hypothalamus et de glandes surrénales bovines. Ce groupe démontra pour la première fois, grâce à des techniques de chromatographie et de résonance magnétique nucléaire (RMN), que ce composé était bien de la morphine, avec une structure identique à la morphine de plante (Goldstein et al., 1985).

D'autres études ont ensuite indiqué que cet alcaloïde était présent chez les invertébrés au niveau des cellules neurales et des cellules immunitaires (Stefano et al., 1993). Les alcaloïdes endogènes semblent également produits par certains parasites, la morphine ayant été détectée chez *Schistosoma mansoni* (Leung et al., 1995) et chez *Ascaris suum* (Goumon et al., 2000). Cependant, certains chercheurs restaient sceptiques et pensaient que cette morphine pouvait provenir de l'alimentation. En effet, de la morphine a été caractérisée dans de nombreux végétaux, incluant le foin et la laitue, ainsi que dans le lait de vache et dans le lait humain à des concentrations comprises entre 200 et 500 ng/L (Hazum et al., 1981).

8.3 La voie de synthèse de la morphine endogène

Afin de prouver que cette morphine était bien une molécule endogène, il fallait démontrer qu'elle était synthétisée *de novo* par des cellules de mammifères. Différents intermédiaires de la voie de synthèse de la morphine furent ainsi isolés. La morphine et la codéine furent caractérisées par spectrométrie de masse dans l'hypothalamus de bovin (Weitz et al., 1986), puis dans des extraits cérébraux de rats. De plus, les injections de salutaridine, de thébaine ou de codéine, trois intermédiaires de la voie de synthèse chez les plantes, ont été décrites pour induire une augmentation du taux de morphine dans le cerveau de rat (Donnerer et al., 1986). La transformation de réticuline en salutaridine par le cytochrome P-450, étape importante dans la formation du squelette de la morphine, fut également démontrée comme ayant lieu dans le foie de rat (Weitz et al., 1987), puis dans des microsomes de foie de cochon. Il est intéressant de noter que chez les patients parkinsoniens traités à la L-DOPA, un taux plus élevé de morphine et de codéine est trouvé dans l'urine (Matsubara et al., 1992). En effet, une fois administrée au patient, la L-DOPA est décarboxylée en dopamine, un intermédiaire de la voie de synthèse de la morphine. De plus, une étude *in vivo* a montré que chez des souris invalidés pour le gène de la tyrosine hydroxylase (nécessaire à la formation de dopamine), il n'y avait pas formation de morphine endogène (Neri et al., 2008). La synthèse de morphine nécessite ainsi la présence de dopamine.

Une ultime preuve de la synthèse *de novo* de morphine par les mammifères a été apportée par Poeaknapo et coll. en 2004. En cultivant une lignée humaine, les cellules SH-SY5Y, en présence de $^{18}\text{O}_2$, ils purent isoler différents intermédiaires de la voie de synthèse de la morphine, ainsi que de la morphine radiomarquée (Poeaknapo et al., 2004, Boettcher et al., 2005). Ils incubèrent également ces cellules avec les différents précurseurs radioactifs et purent décrire l'ensemble de la voie de synthèse de la morphine (figure 10). Des études similaires ont montré la synthèse *de novo* de morphine dans des neutrophiles humains (Zhu et al., 2005), ainsi que dans des érythrocytes humains (Boettcher et al., 2006), prouvant que la morphine est bien une molécule endogène des mammifères.

La voie de synthèse de la morphine chez les mammifères suit en grande partie la voie de synthèse de cet alcaloïde chez les plantes. La première étape de la voie de synthèse de la morphine débute par la condensation de la dopamine et du 4-hydroxyphénylaldéhyde (également nommé DOPAL) qui dérivent tous deux de la tyrosine (figure 10) (Boettcher et

al., 2005). Cette réaction se fait spontanément sans catalyse en conditions aqueuses. L'étape limitante de cette voie de synthèse est la conversion de la réticuline en salutaridine. Cette conversion est catalysée par le cytochrome P450/ salutaridine synthase qui est également décrit comme étant impliqué dans la formation de dopamine à partir de la tyramine et la transformation de la codéine en morphine (Zhu et al., 2005). A l'heure actuelle, les travaux réalisés indiquent que cet enzyme est présent au niveau du foie et des reins, mais également dans des cellules immunitaires (*i.e.*, PMNs) (Zhu et al., 2005). Il semble également que, comme chez les plantes, il existe chez les mammifères deux voies de synthèse de la morphine à partir de la thébaïne (figure 10).

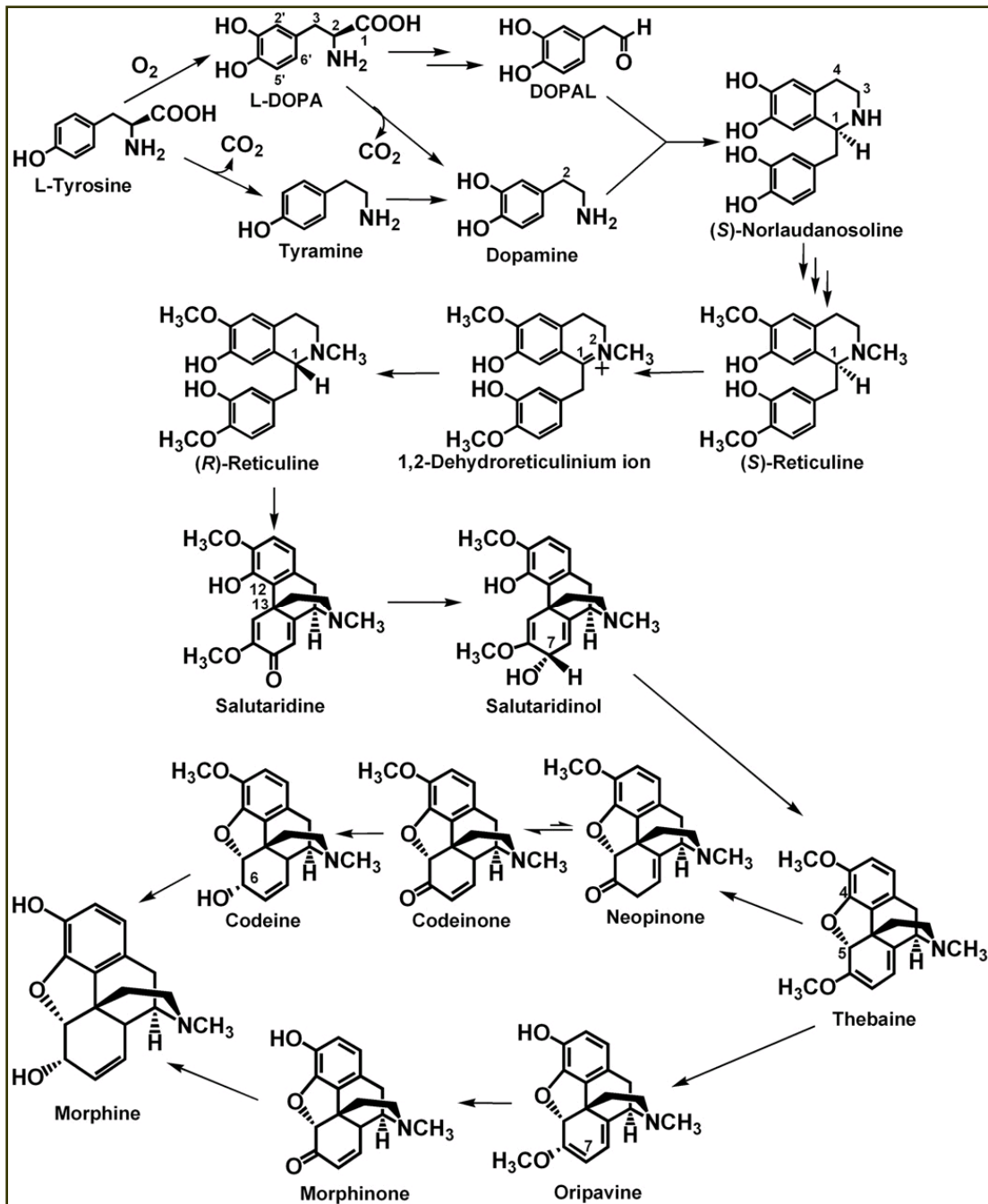


Figure 10: Résumé simplifié de la voie de synthèse de la morphine chez les mammifères (d'après Boettcher et al., 2005). DOPAL: 4-hydroxyphénylacétaldéhyde.

8.4 La localisation tissulaire et cellulaire de la morphine endogène

Grâce aux techniques d'immunohistochimie, de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) et de spectrométrie de masse, la présence de morphine endogène a pu être caractérisée sans ambiguïté dans différents tissus de mammifères: le cerveau de rat, de souris, de veau et de singe, la peau de rat, de lapin et de crapaud, les poumons de rat et de chien, les glandes surrénales de bovin et de rat, l'hypothalamus de bovin et la moelle épinière de souris et de rat (pour revue Neri et al., 2004). Chez l'homme, de la morphine a été isolée à partir d'extraits de cerveau, du LCR, du plasma et de l'urine.

Au niveau cérébral, une cartographie chez le chien et le rat a été réalisée grâce à l'utilisation d'un RIA détectant la morphine, mais également la M6G et la M3G, a montré la présence de morphine et/ou des ses dérivés au niveau du thalamus, du cortex, de l'hypothalamus, du cervelet (figure 11)(Meijerink et al., 1999). Cependant, cette étude a été réalisée après un jeûne de 24 heures, le jeûne étant décrit comme augmentant le taux de morphine endogène cérébrale (Goumon et al., 2000), et aucune donnée n'est disponible sur les quantités basales de morphine dans les différentes régions du cerveau.

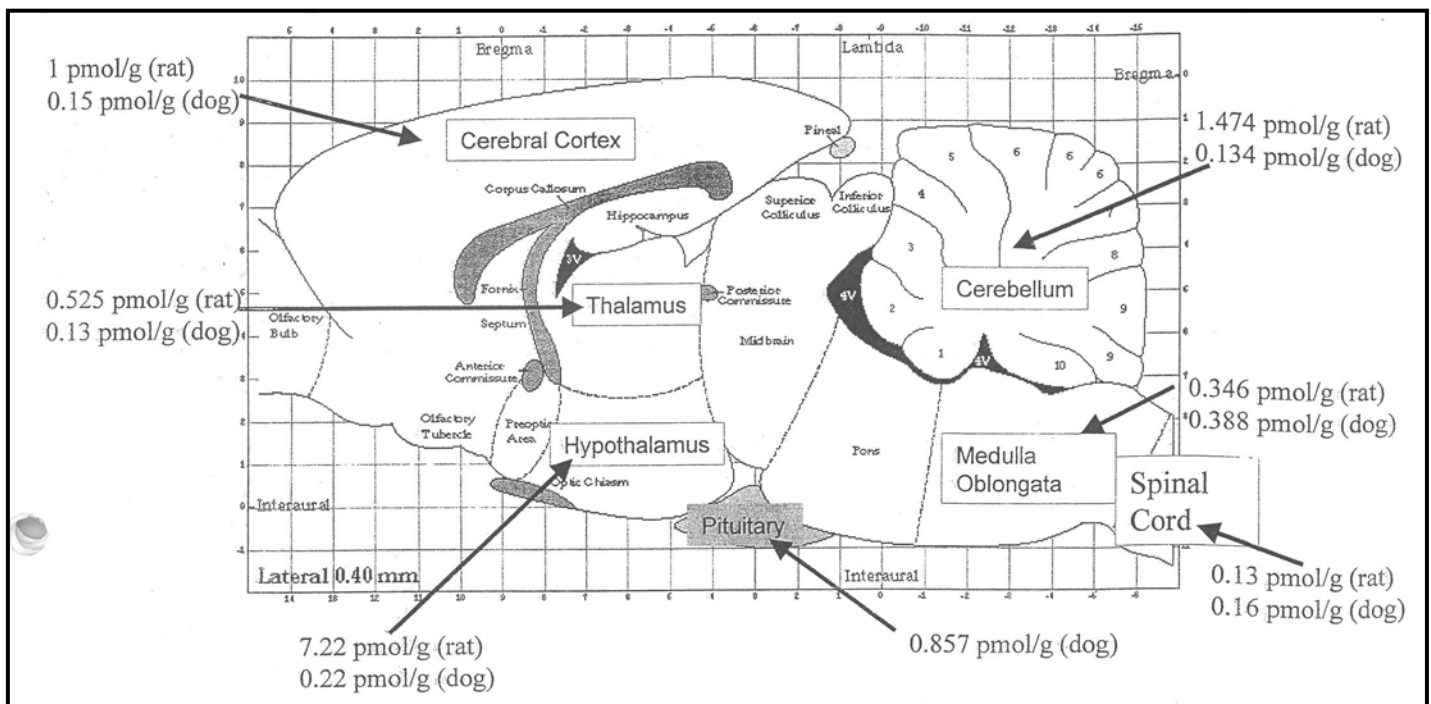


Figure 11: Distribution cérébrale de morphine endogène après un jeûne chez le rat et le chien (d'après Meijerink et al., 1999). Les différentes zones cérébrales ont été disséquées puis les quantités de morphine ont été mesurées par HPLC en phase inverse.

Au niveau subcellulaire, la morphine est décrite comme étant présente dans les corps cellulaires, les fibres et les terminaisons nerveuses de neurones du caudé-putamen, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière (Bianchi et al., 1993). Bianchi et coll. ont également décrit que ces mêmes neurones sont capables d'accumuler de la morphine tritiée après une infusion intra-cérébroventriculaire (Bianchi et al., 1993), laissant supposer que ces neurones possèdent un système permettant la capture de la morphine.

D'autre part, la morphine a été détectée dans la glande surrénale de différents mammifères, qui représente un des organes majeurs impliqués dans la réponse au stress. La partie médullaire de cette glande est principalement constituée par les cellules chromaffines. Il est intéressant de noter que la morphine a aussi été trouvée dans des cellules PC-12 qui sont des cellules chromaffines tumorales de rat (Goumon et al., 2000; Poeknapo et al., 2004). Les cellules chromaffines sont des cellules neuroendocrines qui sont issues de la crête neurale. Elle contiennent de nombreux granules de sécrétion assurant le stockage des catécholamines et un grand nombre d'espèces protéiques et peptidiques incluant les chromogranines (Metz-Boutigue et al., 1993; Aunis et al., 1998). Lors d'une situation de stress, la stimulation des cellules chromaffines par le nerf splanchnique conduit à une dépolarisation membranaire aboutissant à la sécrétion des catécholamines, ainsi que du contenu intragranulaire dans le sang. Il faut noter que les catécholamines (dopamine, adrénaline et noradrénaline) ont, tout comme la morphine, la tyrosine et la dopamine comme précurseurs (figure 12).

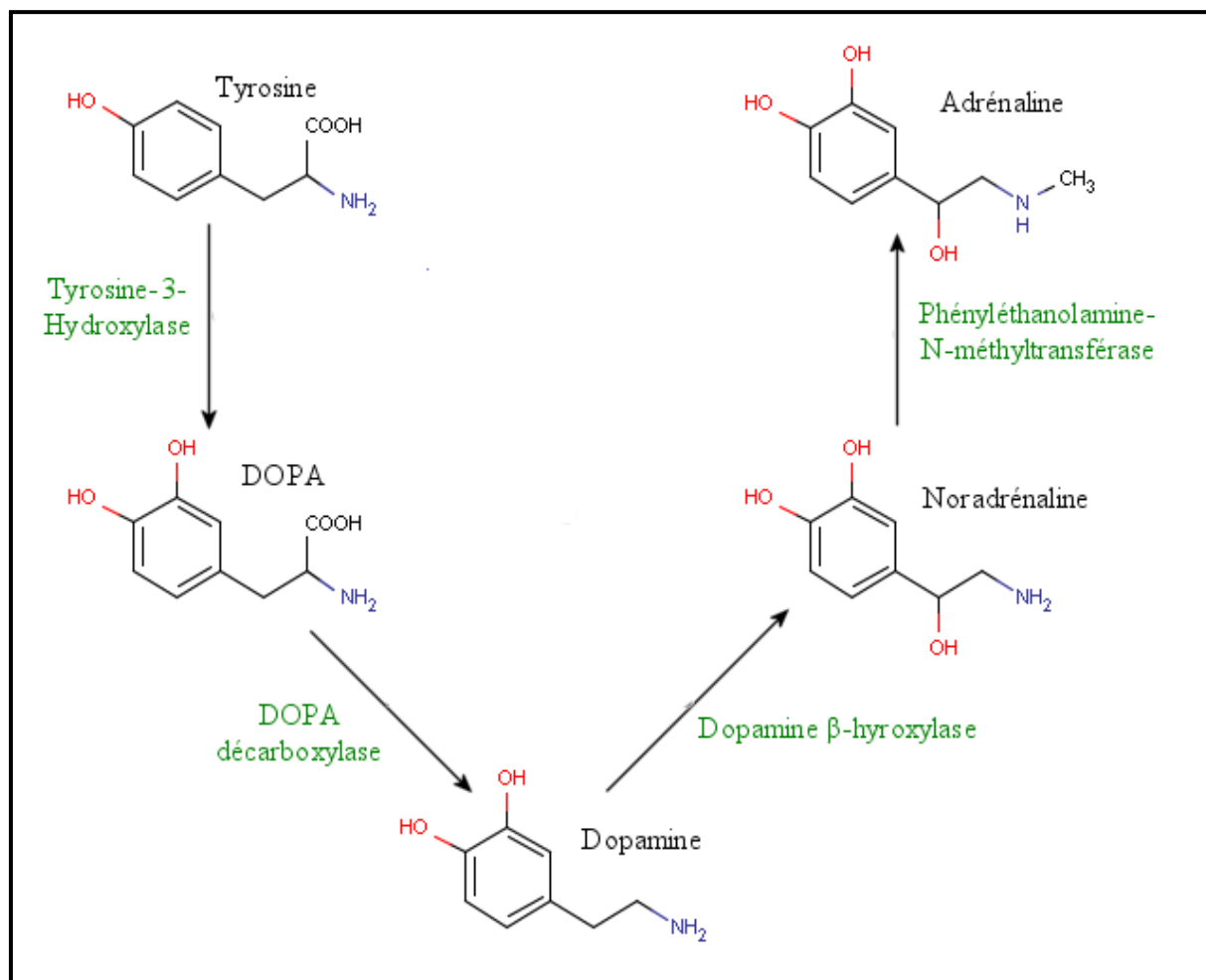


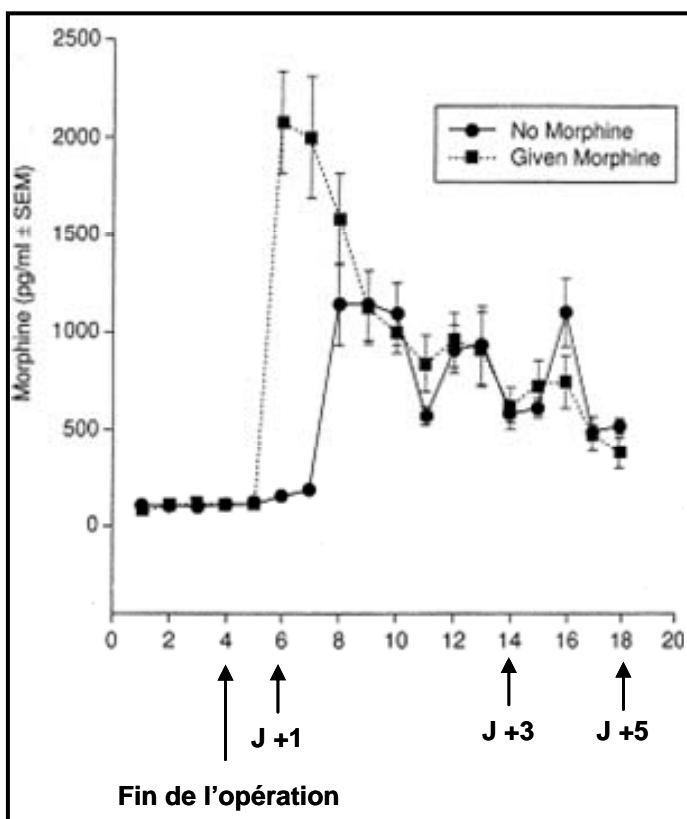
Figure 12: Voie de synthèse simplifiée des catécholamines.

Ainsi, des cellules catécholaminergiques, comme les cellules chromaffines, possèdent une partie de la machinerie cellulaire nécessaire à la synthèse de morphine endogène. Il est donc envisageable que ces cellules soient susceptibles de synthétiser et de libérer de la morphine dans le sang.

9) Quel est le rôle de cette morphine endogène ?

9.1 Expression de la morphine endogène lors d'états de stress

La morphine est présente dans la glande surrénale qui est responsable de la sécrétion des catécholamines et d'autres molécules dans le sang lors d'états de stress. De plus, plusieurs études *in vivo* et *in vitro* indiquent que la morphine est produite et sécrétée lors d'un stress. Ainsi, des travaux ont montré que, chez l'homme, une intervention chirurgicale lourde comme un pontage coronarien induisait une augmentation importante de la concentration de morphine endogène circulante (Brix-Christensen et al., 1997). Alors que dans le plasma de patients témoins, la morphine est présente en faible quantité (80pg/ml), elle augmente fortement après l'intervention pour arriver à une concentration d'environ 1000 pg/ml (3,35 pmole/ml soit 3,35nM) chez les patients. L'augmentation de morphine n'est pas immédiate, et est probablement due à l'inflammation systémique résultante de l'intervention chirurgicale .



Sample No	Sampling Time
1	Day of operation, 6 a.m.
2	After premedication and anaesthetic induction
3	End of CPB
4	Skin closure
5	3 h after skin closure
6	6 h after skin closure
7	1. postoperative day, 6.30 a.m.
8	2 p.m.
9	5.30 p.m.
10	2. postoperative day, 6.30 a.m.
11	2 p.m.
12	5.30 p.m.
13	3. postoperative day, 6.30 a.m.
14	5.30 p.m.
15	4. postoperative day, 6.30 a.m.
16	5.30 p.m.
17	5. postoperative day, 6.30 a.m.
18	5.30 p.m.

Figure 13: Evolution des concentrations plasmatiques de morphine suite à un pontage coronarien (d'après Brix-Christensen et al., 1997). Les taux de morphine endogène sont comparés aux taux observés après injection de morphine

La morphine étant décrite comme possédant un effet immunosuppresseur (voir chapitre 7.5), le rôle de cette libération de morphine pourrait être d'inhiber la réponse inflammatoire très importante faisant suite à ce type d'intervention chirurgicale. L'augmentation du taux de morphine circulante après un pontage coronarien a été confirmé par une étude chez le porcelet (Brix-Christensen et al., 2000). De plus, l'augmentation de la concentration plasmatique de morphine après un acte chirurgical a également été montrée suite à une cholécystectomie (ablation de la vésicule biliaire), avec une concentration plasmatique de 200 fmol/ml trois heures après l'opération.

D'autres études réalisées chez des mammifères ont confirmé l'augmentation du taux de morphine endogène suite à un stress. Ainsi, une étude réalisée sur des rats chez lesquels une arthrite a été induite et souffrant de douleurs chroniques, a montré des taux de morphine et de codéine élevées dans des extraits de moelle épinière et dans l'urine (Donnerer et al., 1987). D'autres travaux ont également indiqué qu'au niveau cérébral, la quantité de morphine endogène augmentait chez des rats suite à un jeûne ou à une injection intrapéritonéale de lipopolysaccharide bactérien (LPS) qui induit une inflammation systémique (Goumon et al., 2000).

A la vue de ces résultats, la morphine endogène pourrait donc correspondre à un médiateur endocrine libéré lors des états de stress. Cependant sa présence au sein de neurones dans différentes structures du cerveau laisse également supposer un rôle fonctionnel au sein du SNC.

9.2 Le rôle de la morphine endogène au sein du SNC

La morphine a été décrite comme étant présente dans des neurones du système nerveux central. De plus, la lignée SH-SY5Y dérivant d'un neuroblastome humain est capable de synthétiser de la morphine. De nombreuses études ont décrit les effets de la morphine sur le SNC. Cependant, la plupart des études ont été réalisées avec des fortes doses de morphine (de l'ordre du μM), qui sont de loin supérieures aux concentrations physiologiques de morphine endogène (entre le pM et le nM). Il est donc difficile d'extrapoler le rôle de la morphine endogène au niveau cérébral.

9.2.1 Morphine endogène et nociception. Sur la base des effets analgésiques de la morphine exogène, un de ses rôles endogènes pourrait être lié au contrôle de la nociception. Ainsi, une étude a montré une localisation identique pour la morphine endogène et le récepteur μ dans différentes zones du tronc cérébral (le locus coeruleus, le noyau parabrachial, la PAG et le noyau du raphé) impliquées dans la modulation supraspinale de la nociception (Stefano et al., 2000). En injectant des anticorps anti-morphine dans le LCR de souris, Guarna et coll. ont pu baisser le taux cérébral de morphine endogène (Guarna et al., 2002). En testant ensuite les souris à l'aide du test de la plaque chaude, les auteurs ont pu mesurer une baisse de la latence de léchage de la patte, indiquant une hyperalgésie à la douleur thermique quand le niveau de morphine endogène est diminué (Guarna et al., 2002). De plus, des souris KO n'exprimant pas le récepteur μ montrent une sensibilité accrue aux stimuli nociceptifs thermiques, mais pas aux stimuli mécaniques. Ces résultats semblent indiquer que la morphine endogène diminue principalement la sensibilité aux douleurs thermiques. Cependant, une baisse de sensibilité à la douleur inflammatoire provoquée par une injection d'adjuvant de Freund a été observée chez les mêmes souris KO (Kieffer et Gavériaux-Ruff, 2002). Une autre étude utilisant le test de la plaque chaude a montré qu'une injection d'une faible doses de morphine (entre 1 et 10 μ g/kg en sous-cutanée) induisait une hyperalgésie, alors que de fortes doses de morphine (1000 et 7000 μ g/kg) entraînaient au contraire une analgésie (figure 14)(Galeotti et al., 2006).

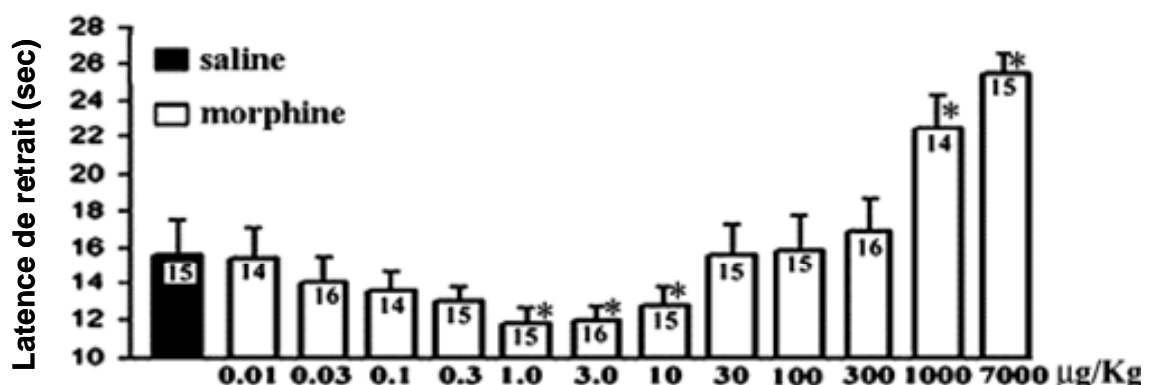


Figure 14: Effet de la dose de morphine sur la latence de retrait de la patte dans un test de plaque chaude (d'après Galeotti et al., 2006). Le numéro dans chaque colonne représente le nombre de souris utilisées par condition.

Cependant, lors d'un cotraitement des souris avec 1µg/kg de morphine et une très faible dose de naltrexone (un antagoniste des récepteurs opioïdes à 0,1ng/kg), l'effet analgésique de la morphine à faible dose est restauré (Crain et Shen, 2001). La morphine aurait ainsi deux effets opposés suivant sa concentration. Ces résultats confirment les études de Robovitch et coll. qui ont montré que le DAMGO, un agoniste des récepteurs μ , stimule la production d'AMPc par une lignée SK-N-SH dérivant d'un neuroblastome à 10^{-9} M, mais inhibe la production d'AMPc à 10^{-7} M (Rubovitch et al., 2003). Une des hypothèses émises par les auteurs est que certains neurones (*e.g.*, les nocicepteurs) pourraient exprimer une faible proportion de récepteurs μ de forte affinité couplés aux protéines Gs responsables de l'hyperalgésie lorsque les concentrations de morphine sont faibles. Ces neurones exprimeraient également des récepteurs μ classiques couplés protéines Gi/o et entrainerait une analgésie pour des concentrations de morphine plus fortes (Crain et Shen, 2001).

9.2.2 Morphine endogène et mémoire. Des études utilisant des injections d'anticorps anti-morphine dans le LCR de souris ont suggéré un lien entre la morphine endogène et la mémorisation (Guarna et al., 2004). En effet, après 12 heures de jeûne, des souris contrôles testées avec un test d'évitement passif montrent une baisse de la mémorisation. Or, les souris auxquelles on a abaissé le taux de morphine endogène (*i.e.*, neutralisation par des anticorps) ne montrent pas de troubles de mémorisation après un jeûne. La morphine endogène pourrait ainsi diminuer la mémorisation dans des états de stress. D'autres données sont également disponibles sur l'effet de la morphine exogène sur le fonctionnement de l'hippocampe, structure clef de la mémorisation. Ainsi, une application de morphine sur des coupes d'hippocampe de rat entraîne une baisse de la libération de GABA par des interneurons présents dans la corne d'Ammon (CA), induisant une augmentation de l'amplitude de décharge des neurones pyramidaux de la zone CA1 (Miller et Lupica, 1997). De plus, la morphine modifie la densité postsynaptique des synapses glutaminergiques de l'hippocampe, modifiant ainsi la plasticité synaptique (Morón et al., 2007). Une étude a également montré que chez le rat, une exposition aiguë à de fortes doses de morphine (10mg/kg en intrapéritonéal) induit des troubles de la mémorisation dans un test de labyrinthe en croix. Cependant, ces doses de morphine sont très supérieures aux concentrations "physiologiques" et des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre l'impact de la morphine endogène sur la mémoire.

9.2.3 Morphine, neurog nese et croissance des cellules nerveuses. Dans le cerveau de mammifères adultes, deux zones sont le siège d'une neurog nese continue: la zone sous-ventriculaire (ZSV) bordant le ventricule latéral et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe. Un traitement chronique à la morphine (10 mg/kg en intrapéritonéal) est décrit pour inhiber de plus de 30% la neurog nese dans la ZSG de rat ou de souris (Eisch et al., 2000 ; Mandyam et al., 2004). De plus, chez des souris KO pour le récepteur μ , on mesure une augmentation de plus de 50% de la survie des neurones néoformés dans la couche granulaire du gyrus denté quatre semaines après l'injection de bromod oxyuridine (BrdU) qui est un marqueur de neurog nese (Harburg et al., 2007). La morphine exogène est ainsi capable de réguler la production et la survie des progéniteurs neuronaux et donc d'influencer la plasticité synaptique de l'hippocampe (Harburg et al., 2007). Ces données sont corroborées par des études cliniques qui montrent des troubles de la plasticité dans l'hippocampe de patients héroïnomanes (Weber et al., 2006).

En ce qui concerne la croissance cellulaire, des études *in vitro* ont montré que la morphine va également avoir des effets opposés sur la croissance de neurones en culture primaire suivant sa concentration. En effet, la morphine inhibe la croissance des neurites de cellules PC-12, de cultures primaires de neurones d'hippocampe et de neurones en grain du cervelet à une concentration de 1 mM (Brailoiu et al., 2004), cette inhibition étant bloquée par la naloxone. A l'opposé, une concentration de 1 pM de morphine stimule l'élongation des neurites de cellules PC-12 (Tenconi et al., 1996), alors que des concentrations de morphine allant de 10^{-9} M   10^{-14} M stimulent la croissance des neurites (axone et dendrites) de neurones de la moelle épinière ou du cortex (Brailoiu et al., 2004). Cependant, cet effet n'est pas inhibé par la naloxone et ne serait donc pas dépendant des récepteurs μ .

9.2.4 Morphine endogène et addiction. Une étude réalisée sur deux modèles d'invertébrés, *Mytilus edulis* et *Homarus americanus*, a montré que l'exposition à des substances addictives ( thanol, nicotine ou cocaïne) entraînait une augmentation d'un facteur deux de la libération de morphine endogène par le système nerveux de ces organismes (Zhu et al., 2006). Or, la morphine dérive de la dopamine, un neurotransmetteur clef de l'addiction. Plusieurs groupes ont ainsi postulé l'existence d'un lien entre la morphine endogène et la dépendance (Stefano et al., 2007). Cependant, aucune étude n'a encore été menée chez des mammifères.

En conclusion, au niveau central, la morphine est synthétisée par des neurones spécifiques et va avoir de nombreux effets qui sont dépendants du site où elle sera exprimée et sécrétée. Les récepteurs μ liants la morphine sont décrits dans de nombreuses régions du SNC. Sur la base des effets de la morphine et de la distribution de la morphine endogène et des ses récepteurs au sein du SNC, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que la morphine représente un neurotransmetteur du système nerveux central de mammifère.

Avant-Propos

Avant-propos

Depuis les années 1980, différents travaux ont permis de prouver définitivement que de la morphine, avec une structure identique à celle des plantes, est bien synthétisée de façon endogène par les mammifères. Cette morphine endogène a été caractérisée dans différents organes, incluant le cerveau, mais également dans la circulation sanguine où elle est présente lors d'états de stress. Cependant, le rôle physiologique de la morphine n'est pas connu, et une manière de connaître son rôle endogène est de déterminer quelles structures et quels types cellulaires la synthétisent chez les mammifères. De la morphine a été caractérisée dans les glandes surrénales de rats et de bovins, un des organes majeurs de la réponse au stress. De plus, de la morphine a été isolée dans des cellules PC-12, qui sont des cellules chromaffines tumorales de rat. Or, les cellules chromaffines, qui composent la partie médullaire de la glande surrénale, sont responsables de la libération des catécholamines qui ont, tout comme la morphine, la dopamine comme précurseur. Les cellules chromaffines bovines représentent un des modèles d'étude de l'équipe « Neuropeptides Bioactifs » que j'ai intégrée en tant qu'étudiant en DEA en 2004. Au vu de la présence de morphine dans des cellules chromaffines tumorales, j'ai recherché si ces cellules chromaffines pouvaient être responsables de la libération de morphine endogène dans le sang lors d'états de stress.

De la morphine a également été caractérisée dans le cerveau de différents mammifères: l'homme, le singe, les bovins, le lapin, le rat ou la souris. La morphine est présente dans différentes structures du SNC, et sa concentration cérébrale est décrite pour augmenter lors d'états de stress. En corrélation avec la présence de morphine dans le cerveau, de nombreuses structures du SNC expriment des récepteurs opioïdes μ liant la morphine. La morphine cérébrale pourrait provenir de la circulation sanguine, mais étant donné son caractère très hydrophile, celle-ci passe mal la barrière hématoencéphalique. L'hypothèse la plus probable est que la morphine est directement synthétisée dans le SNC. Des études en microscopie électronique ont ainsi décrits la présence de morphine dans des neurones présents dans différents structures du SNC, le caudé-putamen, l'hippocampe, l'hypothalamus, le tronc

cérébral, le cervelet et la moelle épinière. De plus, la lignée SH-SY5Y, qui dérive d'un neuroblastome, est capable de néosynthétiser de la morphine. La morphine endogène et les récepteurs opioïdes étant exprimés pas des neurones de différentes structures du SNC, nous avons émis l'hypothèse que la morphine serait un neurotransmetteur au niveau central. Durant ma thèse, j'ai ainsi voulu confirmer que la morphine était bien synthétisée par des neurones et j'ai cherché à identifier les neurones produisant de la morphine endogène dans les différentes structures cérébrales contenant cet alcaloïde. De plus, j'ai étudié si la morphine produite de novo dans le SNC possédait toute les caractéristiques d'un neurotransmetteur.

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

1) Animaux utilisés pour les expériences

Des souris C57BL/6 (élevage du Centre de Neurochimie, Strasbourg) ont été utilisées lors des expériences. Les animaux ont eu libre accès à l'eau et à la nourriture et ont été placés dans un cycle jour-nuit 12h/12h à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Pour les expériences d'immunohistochimie et de dissection, nous avons utilisé des souris mâles âgées de plus de 40 jours, pesant approximativement 30 g. Lors des cultures primaires d'astrocytes, j'ai utilisé des souriceaux C57BL/6 âgés de 3 à 5 jours. Des embryons à E17 prélevés sur une femelle C57BL/6 gestante ont permis de réaliser les cultures primaires d'hippocampe. Tous les protocoles expérimentaux utilisant des animaux ont été approuvés par la Direction des Services Vétérinaires du Bas-Rhin.

2) Isolement des protéines solubles de la matrice intragranulaire des cellules chromaffines de bœuf

Les glandes surrénales de bœufs sont prélevées à l'abattoir municipal de Haguenau, juste après la mort de l'animal. Elles sont maintenues à 4°C durant le transport jusqu'au laboratoire où elles sont immédiatement utilisées.

La technique d'extraction du matériel intragranulaire des cellules chromaffines que nous utilisons est basée sur le principe du fractionnement sub-cellulaire sur gradient de sucrose. Nous avons utilisé le protocole modifié et adapté aux glandes surrénales décrit par Aunis et coll. (Aunis et al., 1977).

La préparation des protéines solubles est réalisée à partir de 10 à 20 glandes. Toutes les opérations sont réalisées à 4°C afin de préserver les protéines. Les glandes surrénales de bœuf sont dégraissées, puis coupées en deux selon l'axe longitudinal pour en prélever ensuite la partie médullaire contenant les cellules chromaffines. Celle-ci est finement hachée puis broyée de façon mécanique à l'aide d'un potter dans une solution du sucrose (sucrose 0,32 M, Hepes 10 mM pH 7). Les débris et fragments cellulaires sont éliminés par centrifugation à basse vitesse (800 g, 20 min, 4°C).

Après filtration du surnageant, une nouvelle centrifugation (12 000 g, 20 min, 4°C) permet de culoter les cellules. Le culot est ensuite homogénéisé par une potterisation manuelle. Une nouvelle centrifugation à 100 000 g sur gradient de sucrose (1,6 M sucrose, 10 mM Hepes pH 7,90 min, 4°C) permet de culoter les granules qui sont finalement lysés par des chocs thermiques (cycles répétitifs de congélation/décongélation). Une centrifugation finale à 100 000 g pendant 30 min à 4°C permet de culoter les membranes des granules et d'isoler le matériel intragranulaire (PSG) présent dans le surnageant.

3) Préparation d'extraits déprotéinisés des aires cérébrales

Des souris adultes C57BL/6 ont été décérébrées et les cerveaux ont été prélevés rapidement sur de la glace. Les aires cérébrales suivantes ont été disséquées : le bulbe olfactif, le tronc cérébral, le cervelet, l'hippocampe, le cortex. L'extraction est réalisée par broyage mécanique des échantillons dans 200 µl d'eau à l'aide d'un potter, suivi d'une étape de congélation/décongélation à -20°C. Les extraits ont été déprotéinisés au chloroforme/isopropanol et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse par test ELISA.

4) Culture de cellules chromaffines

Des glandes surrénales de bœufs fraîchement prélevées sont perfusées de façon rétrograde, pendant 30 min (débit : 7 ml/min, 37°C) avec une solution A correspondant à une solution de Locke exempte d'ions Ca^{2+} (154 mM NaCl ; 5,6 mM KCl ; 3,6 mM $NaHCO_3$; 5,6 mM glucose; 5 mM Hepes, pH 7,4) afin d'éliminer le plasma et les érythrocytes des vaisseaux sanguins. La perfusion se poursuit pendant 1 h avec la solution de Locke sans Ca^{2+} contenant 0,248 U/ml de collagénase A de *Clostridium histolyticum* (Boehringer) et 0,5 % (m/v) d'albumine sérique d'origine bovine (BSA, Euromedex). Après digestion, la partie médullaire des glandes surrénales est dissociée et passée au travers d'un tamis en nylon (245 µm). Après centrifugation des cellules (100g, 10 min, 25°C), le surnageant est éliminé, tandis que le culot de cellules est repris dans 20 ml de solution de Locke sans Ca^{2+} . Une filtration de cette suspension de cellules sur un tamis en nylon (82 µm) permet de retirer les capillaires passés au travers du premier tamis. Afin d'éliminer la plupart des cellules contaminantes (érythrocytes, cellules corticales et cellules endothéliales), une centrifugation du filtrat sur

gradient de Percoll est réalisée durant 20 min (20 000 g, 25°C). Les cellules chromaffines représentent 50 à 60 % des cellules récupérées. Les cellules sont ensuite lavées lors d'une dernière centrifugation (100 g, 10 min, 25°C) dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant du NaHCO₃ 0,2 % (m/v) et des antibiotiques (streptomycine 50 µg/ml et pénicilline 50 U/ml). Le culot de cellules est repris dans du DMEM contenant 10% de sérum foetal de veau; 1 % de cytosine arabinoside (0,28 mg/ml) et 0,1% de 5-fluorodeoxyuridine (2,46 mg/ml). Les cellules sont cultivées à 37°C dans un incubateur où règne une atmosphère humide à 5 % de CO₂.

5) Stimulation de la sécrétion des cellules chromaffines

Les boîtes de culture sont placées sur une plaque chauffante à 37°C. Le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées 4 fois 5 min avec 10 ml de solution de Locke (140 mM NaCl ; 4,7 mM KCl ; 1,2 mM KH₂PO₄ ; 1,2 mM MgSO₄ ; 2,5 mM CaCl₂ ; 11 mM glucose ; 0,5 mM acide ascorbique ; 15 mM Hepes, pH 7,5). La sécrétion des cellules chromaffines est obtenue en incubant les cellules pendant 10 min avec une solution de Locke contenant 10µM de nicotine. Le milieu de sécrétion est ensuite centrifugé à 800g pendant 10 min, puis le surnageant est filtré avec un filtre de 22µm. L'échantillon est ensuite acidifié en présence de TFA 0,1 % (acide trifluoroacétique, v/v) afin de stopper toute dégradation protéolytique, puis gardé à -20°C après concentration à la Speed-Vac.

6) HPLC de phase inverse

L'HPLC de phase inverse est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange en utilisant comme critère de séparation la différence d'hydrophobicité des constituants du mélange. La phase stationnaire est constituée d'un support de silice greffée par des chaînes aliphatiques de 18 atomes de carbone (C18). Ainsi, plus une molécule est hydrophobe, plus elle sera retenue au niveau de la phase stationnaire *via* des interactions hydrophobes. A l'inverse, une molécule polaire sera moins retenue. Le système chromatographique de type Äkta Purifier (Pharmacia Biotechnologie) comporte un programmeur de gradient couplé à deux pompes et un détecteur UV à longueur d'onde variable.

L'échantillon dilué dans 1 ml d'eau/TFA 0,1% (v/v), est injecté sur une colonne de phase inverse de type C-18 (Macherey Nagel Nucleosil 300-5C18, 4X250 mm ; granulométrie 5 µm, porosité 300 nm). L'élution des échantillons est réalisée à un débit de 0,7 ml/min suivant un gradient indiqué sur les chromatogrammes et obtenu à partir d'une solution A (0,1% TFA dans de l'eau, v/v) et d'une solution B (0,09% TFA, 70% d'acétonitrile et 29,91% d'eau, v/v/v). La collecte, qui est programmée pour obtenir des fractions d'un volume de 300µl ou de 1 ml, se fait dans des tubes Minisorp (Nunc) ou dans des plaques 96 puits (Corning) traités afin de minimiser l'adsorption du matériel biologique. Les fractions seront ensuite concentrées à la Speed-Vac (Savant Technologies) jusqu'à un volume de 20 µl, avant d'être stockées à -20°C. Pour la détection d'alcaloïde, le chromatogramme est comparé à celui obtenu pour un mélange de standard d'alcaloïdes composé de morphine, morphine-3-glucuronide (M3G), morphine-6-glucuronide (M6G), morphine acétate (MA) et de codéine (COD).

7) Electrophorèse monodimensionnelle

L'électrophorèse sur gel de polyacryl amide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) permet la séparation des protéines en fonction de leur masse moléculaire apparente. La séparation est réalisée avec un système de type Mini Protean II ou un système de type Criterion (Bio-Rad). Avant d'être déposées sur le gel, les fractions protéiques sont séchées à la Speed-Vac, puis reprises dans un tampon dénaturant (20mM 2-béta-mercaptoéthanol, 3% SDS (m/v), 10% glycérol (v/v), 0,01% bromophénol (m/v), 10mM Tris-HCl pH 6,8), et portées à ébullition durant 3 min. Un marqueur de masse moléculaire apparente (MM, Bio-Rad) permet de visualiser différentes bandes colorées correspondant à des masses moléculaires apparentes définies.

Dans nos conditions expérimentales, les échantillons à analyser et des marqueurs de MM, sont déposés sur un gel de concentration de polyacrylamide à 4% (préparé dans un tampon Tris-HCl à pH 6,8), puis séparés sur un gel de séparation de polyacrylamide à 15% (préparé dans un tampon Tris-HCl à pH 8,8) ou des gels Criterion XT 4-12% (Bio-Rad). Le tampon d'électrophorèse est composé de 192mM de glycine dans un tampon 25 mM Tris-HCl à pH 8,2. L'électrophorèse est réalisée sous une tension de 45 V pendant 20 min, le temps que les échantillons atteignent le gel de séparation, puis sous une tension de 100 V (pendant

environ 2 h) jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel (bleu de bromophénol présent dans le tampon de charge).

8) Electrotransfert sur membrane de PVDF

Les protéines ayant migrées dans le gel de polyacrylamide sont électrotransférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) d'une porosité de 0,45 μm (Amersham). L'électrotransfert est réalisé sous une tension de 75 V pendant 1 h en présence de 192 mM de glycine et de 20% de méthanol dans un tampon 25 mM Tris-HCl pH 8,2.

9) Technique de Western blot

Après transfert, la membrane de PVDF est rincée à l'eau distillée. La membrane est ensuite mise à incuber dans du PBS-T (Phosphate Buffer Saline, avec 0,05% de Tween 20, v/v) contenant 5% de lait en poudre (m/v) pendant 1 h à 37°C (ou une nuit à 4°C) afin de saturer les sites de liaison non spécifiques. La membrane est ensuite incubée en présence du premier anticorps dilué dans du PBS-T avec 5% de lait (m/v) pendant 1 h à 37°C (voir tableau 3). Après plusieurs lavages avec du PBS-T, la membrane est incubée 45 min à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire dirigé contre le premier anticorps et couplé à la peroxydase de raifort (HRP). La membrane est alors lavée six fois avec du PBS-T pendant 5 min à température ambiante. La révélation de l'activité de la peroxydase se fait par chemoluminescence grâce à l'addition d'un réactif de chemoluminescence (Super signal West Dura extended duration substrate, Pierce). La membrane est placée dans une cassette de révélation puis recouverte par un film photographique (Biomax Light, Kodak). Les films sont finalement développés à l'aide d'une développeuse automatique (Hyperprocessor, GE Healthcare).

Les différents anticorps (Ac) utilisés pour les analyses de Western blot, ainsi que leurs dilutions respectives, sont récapitulés dans le tableau suivant :

Anticorps primaire	fournisseur	dilution	Anticorps secondaire	Fournisseur	dilution
Ac polyclonal de chèvre anti-UGT2B	Santa cruz Biotechnology	1/500	Ac anti-IgG de chèvre HRP	Abcam	1/40 000
Ac polyclonal de lapin anti-PEBP ₁₋₁₁	Altergen	1/2000	Ac anti-IgG de lapin HRP	Jackson	1/100 000
AC polyclonal de lapin anti-CGA ₄₋₁₆	Produit au laboratoire	1/1000	Ac anti-IgG de lapin HRP	Jackson	1/100 000
AC polyclonal de lapin anti-CGB ₅₄₇₋₅₆₀	Produit au laboratoire	1/500	Ac anti-IgG de lapin HRP	Jackson	1/100 000

Tableau 3: Anticorps utilisés pour les Western blots.

Afin de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-UGT2B, celui-ci a été incubé avec un peptide bloquant commercial UGT2B (F-17) (Santa Cruz Biotechnology) suivant les conditions expérimentales décrites par le fabricant. L'anticorps et le peptide bloquant ont été incubés dans du tampon PBS 2 h à 25°C à un ratio de 1:5 en masse (2,4 µg d'anticorps et 12 µg de peptide bloquant). L'anticorps primaire absorbé est ensuite dilué dans du PBS additionné de 0,05% de Tween 20 (v/v) et de 5% (m/v) de lait et est utilisé dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites.

10) Chromatographie d'affinité

Le principe de la chromatographie d'affinité repose sur l'affinité d'une molécule pour une molécule greffée (ligand) sur une résine. Ces deux molécules interagissant de manière hautement spécifique et peuvent être par exemple un anticorps et son épitope.

Couplage du ligand sur la colonne: le ligand (anticorps) est dissout dans un tampon de couplage (0,5 M NaCl, 0,2 M NaHCO₃, pH 8,3). 3 mg d'anticorps purifié anti-PEBP et 200 µg d'anticorps anti-UGT2B sont couplés à une colonne HiTrap NHS-activated high performance de 1 ml (GE Healthcare). La colonne est d'abord lavée avec 3 volumes d'HCl 1 mM froid. La solution de couplage contenant le ligand est ensuite injectée sur la colonne et laissée à incuber 30 min à 25°C. La colonne est lavée et les fonctions non liées sont désactivées par 3 passages de 3 ml d'une solution A (0,5 M NaCl, 0,5 M éthanolamine, pH8,3) alterné avec 3 lavages avec 3 ml d'une solution B (0,5 M NaCl, 0,1 M acétate, pH4). Puis la colonne est neutralisée par ajout de tampon C (0,05 M Na₂HPO₄, pH 7).

Réalisation de la chromatographie d'affinité: la colonne est équilibrée par passage de 10 volumes de tampon D (75 mM Tris-HCl pH 8). 2 mg d'échantillons sont dissout dans 1 ml de tampon D, puis injecté sur la colonne. Les protéines non fixées sont éluées par 10 volumes de colonne de tampon D. La protéine d'intérêt est éluée par 1 ml de tampon 150 mM NaCl, 100 mM Glycine-HCl pH 3 et l'éluât est immédiatement neutralisé par ajout de 20 µl d'une solution 1 M Tris-HCl pH 8.

11) Co-immunoprécipitation

Les différents extraits sont immunoprécipités par l'addition de Protein A/G Plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology). Après 4 lavages avec un tampon TNE (100mM Tris; 2.0M NaCl; 10mM EDTA; pH 7.4), les échantillons immunoprécipités sont analysés par Western blot.

12) Digestion trypsique

Afin de permettre l'identification des protéines séparées par électrophorèse par spectrométrie de masse, une digestion trypsique des fragments de gels contenant les protéines a été réalisée. Les spots d'intérêt sont excisés du gel coloré au nitrate d'argent, puis lavé à l'aide 100 µl d'une solution A (25 mM de NH₄NCO₃ pH 7.8). Les fragments de gel sont déshydratés et décolorés par 2 lavages successifs de 30 min à 37°C à l'aide de 100 µl d'acétonitrile et évaporé avec une SpeedVac avant une étape de réduction (10 mM dithiothreitol dans le tampon A) et alkylation (55 mM iodocatetamide dans le tampon A). Le gel est ensuite réhydraté par une solution de tampon A contenant 12.5 ng/µl de trypsine, et laissé à incuber une nuit à 37°C. Les peptides digérés sont extraits du gel à l'aide d'un tampon

contenant 70% d'acétonitrile, 30% d'eau et 5% d'acide formique (v/v), puis analysés par spectrométrie de masse.

13) Coloration des protéines au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent est réalisée à l'aide du kit Dodeca Silver Stain Kit (Bio-Rad). Les gels sont tout d'abord fixés sous agitation pendant 30 min ou toute la nuit dans une solution contenant 40% (v/v) d'éthanol, 10% (v/v) d'acide acétique et 50% d'eau (v/v/v). Puis, le gel est sensibilisé dans 10% (v/v) de « Sensitizer concentrate », 1% (v/v) de « Background reducer concentrate », 30% (v/v) d'éthanol, pendant 30 min sous agitation. Après 3 lavages à l'eau de 5 min, le gel est coloré pendant 20 min sous faible agitation également dans un tampon contenant 2% (v/v) de « Silver reagent concentrate » dans de l'eau. Le développement du gel se fait après 2 lavages de 1 min dans l'eau, avec une solution de développement contenant 10% (v/v) de « Development buffer concentrate », 0.02 % (v/v) « Image developer concentrate », 0,005 % (v/v) « Background reducer concentrate » dans de l'eau. Le développement est réalisé sous agitation le temps nécessaire pour obtenir la coloration désirée (entre 5 à 30 min). La coloration est ensuite stoppée par le lavage du gel dans une solution contenant 5% (v/v) d'acide acétique dans l'eau (10 min sous agitation). Après un rinçage à l'eau (10 min), les spots d'intérêt sont excisés du gel afin de réaliser une digestion trypsique.

14) Spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées par le Dr François Delalande au laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (LMSBO) dirigé par le Dr Alain Van Dorsselaer. Cette technique d'analyse permet de mesurer la masse des molécules présentes dans un échantillon en mesurant leur rapport masse sur charge (m/z).

Dans le cadre de notre étude, les analyses ont été réalisées soit sur un spectromètre de masse de type quadrupole-TOF (pour Time of flight, Micromass Ltd) ou de type trappe à ions de Bruker (Bruker Daltonics).

Les échantillons sont concentrés par évaporation (speed vac) et repris dans 10 µl d'eau et d'acétonitrile (50/50) avec 0.1% d'acide formique. 5 µl de l'échantillon sont ensuite injectés

sur une HPLC (Agilent Technologies) couplée au spectromètre de masse. En mode MS (mesure directe de la masse des molécules), lorsque le spectromètre détecte le m/z de la morphine (286.1 m/z) ou de la M6G (462.1 m/z), alors celui-ci va accumuler ces molécules et basculer en mode MS/MS. Cela va aboutir à la fragmentation de la molécule sélectionnée. La présence de la molécule d'intérêt est ensuite confirmée ou non en comparant les spectres de fragmentation obtenus avec les spectres de fragmentation de morphine et de M6G standards.

15) Synthèse de novo de M6G

L'UGT2B a été purifié à partir du matériel intragranulaire de cellules chromaffines *via* une approche de chromatographie d'affinité. Le matériel élué est dessalé par Sep-Pak (Waters), puis la présence d'UGT2B a été confirmée par une analyse de Western blot.

L'éluât contenant l'UGT2B purifié par affinité est évaporé et incubé 3 heures à 37°C dans 100 µl de mélange réactionnel (100 µM acide UDP-glucuronique, 2 mM saccharolactone, 0.9 µM morphine, 50 mM tris-HCl, pH 5.5). Le milieu réactionnel obtenu est déprotéinisé et la présence de M6G est analysée par spectrométrie de masse. Des contrôles correspondant à l'éluât de la colonne d'affinité bouilli (pour inactiver l'enzyme), ou avec le mélange réactionnel seul ont été effectués.

16) Déglycosylation de l'UGT2B

L'UGT2B est déglycosylée en utilisant un kit "enzymatic protein deglycosylation kit" (Sigma Aldrich) en présence de triton X100. La déglycosylation a été réalisée en utilisant de la N-glycosidase F, de la O-glycosidase, de la α2(3,6,8,9)-neuroaminidase, de la β1,4-galactosidase et de la β-N-acétylglucosaminidase. Les contrôles non déglycosylés et les échantillons déglycosylés ont été analysés par Western blot.

17) Extraction du matériel non protéique

Un volume d'extrait intracellulaire est mélangé à 2 volumes d'HCN 1 N et à 2 volumes de chloroforme/isopropanol (9:1 ; v:v). Après agitation manuelle, le tube est laissé au

repos 5 min à 4°C, puis centrifugé 15 min à 2 500 g. Le surnageant aqueux qui contient les alcaloïdes est alors récupéré pour être analysé par HPLC ou spectrométrie de masse.

18) Dosage protéique

La méthode de Bradford est une technique de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le réactif de Bradford (Bleu Brillant G dans de l'acide phosphorique et du méthanol). Ce réactif prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines. Afin de doser les extraits protéiques, une gamme étalon est réalisée avec une solution de BSA (solution d'albumine sérique d'origine bovine à 0,025 mg/ml), correspondant à une quantité croissante de protéines (0 à 20 µg). Le volume de chaque tube est ajusté à 800 µl par addition d'eau milliQ, puis 200 µl de réactif de Bradford sont ajoutés. Après une brève agitation et 5 min d'incubation, une lecture de la densité optique à 595 nm des échantillons standards permet d'obtenir une représentation graphique du dosage avec la quantité de protéines en abscisse et l'absorbance à 595 nm en ordonnée. La même expérience est réalisée avec l'échantillon à doser. La quantité de protéines présentes dans l'échantillon testé est calculée grâce à l'équation déduite de la courbe d'étalonnage.

19) Culture primaire de neurones et d'astrocytes

19.1 Culture primaire de neurones d'hippocampe de souris

Des souris femelles C57BL/6 gestantes (17 jours) sont utilisées pour la manipulation. En effet, le stade embryonnaire E17 correspond au stade au cours duquel les neurones de l'hippocampe sont encore sous forme de précurseurs. Les femelles sont anesthésiées avec du pentobarbital sodique (0,18 g/kg ; CEVA santé animale, France) et de la kétamine (1 g/kg ; CEVA santé animale). Le péritoine est ouvert et le chapelet d'embryon est prélevé (5 à 10 embryons pour la souche C57BL/6). A partir de ce moment, toute l'expérimentation est réalisée en conditions stériles. Les embryons sont décapités, le cerveau est prélevé et déposé dans une goutte de GBSS (Gey's Balanced Salt Solution ; Sigma Aldrich) supplémenté avec 0,65% (m/v) de glucose, et ce afin de préserver au maximum les tissus. L'hippocampe est isolé du reste du cerveau par dissection sous une loupe binoculaire. Les méninges et les vaisseaux sanguins sont retirés de façon à éviter le plus possible une contamination et la

multiplication des fibroblastes et des cellules endothéliales. Les hippocampes prélevés sont placés dans 5 ml d'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution ; Gibco) supplémenté avec 0,65% (m/v) de glucose, auquel on rajoute 500 µl de trypsine à 2,5% (m/v). Le mélange est laissé à incuber sous agitation pendant 25 min à 37°C, ce qui permet la dissociation des tissus. Après cette dissociation chimique, ce mélange est centrifugé (5 min à 400g), le surnageant est éliminé et le culot de cellules repris dans 1 ml de milieu de mise en culture (DMEM sans glutamine, avec 0,11 g/l de sodium pyruvate et 4,5 g/l de glucose; Sigma Aldrich) supplémenté avec 0,2% (v/v) de glucose 2,5 M, 1% (v/v) de glutamine 200 mM, 5% (v/v) de SFV décomplémenté, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Après mise en suspension des cellules, celles-ci sont passées au travers d'un tamis de 48 µm disposé au dessus d'un microtube de 1,5 ml. Après coloration de 10 µl du filtrat avec 10 µl de bleu trypan (v/v ; Sigma Aldrich), les cellules sont comptées sur une cellule de Neubauer et mises en culture dans le même milieu à une concentration de 2.10^5 cellules/ml. Au bout de 6 h, le milieu est remplacé par du milieu défini correspondant à du milieu neurobasal sans glutamine (Gibco) supplémenté avec 0,5% (v/v) de glutamine 200 mM, 2% de complément B27 (v/v ; Gibco), 5% (v/v) de SFV décomplémenté. Le milieu est ensuite renouvelé tous les 3 jours.

19.2 Culture primaire d'astrocytes de souris.

Le cerveau est prélevé sur des souriceaux C57BL/6 âgés de 4 jours (stade du développement du système nerveux pendant lequel l'astrogénèse est la plus importante). Les souriceaux sont décapités et le cerveau est prélevé et disséqué dans du PBS (Phosphate Buffered Saline; 10,5 mM KH₂PO₄, 30 mM Na₂HPO₄, 1,54 M NaCl) stérile. Le cortex est isolé des structures sous corticales et de l'hippocampe à l'aide d'une loupe binoculaire. Les méninges et les vaisseaux sanguins sont éliminés afin d'éviter une contamination et donc la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales dans la culture. Les tissus corticaux sont ensuite dissociés mécaniquement par passage sur un tamis de 82 µm au dessus d'une boîte de culture contenant 20 ml de milieu de culture. Le milieu de culture pour astrocytes primaires est composé de DMEM sans glutamine (Gibco), contenant 0,11 g/l de sodium pyruvate et 4,5 /l de glucose (Gibco), supplémenté avec 1% (v/v) de glutamine 200 mM, 10% (v/v) de SFV décomplémenté, ainsi que 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Le volume de milieu de culture est complété de manière à avoir un volume final égal à 15 ml multiplié par le nombre d'hémicortex. Le milieu contenant les cellules est

ensuite distribué dans des boîtes de culture (10 ml dans une boîte de culture de 9 cm de diamètre, 2 ml par puits dans une plaque 6 puits et 500 µl par puits dans une plaque 24 puits). Le milieu est changé une première fois au bout de 5 jours, puis tous les 3 jours avec le même milieu. Les astrocytes sont utilisés lorsqu'une confluence d'environ 90% est atteinte. Des tapotements sur la boîte permettent de purifier la culture en décrochant les cellules non astrocytaires qui sont alors éliminées par lavage.

20) Culture de lignée cellulaire

20.1 La lignée cellulaire SH-SY5Y

La lignée humaine SH-SY5Y est issue d'un neuroblastome métastatique d'un enfant de 4 ans. Ce neuroblastome qui présente des caractéristiques catécholaminergiques, comme une activité dopamine β-hydroxylase, représente un modèle bien caractérisé pour l'étude de la libération des catécholamines et de la neurotransmission dopaminergique (Ault and Werling, 2000). Nous avons obtenu ces cellules auprès du service de culture cellulaire de l'institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) situé à Illkirch-Graffenstaden (référence ATCC: CRL-2266)

20.2 La lignée cellulaire U373-MG

La lignée cellulaire U373-MG dérive d'un astrogliome humain prélevé sur un homme de 61 ans. Cette lignée est utilisée comme modèle d'étude *in vitro* des astrocytes (Lieb et al., 2005). Nous avons obtenu ces cellules auprès du service de culture cellulaire de l'IGBMC) situé à Illkirch-Graffenstaden (référence ATCC: HTB-17).

20.3 Condition de culture

Les cellules SH-SY5Y et U373-MG sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium supplémenté avec 4,5 g/l de glucose, de la L-glutamine, du NaHCO₃ et de la pyridoxine-HCL, Sigma), auquel a été rajouté 10% de sérum de veau fœtal (v/v), décomplémenté par un traitement thermique (30 min à 56°C), et des antibiotiques (streptomycine et pénicilline 100 U/ml)

La culture est réalisée à 37°C sous une atmosphère contenant 5% de CO₂ dans des boites de Pétri de 8 et 14 cm de diamètre. Arrivées à confluence, les cellules sont décollées de

leur support plastique par un traitement à la trypsine-EDTA (0,5 g/l de trypsine bovine et 0,2 g/l d'EDTA, Sigma) pendant 2 min. Après sédimentation des cellules par centrifugation (3 min à 400 g), le surnageant est éliminé par aspiration. Le culot de cellules est alors dilué dans du milieu frais et réparti dans de nouvelles boîtes de Pétri.

21) Stimulation de la sécrétion des cellules SH-SY5Y

Le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées (2 x 5 min) avec du DMEM sans sérum, puis incubé 1 h avec du DMEM sans sérum. La sécrétion des cellules SH-SY5Y est obtenue en incubant les cellules pendant 24 h avec 100 μ M de nicotine dans du DMEM sans sérum. Un traitement au Cadmium 200 μ M (Sigma Aldrich) est utilisé pour vérifier si le mécanisme est calcium-dépendant. Après 24 h, le milieu de culture est récupéré et la morphine est quantifiée grâce à un test ELISA. Les résultats sont alors analysés par un test de Mann-Whitney avec un $p < 0.01$. De plus, l'efficacité de sécrétion est confirmée par un Western Blot avec un anticorps dirigé contre la chromogranine B, un marqueur de sécrétion (Giudici et al., 1992).

22) Extraction du matériel intracellulaire

Des fractions intracellulaires sont obtenues à partir de boîtes de culture confluentes. Le milieu de culture est éliminé par aspiration, puis la boîte de Pétri est lavée deux fois au PBS (Phosphate Buffered Saline, 10,5 mM KH_2PO_4 , 30mM Na_2HPO_4 , 1,54 M NaCl) préchauffé à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées dans un tampon Ripa (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS), auquel on ajoute un cocktail d'antiprotéases (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Les cellules sont ensuite décollées de la boîte de culture et récupérées dans un microtube Eppendorf (1,5 ml), siliconé afin de minimiser la perte de matériel. Les cellules sont alors lysées par sonication (3x 10 sec). Après centrifugation (30 min, 10 000 g, 4°C), le surnageant qui contient les extraits cytoplasmiques est récupéré. La quantité totale de protéines présentes dans les extraits est alors estimée par la technique de Bradford, puis les extraits sont stockés à -20°C.

23) Immunohistochimie

23.1 Préparation des tissus

Les souris sont anesthésiées avec 0,18 g/kg de pentobarbital sodique et 0,1 g/kg de ketamine. Après thoracotomie, la fixation est réalisée par perfusion intracardiaque du fixateur pendant 10 min (passage de 100 ml de fixateur) à l'aide d'une pompe péristaltique fonctionnant avec un débit de 10 ml/min. Pour les expériences de microscopie optique la solution de fixation contenait 4% (m/v) de formaldéhyde dans un tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 (81 mM Na₂HPO₄, 18,8 mM NaH₂PO₄). Pour les expériences de microscopie électronique du glutaraldéhyde 0.5% (v/v) a été ajouté à la solution de fixation.

Après fixation, le cerveau est prélevé et incubé pendant 2 h dans la même solution de fixation. Des coupes coronales et sagittales de 70 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un vibratome (VT 1000 S, Leica Microsystems) et collectées dans du tampon PBS. Pour la microscopie optique, les coupes sont conservées à -20°C dans le cryoprotecteur de Watson (0,87 M saccharose, 250 nM polyvinylpyrrolidone, 150 mM NaCl, 40,5 mM Na₂HPO₄, 9,4 mM NaH₂PO₄, 30% (v/v) éthylène glycol).

23.2 Immunomarquage

Les coupes sont sorties du milieu de Watson et rincées avec du PBS (3x 5 min). Les coupes sont ensuite incubées pendant 1 h avec de l'albumine sérique de bœuf (BSA, Euromedex,) à 3% (m/v) dans du PBS afin de saturer les sites aspécifiques. Après 6 lavages de 5 min avec du PBS, les coupes sont incubées pendant toute la nuit avec les anticorps primaires dilués dans la solution de saturation (voir tableau 4). Les coupes sont alors lavées 6 fois 5 min avec du PBS, puis les anticorps secondaires dilués dans la solution de saturation sont incubés avec les coupes pendant 2 h à température ambiante. Six lavages de 5 min avec du PBS permettent ensuite d'éliminer les anticorps secondaires non fixés et ainsi diminuer les liaisons aspécifiques.

Pour les anticorps secondaires liés à la peroxydase, l'activité de la HRP (Horse Radish Peroxydase) est révélée grâce à une solution fraîchement préparée contenant 0,024% de 4-chloro-1-naphtol (m/v) et 0,012% (v/v) de peroxyde d'hydrogène dans de l'eau ultra pure. La réaction est stopée après apparition d'un marquage suffisant grâce à 6 lavages de 5 min avec du PBS. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelle dans une solution de PBS/glycérol (1/1, v/v), puis la lamelle est scellée sur la lame avec du vernis cosmétique.

Les différents anticorps (Ac) utilisés pour les analyses par immunohistochimie, ainsi que leurs dilutions respectives, sont récapitulés dans le tableau suivant :

Anticorps primaire	fournisseur	dilution	Anticorps secondaire	Fournisseur	dilution
Ac monoclonal de souris anti-morphine	Aviva	1/1000	Ac anti-IgG de souris HRP	P.A.R.I.S.	1/500
Ac monoclonal de souris anti-morphine	Aviva	1/1000	Ac anti-IgG de souris Cy3	Jackson	1/1000
Ac polyclonal de lapin anti-GFAP	Dako	1/1000	Ac anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488	Invitrogen	1/1000
Ac polyclonal de poulet anti-nestin	Abcam	1/200	Ac anti-IgG de poulet Alexa Fluor 633	Invitrogen	1/1000
Ac polyclonal de poulet anti-Tuj-1	Neuromics	1/150	Ac anti-IgG de poulet Alexa Fluor 633	Invitrogen	1/1000

Tableau 4: Anticorps utilisés pour les expériences d'immunohistochimie.

23.3 Observation au microscope

Les coupes révélées avec un anticorps secondaires liés à la peroxydase sont observées avec un microscope Leica DMRB équipé d'un objectifs 20x/40x et d'une caméra digitale (AxioCam, Zeiss).

Les coupes de tissus marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes sont montées entre lame et lamelle dans une solution de Vecta Shield (Vector) à l'aide d'une loupe binoculaire. La lamelle est alors scellée sur la lame avec du vernis cosmétique.

Les marquages immunofluorescents sont observés à l'aide d'un microscope confocal LSM 510 (Zeiss) équipé d'un objectif 63x à immersion dans l'huile et possédant trois lasers :

- (i) un laser argon qui permet d'exciter les fluorophores à 488 nm (*e.g.*, Alexa fluor 488)
- (ii) un laser hélium/néon qui permet d'exciter les fluorophores à 543 nm (*e.g.*, Cy3)

(iii) un laser hélium/néon permettant d'exciter les fluorophores à 633nm (*e.g.*, Cy5).

La microscopie confocale à balayage laser permet d'effectuer des coupes virtuelles de 0,2 à 0,3 μm dans la préparation et ainsi d'enregistrer la fluorescence émise par un seul plan.

Certaines de nos coupes ont été observées au microscope à épifluorescence avec un microscope Axiovert 200M (Zeiss) équipé d'un objectif 40x. L'utilisation de filtres adéquats permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation à partir du spectre émis par une lampe HBO et ainsi exciter le fluorophore voulu. Le microscope est équipé de filtres nous permettant d'exciter des fluorophores à 345nm (*e.g.*, DAPI), 488nm (*e.g.*, Alexa fluor 488) et 543nm (*e.g.*, Cy3).

23.4 Immunomarquage réalisé pour la microscopie électronique

Les études de microscopie électronique sont effectuées en collaboration avec le Dr Guy Roussel et Mme Monique Miehé.

Les coupes sont marquées immédiatement après la coupe au vibratome à l'aide d'un anticorps anti-morphine ou un anticorps anti-PEBP (voir chapitre 21.2). La révélation de l'activité peroxydase est réalisée avec une solution contenant du 3,3-diaminobenzidine tétrahydrochloride (0,025% (m/v) et du peroxyde d'hydrogène 0,006% (m/v)) dans du TBS. Après lavage au PBS, les échantillons sont postfixés pendant 30 min à température ambiante dans une solution contenant du glutaraldéhyde à 2,5% (m/v) dans du PBS, puis pendant 1 h à 4°C dans une solution de tétroxyde d'osmium 1% (m/v) dans du PBS. Après une étape de déshydratation dans de l'éthanol, l'inclusion des coupes dans de la résine araldite est effectuée. Les coupes ultrafines sont réalisées, puis observées au microscope électronique (Hitachi H 7500) équipé d'une caméra digitale (C 4742-95) pour l'acquisition des images.

24) Immunocytochimie

24.1 Préparation des cellules

Les cellules sont cultivées dans des boîtes 6 puits contenant des lamelles de verre qui ont été préalablement traitées 2 h avec de la polylysine stérile (Sigma Aldrich) pour permettre l'adhésion des cellules. Les cultures sont utilisées pour réaliser les expériences

d'immunocytochimie lorsqu'elles ont atteint un stade de semi-confluence. Le milieu est éliminé et les cellules sont lavées deux fois avec du PBS à 37°C. Les cellules sont alors incubées pendant 15 min en présence d'une solution de fixation contenant 4% (m/v) de paraformaldéhyde (Sigma Aldrich) dans un tampon phosphate 0,1M pH7,4 (Na₂HPO₄ 81mM, NaH₂PO₄ 18,8 mM). Après la fixation, 6 lavages avec du PBS permettent d'éliminer les traces de formaldéhyde.

24.2 Immunomarquage

Afin de permettre aux anticorps d'être en contact avec les antigènes intracellulaires, les cellules sont perméabilisées durant 15 min avec du PBS contenant 0,1% (v/v) de Triton X100 (Sigma Aldrich). Les lamelles sont ensuite lavées 6 fois 5 min avec du PBS, puis les sites aspécifiques sont bloqués par une incubation de 30 min dans une solution de BSA 3% (m/v) dans du PBS. L'incubation des anticorps primaires (tableau 5) se fait pendant 2 h sous agitation et à température ambiante. Après 6 lavages de 5 min avec du PBS, les anticorps secondaires (Tableau 5) sont laissés incubés avec les lamelles pendant 1 h à température ambiante. Une coloration au DAPI (1µg/ml ; Sigma Aldrich), permettant un marquage des noyaux, est réalisée en même temps que l'incubation des anticorps secondaires. Les lamelles sont ensuite lavées 6 fois 5 min avec du PBS. Un lavage final à l'eau distillée permet d'éliminer les sels résiduels. Les lamelles sont montées avec de l'aquapoly mount (Polyscience) sur des lames en verre. Le milieu de montage est laissé à polymériser à 4°C pendant au moins 12 h avant d'effectuer les observations au microscope confocal ou au microscope à épifluorescence.

Les différents anticorps (Ac) utilisés pour les analyses immunohistochimiques, ainsi que leurs dilutions respectives, sont récapitulés dans le tableau suivant :

Anticorps primaire	fournisseur	dilution	Anticorps secondaire	Fournisseur	dilution
Ac polyclonal de mouton anti-morphine	Biogenesis	1/1000	Ac anti-IgG de mouton Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1/2000
Ac monoclonal de souris anti-morphine	Aviva	1/2000	Ac anti-IgG de souris Cy3	Jackson	1/1000
Ac polyclonal de lapin anti-CGA ₁₂₄₋₁₄₃	Produit au laboratoire	1/1000	Ac anti-IgG de lapin Cy5	Molecular Probes	1/2000
Ac polyclonal de lapin anti-GFAP	Dako	1/2000	Ac anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488	Invitrogen	1/2000
Ac polyclonal de chèvre anti-UGT2B	Santa Cruz Biotechnology	1/500	Ac anti-IgG de chèvre Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1/2000
Ac polyclonal de lapin anti-MAP ₂	Chemicon	1/2000	Ac anti-IgG de lapin Alexa Fluor 488	Molecular Probes	1/2000

Tableau 5: Anticorps utilisés pour les expériences d'immunocytochimie.

25) Spécificité du marquage de la morphine

La spécificité de l'anticorps anti-morphine (Aviva) utilisé pour les études d'immunohistochimies et d'immunocytochimie a été testée grâce à un test ELISA. L'anticorps anti-morphine utilisé reconnaît à la fois la morphine, la M3G et la M6G. Pour toutes les expériences, un contrôle de la spécificité du marquage de la morphine par blocage de l'anticorps est réalisé. Ainsi, une préincubation de 10 ng de morphine par µg d'anticorps pendant 1 h à 37°C est réalisée avant l'incubation avec les coupes ou les cellules. Les anticorps secondaires ont également été testés seuls (omission de l'anticorps primaire). Le bruit de fond visualisé en microscopie confocale est soustrait des images suivantes observées avec les mêmes paramètres.

26) Extraction des ARN totaux

Les cellules en culture ont été trypsinisées avec 3 ml de trypsine (Sigma-Aldrich). Après centrifugation à 1500 rpm pendant 5 min, les cellules ont été comptées. 5×10^6 cellules ont été lysées afin d'extraire les ARN totaux selon les recommandations du protocole d'extraction (RNA II extraction kit, Macherey-Nagel).

Les ARN ont été quantifiés par mesure de l'absorbance aux longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm avec un spectrophotomètre. Les volumes ont été ajustés pour une concentration finale de 100 ng/ μ l et les ARN ont été aliquotés et stockés à -20°C.

27) RT-PCR

La rétrotranscription et l'amplification par PCR ont été effectuées en une seule étape avec le kit RT-PCR One Step (Qiagen). Les amorces sens et antisens (0,6 μ M final) spécifiques pour chaque amplicon ont été utilisées pour réaliser les amplifications. Les réactions de RT-PCR ont été effectuées à l'aide d'un thermocycleur Mastercycler® (Eppendorf). Le programme utilisé comprend une première étape à 50°C de 30 min permettant la rétrotranscription des ARN en ADNc, suivi de 15 min à 72°C pour l'activation de la polymérase. La réaction de PCR se compose d'une étape de dénaturation (95°C pendant 1 min), suivi d'une étape d'hybridation des amorces à une température spécifique de chaque couple d'amorces pendant 2 min, et d'une étape d'élongation à 72°C pendant 2 min et 30 sec. La répétition de ce cycle (35 fois) permet l'amplification des amplicons. Après une étape d'élongation finale de 10 min à 72°, les échantillons ont été conservés à 4°C. Toutes les étapes d'extraction et de RT-PCR ont été effectuées avec des solutions exemptes de RNase pour éviter toute dégradation des ARN.

28) Electrophorèse des produits de RT-PCR

Les produits de RT-PCR ont été déposés sur gel agarose 2% (m/v) dans un tampon TBE 1X (Tris/Borate/EDTA ; Ethylene-Diamine-TetraAcetic acid ; Euromedex). La séparation des fragments amplifiés a été effectuée par application d'un courant de 75V pendant 45 min dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TBE 1X. L'addition de BET à 0,5 μ g/ml (Bromure d'ETHidium, agent s'intercalant entre les bases de l'ADN) dans le

gel permer de visualiser le profil de migration sous UV. L'acquisition des images a été réalisée avec un GeneGenius (SynGene) équipé d'une caméra et avec le logiciel GeneSnap.

29) Electrophysiologie

Les expériences d'électrophysiologie ont été réalisées par le Dr Taleb sur des cellules SH-SY5Y en culture dans des boîtes de 35 mm ayant une faible densité cellulaire. Les enregistrements ont été effectués avec un amplificateur Axopatch-B200 (Axon Instruments).

Deux configurations ont été utilisées : la technique de patch-clamp sur cellule entière et celle sur cellule attachée. Dans le cas de patch-clamp sur cellule entière, la pipette d'enregistrement était remplie d'une solution composée de gluconate de potassium (131 mM), d'HEPES (10 mM), d'EGTA (5,5 mM), de CaCl₂ (1 mM), de MgCl₂ (2 mM), de NaCl (3mM), de KCl (5 mM), d'ATP (0,1 mM), et de GTP (0,1 mM), et présentait une résistance de 2 à 4 MV. Après sélection de cellules SH-SY5Y isolées, l'enregistrement a été réalisé sur des cellules isolées et maintenues en perfusion continu dans le milieu contrôle composé de gluconate de sodium (1 mM), d'HEPES (10 mM), de CaCl₂ (1 mM), de MgCl₂ (2 mM), de NaCl (132 mM), de KCl (2 mM) et de D-glucose (10 mM). Les pH de la solution de la pipette et du milieu ont été ajustés respectivement à 7,2 avec du KOH et à 7,4 avec du NaOH. Pour le mode en cellule attachée, la pipette a été remplie avec le milieu contrôle.

Les solutions à tester (morphine, M6G ou naloxone, Sigma-Aldrich) ont été diluées aux concentrations désirées (de 10⁻¹⁰ M à 10⁻⁶ M pour la morphine et la M6G, pour la naloxone) dans le milieu contrôle. Elles ont été appliquées à l'aide du système de perfusion à multiple canaux (RCS-160 rapid solution exchanger, Bio-Logic). Chaque canal possède un diamètre interne de 1 mm. Le tube contenant la solution à perfuser a été placé à 50 mm de la cellule à enregistrer. Le début de l'enregistrement débute dès que le tube contenant les solutions à tester (morphine, M6G ou naloxone) est positionné devant la cellule. Le voltage et le tracé du courant ont été enregistrés avec l'interface Digidata 1322A (Axon Instrument) et le logiciel Pclamp (Axon Instruments). Les courants enregistrés ont été filtrés (seuil minimal de passage du filtre 2 kHz) avant d'être digitalisés à 5 kHz.

30) Test ELISA

Les tests ELISA ont été réalisés à l'aide d'un kit ELISA spécifique de la morphine (Morphine Specific Direct ELISA Kit, Immunalysis Corporation). L'anticorps utilisé pour saturer les plaques ne reconnaît que la morphine. Les contrôles négatifs pour des concentrations de 0 à 25 ng/ml de M6G, de M3G et de codéine ont été validés par notre équipe. Les seuils de sensibilité déterminés pour ce kit sont de 0,01 ng/ml (morphine exogène ou endogène). Des concentrations croissantes morphine ont permis d'établir une gamme étalon. 20 µl des échantillons ont été déposés par puits. Puis, 100µl d'enzyme HRP conjuguée à la morphine ont été ajoutés. Après une incubation d'une heure à température ambiante et dans l'obscurité, les puits ont été lavés 6 fois dans du PBS. La révélation a été réalisée par ajout de 100 µl de substrat (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) qui a été laissé incubé 30 min (température ambiante, à l'obscurité). La réaction est stoppée par ajout de 100 µl d'une solution HCl (1 N). La lecture de l'absorbance a alors été effectuée dans l'heure qui suit aux longueurs d'onde de 450 nm et de 630 nm. Chaque échantillon a été déposé en double. Les concentrations de morphine ont été déterminées d'après l'équation de la courbe étalon

Résultats

Résultats

Mes travaux réalisés durant mon DEA au sein de l'équipe du Dr Metz-boutigue se sont dans un premier temps focalisés sur l'étude la morphine endogène et de ses dérivés au sein des cellules chromaffines. Ces travaux, encadrés par le Dr. Goumon, ont mené à une publication dans le journal « Journal of Biological Chemistry » en 2006 (publication I). Puis, étant particulièrement intéressé par les Neurosciences, je me suis focalisé durant ma thèse sur l'étude de cette morphine endogène au sein du SNC de mammifère, en utilisant à la fois des modèles cellulaires et un modèle intégré. Une partie de ces études a été publiée dans le journal « Plos One» en 2008 (publication II), les résultats plus récents étant présentés dans la dernière partie de ce chapitre (résultats non publiés).

Publication I

Publication I: Identification de la morphine-6-glucuronide au sein des granules de sécrétion des cellules chromaffines.

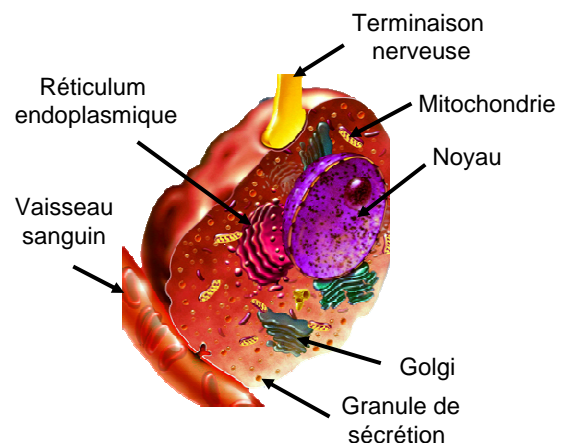
Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules

Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters ID, Van Dorsselaer A, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH.

(2006) J. Biol. Chem., Vol. 281, Issue 12, 8082-8089

Les cellules chromaffines bovines représentent un des modèles d'étude de l'équipe « Neuropeptides Bioactifs » que j'ai intégrée en tant qu'étudiant en DEA en 2004. Ce sont des cellules neuroendocrines (figure 15) qui sont issues de la crête neurale et qui contiennent de nombreux granules de sécrétion assurant le stockage des catécholamines et d'un grand nombre d'espèces protéiques et peptidiques (voir tableau 6; pour revue Metz-Boutigue et al., 1998; Aunis, 1998). Ces cellules composent la partie médullaire de la glande surrénale, la partie corticale étant responsable de la sécrétion des glucocorticoïdes. Lors d'une situation de stress, une stimulation des cellules chromaffines par le nerf splanchnique conduit à une dépolarisation membranaire aboutissant à la sécrétion dans le sang des catécholamines, ainsi que de nombreux peptides (*e.g.*, vasostatine 1, VS1). Parmi ces peptides, certains affectent la physiologie cardiaque (Tota *et al.* 2003; Tota *et al.* 2004; Cerra *et al.* 2006), tandis que d'autres sont impliqués dans l'immunité innée (Goumon et al., 1998; Aunis et Metz-Boutigue 2000; Metz-Boutigue *et al.* 2003) et la modulation de la douleur (proenképhaline-A, peptides dérivés de la CGA) (Plotnikoff *et al.* 1997; Ghia *et al.* 2004; Ghia *et al.* 2004).

Figure 15: Représentation schématique d'une cellule chromaffine de la médullo-surrénale.



Catécholamines	Adrénaline, noradrénaline, dopamine, dérivés du 3-amino-2-phénylpropène
Nucléotides	ATP , ADP, AMP, GTP, GDP, UDP.
Enzymes	DBH (Dopamine β -Hydroxylase), enképhalinase, acétylcholinestérase, PCs (Prohormone Convertases), PTP (prohormone thiol-protéase), AGE (Adrenorphin-Generating Enzyme), ACE (Angiotensin-Converting Enzyme), PAM (Peptidylglycine- α -Amidating Monooxygenase), carboxy peptidase H/E, endopine 1 & 2
Cofacteur	Acide ascorbique
Ions	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , PO ₄ ²⁻
Peptides	Neuropeptide Y, substance P, VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), enképhalines, somatostatine, neurotensine, dynorphine, galanine, ANP (Atrial Natriuretic Peptide), CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), ACTH (AdrenoCorticoTropin Hormon), Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor
Protéines	Chromogranines, proenképhaline A, ubiquitine, protéines Alpha1-antichymotrypsin-like I & II

Tableau 6: Principaux constituants de la matrice des granules chromaffines.

Les catécholamines présentes dans ces cellules chromaffines ont, tout comme la morphine, la tyrosine et la dopamine comme précurseurs (figure 12, chapitre 8). Par le passé, de nombreuses études ont montré une augmentation des quantités morphine dans des états de stress. Par exemple, des travaux ont montré que chez l'homme une intervention chirurgicale lourde tel qu'un pontage coronarien induisait une augmentation importante de la concentration de morphine endogène circulante (Brix-Christensen et al., 1997) (voir chapitre 8.1). D'autre part, de la morphine a été détectée dans la glande surrénale, qui représente un des organes majeurs impliqués dans la réponse au stress de différents mammifères. Une étude *in vitro* a montré que des cellules chromaffines d'anguille libéraient de la morphine suite à une dépolarisation (Epple et al., 1993). De plus, la morphine a également été retrouvée dans des cellules PC-12 qui sont des cellules chromaffines tumorales de rat (Goumon et al., 2000, Poeaknapo et al., 2004). De ce fait, il était important d'étudier la présence de morphine endogène au sein des cellules chromaffines.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressé à la localisation subcellulaire de l'immunoréactivité à la morphine et ses dérivés au sein des cellules chromaffines.

Etude de la localisation subcellulaire des composés apparentés à la morphine par microscopie laser confocale

Afin d'approcher la localisation subcellulaire de la morphine par microscopie laser confocale, un immunomarquage a été réalisé sur des cellules chromaffines en culture primaire à l'aide d'un anticorps reconnaissant la morphine, mais également la M3G et la M6G. Cette expérience a indiqué un fort marquage des granules de sécrétion des cellules chromaffines pour la morphine (figure 16, marquage vert). Ce marquage colocalise avec celui de la CGA (marquage rouge) qui représente un marqueur intragranulaire (Goumon et al., 2004) (colocalisation visualisée en jaune).

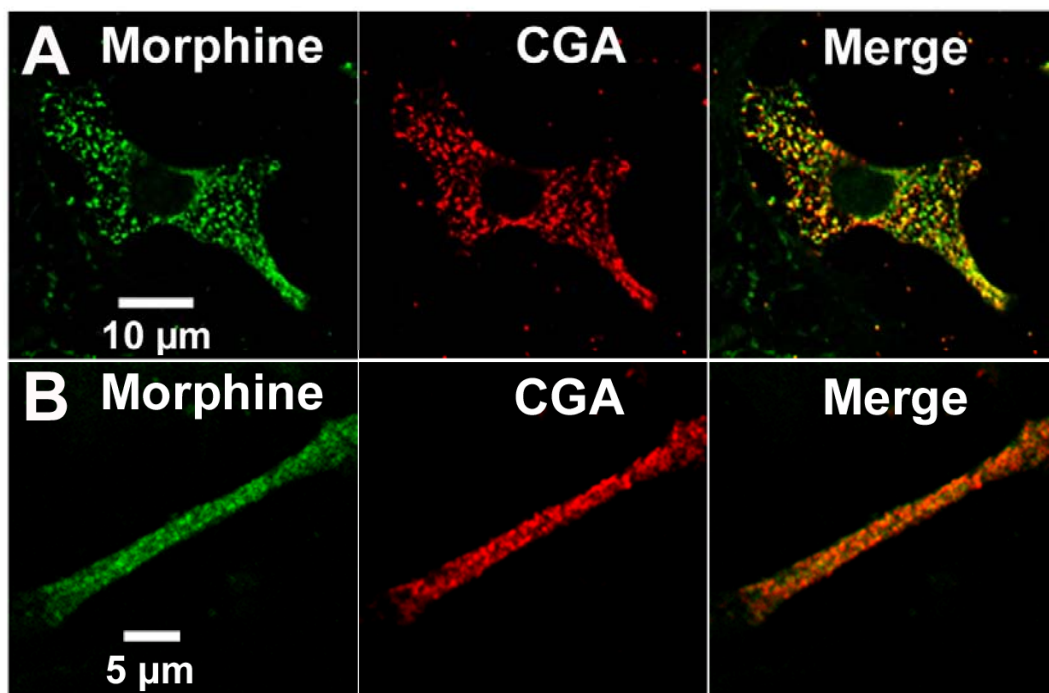


Figure 16: Analyse par microscopie laser confocale de la localisation subcellulaire de l'immunoréactivité apparentée à la morphine dans les cellules chromaffines bovines en culture primaire. A: Le marquage de la morphine est visualisé en vert, tandis qu'un marqueur spécifique de la matrice intragranulaire (CGA) est visualisé en rouge. Merge: colocalisation visualisée en jaune. B: Agrandissement réalisé sur un prolongement cellulaire.

Caractérisation biochimique

Afin de confirmer la présence de morphine ou de ses dérivés dans la matrice des granules chromaffines, une analyse biochimique des composants non protéiques de la matrice intragranulaire (matériel intragranulaire déprotéinisé) a été réalisée par HPLC de phase inverse. Cette technique permet de purifier les alcaloïdes et de comparer les profils d'éluion obtenus avec un standard d'alcaloïdes (*i.e.*, morphine, codéine, M3G, M6G et acétate de morphine, figure 17). De façon surprenante, seul un pic pouvant correspondre à de la M6G a été observé. Une analyse par spectrométrie de masse (Q-TOF) en mode MS-MS de la fraction correspondant à la M6G intragranulaire a indiqué que la molécule présente possédait un profil de fragmentation identique au standard de M6G (figure 18). En effet, en mode MS-MS, la molécule d'intérêt est isolée et fragmentée afin d'obtenir des fragments spécifiques correspondant à une signature unique de la molécule de départ. Dans notre cas, la M6G qui possède une masse moléculaire de 462Da se fragmente pour générer la morphine (286Da), ce qui prouve la présence de M6G dans le matériel intragranulaire.

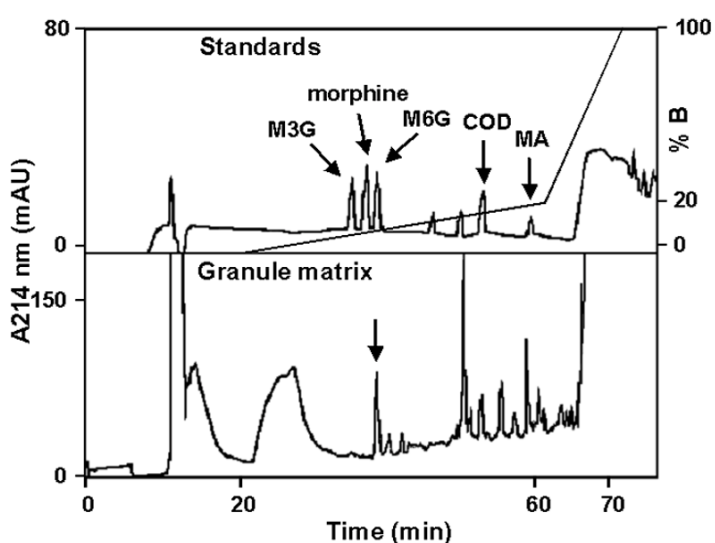
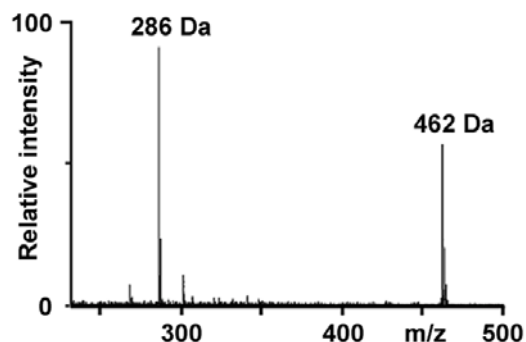


Figure 17: Purification par HPLC de phase inverse d'un standard d'alcaloïdes (haut) et du matériel intragranulaire (bas). Cod : codéine, MA : morphine acétate.

Figure 18: Analyse MS-MS par Q-TOF de la M6G présente dans la fraction HPLC isolée à partir de la matrice intragranulaire. La masse de 462 Da correspond à la M6G, tandis que la masse de 286 Da correspond à la morphine provenant de la fragmentation de la M6G.



Afin de compléter cette étude, les sécrétions de cellules chromaffines bovines en culture primaire stimulées par de la nicotine (10 μ M) ont été déprotéinisées et purifiées par HPLC de phase inverse. Un pic ayant le même temps d'élution que la M6G du standard d'alcaloïdes a été observé sur le chromatogramme (figure 19A). L'analyse par Q-TOF (MS-MS) réalisée sur cette fraction a confirmé la présence de M6G (figure 19B). En effet, la présence de deux masses à 462Da et 286Da, correspondant respectivement à la M6G et à la morphine, prouve de façon non ambiguë la présence de M6G. Ces résultats suggèrent que la M6G est sécrétée par les cellules chromaffines dans la circulation sanguine lors d'états de stress.

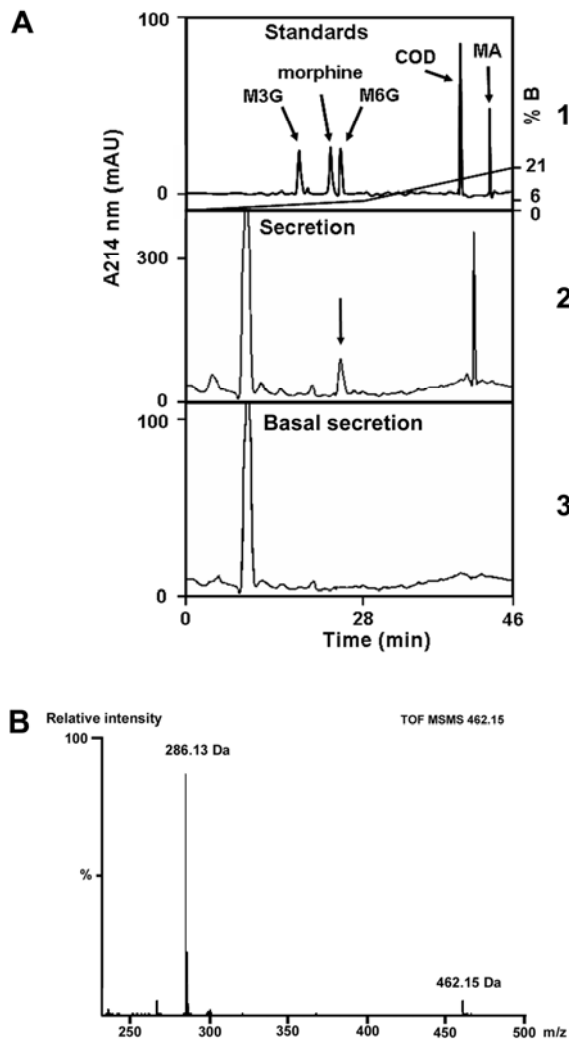


Figure 19: Identification de la M6G dans les sécrétions des cellules chromaffines bovines. *A: Purification par HPLC de phase inverse (1) d'un standard d'alcaloïdes, (2) du matériel sécrété par les cellules et (3) d'un contrôle correspondant à une sécrétion basale (sans stimulation).* *B: Analyse MS-MS par Q-TOF de la M6G présente dans la fraction HPLC isolée à partir des sécrétions de cellules chromaffines.*

Caractérisation d'une protéine intragranulaire liant la M6G

La morphine a été décrite pour se lier de manière non spécifique à différentes protéines telle que la sérum albumine. Cependant, une étude réalisée en 1991 par Grandi et Coll. (Grandy *et al.* 1990) avait indiqué que la PhosphatidylEthanolamie Binding Protein (PEBP) représentait une des protéines majeures liant la morphine après le passage de différents extraits cellulaires sur une colonne greffée avec de la morphine. Or, cette protéine a été décrite dans notre laboratoire pour être présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines bovines (Goumon et al., 2004). La présence concomitante de M6G et d'une protéine décrite comme liant la morphine suggérait une association au sein des granules chromaffines.

Afin de confirmer cette hypothèse, une stratégie expérimentale visant à purifier la PEBP et les molécules pouvant lui être associées (*i.e.*, M6G) dans la matrice intragranulaire a été mise en place. L'utilisation d'une colonne d'affinité greffée avec des anticorps anti-PEBP a permis de purifier la PEBP et son ligand intragranulaire en conditions douces non dénaturantes. Des expériences similaires ont été réalisées sur des fractions microsomales et cytoplasmiques, lysosomales et mitochondriales. Après purification des éluats par HPLC de phase inverse, un pic de densité optique correspondant au temps de rétention de la M6G a été observé dans les éluats provenant des expériences d'affinité réalisées sur un extrait de la matrice intragranulaire (figure 20A). L'analyse par spectrométrie de masse par Q-TOF a confirmé que de la M6G était également présente dans cette fraction (figure 20B; masse de 462Da), indiquant que la M6G représente un ligand intragranulaire de la PEBP au sein des granules des cellules chromaffines bovines.

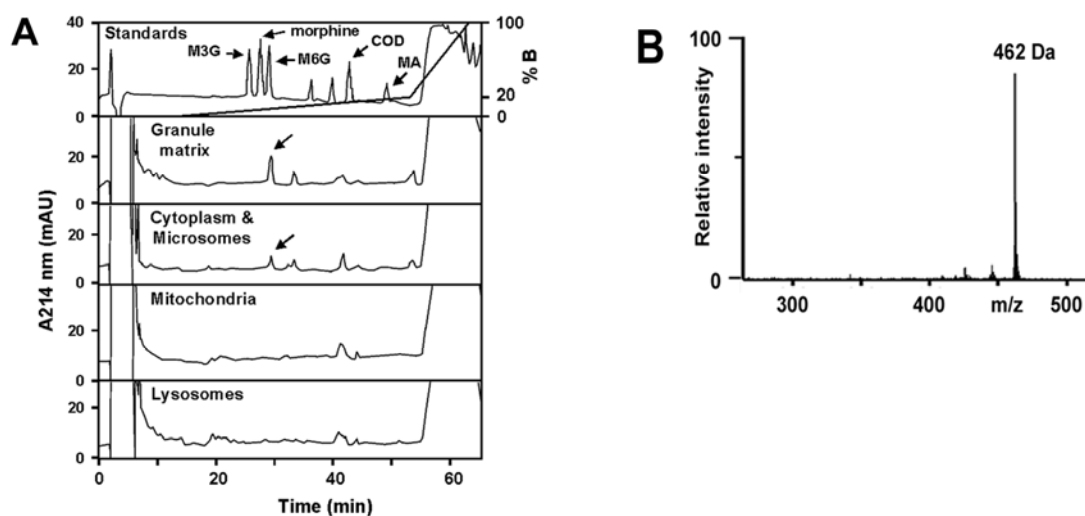


Figure 20: Caractérisation de la M6G liée à la PEBP dans la matrice intragranulaire des cellules chromaffines bovines. *A: Purification par HPLC de phase inverse d'un standard d'alcaloïdes. Les éluats issus du passage sur une colonne d'affinité anti-PEBP du matériel intragranulaire, d'extrait de cytoplasme et de microsomes, de mitochondries et de lysosomes ont été séparés par HPLC de phase inverse après une étape de déprotéinisation. Les flèches indiquent les fractions pouvant contenir de la M6G, sur la base des temps d'éluion des standards.* *B: Analyse par spectrométrie de masse Q-TOF en mode MS de la M6G (462Da) présente dans la fraction HPLC isolée à partir de la matrice intragranulaire.*

Mise en évidence d'un enzyme synthétisant la M6G

La présence de M6G suggérait la présence d'un enzyme impliqué dans sa synthèse à partir de la morphine et qui appartiendrait à la famille des UGT2B au sein des cellules chromaffines. En effet, parmi les UGT2Bs présents dans les microsomes, l'isoforme 7 est la seule décrite comme pouvant générer la M6G à partir de la morphine (mais qui produit également de la M3G).

Afin d'examiner une telle hypothèse, une première approche de microscopie laser confocale a été utilisée sur des cellules chromaffines bovines en culture primaire. Un immunomarquage a été réalisé avec des anticorps reconnaissant la famille UGT2B (figure 21, marquage vert). Ce marquage a été comparé à celui de la CGA qui représente un marqueur

intragranulaire (marquage rouge). Ainsi, un marquage ponctiforme colocalisant avec la CGA intragranulaire a été observé (marquage jaune).

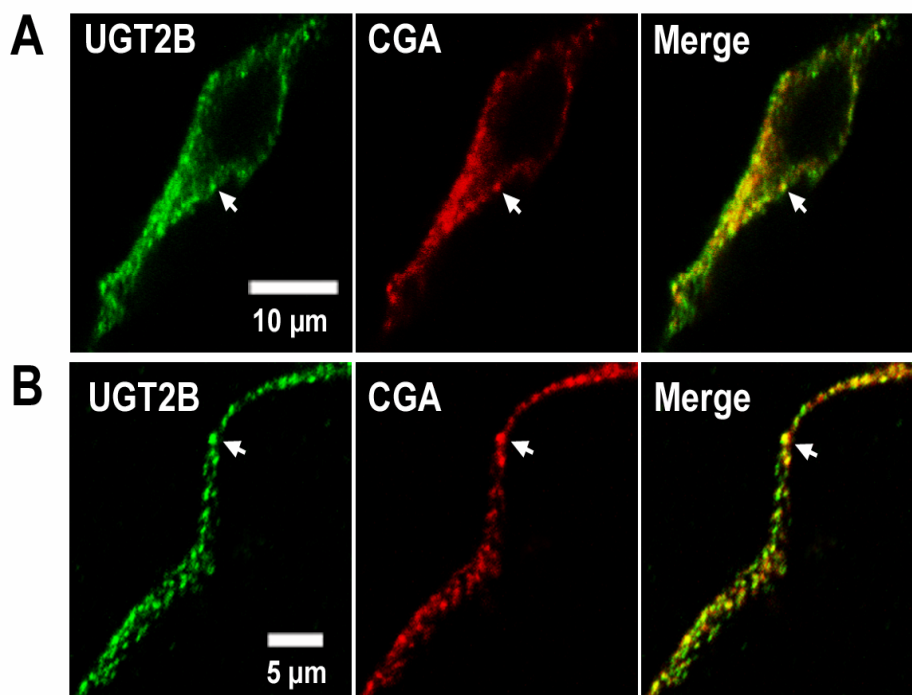


Figure 21: Analyse par microscopie confocale de la localisation subcellulaire des enzymes de la famille UGT2B dans les cellules chromaffines bovines en culture primaire. **A:** Le marquage de l'UGT2B est visualisé en vert, tandis qu'un marquage spécifique de la matrice intragranulaire (CGA) est visualisé en rouge. La superposition des marquages est visualisée en jaune sur la quadrant « merge ». **B:** Agrandissement réalisé sur un prolongement cellulaire.

La présence d'UGT2B au sein des cellules chromaffines a été confirmée par Western blot. Afin de montrer que l'enzyme UGT2B présent dans les cellules chromaffines pouvait permettre la synthèse de M6G à partir de la morphine, une expérience de synthèse *de novo* a été réalisée. L'UGT2B partiellement purifiée par gel filtration a été incubée en présence de morphine dans un mélange réactionnel (100μM acide UDP-glucuronique, 2mM saccharolactone, 0,9μM morphine, 50mM tris-HCl) à pH 5,5 afin de mimer les conditions intragranulaires. L'analyse réalisée par spectrométrie de masse Q-TOF en mode MS-MS a montré que de la M6G est produite par l'enzyme intragranulaire purifié (figure 22). La présence de M6G dans le mélange réactionnel confirme que l'UGT2B présent dans les cellules chromaffines est capable de transformer de la morphine en M6G.

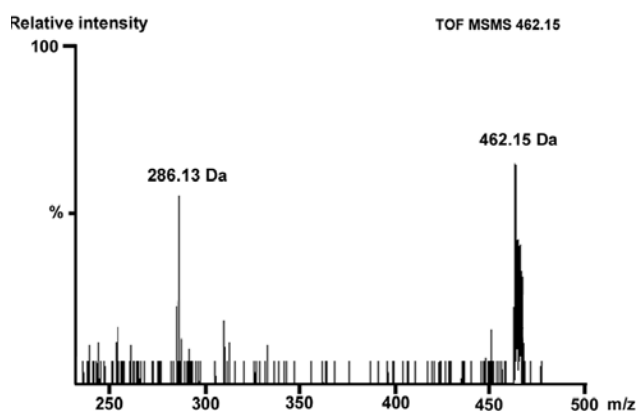


Figure 22: Synthèse de novo de M6G.

Analyse par spectrométrie de masse (Q-TOF en mode MS-MS) de la présence de M6G dans le mélange réactionnel. La masse de 462 Da correspond à la M6G, tandis que la masse de 286 Da correspond à la morphine provenant de la fragmentation de la M6G.

Nous avons alors cherché à caractériser un complexe contenant à la fois la PEBP et l'enzyme UGT2B en utilisant une approche de coimmunoprécipitation. Les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence la présence d'un complexe PEBP-UGT2B intragranulaire.

En conclusion, nos résultats ont montré que la M6G est présente et sécrétée par les cellules chromaffines. Ces études suggèrent également que la PEBP représente une protéine liant la M6G dans les granules chromaffines (figure 23). Ainsi, la morphine est synthétisée à partir de la dopamine dans les microsomes (cytochrome P450/CYP2D6) et pourrait lier la PEBP. Une partie de cette morphine pourrait alors être transformée par l'UGT2B intragranulaire pour produire la M6G. La M6G intragranulaire liée à la PEBP pourrait finalement être libérée dans la circulation lors des états de stress. Une telle liaison permettrait d'augmenter la $\frac{1}{2}$ vie sérique de la M6G. Il est intéressant de noter que la M6G, qui est normalement issue du catabolisme de la morphine dans le foie par l'UGT2B, est décrite comme étant plus analgésique que la morphine. Ces données laissent supposer que la M6G, qui dérive de la morphine endogène, représente un nouveau facteur neuroendocrine.

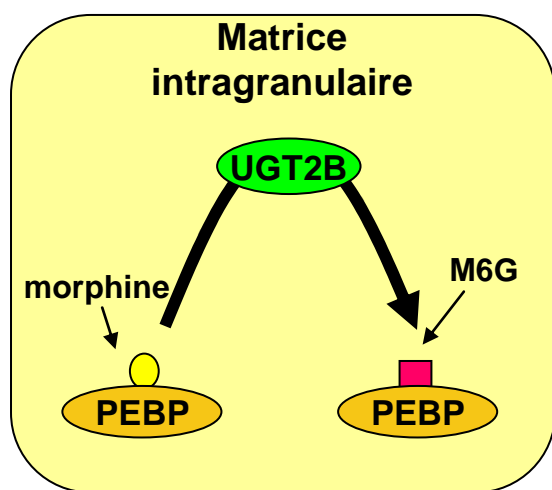


Figure 23: Schéma hypothétique du système « morphinergique » présent au sein des cellules chromaffines.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules

Y. GOUMON, A. MULLER, E. GLATTARD, C. MARBAN, C. GASNIER, J.M. STRUB, S. CHASSEROT-GOLAZ, O. ROHR, G.B. STEFANO, I.D. WELTERS, A. VAN DORSSELAER, F. SCHOENTGEN, D. AUNIS, M.H. METZ-BOUTIGUE

Journal of biological chemistry, 2006, vol. 281, n° 2, pages 8082-8089

Publication I : pages 101-...

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M502298200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Publication II

Publication II : Etude de l'implication de la morphine endogène dans les cellules SH-SY5Y et dans le système nerveux central de souris.

Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum

Arnaud Muller, Elise Glattard Omar Taleb, Véronique Kemmel, Alexis Laux, Monique Miehé, François Delalande, Guy Roussel, Alain Van Dorsselaer, Marie-Hélène Metz-Boutigue, Dominique Aunis, Yannick Goumon.

(2008) PLoS ONE 3(2): e1641. doi:10.1371/journal.pone.0001641.

Après avoir étudié la présence et la sécrétion de M6G endogène au niveau périphérique grâce à l'utilisation du modèle de la cellule chromaffine, je me suis intéressé à la présence de morphine endogène au sein du SNC. La morphine endogène a déjà été décrite dans des extraits de cerveau de différents mammifères (voir chapitre 8.4) et la néosynthèse de morphine a été mise en évidence dans la lignée SH-SY5Y dérivant d'un neuroblastome humain (Poeaknapo et al., 2004). De plus, l'UGT2B7 formant la M6G est exprimée dans le cerveau humain et le cerveau de rat (King et al., 1999). Cependant, la présence de M6G n'avait jamais été étudiée jusqu'à présent au sein du SNC.

Les récepteurs μ liant la morphine sont également décrits dans de nombreuses régions du SNC. Très peu de données sont disponibles sur le rôle de la morphine endogène au sein du SNC. Précédemment, une étude *in vitro*, utilisant des coupes de cerveau de rats privés de nourriture, a montré une libération de morphine en présence d'un milieu riche en potassium (50 mM K^+) qui induit une dépolarisation neuronale et une sécrétion de neurotransmetteurs (Guarna et al., 1998). De plus, une étude de microscopie électronique réalisée par Bianchi et coll. a indiqué la présence de morphine dans les terminaisons synaptiques de neurones de différentes régions du SNC incluant le striatum et la moelle épinière (Bianchi et al., 1994). Sur ces bases, une des hypothèses postulées est que la morphine représente un neurotransmetteur central. Afin de confirmer cette hypothèse, j'ai débuté une étude en utilisant le modèle des cellules SH-SY5Y déjà connues pour leur capacité à synthétiser de la morphine *de novo* (Boettcher et al., 2005). Dans un deuxième temps, j'ai étudié la localisation de la morphine endogène dans le cerveau de souris. Ce chapitre vous présentera une partie des

résultats obtenus dans ces 2 modèles, qui ont été publiés dans le journal « Plos One ». Cette partie sera suivie d'une présentation de mes résultats non publiés.

Localisation subcellulaire de la morphine dans les cellules SH-SY5Y

La lignée cellulaire SH-SY5Y représente un modèle d'étude simple qui dérive d'un neuroblastome humain. Ce sont des cellules catécholaminergiques qui ont précédemment été utilisées pour valider la voie de synthèse de la morphine endogène (Poeaknapo et al., 2004, Boettcher et al., 2005). Cependant, lors de ces travaux, la localisation subcellulaire et l'implication potentielle de la morphine dans la neurotransmission n'avaient pas été étudiées, Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la localisation subcellulaire des composés apparentés à la morphine dans les cellules SH-SY5Y grâce à une approche par microscopie laser confocale en utilisant un anticorps reconnaissant la morphine, la M3G et la M6G (figure 24).

Le marquage pour la morphine et ses dérivés (figure 24 marquage vert) s'est avéré colocaliser avec celui de la chromogranine A (marquage rouge), un marqueur intragranulaire, suggérant une localisation dans des vésicules de sécrétion (colocalisation visualisée en jaune). Un agrandissement réalisé sur les cellules a montré que la morphine est présente dans le corps cellulaire, les prolongements, ainsi que les cônes de croissance des cellules SH-SY5Y.

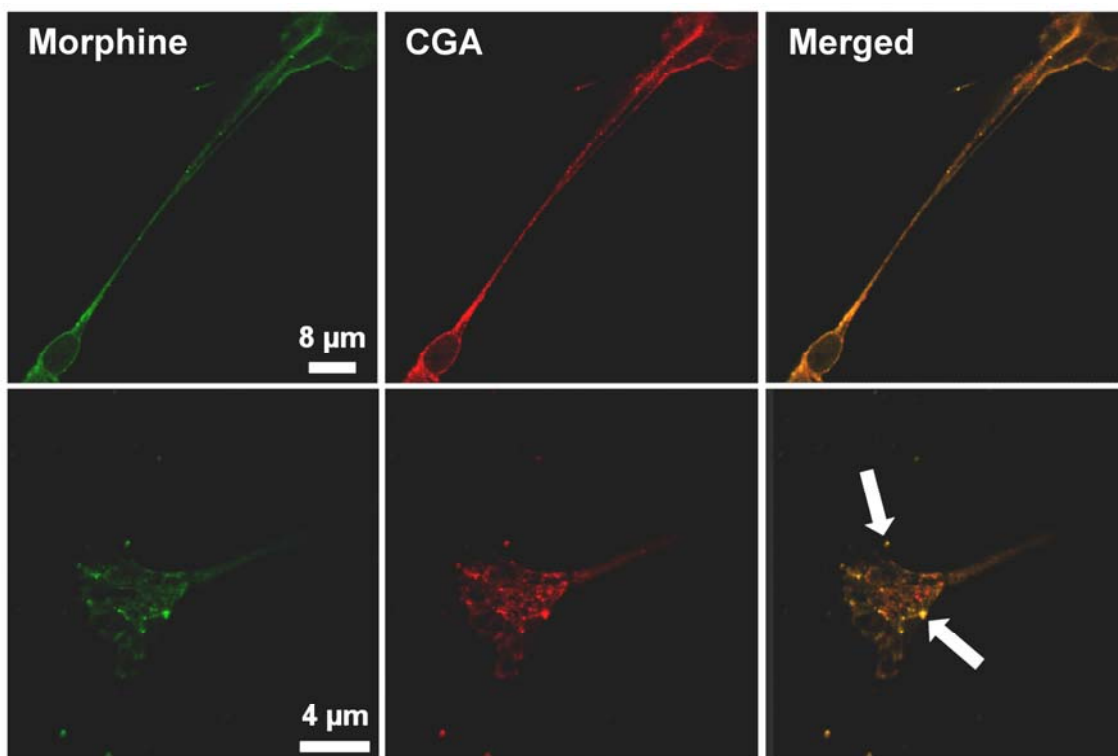


Figure 24: Localisation subcellulaire de la morphine et de ses dérivés dans les cellules SH-SY5Y. *A: L'immunoréactivité pour la morphine est visualisée en vert et l'immunoréactivité à la CGA (marqueur intragranulaire) est visualisée en rouge. La colocalisation des 2 marqueurs apparaît en jaune dans la quadrant merge. B: Grossissement montrant un cône de croissance.*

Caractérisation biochimique des alcaloïdes présents dans les cellules SH-SY5Y

Auparavant, seule la voie de synthèse de la morphine avait été étudiée au sein des cellules SH-SY5Y et la présence de M6G, précédemment considérée comme un produit du catabolisme, n'avait pas été recherchée. Or, il apparaît au vu de notre précédente étude réalisée sur les cellules chromaffines bovines que la M6G pourrait représenter un alcaloïde endogène synthétisé à partir de morphine (Goumon et al., 2006). Afin de déterminer la nature exacte des alcaloïdes présents dans les cellules SH-SY5Y, des extraits intracellulaires déprotéinisés ont été analysés par HPLC de phase inverse, puis par spectrométrie de masse.

Les pics d'HPLC correspondant aux temps de rétention de la morphine et de la M6G (figure 25A) ont été analysés par spectrométrie de masse. Cette analyse montre la présence de morphine (m/z : 286,17 Da, figure 25 C), déjà décrite dans ce type cellulaire (Poeaknapo et al., 2004), et de M6G (m/z : 462,12 Da, fragmentée en morphine en mode MS/MS, figure 25B) au sein de l'extrait de cellules SH-SY5Y.

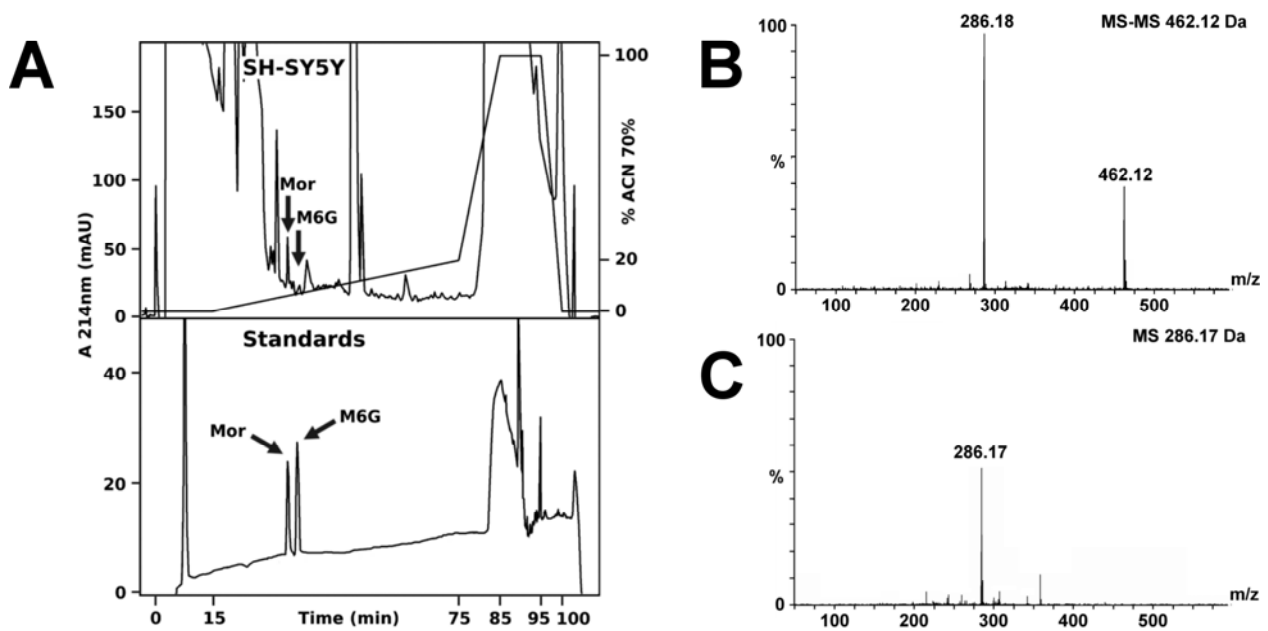


Figure 25: Caractérisation de morphine et de M6G présentes dans un extrait de cellules SH-SY5Y. A: Purification par HPLC de phase inverse d'un standard d'alcaloïdes (bas) et du matériel intracellulaire (haut). B: Analyse MS-MS par Q-TOF de la fraction correspondant au pic de M6G séparé par HPLC. C: Analyse MS par Q-TOF de la fraction correspondant au pic de morphine séparé par HPLC.

La M6G est formée à partir de morphine par une enzyme UGT2B7, suggérant la présence de cette enzyme dans cette lignée. Nous avons donc étudié la présence de cette enzyme dans des extraits des cellules SH-SY5Y. Ainsi, une première étude de Western blot a montré la présence d'une bande à 63 kDa immunorévélée par un anticorps dirigé contre l'UGT2B et qui comigre avec l'UGT2B7 humaine recombinante (figure 26).

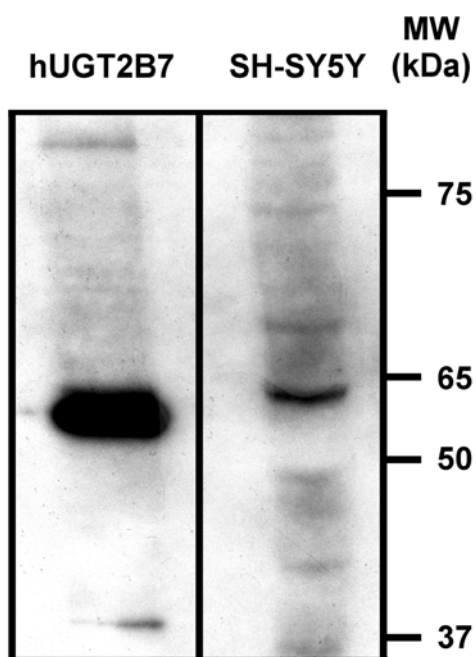


Figure 26: Mise en évidence de l'UGT2B7 dans un extrait de cellules SH-SY5Y par Western blot. L'UGT2B7 humaine recombinante a été utilisée comme contrôle positif (63kDa). Une bande à 63kDa est observée dans l'extrait de cellules SH-SY5Y.

Des études complémentaires de RT-PCR et d'immunocytochimie ont confirmé la présence de l'UGT2B7 dans la lignée SH-SY5Y, enzyme capable de transformer la morphine en M6G.

Sécrétion de morphine par les cellules SH-SY5Y

Sur la base de la présence de morphine dans les vésicules de sécrétion des cellules SH-SY5Y, j'ai étudié si ces cellules étaient capables de sécréter cette morphine. Les cellules ont été stimulées 24h à la nicotine 100 μ M. En effet, la liaison de la nicotine sur les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine entraîne une dépolarisation et l'exocytose des vésicules de sécrétion. La quantité de morphine dans le milieu de sécrétion a ensuite été mesurée par un test ELISA spécifique de la morphine, ne reconnaissant ni la M3G, ni la M6G. Malheureusement, il n'existe pas encore de test ELISA capable de mesurer la M6G et nous n'avons donc pas pu analyser la sécrétion de M6G par spectrométrie de masse car cette analyse nécessite des quantités importantes de M6G. Pour vérifier si la sécrétion de morphine était dépendante du calcium (un des critères requis pour catégoriser la morphine en tant que

neurotransmetteur), j'ai utilisé du cadmium qui est un inhibiteur des canaux Ca^{2+} voltage dépendant et des canaux K^{+} dépendants du Ca^{2+} . Le cadmium inhibe ainsi la sécrétion dépendante du calcium.

Cette expérience a montré que lors d'une stimulation à la nicotine, la quantité de morphine libérée augmente significativement d'un facteur 5 (0,5 ng/ml) par rapport à la sécrétion basale (0,1 ng/ml, figure 27). Un traitement au cadmium, qui bloque les canaux calciques, entraîne une diminution significative de la libération de morphine d'un facteur 2, ce qui indique une implication des canaux calcium dans cette sécrétion (figure 27). Ces résultats montrent que la lignée SH-SY5Y est capable de sécréter de la morphine *via* un mécanisme calcium-dépendant.

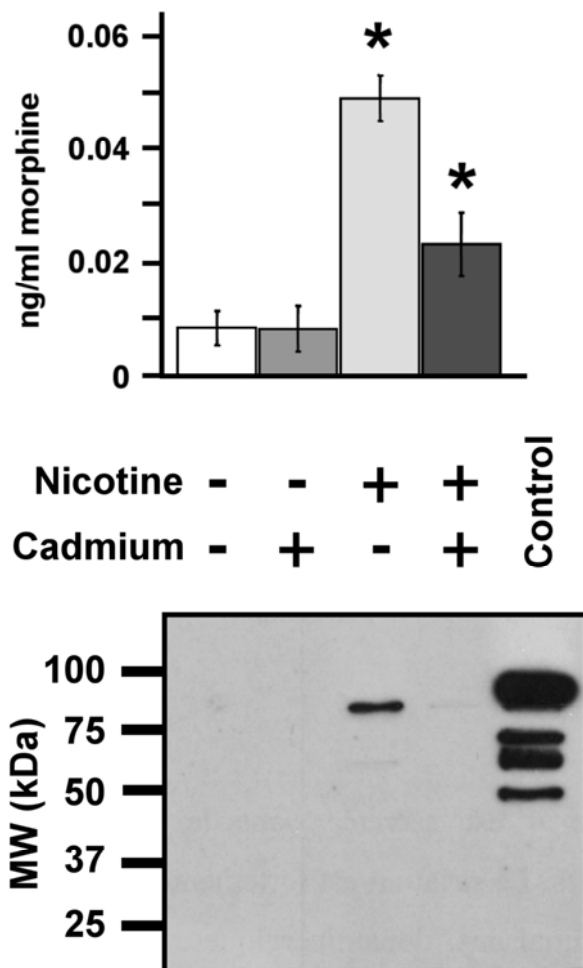


Figure 27: Quantification de la morphine sécrétée par les cellules SH-SY5Y. Les cellules SH-SY5Y ont été stimulées 24h avec 100 μM de nicotine, en présence ou en absence de cadmium (200 μM). L'efficacité de la sécrétion a été vérifiée par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-CGB₅₄₇₋₅₆₀ qui représente un marqueur intragranulaire (PM \approx 80kDa). Les résultats sont alors analysés par un test de Mann-Whitney avec un $p < 0.01$. *: différence significative par rapport à la sécrétion basale.

En parallèle de ces travaux, nous nous sommes également intéressés aux effets physiologiques de la morphine et de la M6G sur les cellules SH-SY5Y. Les récepteurs μ sont

déjà décrits pour être exprimés par ces cellules (Elliott et al., 1993), mais nous avons dans un premier temps confirmé leur présence dans notre souche par RT-PCR. Puis, grâce à une collaboration avec le Dr Omar Taleb, nous avons pu enregistrer les réponses électrophysiologiques des cellules SH-SY5Y consécutives à une application de morphine ou de M6G. Nos résultats montrent qu'à de faibles concentrations comprises entre 10^{-8} M et 10^{-10} M, la morphine et la M6G induisent des courants membranaires qui sont antagonisés par la naloxone (figure 28 A et B)

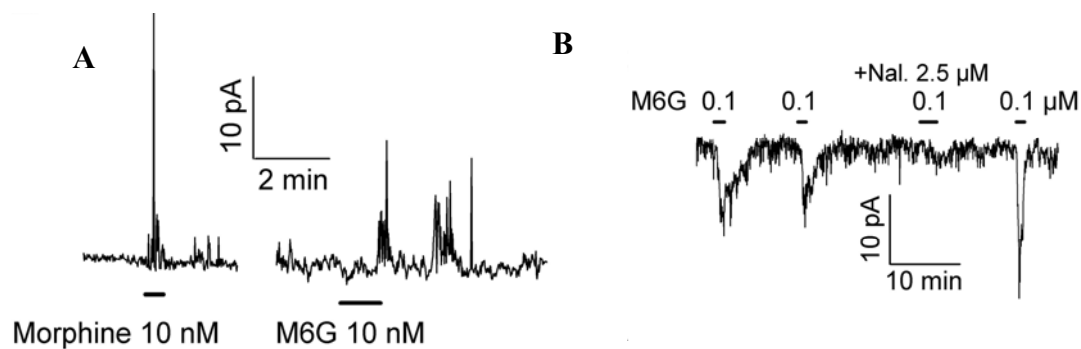


Figure 28: Etude électrophysiologique des effets de la morphine et de la M6G sur les cellules SH-SY5Y. **A:** Patch-clamp réalisé en mode cellule attachée. Les réponses électrophysiologiques des cellules SH-SY5Y sont mesurées en présence de morphine 10 nM à un potentiel de 60 mV ou en présence de M6G 10 nM à un potentiel de 80 mV. **B:** Patch-clamp réalisé en mode cellule attachée à un potentiel de -135 mV. Les réponses observées pour des administrations répétées de M6G (0,1 μM) sont antagonisées par la naloxone (2,5 μM).

En conclusion, les études réalisées sur le modèle des cellules SH-SY5Y ont permis de montrer la présence de morphine et de M6G dans des vésicules de sécrétion et une libération de morphine *via* un mécanisme calcium-dépendant lors d'une dépolarisation membranaire. La morphine libérée pourra se lier à des récepteurs μ et induire des courants entrants. Afin de valider les données obtenues sur ce modèle cellulaire simple, je me suis intéressé au modèle du cerveau de souris, espèce qui est décrite comme étant incapable de former de la M6G à partir de morphine (Zelcer et al., 2005).

Localisation de morphine dans le SNC de souris

Dans un premier temps, une approche d'immunohistochimie réalisée sur le cerveau de souris C57BL/6 mâle adulte a permis de définir les aires cérébrales présentant une immunoréactivité à la morphine et à ses dérivés. L'immunomarquage, observé à l'aide d'un anticorps reconnaissant la morphine et ses dérivés, indique que certaines zones contiennent plus de morphine endogène que d'autres (figure 29A). Un contrôle, correspondant à l'anticorps bloqué par une préincubation de l'anticorps avec de la morphine, n'a montré aucun marquage (figure 29B). Parmi les zones contenant de la morphine, on trouve le cervelet, l'hippocampe, le bulbe olfactif, le cortex et le tronc cérébral. La présence de morphine a été confirmée par un test ELISA reconnaissant spécifiquement la morphine (figure 29C).

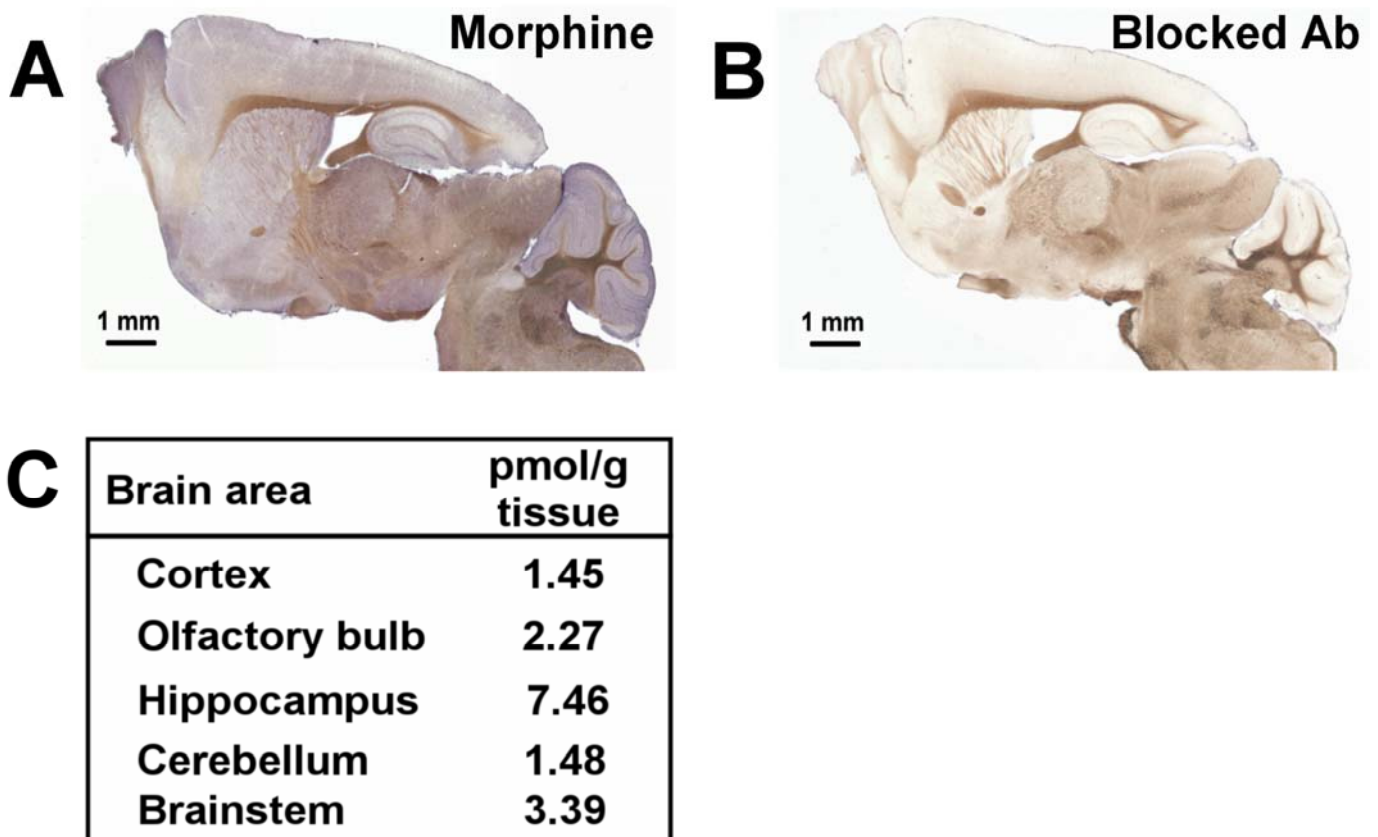


Figure 29: Etude de la présence de morphine dans le cerveau de souris adulte. A: Immunomarquage pour la morphine et ses dérivés réalisé sur une coupe sagittale de cerveau de souris adulte. B: Contrôle correspondant à l'anticorps anti-morphine bloqué par de la morphine. C: Dosage de la morphine présente dans différentes structures cérébrales réalisé à l'aide d'un test ELISA.

Sur la base de cette cartographie nous avons focalisé notre attention sur le cervelet, où l'on peut observer un marquage bien défini autour des cellules de Purkinje en microscopie optique (figure 30).

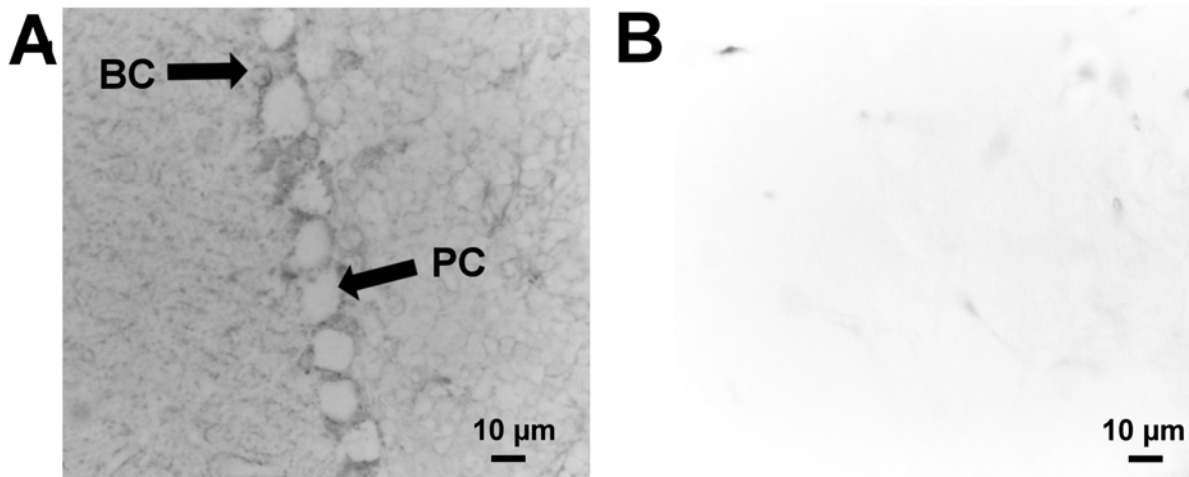


Figure 30: Immunodétection de morphine dans le cervelet de souris. *A: Le marquage de la morphine est visible autour des cellules de Purkinje (PC) et dans des cellules en corbeille (BC). B: Contrôle correspondant à l'anticorps anti-morphine bloqué par de la morphine.*

Afin de définir de façon plus précise la localisation subcellulaire de la morphine dans le cervelet, nous avons utilisé une approche de microscopie électronique. Cette technique nous a permis d'observer une immunoréactivité à la morphine dans des terminaisons établissant des synapses autour du corps cellulaire des cellules de Purkinje (figure 31A et B). Or, les cellules en corbeille sont les seules cellules à établir des synapses sur les corps cellulaires des cellules de Purkinje. Ce résultat a été confirmé par la présence d'une immunoréactivité pour la morphine dans le corps cellulaire de cellules en corbeille qui sont des neurones GABAergiques inhibiteurs (figure 31C). Nos résultats confirment donc la présence d'un immunomarquage pour la morphine dans le cervelet et suggèrent la modulation des cellules de Purkinje par des cellules en corbeille qui utiliseraient la morphine comme neuromodulateur.

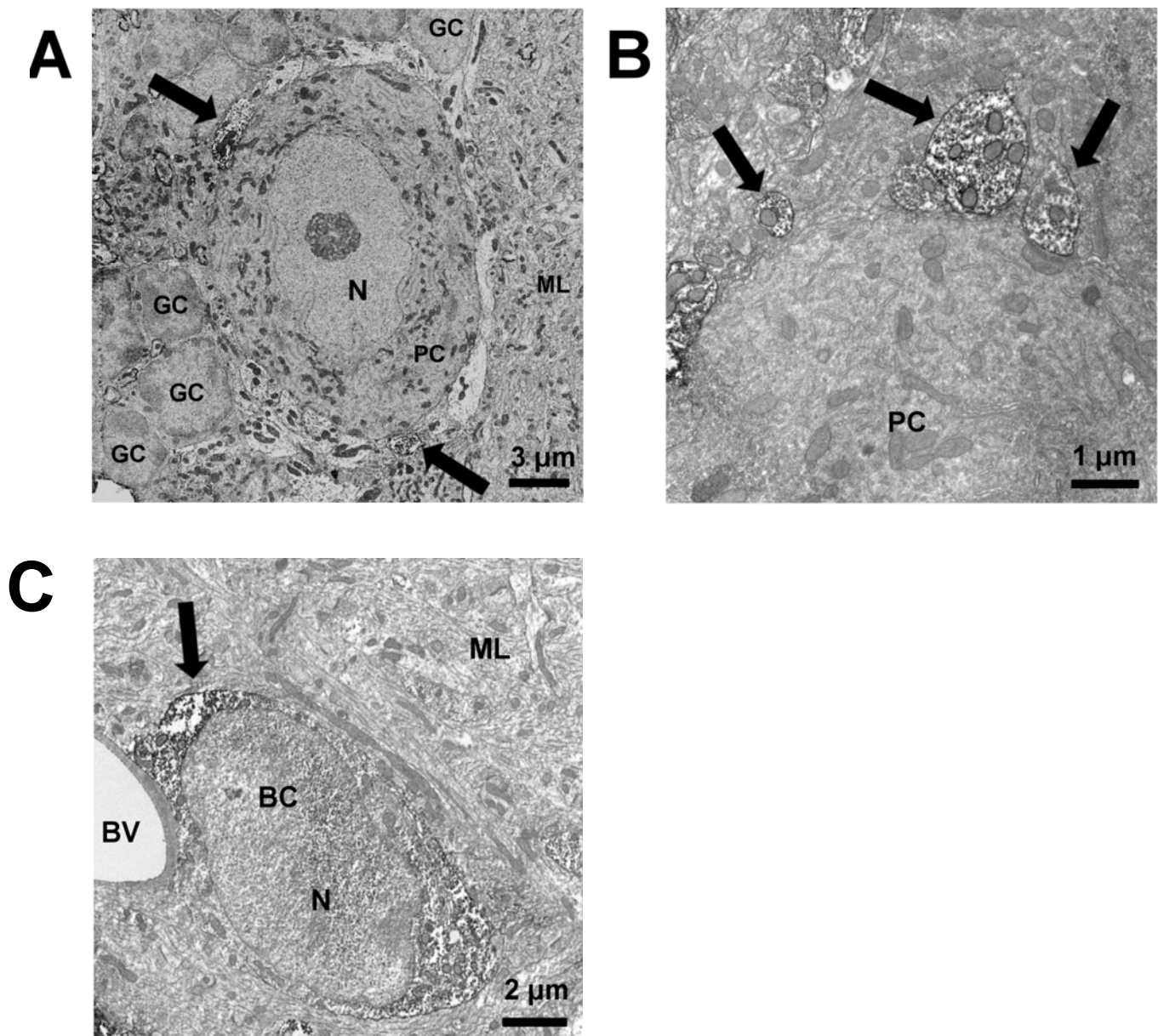


Figure 31: Visualisation de l'immunomarquage de la morphine dans le cervelet en microscopie électronique. A: Immunomarquage des synapses innervant le corps cellulaire des cellules de Purkinje. B: Agrandissement réalisé sur des synapses. C : Immunomarquage de morphine dans le cytoplasme d'une cellule en corbeille. GC: cellules en grain. PC: cellules de Purkinje. ML: couche moléculaire. N: noyau. BC: cellule en corbeille.

Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum

Arnaud Muller^{1,9}, Elise Glattard^{1,9}, Omar Taleb¹, Véronique Kemmel^{1,2}, Alexis Laux¹, Monique Miehe¹, François Delalande¹, Guy Roussel^{1,2}, Alain Van Dorsselaer³, Marie-Hélène Metz-Boutigue¹, Dominique Aunis¹, Yannick Goumon^{1*}

1 Inserm, U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Strasbourg, France, **2** Faculty of Medicine, Institut de Chimie Biologique, Strasbourg, France, **3** Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, The European School of Chemistry, Polymers and Materials (ECPM), Université Louis Pasteur, LC4-UMR7178, Strasbourg, France

Abstract

Background: Morphine, the principal active agent in opium, is not restricted to plants, but is also present in different animal tissues and cell types, including the mammalian brain. In fact, its biosynthetic pathway has been elucidated in a human neural cell line. These data suggest a role for morphine in brain physiology (*e.g.*, neurotransmission), but this hypothesis remains a matter of debate. Recently, using the adrenal neuroendocrine chromaffin cell model, we have shown the presence of morphine-6-glucuronide (M6G) in secretory granules and their secretion products, leading us to propose that these endogenous alkaloids might represent new neuroendocrine factors. Here, we investigate the potential function of endogenous alkaloids in the central nervous system.

Methodology and Principal Findings: Microscopy, molecular biology, electrophysiology, and proteomic tools were applied to human neuroblastoma SH-SY5Y cells (*i*) to characterize morphine and M6G, and (*ii*) to demonstrate the presence of the UDP-glucuronyltransferase 2B7 enzyme, which is responsible for the formation of M6G from morphine. We show that morphine is secreted in response to nicotine stimulation *via* a Ca²⁺-dependent mechanism involving specific storage and release mechanisms. We also show that morphine and M6G at concentrations as low as 10⁻¹⁰ M are able to evoke specific naloxone-reversible membrane currents, indicating possible autocrine/paracrine regulation in SH-SY5Y cells. Microscopy and proteomic approaches were employed to detect and quantify endogenous morphine in the mouse brain. Morphine is present in the hippocampus, cortex, olfactory bulb, and cerebellum at concentration ranging from 1.45 to 7.5 pmol/g. In the cerebellum, morphine immunoreactivity is localized to GABA basket cells and their termini, which form close contacts on Purkinje cell bodies.

Conclusions/Significance: The presence of morphine in the brain and its localization in particular areas lead us to conclude that it has a specific function in neuromodulation and/or neurotransmission. Furthermore, its presence in cerebellar basket cell termini suggests that morphine has signaling functions in Purkinje cells that remain to be discovered.

Citation: Muller A, Glattard E, Taleb O, Kemmel V, Laux A, et al (2008) Endogenous Morphine in SH-SY5Y Cells and the Mouse Cerebellum. PLoS ONE 3(2): e1641. doi:10.1371/journal.pone.0001641

Editor: Suzannah Rutherford, Fred Hutchinson Cancer Research Center, United States of America

Received: November 7, 2007; **Accepted:** January 23, 2008; **Published:** February 20, 2008

Copyright: © 2008 Muller et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by Inserm, the University Louis-Pasteur at Strasbourg, the Fondation de France (to Y.G.), the French Ministère délégué à la Recherche et à l'Enseignement Supérieur (Ph.D fellowships to E.G. and A.M.) and the Fondation Transplantation (to Y.G. and D.A.).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

*E-mail: yannick.goumon@inserm.u-strasbg.fr

⁹These authors contributed equally to this work.

Introduction

Morphine is one of the 40 alkaloids present in opium from *Papaver somniferum*, and is one of the strongest known analgesic compounds [1]. Endogenous morphine has been characterized in numerous mammalian cells and tissues [2,3,4], and its structure is identical to that of morphine from poppy (for review see [1,5]). In mammals, the biosynthesis of endogenous morphine is associated with that of dopamine and catecholamines [5,6,7,8,9,10]. Morphine biosynthesis was recently shown in the SH-SY5Y human neuronal catecholamine-producing cell line [8,9], a well-known model for studying neuronal secretion [11,12]. Recently, our group has reported the presence of morphine-6-glucuronide (M6G), previously considered a

product of morphine catabolism, in the secretory granules and secreted material of bovine adrenal chromaffin cells. In these cells, M6G represents the final product of endogenous alkaloid biosynthesis and is formed through the action of an UDP-glucuronosyltransferase 2B-like enzyme (UGT2B). In chromaffin granules, M6G is bound to the intragranular phosphatidylethanolamine-binding protein (PEBP or Raf kinase inhibitor protein) [13], which also binds morphine [14]. Secretion of M6G, catecholamines, and PEBP [15] into the blood is likely to occur during stress situations, and could be involved in different stress-modulating or pain-modulating mechanisms *via* binding to μ opioid receptors (MORs), which are present on numerous cell types [16,17,18]. Together, all these observations suggest that endogenous alkaloids may represent new neuroendocrine factors [15].

Endogenous morphine has been detected in the brains of cows, rats, monkeys, and dogs (for review, see [1]). However, the function of endogenous morphine in the brain remains unknown, and knowledge of its distribution in cerebral areas and neuronal cells is lacking. Enzymes such as those in the UGT1A family, implicated in converting morphine to inactive M3G, are expressed in rat primary neurons and astrocytes [19]. UGT2B7, which produces M6G and M3G, is also expressed in the human brain [20]. Interestingly, human and rat brain extracts incubated with radiolabeled morphine produce labeled M3G and M6G [21,22]. Nevertheless, it remains a matter of debate whether morphine or its derivatives function as neuromediators and/or neurotransmitters.

The present study addresses the function of morphine in the brain. Microscopy, biochemistry, cell biology, molecular biology, and electrophysiology have been used to characterize morphine and its derivatives in detail in the human SH-SY5Y neuroblastoma cell model. At the ultrastructural level, morphine immunoreactivity colocalizes with that of chromogranin A (CGA), a well-known marker of Large Dense Core (LDC) vesicles. We have found that the UGT2B7 enzyme, which converts morphine to M6G, is expressed in these cells. Upon nicotine stimulation, morphine is released from SH-SY5Y cells *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism. Experiments using the patch-clamp technique reveal that naloxone-sensitive electrophysiological responses are induced at concentration of morphine and M6G as low as 10^{-10} M. To extend these experiments in cultured cells, we quantified morphine levels in different areas of the mouse brain. In the cerebellum, morphine immunoreactivity is concentrated in the basket cells and their termini, which innervate Purkinje cell bodies. This study documents the presence of morphine in the brain and shows a specific localization that implies a signaling role that is yet to be precisely established.

Results

Human neuroblastoma SH-SY5Y cells synthesize endogenous morphine [9] and express MORs [17,23,24]. Therefore, we used this cell line to determine the subcellular localization, biosynthesis, and secretion of morphine.

Subcellular localization of morphine in SH-SY5Y cells

Using laser confocal microscopy, the labeling obtained with an anti-morphine sheep polyclonal antibody was compared to that of CGA [15], a specific marker of LDC vesicles [25,26,27,28]. Anti-morphine immunolabeling showed a punctate pattern in the cytoplasm, similar to that obtained with the anti-CGA antibody (Fig. 1A). Superimposition of the two labelings reveals an intravesicular colocalization (Fig. 1A, yellow label). At higher magnification, anti-morphine immunolabeling was also visible in neurite termini, and remained clearly colocalized with CGA (Fig. 1A, lower panel, arrows). Control experiments established the specificity of the labeling in vesicles using either the secondary antibody alone, non-immune sheep serum (Fig. 1B), or the anti-morphine antibody blocked with morphine prior to its use in immunocytochemistry experiments [15].

Evidence for the presence of UGT2B7 in SH-SY5Y cells

The next step was to examine whether SH-SY5Y cells have the capacity to synthesize M6G. First, a PCR approach was used to determine whether UGT2B7, the only enzyme known to convert morphine into M6G, is expressed in SH-SY5Y cells. As shown in Figure 2A, amplification of UGT2B7 RNA performed on SH-SY5Y total RNA extracts indicates the presence of a single band at 462 bp, which corresponds to the band present in total RNA from human primary hepatocytes.

These experiments were then complemented by Western blot analysis of SH-SY5Y cell extracts in order to detect UGT2B7 protein expression (Fig. 2A). Using recombinant human UGT2B7 as a positive control (Fig. 2A), UGT2B7-like immunoreactivity was observed as a band at 65 kDa, showing, for the first time, that SH-SY5Y cells may be capable of synthesizing M6G.

The subcellular localization of the UGT2B7 enzyme was examined by laser confocal immunocytochemistry and compared to that of morphine and CGA. The punctuate labelling of UGT2B7 overlapped with that of morphine (Fig. 2B, yellow label), revealing the presence of UGT2B7 in LDC vesicles. These results indicate that the M6G-producing enzyme UGT2B7 is expressed in SH-SY5Y cells, and that it colocalizes with morphine.

Characterization of morphine and M6G in SH-SY5Y cells

After showing that the UGT2B7-like enzyme is present in SH-SY5Y cells, we sought to confirm the presence of morphine and M6G in the cells using mass spectrometry (MS). SH-SY5Y extracts were purified by HPLC (high performance liquid chromatography) using a specific gradient designed to separate morphine and M6G. Comparison with an elution profile of alkaloid standards (Fig. 3A) allowed for the identification of fractions containing endogenous morphine and M6G. Q-TOF MS-MS analysis of material present in the corresponding fractions unambiguously identified both morphine ($m/z = 286.13$ Da; Fig. 3C) and M6G ($m/z = 462.15$ Da; Fig. 3B). Together, these data confirm the presence not only of endogenous morphine, but also of M6G in SH-SY5Y cells.

Morphine secretion from SH-SY5Y cells

In order to quantify morphine secretion from SH-SY5Y cells and to determine whether it occurs *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism, cells were stimulated with 100 μ M nicotine to trigger membrane depolarization and LDC vesicle exocytosis [28]. The amount of morphine released was measured using a specific and sensitive ELISA technique. A low basal level of morphine secretion was observed in the absence of nicotine (Fig. 4). Stimulation of SH-SY5Y cells with 100 μ M nicotine induced a five-fold increase in secreted morphine over background (Fig. 4). In the presence of the Ca^{2+} -channel blocker cadmium, basal secretion remained unchanged, while nicotine-induced secretion of morphine decreased dramatically. These results unambiguously indicate that morphine can be released *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism upon stimulation of SH-SY5Y cells.

In order to identify the origin of stored morphine, the release of chromogranin B (CGB), an intragranular marker of SH-SY5Y LDC vesicles [28], was investigated by Western blot analysis (Fig. 4). The presence of an 80 kDa CGB-immunoreactive band was detectable among proteins in the extracellular medium when cells were treated with nicotine. Similar to morphine, nicotine-evoked CGB secretion also dramatically decreased when cadmium was present in the medium (Fig. 4). In conclusion, SH-SY5Y cells secrete morphine *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism in response to nicotine stimulation.

Evidence for physiological effects of morphine and M6G on SH-SY5Y cells

To address whether morphine and M6G induce a physiological response in SH-SY5Y cells, we first looked at the expression of the μ opioid receptor family (MOR1; [17,18,29,30]). Using SH-SY5Y total RNA library, we detected MOR1 transcripts using PCR (Fig. 5A, 376 bp band), suggesting that SH-SY5Y cells are responsive to morphine or M6G.

In light of these results, we examined the response of SH-SY5Y cells to alkaloids using the patch clamp electrophysiological approach. As shown in Figure 5, SH-SY5Y cells were responsive

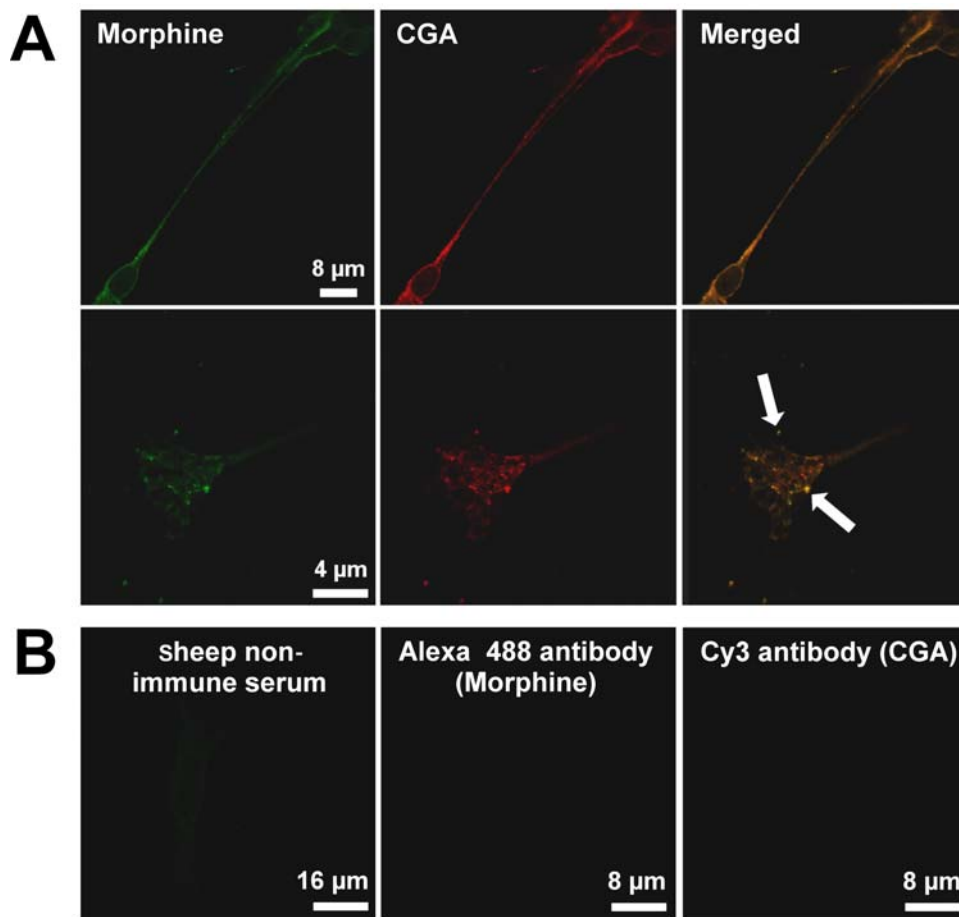


Figure 1. Evidence of the presence of morphine-like immunoreactivity in secretory granules. *A. Upper panel*, double immunofluorescence confocal micrographs. Labeling was performed with a sheep anti-morphine antibody (visualized in green with an Alexa Fluor 488-conjugated IgG) and with an antibody against CGA (a specific intragranular marker) visualized in red with a mouse Cy3-conjugated IgG. Colocalized immunolabelling (merged window) appears as yellow staining. *Lower panel*, SH-SY5Y termini shown at higher magnification. Arrows indicate colocalization points. An identical pattern of labelling was obtained for a different mouse monoclonal anti-morphine antibody (data not shown). *B.* To assess the specificity of morphine immunolabelling, control experiments were performed using either sheep non-immune serum and an Alexa Fluor 488-conjugated IgG, or Alexa Fluor 488-conjugated IgG and Cy3-conjugated IgG without a primary antibody.
doi:10.1371/journal.pone.0001641.g001

to M6G and morphine in either the cell-attached or the whole-cell configuration. Approximately 70% of the 26 randomly chosen cells were responsive.

The cellular response to M6G application was fully reproducible in about 80% of positive cells (Fig. 5C). However, 20% of the positive cells responded to a first M6G application, but not to subsequent applications even after one hour of washout, suggesting a strong desensitization in these cells. M6G was active in SH-SY5Y cells at doses as low as 0.1 nM M6G (Fig. 5D). The cellular response in whole-cell recording corresponded to a membrane potential of -80 mV and an inward current, the peak amplitude of which was dose-dependent. Dose-response curves were obtained for 13 different cells tested with M6G at concentrations ranging from 0.1 to 100 nM. The peak amplitude cellular response was normalized to the cell surface area in order to reduce variability due to cell size. Application of Hill's model to the dose-response data yielded an ED_{50} value of 2.1 nM and a slope of 0.6 (Fig. 5D, middle panel). The I-V plot obtained at the peak cellular response to 0.1 nM M6G was linear. Linear regression analysis of the specific current data in the presence of M6G yielded a calculated reversal potential of about -0.5 mV (Fig. 5D, right-hand panel, upright triangles). This value was close to the equilibrium potential ($E_{cat} = 0$ mV) for monovalent

cations, indicating that M6G activates a channel that allows for the passage of Na and K ions. Figure 5C illustrates the sensitivity of the M6G response to the opioid receptor antagonist naloxone. When used at a concentration of 2.5 μ M, naloxone inhibited 90% of the cellular response to 0.1 μ M M6G. Morphine produced similar effects when applied at low concentration (Fig. 5B).

These data indicate that morphine and M6G can evoke specific membrane currents at low concentrations *via* opioid receptors, indicating a possible regulatory role for secreted morphine/M6G in SH-SY5Y cell culture.

Immunomapping of endogenous morphine in the mouse brain

The presence in SH-SY5Y cells of endogenous alkaloids in LDC vesicle-like structures, their release by a Ca^{2+} -dependent exocytotic mechanism, and their effects on these cells at concentration as low as 0.1 nM led us to investigate whether endogenous morphine may represent a neuromodulator in the mouse brain, where M6G is absent [31].

The localization of endogenous morphine was examined in the mouse CNS by immunocytochemistry using an anti-morphine mouse monoclonal antibody (6D6 antibody). Light microscopy

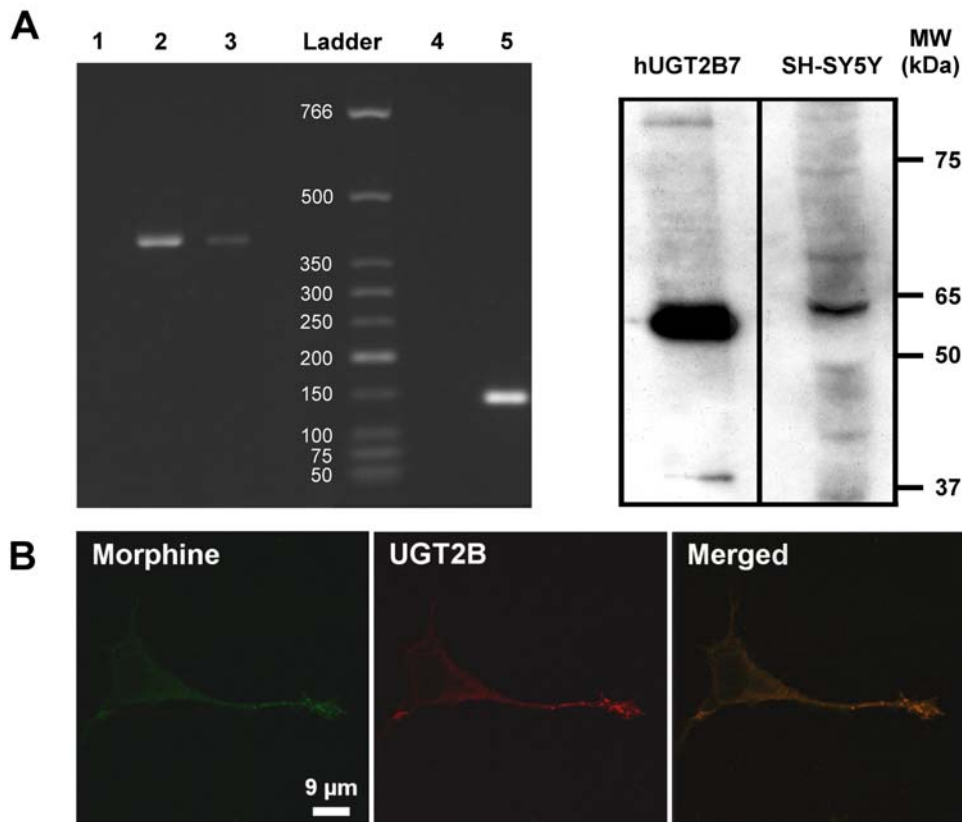


Figure 2. Evidence for UGT2B7 in SH-SY5Y cells. *A*, Amplification of UGT2B7 RNA and Western blot analysis. *Left panel*, total SH-SY5Y RNA was submitted to RT-PCR using specific human UGT2B7 primers. Lane 1, control using water to test for contamination. Lane 2, total RNA from human hepatocyte extract was used as a positive control, showing a single band of 462 bp corresponding to the expected UGT2B7 PCR product. Lane 3, SH-SY5Y total RNA showing a single band of 462 bp. Lane 4, negative control of GAPDH amplification (water). Lane 5, SH-SY5Y total RNA (GAPDH, 142 bp). The size of standards are indicated in bp. *Right panel*, Western blot analysis of SH-SY5Y cell extracts was done using 1 μ g of human recombinant UGT2B7 (positive control) and 50 μ g of SH-SY5Y cell extract. Western blots using anti-UGT2B antibody show a band at 65 kDa [15]. *B*, Localization of UGT2B immunoreactivity in SH-SY5Y cells. Double immunofluorescence confocal micrographs were obtained using an anti-UGT2B antibody (detected in red with an Alexa Fluor 568-conjugated IgG) and with an antibody against morphine visualized in green with an Alexa Fluor 488-conjugated IgG. Colocalized immunolabelling appears as yellow staining (merged window). doi:10.1371/journal.pone.0001641.g002

revealed the presence of morphine immunolabelling in well-defined brain structures such as the cerebellum, the olfactory bulb, the hippocampus, and the cortex (Fig. 6A). Fainter, dispersed labelling was seen in other structures. Quantification of morphine levels in these areas was performed using a morphine-specific ELISA kit. The higher amount of morphine (7.46 pmol/g of fresh tissue) was present in the hippocampus (Fig. 6C; $n = 5$). We chose to focus on the cerebellum area in greater detail because of the apparently clear-cut Purkinje cell labelling (Fig. 6A) and the concomitant presence of MORs in these cells [32,33]. Conventional microscopy, however, revealed that the labelling was not within Purkinje cells themselves, but rather in synaptic endings in contact with Purkinje cells (Fig. 6D, PC). Immunolabelling was observed in basket cells close to Purkinje cells (Fig. 6D, BC). In addition, discrete morphine immunolabelling could be observed in the white matter afferent fibers and in some isolated cells (data not shown). Synapses innervating the Purkinje cell bodies originate from basket cells known as inhibitory GABA interneurons, which are located in the molecular layer close to the Purkinje cells. Electron and laser confocal microscopy were used to determine whether labelling was present in basket cells:

(i) Electron microscopy experiments showed strong immunolabelling of nerve termini over the entire Purkinje cell body (Fig. 7A

& 7B). These endings originate from basket cells which were immunoreactive to the morphine antibody (Fig. 7C).

In parallel, the immunoreactivity of the morphine-binding protein PEBP [14] was found in basket cell nerve termini around Purkinje cell bodies (Fig. 7D, arrow), suggesting the presence of a morphine-PEBP complex in these structures.

(ii) Confocal microscopy experiments using both anti-morphine and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies revealed the colocalization of morphine and glutamic acid decarboxylase around the Purkinje cell bodies (Fig. 7E, yellow label on the merge window). Appropriate controls confirmed the specificity of this immunolabelling (Fig. 7F).

Discussion

The significance of the detection of endogenous morphine in the brains of rats, mice, monkeys, and cows remains a matter of debate as long as its functional role is unknown [1,34]. Previous studies have shown that radiolabelled morphine is taken up and secreted by brain slices and immune cells [22,35,36,37]. Further study has linked levels of endogenous morphine in the brain to physiological states (*e.g.*, inflammation and fasting) [7,38,39,40]. However, a thorough investigation to determine whether endogenous morphine acts as a true neuromodulator has not yet been published.

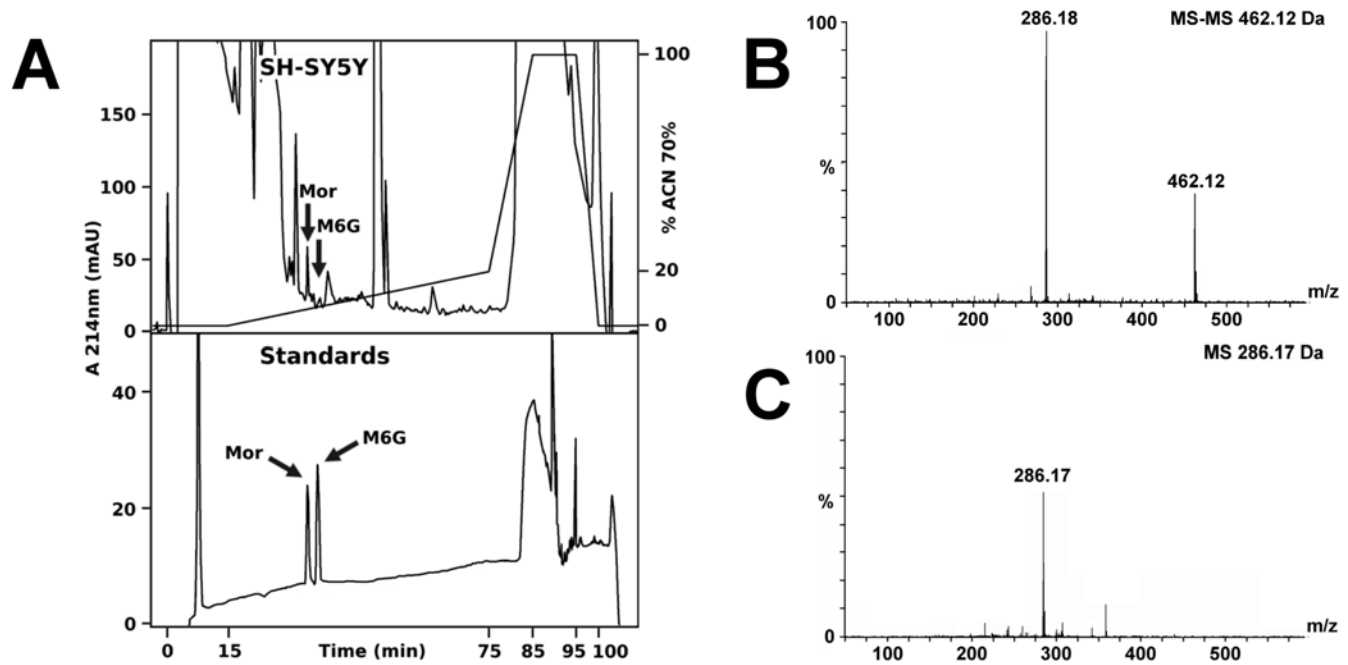


Figure 3. Characterization of morphine and M6G in SH-SY5Y extracts. *A.* Purification of morphine and M6G. Upper panel, RP-HPLC chromatogram showing the purification of endogenous alkaloids from SH-SY5Y cells (375×10^6 cells). Lower panel, RP-HPLC purification of morphine (Mor) and M6G standards (500 pmol). *B.* Characterization of M6G. Q-TOF MS-MS analysis of the HPLC fraction showing M6G in the intragranular material (marked with an arrow in Fig. 3A, upper panel). The fragment at 462.12 Da corresponds to M6G, whereas the 286.18 Da fragment corresponds to morphine. *C.* Q-TOF MS analysis of the HPLC fraction showing morphine (286.17 Da) in the intragranular material (marked with an arrow in Fig. 3A, upper panel).
doi:10.1371/journal.pone.0001641.g003

The aim of the present study was to begin to examine this question and thereby take the first steps towards establishing a functional role for endogenous morphine.

To be considered a neurotransmitter, endogenous morphine should (i) be present in nerve terminals and stored within secretory vesicles, (ii) possess a specific pre/postsynaptic receptor able to induce specific effects (*i.e.*, MOR), (iii) be released upon depolarizing stimulation *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism, and (iv) be degraded or recycled by an extra- or intracellular mechanism. We examined these criteria using the neuronal SH-SY5Y cell line and mouse brain.

(i) Presence of morphine in secretory granules and nerve termini

The human neuroblastoma clone SH-SY5Y, derived from a human sympathetic ganglion [41], possesses the properties of sympathetic neurons [42] and is a well-established model for studying the secretion of neurotransmitters [11,12,28]. These cells have been shown to express several types of receptors, including MOR and δ opioid receptor subtypes (DOR) [16,17,18]. SH-SY5Y cells are characterized by the presence of numerous LDC vesicles (100–200 nm in diameter) which are usually found in sympathetic neurons and that closely resemble the adrenal chromaffin secretory granules. These LDC vesicles store neurotransmitters such as noradrenaline, enkephalins, and chromogranins. Morphine synthesis has been observed in SH-SY5Y cells [9]. The present results reveal that morphine immunoreactivity (which identifies morphine and M6G) is present within secretory structures, as shown by its colocalization with CGA. The colocalization in LDC vesicle-like structures occurs in cell bodies but also along cell processes and within neurite endings.

Biochemical analyses using the sensitive technique of mass spectrometry confirmed the presence not only of morphine in SH-SY5Y cell extracts, but also of M6G, a product of morphine catabolism that has never been found in this cell type [43,44]. We recently reported the presence of M6G in the matrix of bovine adrenal chromaffin secretory granules, as well as in the material secreted from chromaffin cells [15]. We were able to show that in chromaffin cells, M6G is a product of anabolic synthesis by UDP-glucuronosyltransferase 2B-like enzyme (UGT2B). However, the UGT2B7 detected here in SH-SY5Y cells is probably responsible for M6G biosynthesis. While in chromaffin cells morphine is almost completely metabolized into M6G, we found that morphine and M6G coexist in SH-SY5Y cells, suggesting that the two molecules are cosecreted *in vivo*.

Using an immunohistochemical approach, morphine was detectable in the mouse CNS, particularly in specific neurons and nerve terminals. A strong localized immunoreactivity was observed in the cerebellum, olfactory bulb, hippocampus, and cortex, whereas other structures showed more dispersed labelling. Faint immunolabelling was also visible in the white matter, and this may correspond to morphine-positive afferent fibers. Using optical methods, we observed intense immunostaining in the cerebellum surrounding Purkinje cell bodies and in basket cells. Ultrastructural techniques showed morphine immunoreactivity to be concentrated in the cell bodies of basket cells and their endings that make close contacts with Purkinje cell bodies. These anatomical findings implicate this endogenous alkaloid in cerebellum activity.

(ii) Presence of a specific pre/postsynaptic receptor

We investigated whether SH-SY5Y cells respond to the application of morphine and M6G. First, we confirmed that they

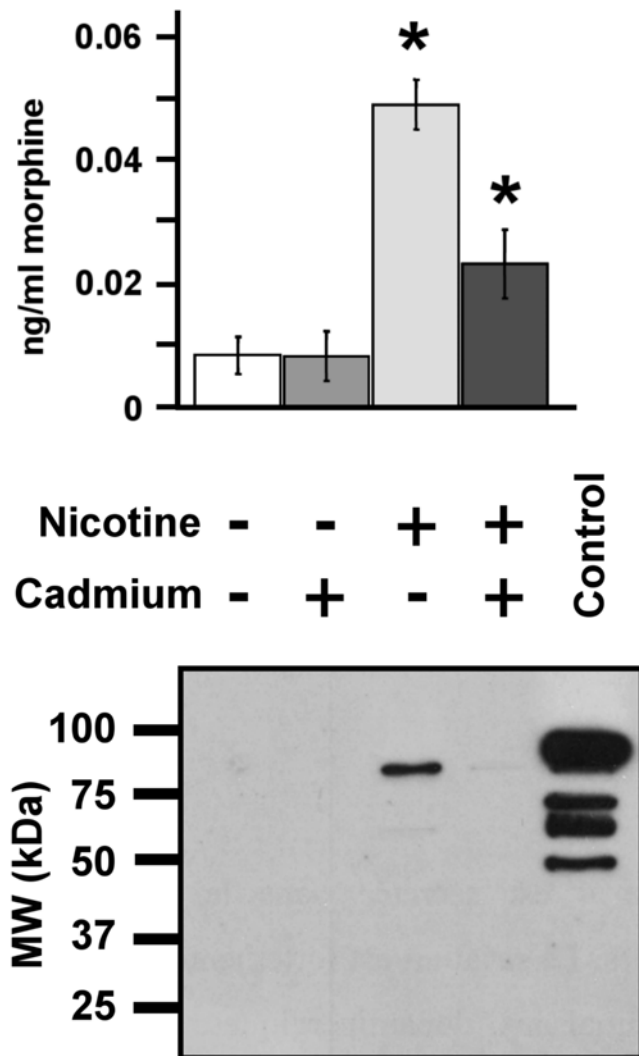


Figure 4. Characterization of morphine secretion from SH-SY5Y cells. *Upper panel.* The amount of morphine secreted into the culture medium was determined after stimulating 4×10^5 cells with $100 \mu\text{M}$ of nicotine with or without cadmium ($200 \mu\text{M}$) for 24 h. The basal secretion level was obtained from cells incubated without nicotine at the same time ($n=6$). Amounts of secreted morphine in the nicotine and nicotine+cadmium groups were statistically different and were both different from the two control groups (no nicotine and no nicotine+cadmium; Mann-Whitney test, * $p < 0.01$). *Lower panel.* The efficiency of secretion was assessed by monitoring the secretion of chromogranin B (CGB), an intra-LDC vesicle protein [28], by Western blot analysis. A positive control, intragranular protein matrix from bovine chromaffin cells ($10 \mu\text{g}$), was loaded in order to evaluate the molecular weight of the entire CGB (80 kDa). doi:10.1371/journal.pone.0001641.g004

express MOR mRNA [23,24]. MORs belong to a large family of receptor proteins derived from the *OPRM1* (opioid receptor μ) gene. MORs are membrane proteins with seven transmembrane domains, and they are coupled to $G_{\alpha/i}$ proteins (for review, see [45]). Stimulation of these receptors leads to various effects, including analgesia and regulation of the gastrointestinal tract. The distribution of MORs in the mouse brain has previously been investigated using immunohistochemistry and molecular biology [46]. However, this is a complex problem given the multiplicity of splice variants, with 32 mRNA splice forms and at least 11 receptor isoforms for

mouse MOR1 [1,45,47]. MOR1 subtypes have been described in mouse, rat, and cat Purkinje cells [32,33,48,49].

The presence of morphine in cerebellum basket cells that form synaptic contacts with Purkinje cell bodies led us to speculate that endogenous morphine may be involved in modulating Purkinje cell output. It is well known that GABA liberated from basket cell endings modulates Purkinje cell activity. Moreover, DAMGO and baclofen, two MOR agonists, have been reported to regulate non-activating outward currents in mouse Purkinje cells when used at μM concentrations [50]. Interestingly, DAMGO inhibits GABA neurotransmission [51]. In the case of morphine, microiontophoretic application to cat Purkinje cells induces either excitatory or inhibitory responses (*i.e.*, an increase or decrease of the firing rates, respectively) [48,49]. Naloxone reverses excitatory morphine-evoked actions, whereas inhibitory effects can be reversed only by the GABA-receptor antagonist bicuculine. This suggests that the excitation of cat Purkinje cells by morphine is related to MORs, whereas inhibitory events involve GABA receptors. Whether morphine and GABA are stored in the same vesicles and released together from basket cells remains an open question. The presence of both molecules in the nerve endings of the same cell may imply complex regulatory processes yet to be elucidated.

(iii) Secreted morphine

At least 11 mouse MOR1 isoforms exist [47] and have various affinities for morphine and its derivatives (K_{d} s ranging from nanomolar to low affinity for the mMOR-1B4 isoform [45,52]), which means that specific morphine concentrations are needed to activate a given receptor isoform. In addition, homo- and heterodimerisation of MOR1 subtypes (or DOR) induce switch in signaling [53].

Endogenous morphine may play a role in brain plasticity and development. At very low concentration (10^{-9} to 10^{-14} M), morphine increases neurite outgrowth in rat primary neuron cultures [54], as well as in the PC-12 tumor cell line [55], *via* a naloxone-independent pathway. In addition, MORs are involved in granule neuron genesis in the mouse cerebellum [56]. Recently, Zeng et al. demonstrated that morphine promotes the regeneration and synaptic reconstruction of the terminals of injured primary unmyelinated afferent fibers by an MOR-mediated, naloxone-dependent process [57]. Morphine has also been shown to modulate synaptic plasticity at hippocampal glutamatergic synapses [58]. Together, these data suggest that secreted endogenous morphine, at low concentrations, can act as a neurofactor involved in regulating the development of specific brain areas or in neuronal plasticity. Morphine activity at low concentrations was also observed in the present study, since the electrophysiological response of SH-SY5Y cells occurred at morphine and M6G concentrations as low as 10^{-10} M.

Previous reports have shown that PEBP is able to bind morphine [14] and M6G [15], suggesting that PEBP is an endogenous morphine/M6G binding protein. In the present study, PEBP immunoreactivity colocalized with that of morphine in basket cell nerve endings, which suggests the presence of PEBP-morphine complexes. Whether morphine is secreted in a complex with PEBP remains an open question.

(iv) Presence of a specific catabolism process for morphine

Neurotransmitters are commonly inactivated in the synaptic gap by enzymes [59], or they are taken up by neurons and astrocytes for recycling or degradation [60]. Once inactivated inside the cell, the inactive product is released into the extracellular space. If morphine is a true neurotransmitter, it should be either inactivated or recycled.

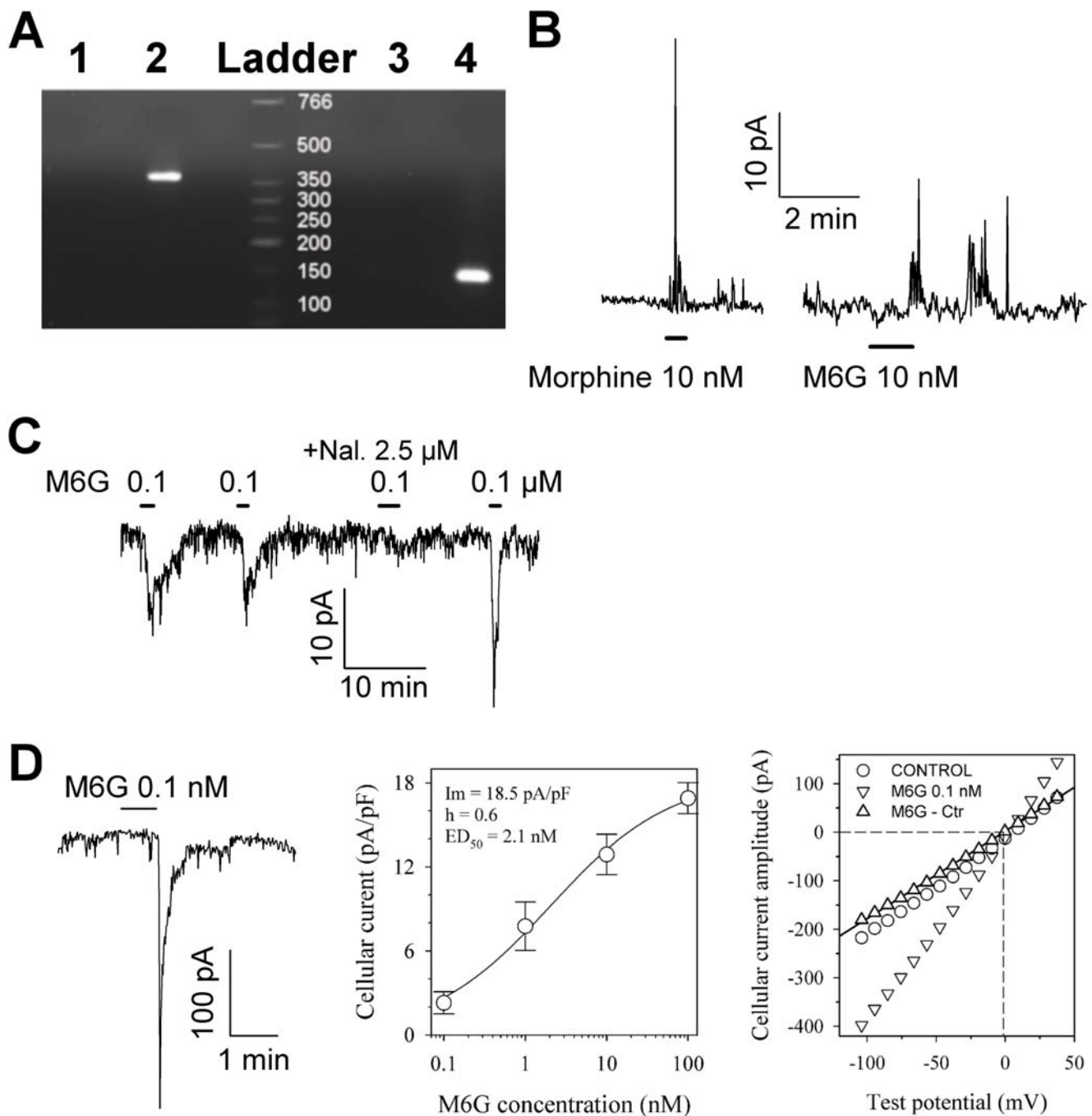


Figure 5. Amplification of MOR1 RNA and characterization of the electrophysiological effects of a low concentration of morphine and M6G. *A*. Total SH-SY5Y RNA was submitted to RT-PCR using specific human MOR1 primers. Lane 1, control using water as a PCR template to test for contamination. Lane 2, total RNA from SH-SY5Y, showing a single band of 376 bp. Lane 3, negative control of GAPDH amplification (water). Lane 4, SH-SY5Y total RNA (GAPDH, 142 bp). Size standards are indicated in bp. *B* and *C*. Typical responses of SH-SY5Y cells to low concentrations of morphine and M6G antagonized by naloxone, as measured by the patch clamp technique in cell-attached mode at a pipette potential of 60 mV and 80 mV (*B* panel), as well as at -135 mV (*C* panel). M6G was repeatedly applied in the absence or presence of naloxone (Nal.). *D*. Whole-cell patch clamp recording of the M6G response: the left-hand panel shows a typical trace recorded at a holding potential of -135 mV, the middle panel shows a dose-response curve obtained at a holding potential of -80 mV, and the right-hand panel shows an I-V plot of the peak amplitude response. The dose-response data were fitted with Hill's equation (continuous line) with optimal parameters as indicated in the Figure. The I-V plot of the steady state current for the control (circles) and at the peak of the response to 0.1 nM M6G (inverted triangles) was obtained using a ramp potential protocol from 80 to -140 mV lasting 800 ms. The specific current elicited in the presence of M6G (upright triangles) was linear, and the reversal potential calculated by linear regression gave a value of -0.5 mV (dashed line). Traces were filtered at 2 kHz and digitized at 5 kHz. Bars indicate the period of drug application at the indicated concentrations. doi:10.1371/journal.pone.0001641.g005

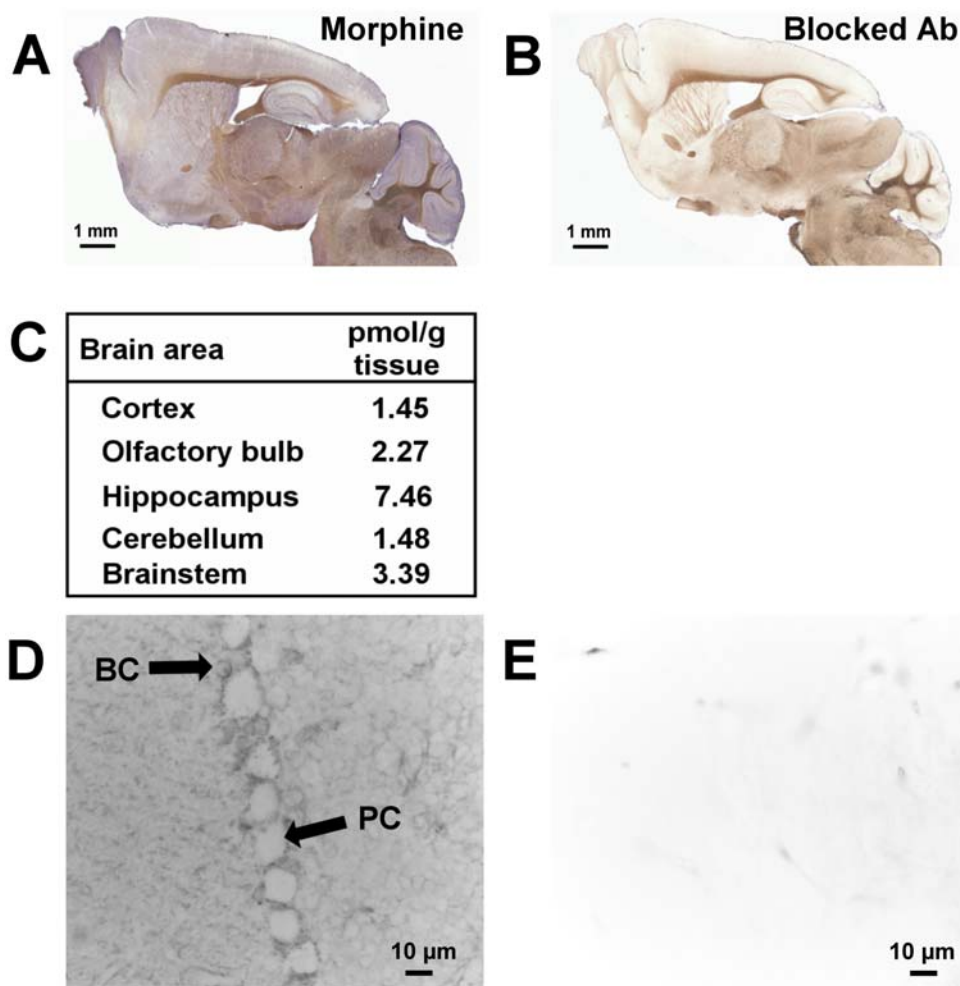


Figure 6. Mapping of endogenous morphine in the mouse brain. *A.* Immunodetection of morphine present in the mouse brain. Sagittal slices were incubated with a mouse monoclonal anti-morphine antibody and visualized with an HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG, in order to detect endogenous morphine in specific brain areas. *B.* Control experiment using morphine immunoadsorbed mouse monoclonal antibody (same incubation time as in *A.*). *C.* Quantification of the morphine present in different mouse brain areas using morphine-specific ELISA. The table shows the quantities of endogenous morphine (pmoles) present per gram of wet tissue. The values correspond to an average of the morphine amount determined for 5 brains ($n = 5$). *D.* Localization of morphine label in the cerebellum using mouse monoclonal anti-morphine antibody and an HRP-conjugated secondary antibody. Morphine labelling was observed around Purkinje cells and in basket cells. PC, Purkinje cell; BC, basket cell. *E.* Control for immunolabelling using morphine-immunoadsorbed mouse monoclonal antibody.
doi:10.1371/journal.pone.0001641.g006

Exogenously administered morphine is known to be catabolized in hepatocytes by enzymes of the UDP-glucuronosyl transferase 1A and 2B families (UGT) [61]. This leads to the formation of morphine-3-glucuronide (M3G; 90%) and M6G (10%). In contrast to the inactive M3G, M6G displays analgesic activity that is much more potent than morphine [15,16]. In the rodent liver, the picture appears to be more complex because in rats, morphine is catabolized to both M6G and M3G [21], whereas only M3G is formed in mice [31].

In the brain, morphine uptake has been described in different cell types, including neurons [35]. Morphine is known to pass the blood brain barrier and to penetrate into the CNS more actively than M6G, probably because it is more hydrophilic [62]. Uptake mechanisms for morphine also appear to exist in non-neuronal cells, as shown by studies with radioactive morphine and human primary white blood cells [22,35,36,37].

Interestingly, enzymes implicated in converting morphine into M3G (*i.e.*, UGT1A enzymes) are expressed in primary neurons [19]

and astrocytes [63]. Human and rat brain extracts, including those from the cerebellum, are able to synthesize labeled M3G and M6G from radiolabelled morphine [21,22], proving that morphine catabolism/anabolism occurs in at least some brain structures. The uptake of released morphine may occur at the pre- or postsynaptic level in neurons as well as in astrocytes. Following uptake, morphine may be recycled in secretory organelles or converted into M3G by the UGT enzyme family present in neurons [64,65] and astrocytes [63]. The resulting inactive M3G may then be transported from the cytoplasm into the extracellular space [31].

Conclusion

Our present observations, together with previously published data, strengthen the proposal that endogenous morphine represents a new neurotransmitter or neuromodulator involved in signalling regulation. Further investigation is required to understand the precise role of endogenous morphine in brain physiology.

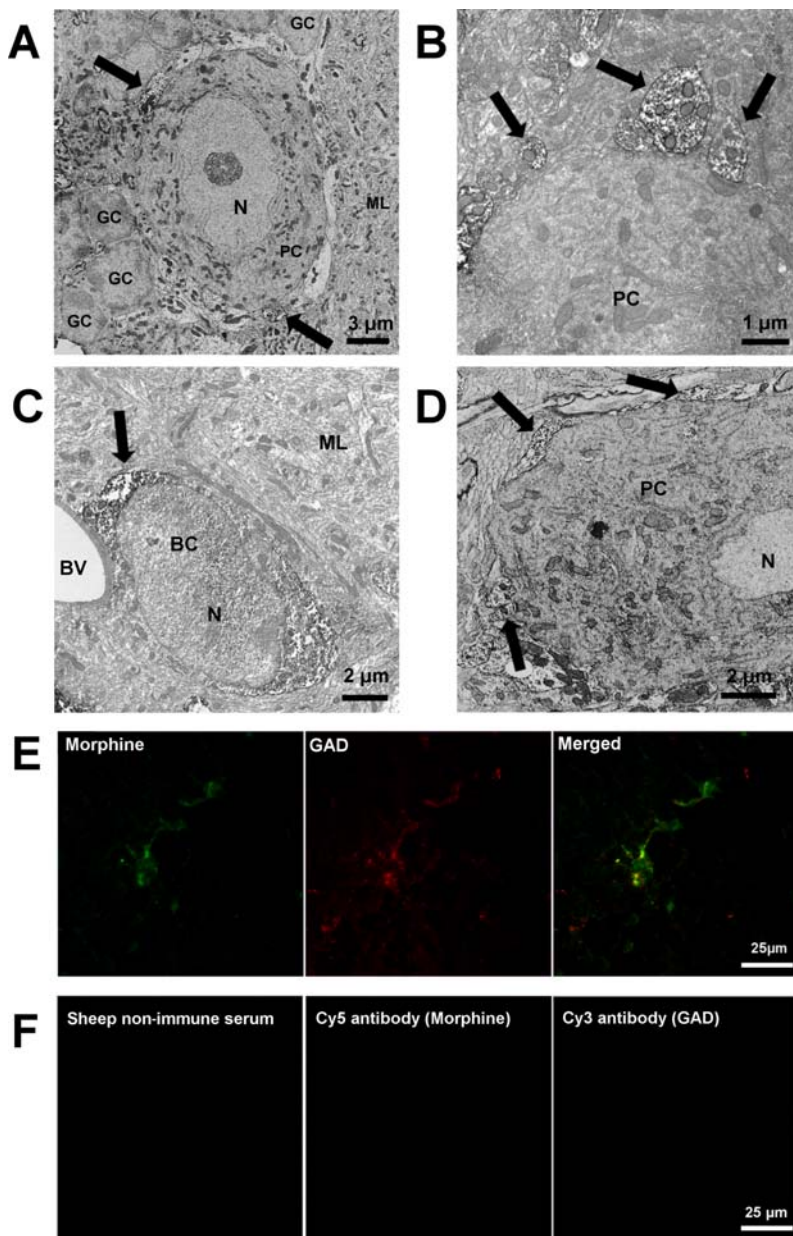


Figure 7. Characterization of morphine immunoreactivity in the mouse cerebellum. *A.* Characterization of morphine immunolabelling around Purkinje cells. Electron microscopy using sheep anti-morphine antibody showed morphine-like immunoreactivity in nerve termini innervating Purkinje cell bodies (PC). Arrows indicate strong immunolabelling of morphine-containing termini around the Purkinje cell body. GC, granular cell. ML, molecular layer, N, nucleus. *B.* Higher magnification showing the presence of morphine immunoreactivity in nerve termini innervating Purkinje cell bodies. *C.* Electron microscopy showing morphine immunoreactivity in basket cells (BC). BV, blood vessel. ML, molecular layer. Control experiments using anti-sheep HRP-conjugated IgG showed the specificity of the immunolabelling. *D.* Electron microscopy showing PEBP-immunoreactivity in nerve termini covering Purkinje cell bodies (PC). Arrows indicate strong immunolabelling of PEBP-containing basket cell termini. *E.* Evidence of colocalization of morphine and glutamic acid decarboxylase (GAD). Double immunofluorescence confocal micrographs were obtained using a sheep anti-morphine antibody (detected with a Cy5-conjugated IgG, green pseudocolor label) and an antibody against GAD visualized in red with a Cy3-conjugated IgG. Colocalized immunolabelling (arrows and merged window) appears as yellow staining. *F.* Control experiments were performed using sheep non-immune serum, or only secondary antibodies detected with Cy5- and Cy3-conjugated IgG (primary antibody omitted), to demonstrate the specificity of the immunolabelling. doi:10.1371/journal.pone.0001641.g007

Materials and Methods

Animals

Experiments were performed on 37 day old laboratory-bred, adult male C57BL/6 mice weighing 30 ± 3 g. Animals were given free access to food and water, with a 12 h light-dark cycle at a temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$. All experiments were carried out in

accordance with the European Community Council Directive (86/609/EEC) of November 24, 1986.

Cell culture

The human SH-SY5Y cell line (ATCC number CRL-2266) was cultured for 5 days in 60 cm^2 dishes in Dulbecco's Modified Eagle

medium (Sigma Aldrich) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. The cells were incubated at 37°C in a wet atmosphere (relative humidity >95%) of 5% CO₂ in air. The medium was changed every three days.

Immunohistochemistry

Tissue preparation for immunocytochemistry studies.

Mice were deeply anesthetized by intraperitoneal injection of 0.1 ml of a 5.6% (w/v) pentobarbital sodium solution (CEVA Santé Animale) and perfused transcardially with fixative solution using a peristaltic pump. For electron microscopy experiments, the fixative solution consisted of 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich) in NaCl/Pi buffer (0.9% NaCl and 25 mM sodium phosphate, pH 7.4) with 0.25% glutaraldehyde (VWR). The same fixative solution was used for optical microscopy, except that glutaraldehyde was omitted. Fixative solutions were chilled, then injected for 10 min with a peristaltic pump at a flow rate of 10 ml/min. The brain was quickly removed and incubated for 2 hours at 4°C in the same fixative. Coronal and sagittal brain sections (80 µm thick) were cut with a vibratome (Leica VT 1000 S) and collected in Tris-buffered saline (TBS: 50 mM Tris-HCl, 0.9% NaCl, pH 7.4).

Cell preparation for immunocytochemistry studies. Cells cultured on glass coverslips were pre-fixed for 5 min with a solution of 4% (v/v) formaldehyde in NaCl/Pi buffer mixed with the culture medium at 25°C. Then, cells were fixed with 4% formaldehyde solution in NaCl/Pi buffer and permeabilized for 10 min with 0.1% (v/v) Triton X100 [15]. Glass coverslips were mounted on a glass slide with a drop of Mowiol 4-88.

Immunostaining. Immunostaining was performed on sections free-floating in TBS or on cells grown on coverslips as previously described [66]. Sections or slides were washed in TBS and incubated for 1 hour in bovine serum albumin diluted in TBS (3%, w/v) in order to saturate nonspecific immunoreactive sites. After six TBS washes of 5 min each, sections were incubated overnight in different antisera. Primary antibodies were used as follows: (i) mouse monoclonal antibodies (6D6, Aviva System Biology; dilution 1:2000) or sheep polyclonal antibodies (AbD Serotec; dilution 1:500) raised against morphine-like compounds (morphine, M3G, and M6G, based on supplier specifications and our own experiments, described below), (ii) goat polyclonal antibody raised against human and murine UGT2B [15], (iii) mouse monoclonal anti-glutamic acid decarboxylase (Chemicon; dilution 1:1000), (iv) purified rabbit anti-PEBP antibody (dilution 1:100) [13] and (v) mouse monoclonal antibody anti-CGA 5A8 (dilution 1:500) [67].

After incubation with the primary antibody, sections or slides were washed six times with TBS (5 min) and specific secondary antisera were added for 2 h at room temperature, followed by six TBS washes (5 min). These secondary antisera were (i) HRP-conjugated donkey anti-mouse IgG (P.A.R.I.S.; dilution 1:500), (ii) Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-sheep IgG (Molecular Probes; dilution 1:2000), (iii) Alexa Fluor 568-conjugated donkey anti-goat (1:2000), (iv) Cy5-conjugated donkey anti-sheep IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; dilution 1:200) and (v) Cy3-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, dilution 1:800).

Several controls were carried out to assess antibody specificity and nonspecific immunoreactivity. Primary antibodies were omitted, and each secondary antibody was tested individually or in a mixture in the presence of tissue sections or cells. Controls for morphine and UGT2B immunoreactivities were carried out by incubating the antibody with morphine (2 h, 25°C, 50:1, w/w) or the corresponding blocking peptide (12 h, 4°C, 1:5, w/w) [15],

respectively, prior to immunocytochemistry experiments. Each antibody was also tested with the secondary antibody used for the second immunolabelling in order to determine whether interspecies cross-reactivity exists. Anti-morphine antibodies were also tested by ELISA in order to determine cross reactivity with morphine, M6G, and M3G, showing a specificity for morphine M6G and M3G. In order to assess whether morphine binds to proteins nonspecifically, extracts of SH-SY5Y and the mouse hippocampus were submitted to Western blot analysis; the results show that neither anti-morphine antibody labels proteins in these extracts. All experiments using anti-morphine antibodies were done in duplicate using mouse monoclonal and sheep polyclonal antibodies. The pattern of immunolabelling was similar each time.

Light microscopy immunocytochemistry

Peroxidase activity was measured after a 20 min incubation in a freshly prepared solution of 4-chloro 1-naphtol (0.2 mg/ml) in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with TBS, the sections were mounted in glycerol/TBS (1:1, v/v) before analysis with a Leica DMRB microscope equipped with a digital camera (Axiocam, Zeiss).

Electron microscopy immunocytochemistry

Peroxidase activity was detected with a freshly prepared solution of 0.025% (w/v) 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride in TBS containing 0.006% (w/v) hydrogen peroxide. After washing with NaCl/Pi buffer, sections and slides were postfixed for 30 min with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M NaCl/Pi buffer (pH 7.4), and then with 1% (w/v) osmium tetroxide in 0.1 M NaCl/Pi buffer (pH 7.4) at 4°C for 1 hour. Sections were dehydrated in ethanol and embedded in Araldite resin [66]. Ultrathin sections were observed with a Hitachi H 7500 electron microscope without additional staining. Pictures were acquired with a Hamamatsu Digital camera (C 4742-95).

Confocal microscopy observations

Immunofluorescent staining was analyzed with a Leica laser scanning microscope (TCS-SP2 invert) equipped with a plan apo 63× oil immersion lens. Tissue sections were subjected to optical serial sectioning to produce images in the X–Y plane. Each optical section was scanned eight times for brain sections and four times for cells to obtain an average image. Pictures were recorded digitally in a 512×512 pixel format. A look-up table (glowoverglowunder, Leica) ensured that the full dynamic range of the photomultipliers was used. Before each measurement, a series of sections was acquired through the vertical axis in order to choose the equatorial section.

Anatomical and cellular distribution

Anatomical structures were identified under direct observation using the atlas and nomenclature of Paxinos and Watson [68]. Light microscopic sections were examined using a Leica DMRB brightfield microscope (objectives 1.6× to 20×).

Isolation of exocytosed material from stimulated SH-SY5Y cells

SH-SY5Y cells were grown for 4 days in 24-well dishes (4×10^5 cells per well) in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma Aldrich). Prior to the experiments, they were washed twice (5 min each) with FBS-free DMEM at 37°C and incubated for 1 h in FBS-free DMEM at 37°C. Cells were then incubated with or without 100 µM nicotine in FBS-free DMEM for 24 h. The culture medium was collected and tested for morphine using a

morphine-specific ELISA kit (Immunalysis Corporation; see below). Cadmium treatments (200 μM ; Sigma Aldrich) were used to assess whether a Ca^{2+} -dependent release mechanism exists.

Secretion efficiency was checked by Western blot analysis (see below) using a validated antibody raised against the conserved C-terminal part of chromogranin B (bovine CGB₆₁₄₋₆₂₆ [69]), which serves as a secretion marker [27].

Alkaloid and protein analysis

Prior to HPLC separation, Western blot analysis, or ELISA, scraped cells or homogenized brain areas were sonicated at 4°C (3×10 sec) in water containing protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). The sonicates were centrifuged (30 min, 10000 g, 4°C), and the supernatant containing the intracellular material was used for protein analysis after protein quantification [15].

Endogenous alkaloids present in the tissue or cell homogenates were extracted as described in our previous study [15].

Purification of alkaloids by reverse phase HPLC

Deproteinized or untreated samples corresponding to 375×10^6 cells, as well as alkaloid standards, were purified using an Äkta purifier HPLC system (GE Healthcare Bioscience) as previously described [15]. The gradients of acetonitrile (ACN) are indicated on the chromatograms. Buffer A was 0.1% (v/v) in water, and buffer B was 70% acetonitrile and 0.09% , trifluoroacetic acid in water.

Mass spectrometry

MS and MS-MS analyses were performed using electrospray mass spectrometry (ES-MS) on a Q-TOF II (Bio-Tech) in positive mode as previously described [15].

Gel electrophoresis and Western blot analysis

Proteins were separated on SDS-PAGE gradient gels (4%–12% acrylamide; Criterion XT, BioRad) and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare Bioscience) [13]. UGT2B enzymes were detected with a goat polyclonal antibody raised against the human UGT2B family (Santa Cruz Biotechnology, 65 kDa, dilution 1:1,000), and signal was developed using HRP-conjugated anti-goat antisera (Santa Cruz Biotechnology, dilution 1:50,000) [15]. Human hepatocyte extract (XenoTech) and human recombinant UGT2B7 (Sigma Aldrich) were used as positive controls. Chromogranin B (CGB) was detected using a rabbit polyclonal antibody raised against the conserved C-terminal part of chromogranin B (bovine CGB₆₁₄₋₆₂₆ [69]), and the signal was developed using HRP-conjugated anti-rabbit antisera (Sigma Aldrich, dilution 1:400,000).

Morphine-specific ELISA

The morphine-specific ELISA kit from Immunalysis Corporation was used for the quantification of morphine present in culture medium (n = 6) and brain tissue extracts (n = 5). The specificity of the test for morphine was confirmed by testing different amounts of M6G, M3G, and codeine (0–25 ng/ml, data not shown). For all tests, morphine standards were diluted in the appropriate buffer.

Statistical analysis of the secretion experiments

In order to assess the effect of nicotine stimulation on SH-SY5Y cells, morphine concentrations in the medium were subjected to *post hoc* analysis using a Mann-Whitney test. Our analysis included four different conditions: control, control+cadmium, nicotine, nicotine+cadmium. Each value was the result of six independent experiments (n = 6). Statistical data analysis was performed using MINITAB 13.20 (Minitab Inc.). Differences were considered to be

statistically significant when the probability value was <0.01 (indicated by asterisks in the Figure).

Total RNA isolation and Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Total RNA was extracted from SH-SY5Y cells using the NucleoSpin RNA II extraction kit (Macherey-Nagel). RNA purity was quantified by UV spectrophotometry at 260/280 nm.

Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was performed with the One-Step RT-PCR kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Briefly, total RNA (100 ng) was retro-transcribed into cDNA for 30 min at 50°C; after inactivation of the transcriptase at 95°C for 15 min, PCR was performed for 35 cycles (1 min at 94°C, 1 min at the specific T_m , 1 min at 72°C) followed by a final extension for 10 min at 72°C on a Mastercycler personal (Eppendorf).

Forward and reverse primers specific to human MOR1 (5'-3' ACCAACATCTACATTTTCAACCTT and 5'-3' CAGTAC-CAGGTTGGATGAGAG) were designed to amplify a 376-bp fragment of the region common to all MOR1 splice variants (OligoExplorer 1.2, Gene Link).

Human UGT2B7 forward and reverse primers (5'-3' TCCAC-GAGCATCTTCGAGA and 5'-3' ATACTGGAAGCACATGCC) were designed to amplify a 462-bp fragment specific to UGT2B7, (OligoExplorer 1.2, Gene Link).

Amplification of GAPDH RNA was used as a positive control in RT-PCR reactions. PCR products (one-fifth of the PCR reaction) were loaded on an ethidium bromide-stained agarose gel (0.8%) and visualized by UV illumination using the GeneSnap system (Syngene).

Reactions were carried out using synthesized oligonucleotides (6 μM final concentration) at a T_m of 51°C for MOR1 and UGT2B7.

Patch-clamp experiments on SH-SY5Y cells

For patch-clamp recording, SH-SY5Y cells were maintained in culture (DMEM+10% FCS and 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin) at low density (about 2×10^4 cells/ml) in 35 mm dishes and subjected to recording experiments 3–8 days after plating. M6G-induced responses were measured either in the cell-attached or whole-cell configuration of the patch-clamp technique [70] using an Axopatch-B200 amplifier (Axon Instruments). For whole-cell recording, the recording pipette had a 2–4 M Ω resistance when filled with recording solution (131 mM K-gluconate, 10 mM HEPES, 5.5 mM EGTA, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 3 mM NaCl 5 mM KCl, 0.1 mM ATP, and 0.1 mM GTP). Isolated SH-SY5Y cells were selected and recorded under continuous perfusion with control medium (132 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 1 mM Na-Gluconate, 10 mM HEPES and 10 mM D-glucose). The pH of the pipette and bath medium was adjusted to 7.2 with KOH and 7.4 with NaOH, respectively. For cell-attached recordings, the pipette was filled with bath medium. Voltage command and current trace digitization were achieved using the Digidata 1322A card interface (Axon Instruments) and Pclamp software (Axon instrument). Current traces were low-pass filtered at 2 kHz before digitization at 5 kHz.

Drugs were diluted to the desired concentrations in the bath medium and applied to the recorded cell through a multi-barrel perfusion system (RCS-160 rapid solution exchanger, Bio-Logic). Each barrel had a 1 mm inner diameter, and the selected perfusion tube was placed about 50 μm from the recorded cell. Drug application began when the selected tube was positioned in front of the cell. Naloxone antagonist was purchased from Sigma Aldrich.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. A. Corti (San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy) for providing the monoclonal antibody against human chromogranin A and Dr. F. Schoentgen (CNRS UPR 4301, Orléans, France) for providing the anti-PEBP antibody. We are grateful to Dr. M. Reber for his knowledge of molecular biology.

References

1. Stefano GB, Goumon Y, Casares F, Cadet P, Fricchione GL, et al. (2000) Endogenous morphine. *Trends Neurosci* 23: 436–442.
2. Hazum E, Sabatka JJ, Chang KJ, Brent DA, Findlay JW, et al. (1981) Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (μ) receptors? *Science* 213: 1010–1012.
3. Gintzler AR, Gershon MD, Spector S (1978) A nonpeptide morphine-like compound: immunocytochemical localization in the mouse brain. *Science* 199: 447–448.
4. Goldstein A, Barrett RW, James IF, Lowney LI, Weitz CJ, et al. (1985) Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 5203–5207.
5. Herbert RB, Venter H, Pos S (2000) Do mammals make their own morphine? *Nat Prod Rep* 17: 317–322.
6. Stefano GB, Scharrer B (1994) Endogenous morphine and related opiates, a new class of chemical messengers. *Adv Neuroimmunol* 4: 57–67.
7. Meijerink WJ, Molina PE, Abumrad NN (1999) Mammalian opiate alkaloid synthesis: lessons derived from plant biochemistry. *Shock* 12: 165–173.
8. Poeknapo C, Schmidt J, Brandsch M, Drager B, Zenk MH (2004) Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 14091–14096.
9. Boettcher C, Fellermeier M, Boettcher C, Drager B, Zenk MH (2005) How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8495–8500.
10. Kream RM, Stefano GB (2006) De novo biosynthesis of morphine in animal cells: An evidence-based model. *Med Sci Monit* 12: RA207–219.
11. Agis-Torres A, Ball SG, Vaughan PF (2002) Chronic treatment with nicotine or potassium attenuates depolarisation-evoked noradrenaline release from the human neuroblastoma SH-SY5Y. *Neurosci Lett* 331: 167–170.
12. Vaughan PF, Peers C, Walker JH (1995) The use of the human neuroblastoma SH-SY5Y to study the effect of second messengers on noradrenaline release. *Gen Pharmacol* 26: 1191–1201.
13. Goumon Y, Angelone T, Schoentgen F, Chasserot-Golaz S, Almas B, et al. (2004) The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem* 279: 13054–13064.
14. Grandy DK, Hanneman E, Bunzow J, Shih M, Machida CA, et al. (1990) Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol* 4: 1370–1376.
15. Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, et al. (2006) Identification of Morphine-6-glucuronide in Chromaffin Cell Secretory Granules. *J Biol Chem* 281: 8082–8089.
16. Lotsch J, Geisslinger G (2001) Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clin Pharmacokinet* 40: 485–499.
17. Cadet P, Mantione KJ, Stefano GB (2003) Molecular identification and functional expression of μ 3, a novel alternatively spliced variant of the human μ opiate receptor gene. *J Immunol* 170: 5118–5123.
18. Cadet P, Mantione KJ, Zhu W, Kream RM, Sheehan M, et al. (2007) A functionally coupled μ 3-like opiate receptor/nitric oxide regulatory pathway in human multi-lineage progenitor cells. *J Immunol* 179: 5839–5844.
19. Suleman FG, Abid A, Gradinaru D, Daval JL, Magdalou J, et al. (1998) Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 358: 63–67.
20. King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR (1999) Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch Biochem Biophys* 365: 156–162.
21. Nagano E, Yamada H, Oguri K (2000) Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci* 67: 2453–2464.
22. Yamada H, Ishii K, Ishii Y, Teiri I, Nishio S, et al. (2003) Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J Toxicol Sci* 28: 395–401.
23. Zadina JE, Chang SL, Ge LJ, Kastin AJ (1993) μ opiate receptor down-regulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 254–262.
24. Liu AM, Wong YH (2005) μ -opioid receptor-mediated phosphorylation of I κ B kinase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosignals* 14: 136–142.
25. Aunis D (1998) Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int Rev Cytol* 181: 213–320.
26. Ou XM, Partoens PM, Wang JM, Walker JH, Danks K, et al. (1998) The storage of noradrenaline, neuropeptide Y and chromogranins in and

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FD YG AM EG OT VK GR MM. Performed the experiments: FD YG AM EG OT VK AL MM. Analyzed the data: FD YG AM EG OT VK AL MM GR. Contributed reagents/materials/analysis tools: AV YG GR MM DA. Wrote the paper: YG OT DA.

27. Giudici AM, Sher E, Pelagi M, Clementi F, Zanini A (1992) Immunolocalization of secretogranin II, chromogranin A, and chromogranin B in differentiating human neuroblastoma cells. *Eur J Cell Biol* 58: 383–389.
28. Goodall AR, Danks K, Walker JH, Ball SG, Vaughan PF (1997) Occurrence of two types of secretory vesicles in the human neuroblastoma SH-SY5Y. *J Neurochem* 68: 1542–1552.
29. Yu X, Mao X, Blake AD, Li WX, Chang SL (2003) Morphine and endomorphins differentially regulate micro-opioid receptor mRNA in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 447–454.
30. Horner KA, Zadina JE (2004) Internalization and down-regulation of μ opioid receptors by endomorphins and morphine in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res* 1028: 121–132.
31. Zelcer N, van de Wetering K, Hillebrand M, Sarton E, Kuil A, et al. (2005) Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7274–7279.
32. Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH, Day DJ (2004) Abundant expression of μ and δ opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res Dev Brain Res* 148: 213–222.
33. Zhang Y, Pan YX, Kolesnikov Y, Pasternak GW (2006) Immunohistochemical labeling of the μ opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain Res* 1099: 33–43.
34. Weitz CJ, Lowney LI, Faull KF, Feistner G, Goldstein A (1986) Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 9784–9788.
35. Guarna M, Neri C, Petrioli F, Bianchi E (1998) Potassium-induced release of endogenous morphine from rat brain slices. *J Neurochem* 70: 147–152.
36. Zhu W, Mantione KJ, Kream RM, Cadet P, Stefano GB (2007) Cholinergic regulation of morphine release from human white blood cells: evidence for a novel nicotinic receptor via pharmacological and microarray analysis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20: 229–237.
37. Zhuu W, Mantione K, Kream RM, Stefano GB (2006) Alcohol-, nicotine-, and cocaine-evoked release of morphine from human white blood cells: substances of abuse actions converge on endogenous morphine release. *Med Sci Monit* 12: BR350–354.
38. Goumon Y, Bouret S, Casares F, Zhu W, Beauvillain JC, et al. (2000) Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci Lett* 293: 135–138.
39. Lee CS, Spector S (1991) Changes of endogenous morphine and codeine contents in the fasting rat. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 647–650.
40. Molina PE, Hashiguchi Y, Meijerink WJ, Naukam RJ, Boxer R, et al. (1995) Modulation of endogenous opiate production: effect of fasting. *Biochem Biophys Res Commun* 207: 312–317.
41. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 71: 741–747.
42. Pahlman S, Mamaeva S, Meyerson G, Mattsson ME, Bjelfman C, et al. (1990) Human neuroblastoma cells in culture: a model for neuronal cell differentiation and function. *Acta Physiol Scand Suppl* 592: 25–37.
43. Lotsch J (2005) Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage* 29: S10–24.
44. van Dorp EL, Romberg R, Sarton E, Bovill JG, Dahana A (2006) Morphine-6-Glucuronide: Morphine's Successor for Postoperative Pain Relief? *Anesth Analg* 102: 1789–1797.
45. Pan YX (2005) Diversity and complexity of the μ opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA Cell Biol* 24: 736–750.
46. Minami M, Onogi T, Toya T, Katao Y, Hosoi Y, et al. (1994) Molecular cloning and in situ hybridization histochemistry for rat μ -opioid receptor. *Neurosci Res* 18: 315–322.
47. Doyle GA, Sheng XR, Lin SS, Press DM, Grice DE, et al. (2007) Identification of five mouse μ -opioid receptor (MOR) gene (Oprm1) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene* 395: 98–107.
48. Taguchi K, Abe K, Chyuma T, Kato M, Shigenaga T, et al. (2000) Effects of microiontophoretically-applied opioid peptides on Purkinje cells in the cat cerebellum. *Acta Pharmacol Sin* 21: 877–884.
49. Taguchi K, Suzuki Y (1989) Effects of microiontophoretically-applied morphine on the Purkinje cell in the cerebellum of the cat. *Neuropharmacology* 28: 235–242.
50. Bushnell T, Clarke C, Mathie A, Robertson B (2002) Pharmacological characterization of a non-inactivating outward current observed in mouse cerebellar Purkinje neurones. *Br J Pharmacol* 135: 705–712.
51. Vaughan CW, Ingram SL, Connor MA, Christie MJ (1997) How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 390: 611–614.

52. Pan YX, Xu J, Bolan E, Moskowitz HS, Xu M, et al. (2005) Identification of four novel exon 5 splice variants of the mouse mu-opioid receptor gene: functional consequences of C-terminal splicing. *Mol Pharmacol* 68: 866–875.
53. Rozenfeld R, Devi LA (2007) Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: {beta}-arrestin2-mediated ERK activation by {micro}-delta opioid receptor heterodimers. *Faseb J*.
54. Brailoiu E, Hoard J, Brailoiu GC, Chi M, Godbolde R, et al. (2004) Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci Lett* 365: 10–13.
55. Tenconi B, Lesma E, DiGiulio AM, Gorio A (1996) High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neurogenesis in PC12 cells. *Brain Res Dev Brain Res* 94: 175–181.
56. Hauser KF, Houdi AA, Turbek CS, Elde RP, Maxson W 3rd (2000) Opioids intrinsically inhibit the genesis of mouse cerebellar granule neuron precursors in vitro: differential impact of mu and delta receptor activation on proliferation and neurite elongation. *Eur J Neurosci* 12: 1281–1293.
57. Zeng YS, Nie JH, Zhang W, Chen SJ, Wu W (2007) Morphine acts via mu-opioid receptors to enhance spinal regeneration and synaptic reconstruction of primary afferent fibers injured by sciatic nerve crush. *Brain Res* 1130: 108–113.
58. Moron JA, Abul-Husn NS, Rozenfeld R, Dolios G, Wang R, et al. (2007) Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. *Mol Cell Proteomics* 6: 29–42.
59. Zimmerman G, Soreq H (2006) Termination and beyond: acetylcholinesterase as a modulator of synaptic transmission. *Cell Tissue Res* 326: 655–669.
60. Figlewicz DP (1999) Endocrine regulation of neurotransmitter transporters. *Epilepsy Res* 37: 203–210.
61. Mackenzie PI, Walter Bock K, Burchell B, Guillemette C, Ikushiro S, et al. (2005) Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet Genomics* 15: 677–685.
62. Wu D, Kang YS, Bickel U, Pardridge WM (1997) Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab Dispos* 25: 768–771.
63. Heurtaux T, Benani A, Moulin D, Muller N, Netter P, et al. (2006) Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 50: 317–328.
64. Brands A, Munzel PA, Bock KW (2000) In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem Pharmacol* 59: 1441–1444.
65. Martinasevic MK, King CD, Rios GR, Tephly TR (1998) Immunohistochemical localization of UDP-glucuronosyltransferases in rat brain during early development. *Drug Metab Dispos* 26: 1039–1041.
66. Hedou G, Chasserot-Golaz S, Kemmel V, Gobaille S, Roussel G, et al. (2000) Immunohistochemical studies of the localization of neurons containing the enzyme that synthesizes dopamine, GABA, or gamma-hydroxybutyrate in the rat substantia nigra and striatum. *J Comp Neurol* 426: 549–560.
67. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, et al. (2000) Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 275: 10745–10753.
68. Paxinos G, Watson C (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* New York: Academic Press. 456 p.
69. Gasnier C, Lugardon K, Ruh O, Strub JM, Aunis D, et al. (2004) Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics* 4: 1789–1801.
70. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85–100.

Résultats non publiés

Résultats non publiés

En parallèle de mes travaux réalisés sur le cervelet, j'ai étudié la présence de morphine dans l'hippocampe de souris, zone cérébrale dans laquelle nous avons précédemment montré la présence de morphine par immunocytochimie et test ELISA (figure 29).

L'hippocampe est une structure bilatérale faisant partie du système limbique. Structuralement, l'hippocampe est formé du gyrus denté et de la corne d'Ammon qui est elle-même subdivisée en 3 régions: CA1, CA2 et CA3. Les principales fibres innervant l'hippocampe viennent, *via* la voie perforante, du cortex entorhinal qui est une structure où convergent des informations en provenance de tout le cortex. Dans l'hippocampe, les informations suivent un circuit neuronal trisynaptique: les cellules granulaires du gyrus denté envoient leurs axones (fibres moussues) vers le zone CA3. Ces axones font synapse avec les dendrites des cellules pyramidales de cette zone. Puis, les axones des cellules pyramidales de la zone CA3 projettent leurs axones vers les dendrites des cellules pyramidales de la zone CA1 (collatérales de Schaeffer). Celles-ci projettent à leur tour leurs axones vers le subiculum ou le cortex entorhinal qui sont les principales sorties de l'hippocampe (figure 32).

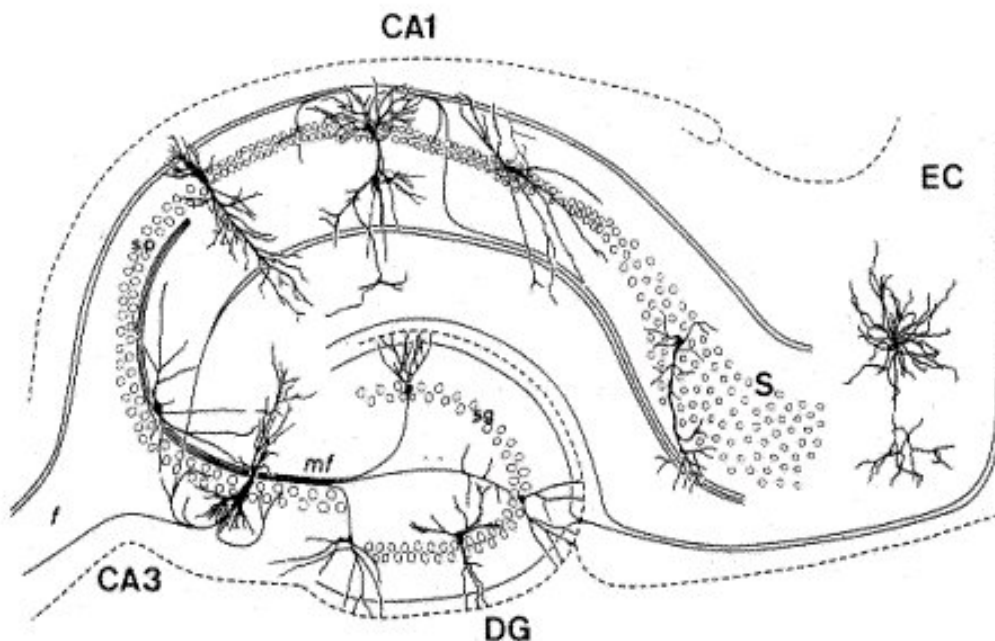


Figure 32: Schéma de l'hippocampe de souris. DG: gyrus denté. CA: corne d'Ammon. S: subiculum. EC: cortex entorhinal. mf: fibres moussues. f: fimbria.

Identification des cellules contenant de la morphine dans la zone sous granulaire du gyrus denté de souris adulte

Notre approche de microscopie optique indique que le marquage pour la morphine est le plus fort dans le gyrus denté de l'hippocampe (figure 33A). Un agrandissement réalisé sur cette structure a montré plus particulièrement un marquage dans la zone sous granulaire (ZSG, figure 33B) qui est une niche de neurogénèse pour les neurones en grain du gyrus denté (Taupin, 2006). Du fait de la spécificité relative de l'anticorps anti-morphine, les marquages observés peuvent correspondre à la morphine et à ses dérivés glucuronidés. Cependant, la souris est décrite comme ne produisant que de la M3G et pas de M6G (Zelcer et al., 2005). De ce fait, les marquages peuvent uniquement correspondre à la présence de morphine et/ou de M3G.

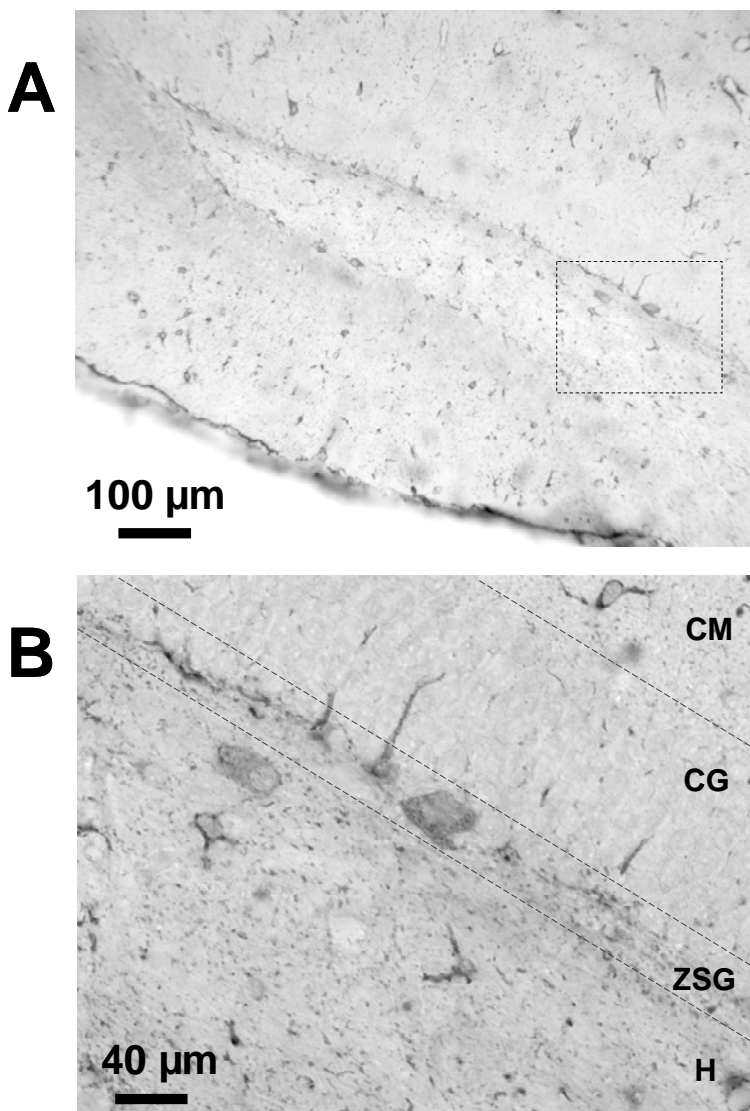


Figure 33: Immunoréactivité pour la morphine dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte. Un anticorps monoclonal de souris anti-morphine est utilisé sur des coupes sagittales de cerveau de souris C57BL/6 adultes. A: marquage observé dans le gyrus denté. B: Agrandissement de la zone encadrée en A. CG: couche des cellules granulaires. CM: couche moléculaire. H: hile. ZSG: zone sous granulaire.

Afin d'identifier les types cellulaires contenant de la morphine dans la ZSG (figure 34A), différents marqueurs immunohistochimiques ont été utilisés (figure 34B).

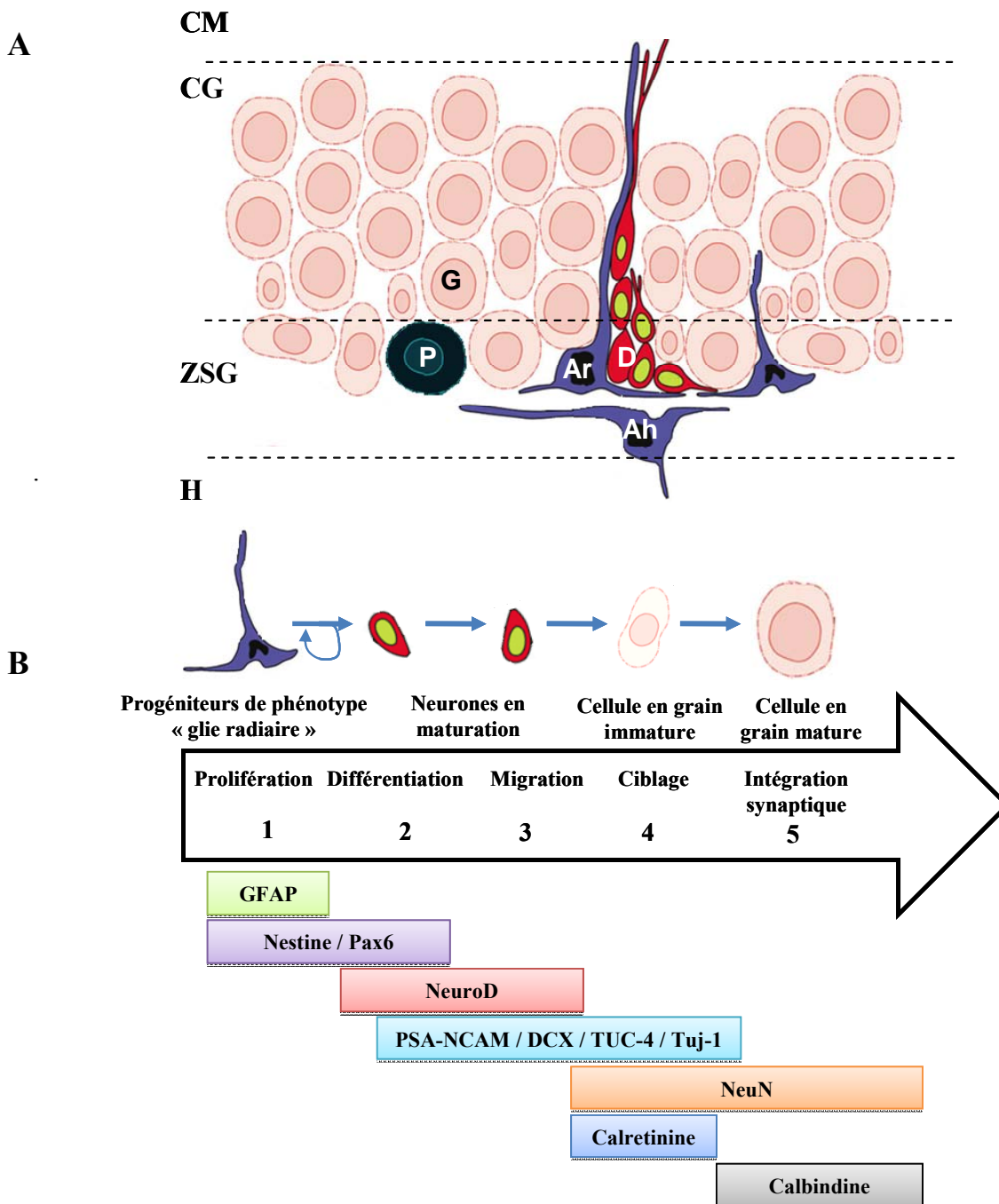


Figure 34: La zone sous granulaire du gyrus denté de l'hippocampe. **A:** Schéma du gyrus denté représentant les différents types cellulaires qui le compose. CM: couche moléculaire. CG: couche granulaire. ZSG: zone sous granulaire. H: hile. G: neurone en grain. P: interneurone en corbeille. D: neurones granulaires en maturation. Ar: astrocyte radiaire. Ah: Astrocyte horizontal. **B:** Différents marqueurs exprimés lors de la neurogenèse dans la ZSG de souris adulte (d'après von Bohlen Und Halbach, 2007).

Dans la ZSG, des progéniteurs de phénotype « glie radiaire », qui expriment la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) et la nestine, vont se différencier en neurones en maturation. Les neurones créés dans la ZSG vont ensuite migrer dans la couche granulaire du gyrus denté et se différencier en neurones en grain matures. La GFAP, qui est exprimée par les astrocytes matures, permet d'identifier les cellules de phénotype astrocytaire présentes dans la ZSG. Deux types de cellule de phénotype astrocytaire sont décrits dans cette zone: les astrocytes horizontaux et les astrocytes radiaires. Les astrocytes radiaires sont également appelés progéniteurs de phénotype « glie radiaire » et sont considérés comme les progéniteurs des cellules en grain en maturation de cette zone (figure 34).

Une approche de microscopie confocale m'a permis de visualiser un comarquage de la morphine (marquage rouge, figure 35) et de la GFAP (marquage vert), la GFAP marquant à la fois les astrocytes horizontaux et les astrocytes radiaires (figure 35). Afin de différencier ces deux populations d'astrocytes GFAP positives, j'ai utilisé un anticorps reconnaissant la nestine qui est un filament intermédiaire présent uniquement dans les progéniteurs de phénotype « glie radiaire » (GFAP et nestine positifs). La microscopie confocale a montré un marquage faible pour la nestine (violet) qui colocalise avec la GFAP et la morphine (figure 36A et 36B). De plus, la morphologie des cellules de phénotype astrocytaire contenant de la morphine (du fait de leurs prolongements qui s'étendent de la ZSG à la couche moléculaire), ainsi que le marquage faible à la nestine suggèrent que ces cellules correspondent aux progéniteurs de type « glie radiaire » présents dans la ZSG (figure 35A). Cependant, des études complémentaires seront nécessaires afin d'améliorer le marquage anti-nestine.

La colocalisation GFAP-morphine a également été observée dans d'autres régions du SNC, indiquant que la plupart des astrocytes contiennent de la morphine. En dehors de la ZSG, un marquage pour la morphine a été observé dans des grosses cellules de la couche granulaire n'exprimant pas de GFAP et pouvant correspondre à des neurones en corbeille (figure 35B, flèche). Des études complémentaires seront effectuées pour identifier ces cellules. Par ailleurs, j'ai observé un comarquage morphine-GFAP dans les pieds astrocytaires apposés sur les capillaires sanguins (figure 35C), suggérant une capture de la morphine sérique par les astrocytes.

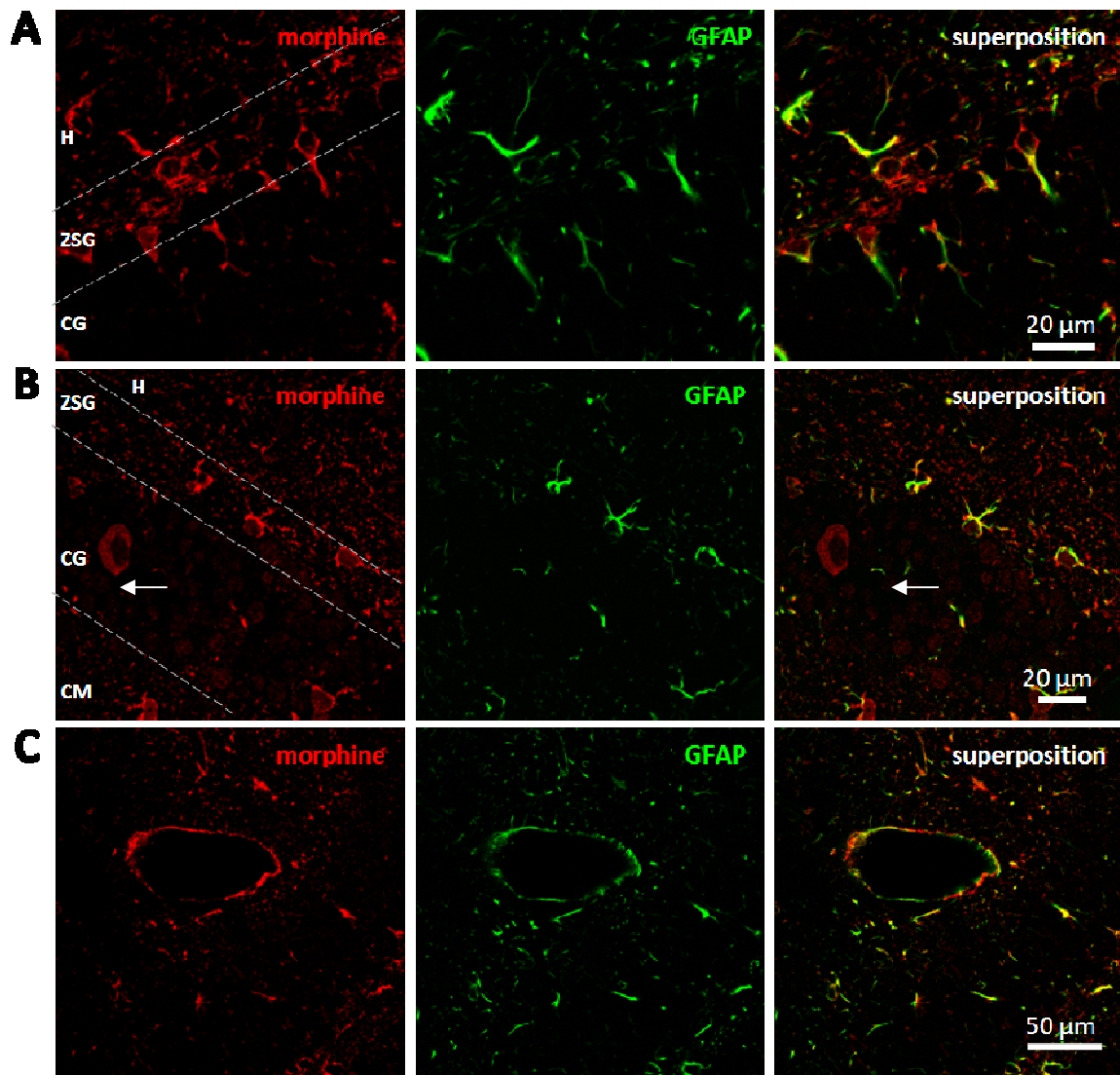


Figure 35: Etude par microscopie confocale de la localisation de la morphine et de la GFAP présentes dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte. A: Visualisation de cellules immunoréactives pour la morphine et la GFAP dans la ZSG. **B:** Visualisation d'une cellule positive pour la morphine (en rouge) et négative pour la GFAP (en vert) dans la couche des cellules granulaires (flèche). **C:** Comarquage morphine-GFAP (en jaune) observé dans des pieds astrocytaires apposés sur un capillaire sanguin. CG: couche des cellules granulaires. CM: couche moléculaire. H: hile. ZSG: zone sous granulaire.

Afin de compléter cette étude, j'ai utilisé en parallèle un anticorps dirigé contre la protéine Tuj-1 qui est exprimée par les neurones postmitotiques immatures. Un triple marquage a été effectué sur des coupes frontales d'hippocampe de souris pour observer la présence de GFAP (marquage vert), de morphine (marquage rouge) et de Tuj-1 (marquage violet). Comme précédemment, l'immunoréactivité à la morphine s'est avérée colocaliser (en jaune) avec la GFAP, tandis qu'aucune colocalisation n'est visible avec Tuj-1 (figure 36C et 36D). Ces résultats indiquent la présence d'une immunoréactivité pour la morphine dans des cellules de phénotype astrocytaire, incluant les progéniteurs de phénotype « glie radiaire ».

Nos données montrent également l'absence d'immunoréactivité pour la morphine dans les neurones en grain postmitotiques immatures de l'hippocampe.

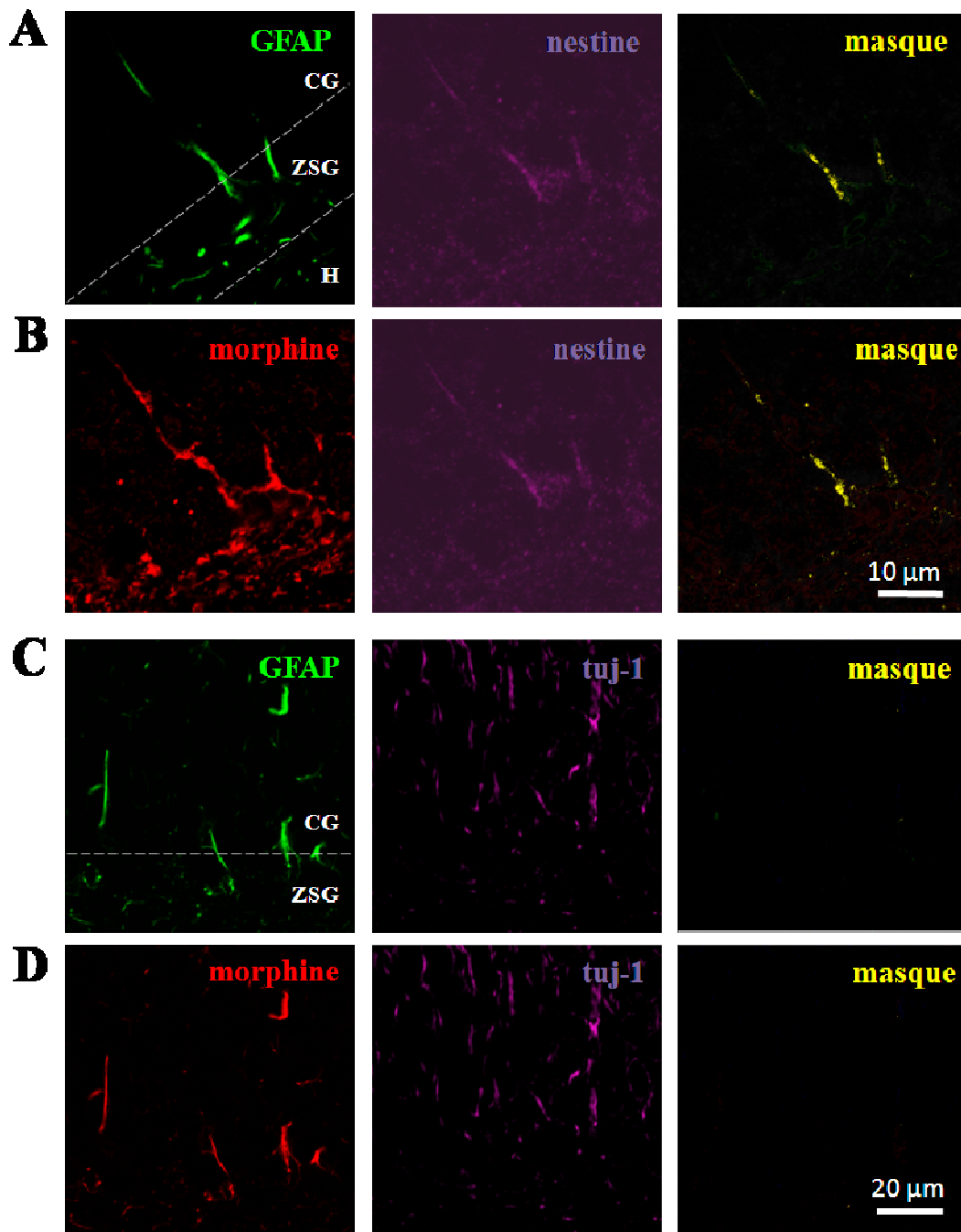


Figure 36: Etude par microscopie confocale de la colocalisation morphine-GFAP-Nestine et morphine-GFAP-Tuj-1 dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte. A: marquage GFAP-nestine. B: marquage morphine-nestine. C: marquages GFAP-Tuj-1. D: marquage morphine-Tuj-1. CG: Couche des cellules granulaires. CM: couche moléculaire. H: hile. ZSG: zone sous granulaire.

Mise en évidence d'une immunoréactivité à la morphine dans les astrocytes et les neurones en culture primaire: hypothèse d'une capture astrocytaire

Notre première approche effectuée sur les tranches d'hippocampe de souris a montré la présence d'une immunoréactivité pour la morphine dans les astrocytes et certains neurones. Ces observations m'ont amené à me questionner sur l'origine de la morphine dans les cellules de type astrocytaire: est-elle due à une synthèse ou une capture de morphine présente dans le milieu extracellulaire ?

Afin de mettre en évidence la présence de morphine endogène dans ces cellules *in vitro*, ma première approche a utilisé une culture primaire contenant à la fois des neurones et des astrocytes d'hippocampe de souris cultivés pendant deux semaines afin de leur laisser le temps d'atteindre un phénotype mature. Un comarquage morphine-GFAP a ensuite été réalisé sur ces cocultures et analysé par une approche de microscopie laser confocale. Cette approche m'a permis de montrer un marquage de la morphine (marquage rouge) et de la GFAP (marquage vert) dans les astrocytes, mais également la présence d'un immunomarquage pour la morphine dans les neurones GFAP négatifs (figure 37). L'immunoréactivité pour la morphine apparaît comme étant ponctiforme dans les neurones (correspondant probablement à un marquage vésiculaire), tandis que le marquage pour la morphine dans les astrocytes apparaît comme étant diffus (correspondant probablement à un marquage cytoplasmique).

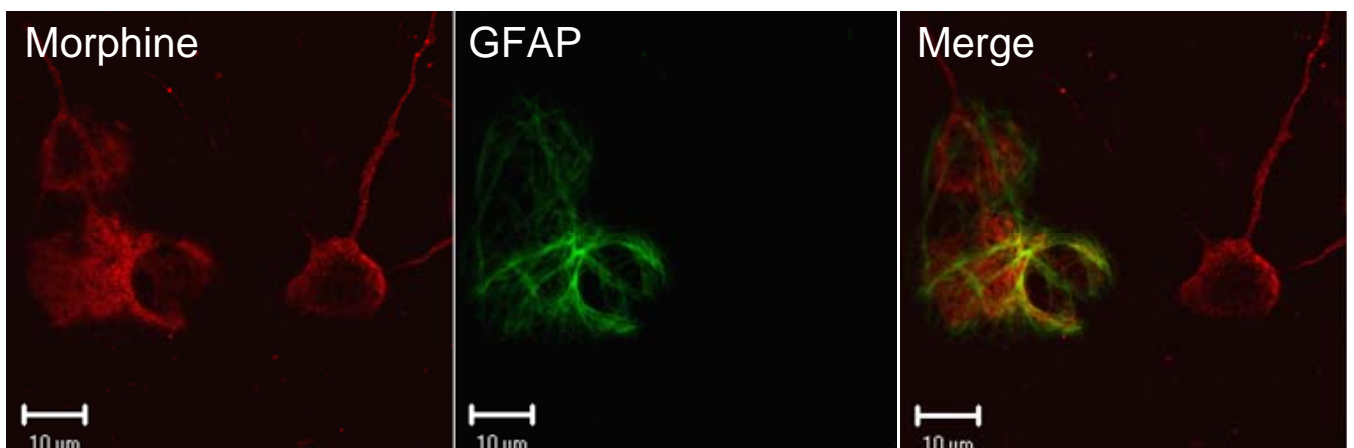


Figure 37: Etude par microscopie confocale de la présence d'une immunoréactivité à la morphine dans une coculture primaire d'astrocytes et les neurones d'hippocampe de souris.

Ainsi, un grossissement réalisé sur un astrocyte montre un marquage fibrillaire classique pour la GFAP, alors que le marquage de la morphine apparaît comme étant cytoplasmique (figure 38).

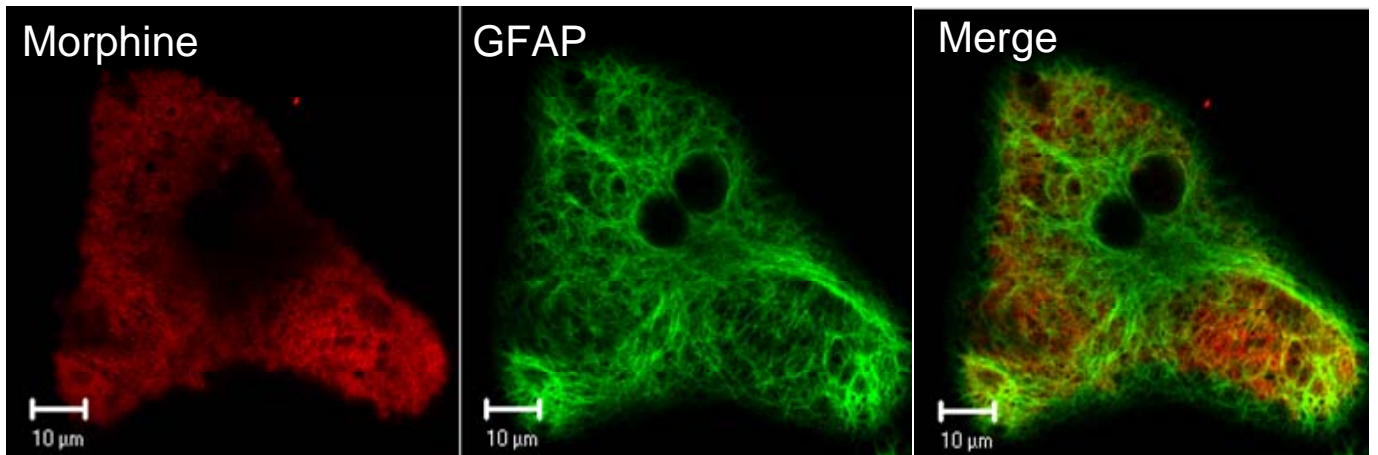


Figure 38: Observation au microscope confocal d'un astrocyte marqué avec l'anticorps anti-morphine (coculture de neurones et d'astrocytes d'hippocampe de souris).

J'ai également effectué des cultures primaires pures de neurones d'hippocampe. La protéine MAP-2 a été utilisée comme marqueur neuronal afin de vérifier la pureté de la culture (figure 39). Toutes les cellules visualisées en microscopie confocale étaient à la fois immunomarquées pour la protéine MAP-2 (marquage vert) et pour la morphine (en rouge).

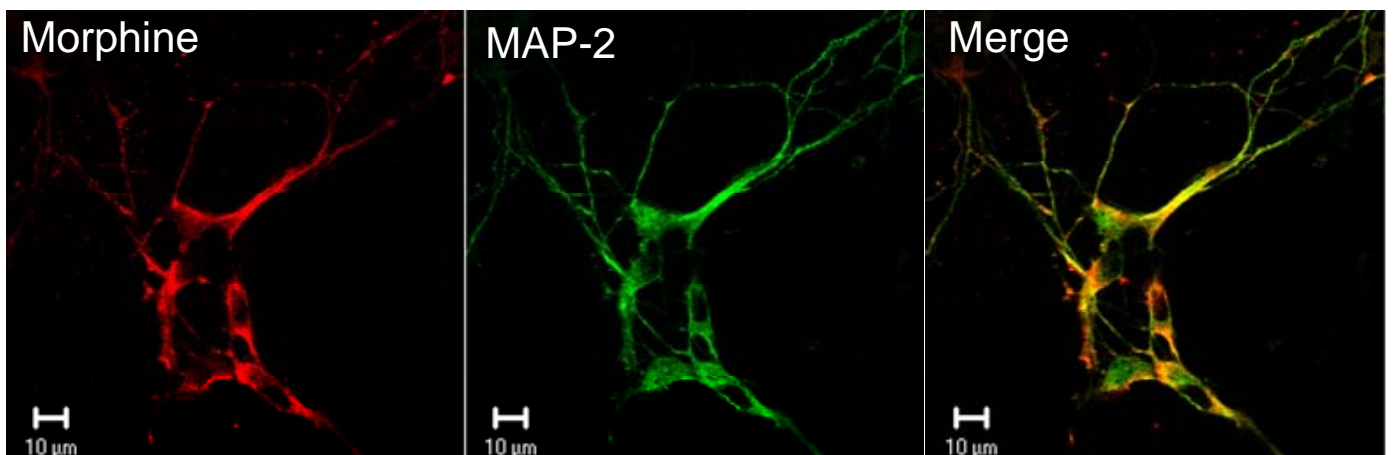


Figure 39: Présence d'une immunoréactivité à la morphine dans une culture primaire de neurones d'hippocampe de souris. La colocalisation apparaît en jaune sur la fenêtre Merge.

La présence d'une immunoréactivité pour la morphine dans les deux types cellulaires confirme que la morphine est présente dans les neurones et les astrocytes, mais ne permet pas de conclure sur l'origine de la morphine. Afin de clarifier ce résultat, une culture primaire d'astrocytes de souris a été réalisée. Un marquage pour la GFAP et au DAPI qui marque les noyaux, a permis d'évaluer par comptage que la proportion d'astrocytes dans notre culture était supérieure à 95%. Les 5% d'autres cellules pouvant correspondre à des fibroblastes ou des cellules endothéliales contaminantes. D'autre part, un comarquage morphine-GFAP réalisé sur cette culture d'astrocytes montre une immunoréactivité très faible pour la morphine (en rouge, figure 40A). A l'heure actuelle, nous ne savons pas si cette faible quantité de morphine provient des astrocytes ou des 5% de cellules contaminant la culture.

Afin de confirmer ce résultat et de s'affranchir des cellules non astrocytaires pouvant contaminer la culture, j'ai utilisé la lignée cellulaire U373-MG qui dérive d'un astrogliome humain. Cette lignée est utilisée comme modèle d'étude *in vitro* des astrocytes humains (Lieb et al., 2005). L'utilisation des mêmes anticorps anti-GFAP et anti-morphine ne m'a pas permis d'observer une immunoréactivité pour la morphine et ses dérivés dans cette lignée (figure 40B).

Ces résultats indiquent la présence de morphine dans les neurones primaires d'hippocampe en culture et suggèrent que les astrocytes primaires et la lignée cellulaire U373-MG sont incapables de synthétiser de la morphine *de novo*.

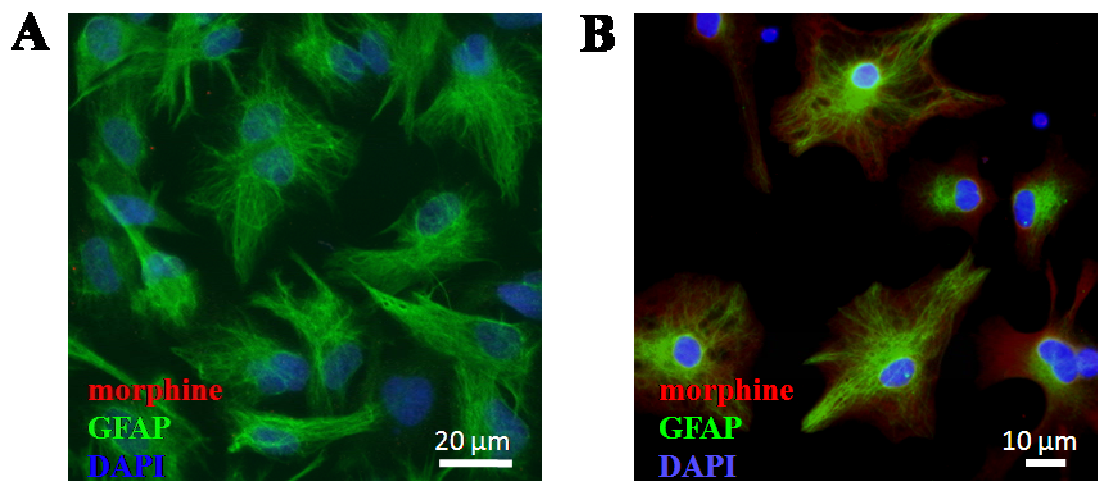


Figure 40: Etude par microscopie optique de l'immunomarquage GFAP-morphine-DAPI présent dans une culture primaire d'astrocytes de souris et dans une culture de cellules U373-MG. **A:** Présence d'une très faible immunoréactivité à la morphine dans des astrocytes de souris après deux semaines de culture. **B:** Absence d'immunoréactivité pour la morphine dans les cellules U373-MG.

L'ensemble de ces résultats suggère que ce sont principalement les neurones qui synthétisent de la morphine et que les astrocytes sont capables de capter la morphine sécrétée par les neurones à partir du milieu de culture.

Présence de morphine endogène lors du développement cérébral

La morphine est connue pour influencer la neurogénèse chez l'adulte (Mandyam et al., 2004; Eisch et al., 2000). De plus, des études *in vitro* ont montré que suivant sa concentration, la morphine possède des effets opposés sur la croissance de neurones en culture cellulaire (Tenconi et al., 1996; Brailoiu et al., 2004; voir chapitre 9.2c). Nous nous sommes donc demandé si la morphine endogène était impliquée dans le développement cérébral. J'ai ainsi réalisé une étude préliminaire dans laquelle j'ai étudié l'expression de morphine chez des embryons de souris à E15 (figure 41A). A ce stade embryonnaire, des progéniteurs neuronaux se multiplient et se différencient en neurones dans la zone ventriculaire. Les neuroblastes néoformés migrent alors vers les couches externes de la plaque corticale pour former le cortex (figure 41B).

De façon assez surprenante, à ce stade embryonnaire, un immunomarquage pour la morphine est observé pour un nombre très important de cellules de la zone ventriculaire et de la plaque corticale (figure 41A). Une des perspectives de l'équipe sera de suivre l'évolution de l'expression de la morphine chez des souris allant du stade embryonnaire E12 à l'âge adulte grâce à des marquages immunohistochimiques.

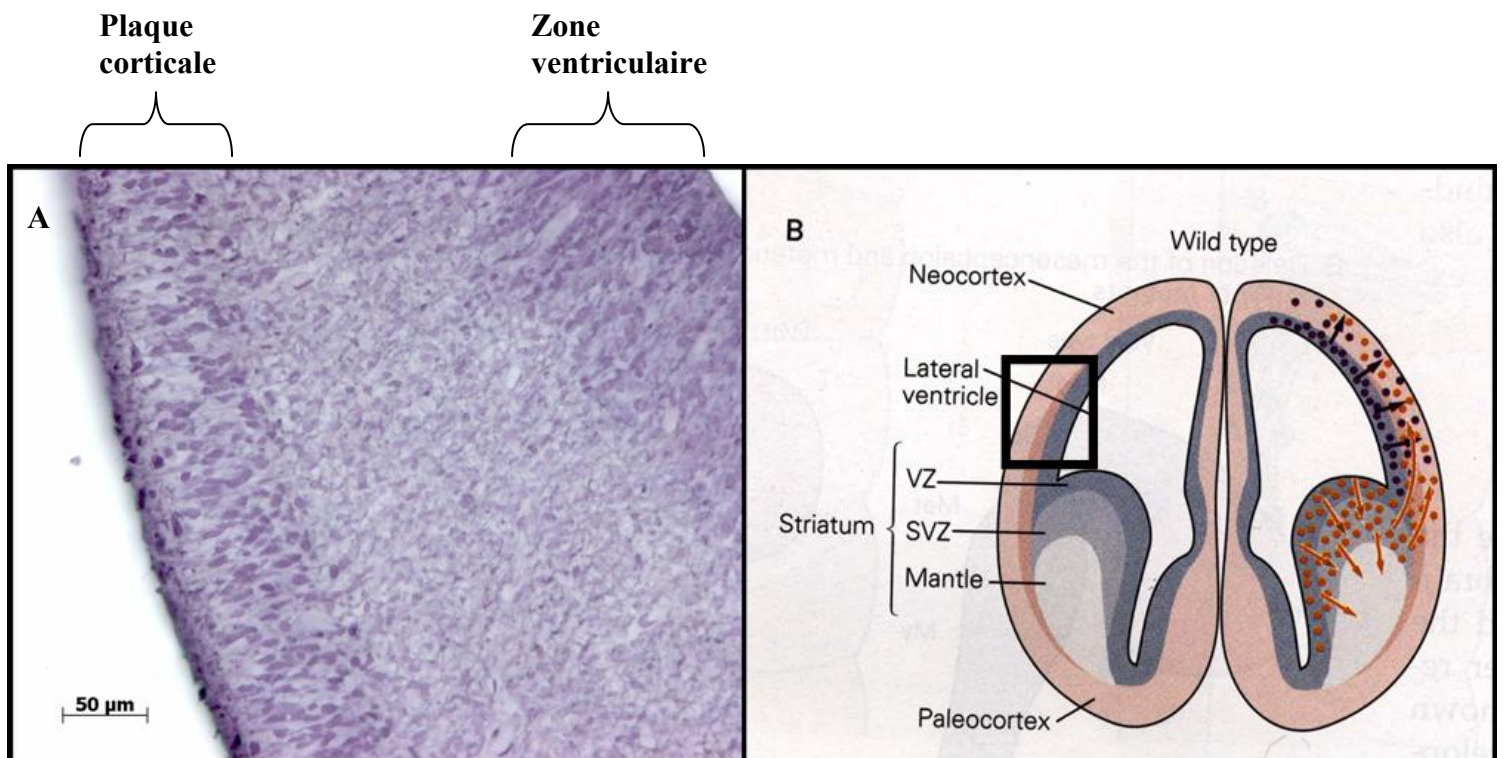


Figure 41: Immunomarquage d'une coupe d'embryon de souris E15 réalisé à l'aide d'un anticorps anti-morphine. A: Grossissement sur une coupe d'embryon E15 marqué pour la morphine. B: Schéma d'une coupe d'embryon de souris à E15 (d'après *Principles of neural science*, Kandel). Le carré noir représente la zone visible sur le panneau de gauche. Les flèches représentent la migration des neurones néoformés.

Discussion

Discussion

La plupart des études réalisées sur la morphine concerne la morphine exogène. Le but de ces études étant de mieux comprendre l'action de cette molécule lorsqu'elle est injectée à de fortes doses, comme c'est le cas en milieu hospitalier où la morphine est l'analgésique le plus utilisé. Cependant, depuis une vingtaine d'année de plus en plus de publications ont montré la présence endogène de morphine chez les mammifères et, à l'heure actuelle, plusieurs équipes à travers le monde étudient le rôle physiologique de cet alcaloïde endogène.

1) Présence de morphine endogène au sein des cellules chromaffines

Nos résultats montrent que la M6G est présente dans les granules de sécrétion et est sécrétée par les cellules chromaffines bovines. Ils suggèrent également que la PEBP représente une protéine liant la M6G au sein des granules chromaffines. Ainsi, la morphine est synthétisée à partir de la dopamine et pourrait lier la PEBP. Une partie de cette morphine peut alors être transformée en M6G par l'UGT2B. La M6G intragranulaire liée à la PEBP pourrait finalement être libérée dans la circulation lors des états de stress.

Il est intéressant de noter que la M6G, qui est normalement issue du catabolisme de la morphine dans le foie par l'UGT2B, est décrite comme étant de 1 à 600 fois plus analgésique que la morphine suivant les modèles d'étude (Lötsch et Geisslinger, 2001). Les données que nous avons obtenues sur les cellules chromaffines vont dans le sens de l'hypothèse de Yamada et coll. qui ont montré que la M6G est formée dans le cerveau humain et représentait un produit de l'anabolisme et non du catabolisme (Yamada et al., 2003). Dans les cellules chromaffines bovines (où la morphine n'a pas pu être détectée, car vraisemblablement en concentration trop faible), la M6G serait le produit final et la morphine représenterait un simple intermédiaire de synthèse. Cependant, nous ne savons pas si la M6G est également présente dans d'autres types cellulaires, ainsi que chez d'autres mammifères. Chez la souris, suite à une injection de morphine exogène, seule de la morphine et de la M3G ont été

détectées dans l'urine (Kuo et al., 1991). Chez l'homme, des études effectuées au laboratoire ont mis en évidence par spectrométrie de masse la présence de morphine et non de M6G dans le sérum de patients atteints de choc septique (Glattard et al., en révision). Cependant, des grandes quantités de M6G sont nécessaires pour être détectables en spectrométrie de masse, et des études *in vitro* ont montré que les UGTs humaines et de souris sont capables de transformer la morphine en M6G et M3G (Yamada et al., 2003; Kuo et al., 1991), mais à des ratios différents selon les espèces. Dans les cellules SH-SY5Y, qui dérivent d'un neuroblastome humain, nous avons montré la présence conjointe de morphine et de M6G (Muller et al., 2008). Il est ainsi tout à fait envisageable que, selon les espèces ou les types cellulaires, ce soit la M6G et/ou la morphine qui représente le produit final du métabolisme.

Une fois sécrétée, la morphine/M6G sanguine serait alors à même de médier des effets physiologiques *via* sa liaison aux récepteurs μ présents sur de nombreux types cellulaires. A titre d'exemple, les cellules constituant l'endothélium ou les cellules immunitaires possèdent des récepteurs de type μ liant la morphine et ses dérivés (Cadet et al., 2003; Makman, 1994). La liaison de la morphine sur ces récepteurs se traduit par une immunosuppression directe (inhibition directe des cellules immunitaires passant par la synthèse de NO) et indirecte (inhibition de la synthèse de molécules d'adhésion nécessaires au recrutement des cellules immunitaires aux sites d'inflammation par les cellules endothéliales) (Stefano et al., 2000). La morphine/M6G libérée pourrait créer une immunodépression qui atténuerait la réponse immunitaire excessive résultante d'une l'inflammation systémique. Cependant, à l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur les effets de la morphine/M6G à faible dose. Il est donc difficile de cerner le réel rôle physiologique d'une telle sécrétion.

Une autre hypothèse est que la morphine/M6G servirait à créer une analgésie bénéfique pour une « fuite » ou un « combat ». En effet, des cas d'analgésie sont décrits lors de stress intense, comme en temps de guerre où certains soldats racontent avoir été grièvement blessés sans avoir ressenti de douleur jusqu'à la fin des combats (Kurrikoff et al., 2008). Cette analgésie de stress est difficile à étudier et à modéliser. De façon intéressante, les peptides opioïdes endogènes et les endocannabinoïdes sont déjà décrits comme impliqués dans ce mécanisme (Vacarino et Kastin, 2001).

Il est également important de noter que la M6G est à l'heure actuelle en cours d'essais cliniques (phase III) et que l'utilisation de la M6G pour le traitement des douleurs postopératoires (i.v.) a montré un apport significatif par rapport à la morphine (d'après

l'entreprise Paion AG), ce qui souligne l'importance physiologique d'une telle molécule, mais aussi l'importance de mieux comprendre son mécanisme d'action.

Le rôle de la liaison de la M6G à la PEBP dans les cellules chromaffines bovines n'est pas encore défini. Cependant la PEBP pourrait représenter un transporteur de la M6G sécrétée et la protéger d'une clairance rénale. En effet, la M6G est très hydrophile et est rapidement éliminée dans l'urine.

2) Présence de la morphine endogène dans le système nerveux central

Lors de notre deuxième étude, nous avons montré la présence de M6G et de morphine au sein de la lignée SH-SY5Y dérivant d'une neuroblastome humain. Dans ces cellules, la morphine est contenue dans des vésicules de sécrétion et est libérée suite à une stimulation nicotinique induisant une dépolarisation. Nous avons également montré qu'à de très faibles concentrations la morphine et la M6G induisent des courants membranaires au sein des cellules SH-SY5Y. Dans le système nerveux central de souris, la morphine est contenue dans différentes structures incluant le cervelet et l'hippocampe. Dans le cervelet, la morphine est présente dans les terminaisons nerveuses des cellules en corbeille innervant le corps cellulaire des cellules de Purkinje. Dans l'hippocampe, la morphine est surtout présente dans la zone sous granulaire, à la fois dans des neurones et des astrocytes.

Sur la base des effets de la morphine et de la distribution de la morphine endogène et des ses récepteurs au sein du SNC, plusieurs chercheurs ont émis l'hypothèse que la morphine représente un neurotransmetteur/neuromodulateur du système nerveux central de mammifère.

2.1) La morphine endogène est-elle un neurotransmetteur ?

Un neurotransmetteur est une molécule libérée par un neurone au niveau d'une synapse, qui modifie de manière spécifique l'activité d'une autre cellule. Pour qu'une molécule soit considérée comme un neurotransmetteur, elle doit répondre à cinq critères: (1) être synthétisée par les neurones, (2) être stockée au niveau des terminaisons présynaptiques, (3) être libérée de façon calcium-dépendante dans la fente synaptique suite à une stimulation, en quantité suffisante pour induire une réponse de l'élément postsynaptique, (4) avoir des récepteurs spécifiques postsynaptiques, (5) et finalement être inactivée de manière spécifique *via* un mécanisme de dégradation ou de recapture.

2.1a La morphine est-elle synthétisée par des neurones ?

La morphine était déjà décrite comme pouvant être synthétisée par des neuroblastomes humains (Boettcher et al., 2005) et comme étant contenue dans des neurones de différentes zones du SNC (Meijerink et al., 1999; Neri et al., 2004). Nos études de microscopie électronique ont montré la présence de morphine dans des neurones en corbeille du cervelet. De plus, nos travaux ont indiqué qu'elle était synthétisée par des neurones primaires d'hippocampe en culture, ainsi que par la lignée SH-SY5Y.

2.1b La morphine est-elle stockée au niveau de terminaison présynaptique ?

A ce jour, seule une étude de Bianchi et coll. réalisée à l'aide d'une approche de microscopie électronique, a indiqué la présence de morphine dans les terminaisons synaptiques de neurones (Bianchi et al., 1994). Cependant, l'anticorps utilisé ne faisait pas la distinction entre la morphine et certains de ses dérivées, comme la codéine, la M6G ou la M3G. De plus, la résolution des images obtenues ne permettait pas de visualiser si la morphine était contenue dans des vésicules de sécrétion. Une séparation par gradient de sucrose d'extrait de moelle épinière de rats a cependant montré que la morphine était présente dans la fraction synaptosomale contenant les terminaisons synaptiques et riche en vésicules de sécrétion (Donnerer et al., 1987).

Notre étude de microscopie électronique réalisée sur le cerveau de souris a confirmé la présence de morphine dans des terminaisons présynaptiques provenant de cellules en corbeille du cervelet. Ces terminaisons font synapses sur les corps cellulaires des cellules de Purkinje qui sont décrits pour exprimer les récepteurs μ (Zhang et al., 2006).

2.1c La morphine est-elle être libérée de façon calcium-dépendante dans la fente synaptique suite à une stimulation de l'élément présynaptique ?

Une étude *in vitro* réalisée en 1998, utilisant des coupes de cerveau de rat privés de nourriture, a montré une libération de morphine en présence d'un milieu riche en potassium (50mM K^+) (Guarna et al., 1998). Un tel milieu induit une dépolarisation neuronale et une sécrétion de neurotransmetteurs (figure 42). Cette étude a indiqué que la sécrétion de morphine augmente de 0,1 ng par gramme de tissu et par minute dans des conditions basales à

0,5 ng/g/min dans un milieu riche en potassium. Cette augmentation d'un facteur 5 de la sécrétion est bloquée lorsque le calcium est retiré du milieu d'incubation, suggérant que la morphine serait sécrétée de manière calcium-dépendante.

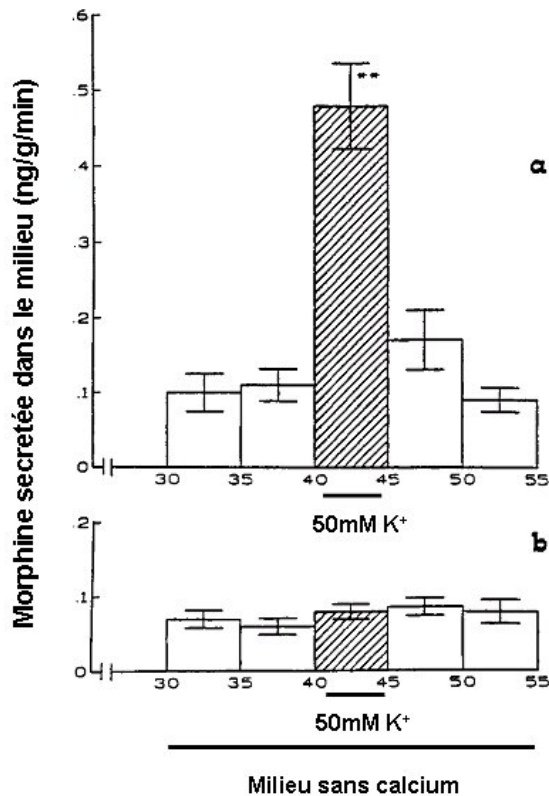


Figure 42: Sécrétion de morphine par des coupes de cerveau de rat (d'après Guarna et al., 1998). La sécrétion de morphine est mesurée par HPLC en réponse à une stimulation potassique dans un milieu avec (a) ou sans calcium (b).

Cette étude laissait supposer que les neurones présents dans les coupes de cerveau libéraient de la morphine suite à une dépolarisation. D'autre part, une autre étude *in vitro* a montré que des cellules chromaffines d'anguille libéraient de la morphine suite à une dépolarisation (Epple et al., 1993).

Nos travaux vont dans le sens de ces études, puisque nous avons montré qu'une stimulation nicotinique des cellules SH-SY5Y est capable d'induire la libération de la morphine de façon calcium dépendante. Cependant, il est nécessaire de confirmer ces résultats sur des cultures primaires de neurones.

2.1d Existe-t-il des récepteurs spécifiques postsynaptiques ?

L'expression des récepteurs μ au niveau des synapses présentes au sein du SNC, ainsi que la transduction du signal suite à l'activation du récepteur, sont largement décrites dans la littérature (voir chapitre 6). Les récepteurs μ sont présents à la fois sur la membrane présynaptique et postsynaptique de certains neurones de différentes zones du SNC, comme la moelle épinière (Arvidsson et al., 1995), le striatum (Olive et al., 1997), l'aire tegmentale ventrale (Garzón et Pickel, 2002), le cervelet (Mrkusich et al., 2004) ou l'hippocampe (Stumm et al., 2004).

2.1e Existe-t-il un système de recapture ou de dégradation de la morphine ?

Les seules informations concernant la dégradation de la morphine proviennent de l'étude son catabolisme dans le foie après une administration de morphine exogène (voir chapitre 3). Cependant, les données de la littérature nous donnent plusieurs pistes pour envisager un système d'inactivation de la morphine libérée dans les fentes synaptiques.

En général, les neurotransmetteurs, une fois sécrétés dans la fente synaptique, sont rapidement inactivés par un des trois mécanismes suivants :

(1) Une dégradation enzymatique qui est principalement décrite pour les synapses cholinergiques. Ainsi, l'acétylcholinestérase présente dans la fente synaptique va convertir l'acétylcholine en choline et en acétate. La choline est alors capturée par l'élément présynaptique pour être réutilisée (Phillis, 2005).

(2) Les peptides neuroactifs, comme la substance P ou la Met-enképhaline, diffusent hors des synapses. Ils ne sont alors plus à portée des récepteurs synaptiques et sont inactivés par des peptidases extracellulaires (*i.e.*, l'enképhalinase pour les enképhalines et la calpaine pour la substance P) (Mauborgne et al., 1987)

(3) La recapture qui est le mécanisme le plus répandu (dopamine, glutamate, GABA), qui permet en une seule étape à la fois l'arrêt de l'action du neurotransmetteur et son recyclage. Elle est réalisée par des transporteurs plus ou moins spécifiques qui sont présents sur les neurones présynaptiques (*eg.*, la DAT pour la dopamine) (Nikolaus et al., 2007). De plus, les astrocytes peuvent également participer à ce processus. Ils expriment deux transporteurs spécifiques au glutamate (GLAST et GLT-1) qui vont capturer ce neurotransmetteur pour le retransformer en glutamine. La glutamine formée sera alors transportée vers les neurones pour être convertie en glutamate (Sibson et al., 2001).

Même si aucune étude n'a encore été menée au niveau de la fente synaptique pour la morphine, l'hypothèse d'une recapture de morphine est la plus probable. En effet, certains transporteurs sont déjà décrits comme ayant la morphine comme substrat et comme étant présents sur des neurones ou des astrocytes (voir chapitre 4). De plus, d'autres études rapportent la présence d'enzymes impliquées dans la conversion de la morphine en M3G inactive (*e.g.*, UGT1A6, UGT2B7) à la fois dans des neurones et des astrocytes primaires (Suleman et al., 1998; Heurtaux et al., 2006). Ces données suggèrent que les astrocytes pourraient participer à la formation de M3G dans le SNC.

Nos études réalisées sur des cultures et des coupes de cerveaux indiquent que la morphine est capturée à partir du milieu par des astrocytes de souris en culture primaire. Ainsi, une de nos hypothèses est que la morphine serait captée par des neurones ou des astrocytes, afin d'être réutilisée ou d'être transformée en M3G. Un nouvel étudiant en thèse de l'équipe (Alexis Laux) a débuté l'étude du système de dégradation de la morphine endogène. Une cinétique de capture de ^3H -morphine a été réalisée en incubant des cellules U373-MG et des astrocytes avec 550Bq de ^3H -morphine durant différents temps. La radioactivité présente dans les cellules a été analysée et est proportionnelle à la quantité de ^3H -morphine captée. Cette approche a permis d'observer une augmentation de la quantité de radioactivité contenue dans les cellules en fonction du temps d'incubation (figure 43). Cette étude a montré une augmentation significative de la quantité de radioactivité intracellulaire à partir de 60 min d'incubation pour la lignée U373-MG, et à partir de 20 min d'incubation pour les astrocytes de souris en culture primaire. La capture de ^3H -morphine semble être maximale pour les deux types cellulaires au bout de 3 h. Ces résultats indiquent qu'une capture de morphine est réalisée par ces deux types cellulaires. Des expériences similaires vont maintenant être effectuées sur des neurones de souris en culture primaire et des cellules SH-SY5Y.

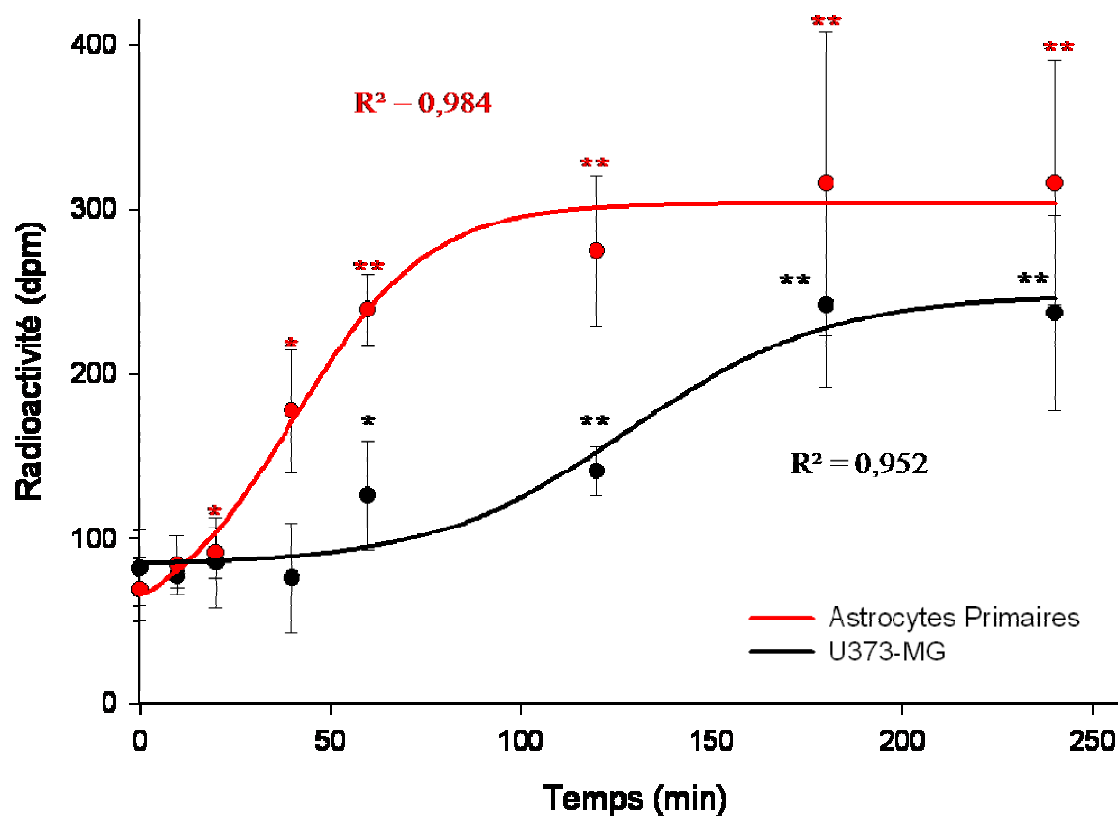


Figure 43: Cinétique de capture de la ^3H -morphine par les U373-MG et les astrocytes de souris. Incubation de ^3H -Morphine ($0,371 \mu\text{M}$, 550 Bq) en présence d'astrocytes et de cellules U373-MG durant différentes périodes. Une régression sigmoïdale est appliquée aux deux séries. Le test statistique non paramétrique de Mann-Withney a été utilisé pour tester les différences entre les différents points et le temps $T=0$. Une différence est considérée comme significative avec un $p < 0,05$. *, $p < 0,05$. **, $p < 0,01$. $n=6$.

En perspectives, il serait intéressant d'étudier l'implication des transporteurs connus de la morphine en montrant leur présence par RT-PCR et Western blot au sein des astrocytes et neurones en culture primaire, des cellules SH-SY5Y et des cellules U373-MG, puis en incubant les cellules avec de la ^3H -morphine en présence ou non d'inhibiteurs des transporteurs d'intérêt. De façon assez surprenante, une étude préliminaire a montré l'implication de la DAT, le transporteur de la dopamine, dans la capture de morphine par les cellules SH-SY5Y. Cette donnée est très intéressante, car la voie de synthèse de la morphine inclut celle de la dopamine.

Sur cette base, une de nos hypothèses est que lorsque la morphine est présente en quantité importante dans le SNC suite à une injection de morphine ou d'héroïne (diacétylmorphine qui est transformée en morphine dans le SNC), il pourrait y avoir une compétition avec la recapture de la dopamine par la DAT. Cette compétition entrainerait alors une augmentation de la quantité de dopamine dans les fentes synaptiques. Or, l'augmentation de la concentration de dopamine dans le noyau accumbens est décrite étant comme responsable des phénomènes d'addiction à de nombreuses drogues (pour revue Di Chiara et al., 2004). La morphine et l'héroïne sont décrites comme étant les drogues entraînant une forte dépendance, et il est donc envisageable que la compétition entre la morphine et la dopamine pour le récepteur DAT soit impliquée dans les effets addictifs des opiacées.

De plus, les transporteurs de la morphine pourraient également être impliqués dans les phénomènes de tolérance. La tolérance se traduit par une diminution des effets de la morphine lors d'administrations répétées. Chez des animaux rendus tolérants à la morphine par des injections chroniques, il a été montré une surexpression du transporteur Pgp (Aquilante et al., 2000). Ce phénomène, qui est observé en clinique chez des patients traités de façon chronique, pourrait être dû à une surexpression de la Pgp, qui accélérerait la sortie de morphine hors du système nerveux central. Une autre hypothèse envisagée est que la présence de morphine en excès de façon chronique pourrait entraîner une surexpression du système de catabolisme central de la morphine. La morphine serait alors plus rapidement dégradée, entraînant une baisse des effets et la tolérance.

Afin de confirmer la capture de morphine par les astrocytes et les neurones, une approche shRNA (Short Airpin RNA) sur les cellules U373-MG et SH-SY5Y permettra de réaliser des lignées stables pour lesquelles l'expression d'un transporteur sera abolie et de confirmer ainsi l'implication de ce transporteur dans la recapture la morphine (*e.g.*, OATP, MRP, DAT...). Une autre étude se focalisera plus particulièrement sur le mécanisme de dégradation de la morphine par les astrocytes. Ainsi, l'utilisation de la technique de capture de ³H-morphine couplée à une approche d'HPLC de phase inverse, suivie d'une analyse par scintillation des fractions éluées, permettra de purifier les alcaloïdes tritiés présents dans le milieu et les cellules. Cette approche permettra d'observer la formation de glucuronides (*i.e.*, M3G ou M6G) par les astrocytes primaires. D'autre part, une approche shRNA permettra de mettre en évidence les enzymes impliquées dans cette dégradation (*i.e.*, UGT2B7, voir chapitre 3.1).

Une meilleure compréhension du mécanisme de dégradation de la morphine au niveau cérébral est très importante. La morphine exogène passe rapidement (5 à 10 min) la BHE (Stain-Textier et al., 1999) et agit sur le SNC *via* sa liaison aux récepteurs μ . Or, dès 2000, un système de catabolisme de la morphine exogène dans le cerveau a été suggéré (Nagano et al., 2000). La compréhension d'un tel mécanisme fournirait de nouvelles informations, par exemple sur les mécanismes impliqués dans l'élimination de la morphine endogène et exogène, mais également sur la tolérance et la dépendance à la morphine. En effet, la tolérance à la morphine est décrite comme résultante d'une régulation du fonctionnement et de l'expression des récepteurs μ du SNC. L'implication de l'augmentation de l'expression du système de dégradation de la morphine n'a jamais été envisagée et pourrait en partie contribuer à la mise en place de la tolérance.

En conclusion, de plus en plus d'études confirment l'hypothèse de la morphine comme neurotransmetteur du SNC (pour revue Guarna et al., 2005). Afin de prouver définitivement que la morphine est un neurotransmetteur, il est important d'étudier son système d'inactivation au niveau synaptique et de montrer que de la morphine est bien libérée par des neurones suite à une dépolarisation. Quant au rôle de la morphine dans le SNC, il dépend probablement, comme pour les autres neurotransmetteurs, des circuits neuronaux dans lesquels elle est exprimée.

2.2) Présence de morphine endogène dans le cervelet de souris

Nos travaux ont montré la présence de morphine au sein du cervelet, et plus particulièrement dans les cellules en corbeille innervant les cellules de Purkinje. Quel pourrait être le rôle de cette molécule endogène au sein du cervelet ? Le cervelet est principalement impliqué dans la coordination des mouvements, mais est également lié à d'autres fonctions motrices et cognitives. La morphine est contenue dans des cellules en corbeille qui sont des interneurons GABAergiques faisant synapse sur les corps cellulaires des cellules de Purkinje. Les cellules de Purkinje intègrent différentes informations sensorielles et motrices. Les axones des cellules de Purkinje sont les seules sorties du cortex cérébelleux vers les noyaux profonds du cervelet (voir figure 44). L'activité des cellules de Purkinje est modulée

par différents interneurones GABAergiques inhibiteurs, incluant les cellules étoilées ou les cellules en corbeille (voir figure 42).

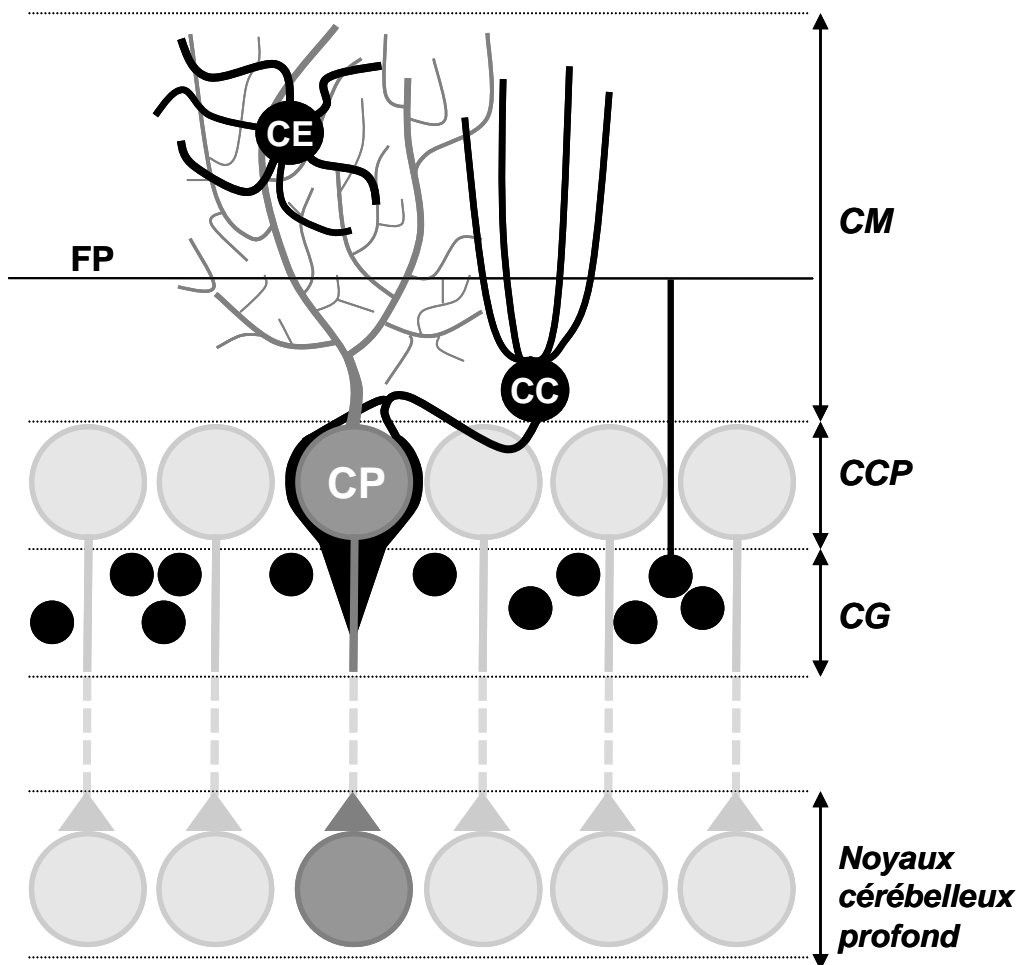


Figure 44: Schéma de l'organisation cellulaire au sein du cervelet. CE: cellule étoilée. FP: fibre parallèle. CC: cellule en corbeille. CP: cellule de Purkinje. CM : couche moléculaire. CCP: couche des cellules de Purkinje. CG: couche granulaire.

La morphine est donc présente dans des cellules en corbeille qui sont GABAergiques. Or, ces cellules ne sont pas décrites comme synthétisant de la dopamine, molécule qui fait partie de la voie de synthèse de la morphine. Cependant, différentes hypothèses sont envisageables pour expliquer la présence de morphine dans ces cellules:

- il existe une voie de synthèse différente pour la morphine endogène dans les cellules en corbeille n'utilisant pas de dopamine. Cependant, une étude récente a montré que chez des

souris invalidées pour le gène de la tyrosine hydroxylase, chez lesquelles la dopamine est absente du SNC, la morphine endogène n'était pas présente à un niveau détectable (Neri et al., 2008). De plus, la baisse de la concentration cérébrale de dopamine chez ces souris corrèle avec la baisse du taux cérébral de morphine. La dopamine semble donc nécessaire à la synthèse de morphine endogène.

- la dopamine est recapturée par les neurones en corbeille, puis transformée en morphine. Des innervations catécholaminergiques arrivent dans le cervelet, principalement noradrénergiques mais aussi dopaminergiques (Nelson et al., 1997; Panagopoulos et al., 1991). Cependant, ces innervations semblent longer des cellules en corbeille sans établir de contact synaptique (Abbott et Sotelo, 2000). La dopamine pourrait également être recapturée à partir des cellules de Purkinje. En effet, différentes études montrent que ces cellules expriment la tyrosine hydroxylase. Cependant, la synthèse de dopamine par ces cellules est toujours sujet à débat au sein de la communauté scientifique (pour revue Nelson et al., 1997).

- une autre hypothèse est que la dopamine n'est exprimée par les cellules en corbeille que dans des conditions particulières. Une étude réalisée sur des fœtus humains décrit un immunomarquage positif pour la tyrosine hydroxylase, enzyme impliquée dans la synthèse de dopamine, sur des cellules en corbeille du cervelet (Yew et al., 1995). Les cellules en corbeille embryonnaires semblent donc posséder la machinerie enzymatique nécessaire à la synthèse de dopamine, mais semblent perdre cette capacité à l'état adulte. Cependant, une étude a montré qu'une injection de méthamphétamine chez des souris induisait la synthèse de tyrosine hydroxylase dans différents types cellulaires (*e.g.*, les cellules de Purkinje) qui ne l'expriment pas ou très faiblement dans des conditions contrôles. Il est ainsi envisageable que certains stimuli induisent de façon transitoire la production de dopamine par les cellules en corbeille.

Une fois sécrétée, la morphine se lie à des récepteurs μ qui vont activer des protéines G de la classe Gi/Go et qui vont inhiber l'activité cellulaire (chapitre 6.2). Or, ces récepteurs μ sont décrits comme étant présents à la surface des cellules de Purkinje (Mrkusich et al., 2004). Nos données suggèrent que la morphine pourrait être cosécétrée avec le GABA par les cellules en corbeille et pourrait ainsi inhiber l'activité spontanée des cellules de Purkinje. En effet, la morphine est décrite pour inhiber l'activité des ces cellules chez le chat (Suzuki et Taguchi, 1983). Une étude plus récente a montré que l'application par microiontophorèse de morphine directement sur des cellules de Purkinje pouvait avoir un effet excitateur ou

inhibiteur sur la fréquence de décharge de ces cellules suivant la cellule de Purkinje enregistrée (Taguchi et al., 2000).

Il existe également des interactions entre la morphine et le GABA. L'effet excitateur de la morphine sur les cellules de Purkinje est inhibé par la naloxone, alors que l'effet inhibiteur de la morphine est quant à lui insensible à la naloxone, mais sensible à la bicuculline ou la picrotoxine qui sont des antagonistes GABA (Taguchi et al., 2000). De plus, l'application de morphine bloque l'effet du GABA appliqué par microiontophorèse sur des cellules de Purkinje (Moises, 1987). Des administrations chroniques de morphine entraînent également une baisse de la liaison du GABA radiomarquée sur des coupes de cervelet (Ticku et Huffman, 1980). Une des hypothèses est que la morphine pourrait moduler et diminuer l'activité du récepteur GABA et ainsi avoir un effet excitateur sur les cellules de Purkinje. Cette interaction entre le GABA et la morphine sur la modulation des cellules de Purkinje sera étudiée prochainement de façon détaillée grâce à des études d'électrophysiologie sur tranches de cervelet et des cellules dissociées par le Dr Omar Taleb.

2.3) Présence de morphine endogène dans l'hippocampe de souris

Nos études montrent la présence de morphine dans des cellules de phénotype astrocytaire, incluant les progéniteurs de phénotype « glie radiaire » dans la ZSG du gyrus denté de l'hippocampe de souris adulte. En dehors de la ZSG, un marquage pour la morphine a été observé dans des astrocytes, ainsi que dans de grosses cellules de la couche granulaire n'exprimant pas de GFAP et pouvant correspondre à des neurones.

L'hippocampe est une des structures les plus étudiées du SNC. Les premières données sur son fonctionnement proviennent de patients avec des lésions comme le fameux patient H.M (Scoville et Milner, 1957). Une lésion bilatérale de l'hippocampe entraîne une amnésie antérograde et une incapacité à acquérir de nouveaux souvenirs conscients alors que la mémoire à court terme, la mémoire procédurale et les souvenirs antérieurs à la lésion sont conservés (Rempel-Clower et al., 1996). Une des hypothèses actuelles, dite théorie déclarative, est que l'hippocampe et d'autres structures diencephaliques fixent et consolident les connaissances de type déclarative. Ces connaissances déclaratives seraient ensuite stockées dans le cortex cérébral.

En plus de son rôle dans la mémoire, l'hippocampe est également étudié pour sa neurogénèse à l'état adulte. En effet, il existe deux zones qui sont le siège d'une neurogénèse continue dans le cerveau de mammifère adulte: la zone sous-ventriculaire (ZSV) bordant le ventricule latéral et la zone sous-granulaire (ZSG) du gyrus denté de l'hippocampe. Une fois formés, les neurones générés dans la ZSV vont migrer vers le bulbe olfactif, alors que les neurones créés dans la ZSG vont migrer dans la couche granulaire du gyrus denté pour former les neurones en grain et projeter vers la zone CA3, s'intégrant fonctionnellement à cette structure (Taupin, 2006).

Nous avons montré qu'une immunoréactivité à la morphine était présente dans les progéniteurs de phénotype « glie radiaire » qui vont générer des neurones, mais était absente dans des neurones immatures. Or, plusieurs études ont montré que la morphine exogène est capable de réguler la neurogénèse et la survie des progéniteurs neuronaux (voir chapitre 9.2c). Ainsi, un traitement chronique à la morphine à forte concentration inhibe de plus de 30% la neurogénèse dans la ZSG de rat ou de souris (Eisch et al., 2000; Mandyam et al., 2004). Ainsi, il est possible que la morphine endogène ait également un rôle dans l'inhibition de la neurogénèse. Une fois qu'elle n'est plus exprimée par les neurones immatures générés par les astrocytes de phénotype « glie radiaire », les cellules pourraient se différencier en neurones matures. Cependant cette hypothèse n'explique pas la présence de morphine dans des neurones matures comme les cellules en corbeille du cervelet.

Afin d'étudier le rôle de la morphine dans la neurogénèse, nous allons marquer des cellules aux différents stades de développement cellulaire et vérifier quelles cellules contiennent de la morphine. Une étude préliminaire a déjà montré qu'à E15 la morphine est exprimée par un nombre très important de cellules de la zone ventriculaire et de la plaque corticale (figure 41A). Or, à E15 les neurones sont néoformés dans la zone ventriculaire, puis migrent dans la plaque corticale. Les neurones immatures semblent donc contenir de la morphine à ce stade embryonnaire. Cependant à l'âge adulte peu de neurones expriment de la morphine endogène. Il sera intéressant de suivre l'évolution de l'expression de la morphine au sein des neurones néoformés. Les cellules néoformées pourront ainsi être visualisées après injection de bromodéoxyuridine (BrdU). Lorsque le BrdU est administré à un animal, il s'incorpore à la place de la thymidine dans l'ADN néosynthétisé. Il est alors possible, a posteriori, de retrouver la trace des cellules qui ont incorporé le marqueur grâce à des anticorps anti-BrdU (figure 45). Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle de la morphine endogène dans la neurogénèse et dans la mise en place du SNC.

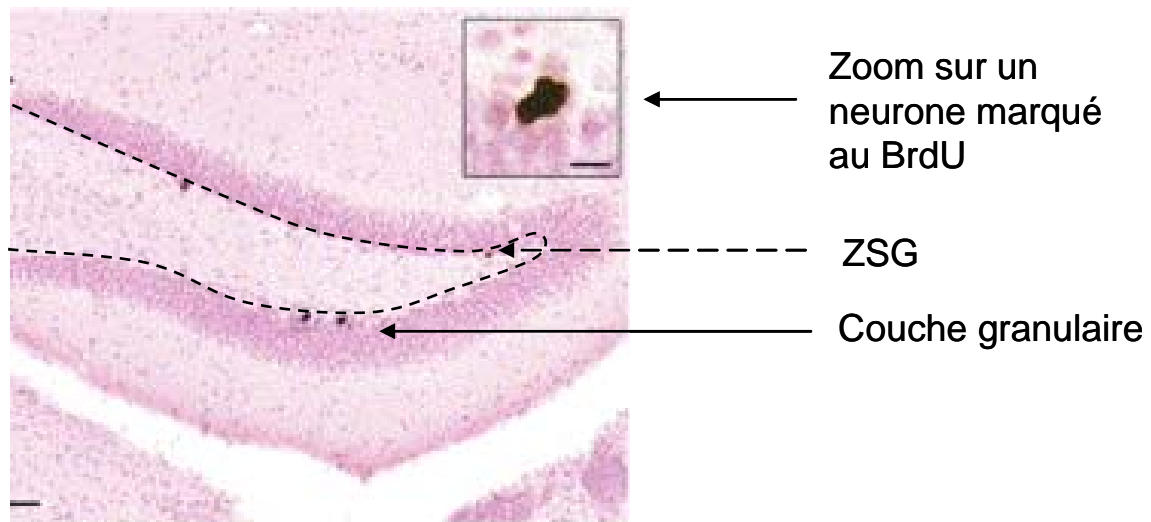


Figure 45: Marquage du BrdU incorporé par les neurones néoformés dans la ZSG du gyrus denté de souris adulte (d'après Harburg et al., 2007).

La morphine est également présente au sein d'astrocytes en dehors de la ZSG, à la fois dans le corps cellulaire et dans des pieds astrocytaires. Nous avons montré que des astrocytes en culture primaire ne synthétisent pas *de novo* de morphine, mais sont capables de capter de la morphine à partir du milieu extracellulaire. Notre hypothèse est qu'*in vivo* la morphine présente dans les astrocytes provient d'une recapture, soit à partir du sang *via* les pieds astrocytaires, soit à partir du milieu extracellulaire suite à une libération de morphine par des neurones.

Conclusion

Les études effectuées durant ma thèse montrent la présence de morphine endogène et de l'un de ces dérivés, la M6G, dans des granules de sécrétion des cellules chromaffines et dans la lignée cellulaire SH-SY5Y qui dérive d'un neuroblastome. Au sein du système nerveux central de souris, la morphine est contenue dans des astrocytes et dans certains neurones matures. Des études préliminaires indiquent également la présence de morphine dans des progéniteurs neuronaux de la zone sous ventriculaire du gyrus denté. Nos études vont dans le sens d'un rôle de neurotransmetteur pour la morphine endogène. Cependant, il reste encore à mieux comprendre son système de catabolisme dans la fente synaptique.

Personnellement, je suis convaincu de l'importance de la morphine endogène dans le fonctionnement cérébral. La grande diversité des variants de récepteurs μ , ainsi que la présence de neurones contenant de la morphine endogène dans de nombreuses structures du SNC, laissent supposer de multiples fonctions pour cet alcaloïde endogène. Nous ne sommes qu'au début de la recherche sur la morphine endogène et le rôle physiologique de cette molécule commence à peine à être étudié. Une meilleure compréhension du système «morphinergique» sera une avancée majeure pour l'étude de la physiologie du système nerveux et du système neuroendocrine et permettra de mieux comprendre le mode d'action de l'analgésique le plus utilisé par l'homme depuis le début de la médecine.

Bibliographie

Bibliographie

A

- Abbadie, C., Pan, Y., Drake, CT. et al. (2000). Comparative immunohistochemical distributions of carboxy terminus epitopes from the mu-opioid receptor splice variants MOR-1D, MOR-1 and MOR-1C in the mouse and rat CNS. *Neuroscience* 100, 141-153.
- Abbadie, C., Gultekin, SH. and Pasternak, GW. (2000). Immunohistochemical localization of the carboxy terminus of the novel mu opioid receptor splice variant MOR-1C within the human spinal cord. *Neuroreport* 11, 1953-1957.
- Abbadie, C., Pan, YX. and Pasternak, GW. (2000). Differential distribution in rat brain of mu opioid receptor carboxy terminal splice variants MOR-1C-like and MOR-1-like immunoreactivity: evidence for region-specific processing. *J. Comp. Neurol.* 419, 244-256.
- Abbott, LC. and Sotelo, C. (2000). Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in weaver and normal mouse cerebellar cortices. *J. Comp. Neurol.* 426, 316-329.
- Akil, H., Mayer, DJ. and Liebeskind, JC. (1976). Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* 191, 961-962.
- Ambudkar, SV., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, ZE. et al. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22, 7468-7485.
- Aquilante, CL., Letrent, SP., Pollack, GM. et al. (2000). Increased brain P-glycoprotein in morphine tolerant rats. *Life Sci.* 66, PL47-51.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Chakrabarti, S. et al. (1995). Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J. Neurosci.* 15, 3328-3341.

Ault, DT. and Werling, LL. (2000). SH-SY5Y cells as a model for sigma receptor regulation of potassium-stimulated dopamine release. *Brain Res.* 877, 354-360.

Aunis, D., Bouclier, M., Pescheloche, M. et al. (1977). Properties of membrane-bound dopamine-beta-hydroxylase in chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* 29, 439-447.

Aunis, D. (1998). Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int. Rev. Cytol.* 181, 213-320.

B

Ballatori, N., Hammond, CL., Cunningham, JB. et al. (2005). Molecular mechanisms of reduced glutathione transport: role of the MRP/CFTR/ABCC and OATP/SLC21A families of membrane proteins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 238-255.

Beaulieu, E., Demeule, M., Ghitescu, L. et al. (1997). P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem. J.* 326 (Pt 2), 539-544.

Bernier, I., Tresca, JP. and Jollès, P. (1986). Ligand-binding studies with a 23 kDa protein purified from bovine brain cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* 871, 19-23.

Bhargava, KP., Dixit, KS. and Gupta, YK. (1981). Enkephalin receptors in the emetic chemoreceptor trigger zone of the dog. *Br. J. Pharmacol.* 72, 471-475.

Bianchi, E., Alessandrini, C., Guarna, M. et al. (1993). Endogenous codeine and morphine are stored in specific brain neurons. *Brain Res.* 627, 210-215.

Bianchi, E., Guarna, M. and Tagliamonte, A. (1994). Immunocytochemical localization of endogenous codeine and morphine. *Adv. Neuroimmunol.* 4, 83-92.

- Bodnar, R.J. (2007). Endogenous opiates and behavior: 2006. *Peptides* 28, 2435-2513.
- Boettcher, C., Fellermeier, M., Boettcher, C. et al. (2005). How human neuroblastoma cells make morphine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8495-8500.
- Boettcher, C., Fischer, W. and Zenk, MH. (2006). Comment on "Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation". *J. Immunol.* 176, 5703-4; author reply 5704.
- Brailoiu, E., Hoard, J., Brailoiu, GC. et al. (2004). Ultra low concentrations of morphine increase neurite outgrowth in cultured rat spinal cord and cerebral cortical neurons. *Neurosci. Lett.* 365, 10-13.
- Brands, A., Münzel, PA. and Bock, KW. (2000). In situ hybridization studies of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 expression in rat testis and brain. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1441-1444.
- Brix-Christensen, V., Tønnesen, E., Sanchez, RG. et al. (1997). Endogenous morphine levels increase following cardiac surgery as part of the antiinflammatory response?. *Int. J. Cardiol.* 62, 191-197.
- Brix-Christensen, V., Goumon, Y., Tønnesen, E. et al. (2000). Endogenous morphine is produced in response to cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 44, 1204-1208.

C

- Cadet, P., Mantione, KJ. and Stefano, GB. (2003). Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J. Immunol.* 170, 5118-5123.
- Callaghan, R. and Riordan, JR. (1993). Synthetic and natural opiates interact with P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J. Biol. Chem.* 268, 16059-16064.

- Cashman, JR. and MacDougall, JM. (2005). Dynamic medicinal chemistry in the elaboration of morphine-6-glucuronide analogs. *Curr Top Med Chem* 5, 585-594.
- Cesselin, F. (1991). Endorphins, opioid receptors and site of action of morphinomimetics. *Agressologie* 32, 310-317.
- Chen, Y., Mestek, A., Liu, J. et al. (1993). Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.* 44, 8-12.
- Choudhuri, S. and Klaassen, CD. (2006). Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. *Int. J. Toxicol.* 25, 231-259.
- Chuang, LF., Killam, KFJ. and Chuang, RY. (1997). Induction and activation of mitogen-activated protein kinases of human lymphocytes as one of the signaling pathways of the immunomodulatory effects of morphine sulfate. *J. Biol. Chem.* 272, 26815-26817.
- Coffman, BL., Rios, GR., King, CD. et al. (1997). Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab. Dispos.* 25, 1-4.
- Cohen, GA., Doze, VA. and Madison, DV. (1992). Opioid inhibition of GABA release from presynaptic terminals of rat hippocampal interneurons. *Neuron* 9, 325-335.
- Connor, M. and Henderson, G. (1996). delta- and mu-opioid receptor mobilization of intracellular calcium in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 117, 333-340.
- Corbett, AD., Henderson, G., McKnight, AT. et al. (2006). 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* 147 *Suppl* 1, S153-62.
- Crain, SM. and Shen, KF. (2001). Acute thermal hyperalgesia elicited by low-dose morphine in normal mice is blocked by ultra-low-dose naltrexone, unmasking potent opioid analgesia. *Brain Res.* 888, 75-82.

D

- Dagenais, C., Rousselle, C., Pollack, GM. et al. (2000). Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to *mdr1a* P-glycoprotein-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 381-386.
- Dahan, A., van Dorp, E., Smith, T. et al. (2008). Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. *Eur J Pain* 12, 403-411.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S. et al. (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47 *Suppl 1*, 227-241.
- Dickenson, AH. and Le Bars, D. (1987). Supraspinal morphine and descending inhibitions acting on the dorsal horn of the rat. *J. Physiol. (Lond.)* 384, 81-107.
- Dinda, A., Gitman, M. and Singhal, PC. (2005). Immunomodulatory effect of morphine: therapeutic implications. *Expert Opin Drug Saf* 4, 669-675.
- Ding, YQ., Kaneko, T., Nomura, S. et al. (1996). Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 367, 375-402.
- Donnerer, J., Oka, K., Brossi, A. et al. (1986). Presence and formation of codeine and morphine in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 4566-4567.
- Donnerer, J., Cardinale, G., Coffey, J. et al. (1987). Chemical characterization and regulation of endogenous morphine and codeine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242, 583-587.
- Doyle, GA., Sheng, XR., Lin, SSJ. et al. (2007). Identification of five mouse mu-opioid receptor (MOR) gene (*Oprm1*) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon. *Gene* 395, 98-107.

E

Eisch, AJ., Barrot, M., Schad, CA. et al. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7579-7584.

Elliott, J., Smart, D., Traynor, JR. et al. (1993). Characterization of the mu-opioid receptors on SH-SY5Y cells using beta-funaltrexamine (beta-FNA) and naloxonazine. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 469S.

Epple, A., Navarro, I., Horak, P. et al. (1993). Endogenous morphine and codeine: release by the chromaffin cells of the eel. *Life Sci.* 52, PL117-21.

G

Galeotti, N., Stefano, GB., Guarna, M. et al. (2006). Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice. *Pain* 123, 294-305.

Garzón, M. and Pickel, VM. (2002). Ultrastructural localization of enkephalin and mu-opioid receptors in the rat ventral tegmental area. *Neuroscience* 114, 461-474.

Gavériaux-Ruff, C. and Kieffer, BL. (2002). Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* 36, 62-71.

Gintzler, AR., Levy, A. and Spector, S. (1976). Antibodies as a means of isolating and characterizing biologically active substances: presence of a non-peptide, morphine-like compound in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2132-2136.

Giudici, AM., Sher, E., Pelagi, M. et al. (1992). Immunolocalization of secretogranin II, chromogranin A, and chromogranin B in differentiating human neuroblastoma cells. *Eur. J. Cell Biol.* 58, 383-389.

- Goldstein, A., Tachibana, S., Lowney, LI. et al. (1979). Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6666-6670.
- Goldstein, A., Barrett, RW., James, IF. et al. (1985). Morphine and other opiates from beef brain and adrenal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 5203-5207.
- Goumon, Y., Lugardon, K., Kieffer, B. et al. (1998). Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 273, 29847-29856.
- Goumon, Y., Zhu, W., Weeks, BS. et al. (2000). Identification of morphine in the adrenal medullary chromaffin PC-12 cell line. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 81, 177-180.
- Goumon, Y., Bouret, S., Casares, F. et al. (2000). Lipopolysaccharide increases endogenous morphine levels in rat brain. *Neurosci. Lett.* 293, 135-138.
- Goumon, Y., Casares, F., Pryor, S. et al. (2000). *Ascaris suum*, an intestinal parasite, produces morphine. *J. Immunol.* 165, 339-343.
- Goumon, Y., Angelone, T., Schoentgen, F. et al. (2004). The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J. Biol. Chem.* 279, 13054-13064.
- Goumon, Y., Muller, A., Glattard, E. et al. (2006). Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J. Biol. Chem.* 281, 8082-8089.
- Grace, D. and Fee, JP. (1996). A comparison of intrathecal morphine-6-glucuronide and intrathecal morphine sulfate as analgesics for total hip replacement. *Anesth. Analg.* 83, 1055-1059.
- Grandy, DK., Hanneman, E., Bunzow, J. et al. (1990). Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol. Endocrinol.* 4, 1370-1376.

Guarna, M., Neri, C., Petrioli, F. et al. (1998). Potassium-induced release of endogenous morphine from rat brain slices. *J. Neurochem.* *70*, 147-152.

Guarna, M., Bianchi, E., Bartolini, A. et al. (2002). Endogenous morphine modulates acute thermnociception in mice. *J. Neurochem.* *80*, 271-277.

Guarna, M., Ghelardini, C., Galeotti, N. et al. (2004). Effects of endogenous morphine deprivation on memory retention of passive avoidance learning in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *7*, 311-319.

Guarna, M., Ghelardini, C., Galeotti, N. et al. (2005). Neurotransmitter role of endogenous morphine in CNS. *Med. Sci. Monit.* *11*, RA190-193.

H

Hussey, HH. and Katz, S. (1950). Infections resulting from narcotic addiction; report of 102 cases. *Am. J. Med.* *9*, 186-193.

Hagenbuch, B. and Meier, PJ. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* *1609*, 1-18.

Harburg, GC., Hall, FS., Harrist, AV. et al. (2007). Knockout of the mu opioid receptor enhances the survival of adult-generated hippocampal granule cell neurons. *Neuroscience* *144*, 77-87.

Hazum, E., Sabatka, JJ., Chang, KJ. et al. (1981). Morphine in cow and human milk: could dietary morphine constitute a ligand for specific morphine (mu) receptors?. *Science* *213*, 1010-1012.

Herz, A. (1995). Role of immune processes in peripheral opioid analgesia. *Adv. Exp. Med. Biol.* *373*, 193-199.

Heurtaux, T., Benani, A., Moulin, D. et al. (2006). Induction of UGT1A6 isoform by inflammatory conditions in rat astrocytes. *Neuropharmacology* 50, 317-328.

Hirrlinger, J., König, J. and Dringen, R. (2002). Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. *J. Neurochem.* 82, 716-719.

Hughes, J., Smith, TW., Kosterlitz, HW. et al. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577-580.

Hughes, J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88, 295-308.

Hunt, S P;Mantyh, P W (2001). The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* 2, 83-91.

J

Jiang, ZG. and North, RA. (1992). Pre- and postsynaptic inhibition by opioids in rat striatum. *J. Neurosci.* 12, 356-361.

Joshi, GP. (2008). Morphine-6-glucuronide, an active morphine metabolite for the potential treatment of post-operative pain. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 786-799.

K

Kieffer, BL. and Gavériaux-Ruff, C. (2002). Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol* 66, 285-306.

- Kilpatrick, GJ. and Smith, TW. (2005). Morphine-6-glucuronide: actions and mechanisms. *Med Res Rev* 25, 521-544.
- King, CD., Rios, GR., Assouline, JA. et al. (1999). Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 156-162.
- King, M., Su, W., Chang, A. et al. (2001). Transport of opioids from the brain to the periphery by P-glycoprotein: peripheral actions of central drugs. *Nat. Neurosci.* 4, 268-274.
- Kline, RH4. and Wiley, RG. (2008). Spinal mu-opioid receptor-expressing dorsal horn neurons: role in nociception and morphine antinociception. *J. Neurosci.* 28, 904-913.
- Kuo, CK., Hanioka, N., Hoshikawa, Y. et al. (1991). Species difference of site-selective glucuronidation of morphine. *J. Pharmacobio-dyn.* 14, 187-193.
- Kurrikoff, K., Inno, J., Matsui, T. et al. (2008). Stress-induced analgesia in mice: evidence for interaction between endocannabinoids and cholecystokinin. *Eur. J. Neurosci.* 27, 2147-2155.

L

- Lazarowski, A., Ramos, AJ., García-Rivello, H. et al. (2004). Neuronal and glial expression of the multidrug resistance gene product in an experimental epilepsy model. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24, 77-85.
- Leow, KP., Wright, AW., Cramond, T. et al. (1993). Determination of the serum protein binding of oxycodone and morphine using ultrafiltration. *Ther. Drug. Monit.* 15, 440-447.
- Leung, MK., Dissous, C., Capron, A. et al. (1995). *Schistosoma mansoni*: the presence and potential use of opiate-like substances. *Exp. Parasitol.* 81, 208-215.

Lieb, K., Biersack, L., Waschbisch, A. et al. (2005). Serotonin via 5-HT7 receptors activates p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase C epsilon resulting in interleukin-6 synthesis in human U373 MG astrocytoma cells. *J. Neurochem.* *93*, 549-559.

Lötsch, J. and Geisslinger, G. (2001). Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future?. *Clin Pharmacokinet* *40*, 485-499.

M

MacDougall, JM., Zhang, X., Polgar, WE. et al. (2004). Design, chemical synthesis, and biological evaluation of thiosaccharide analogues of morphine- and codeine-6-glucuronide. *J. Med. Chem.* *47*, 5809-5815.

Mackenzie, PI., Owens, IS., Burchell, B. et al. (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* *7*, 255-269.

Mackenzie, PI., Bock, KW., Burchell, B. et al. (2005). Nomenclature update for the mammalian UDP glycosyltransferase (UGT) gene superfamily. *Pharmacogenet. Genomics* *15*, 677-685.

Makman, MH. (1994). Morphine receptors in immunocytes and neurons. *Adv. Neuroimmunol.* *4*, 69-82.

Mandyam, CD., Norris, RD. and Eisch, AJ. (2004). Chronic morphine induces premature mitosis of proliferating cells in the adult mouse subgranular zone. *J. Neurosci. Res.* *76*, 783-794.

Mansour, A., Fox, CA., Akil, H. et al. (1995). Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* *18*, 22-29.

- Marker, CL., Luján, R., Colón, J. et al. (2006). Distinct populations of spinal cord lamina II interneurons expressing G-protein-gated potassium channels. *J. Neurosci.* *26*, 12251-12259.
- Martin, G., Nie, Z. and Siggins, GR. (1997). Mu-Opioid receptors modulate NMDA receptor-mediated responses in nucleus accumbens neurons. *J. Neurosci.* *17*, 11-22.
- Matsubara, K., Fukushima, S., Akane, A. et al. (1992). Increased urinary morphine, codeine and tetrahydropapaveroline in parkinsonian patient undergoing L-3,4-dihydroxyphenylalanine therapy: a possible biosynthetic pathway of morphine from L-3,4-dihydroxyphenylalanine in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *260*, 974-978.
- Matthes, HW., Maldonado, R., Simonin, F. et al. (1996). Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* *383*, 819-823.
- Mauborgne, A., Bourgoin, S., Benoliel, JJ. et al. (1987). Enkephalinase is involved in the degradation of endogenous substance P released from slices of rat substantia nigra. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *243*, 674-680.
- Mayer, DJ. and Liebeskind, JC. (1974). Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain: an anatomical and behavioral analysis. *Brain Res.* *68*, 73-93.
- Meijerink, WJ., Molina, PE. and Abumrad, NN. (1999). Mammalian opiate alkaloid synthesis: lessons derived from plant biochemistry. *Shock* *12*, 165-173.
- Mellon, RD. and Bayer, BM. (1998). Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J. Neuroimmunol.* *83*, 19-28.
- Metz-Boutigue, MH., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R. et al. (1993). Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* *217*, 247-257.

- Metz-Boutigue, MH., Goumon, Y., Lugardon, K. et al. (1998). Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell. Mol. Neurobiol.* *18*, 249-266.
- Meunier, JC. (1997). Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* *340*, 1-15.
- Mikkaichi, T., Suzuki, T., Tanemoto, M. et al. (2004). The organic anion transporter (OATP) family. *Drug Metab. Pharmacokinet.* *19*, 171-179.
- Millan, MJ. (2002). Descending control of pain. *Prog. Neurobiol.* *66*, 355-474.
- Miller, RJ. and Pickel, VM. (1980). The distribution and functions of the enkephalins. *J. Histochem. Cytochem.* *28*, 903-917.
- Miller, KK. and Lupica, CR. (1997). Neuropeptide FF inhibition of morphine effects in the rat hippocampus. *Brain Res.* *750*, 81-86.
- Moises, HC. (1987). Electrophysiological correlates of presynaptic opiate receptor activation: reduction in norepinephrine-mediated inhibition from the locus coeruleus. *Brain Res.* *423*, 149-161.
- Morón, JA., Abul-Husn, NS., Rozenfeld, R. et al. (2007). Morphine administration alters the profile of hippocampal postsynaptic density-associated proteins: a proteomics study focusing on endocytic proteins. *Mol. Cell Proteomics* *6*, 29-42.
- Mrkusich, EM., Kivell, BM., Miller, JH. et al. (2004). Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal, and adult rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *148*, 213-222.
- Muller, A., Glattard, E., Taleb, O. et al. (2008). Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS ONE* *3*, e1641.

Nagano, E., Yamada, H. and Oguri, K. (2000). Characteristic glucuronidation pattern of physiologic concentration of morphine in rat brain. *Life Sci.* 67, 2453-2464.

Nelson, TE., King, JS. and Bishop, GA. (1997). Distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive afferents to the cerebellum differs between species. *J. Comp. Neurol.* 379, 443-454.

Neri, C., Guarna, M., Bianchi, E. et al. (2004). Endogenous morphine and codeine in the brain of non human primate. *Med. Sci. Monit.* 10, MS1-5.

Neri, C., Ghelardini, C., Sotak, B. et al. (2008). Dopamine is necessary to endogenous morphine formation in mammalian brain in vivo. *J. Neurochem.* , .

Nevo, I., Avidor-Reiss, T., Levy, R. et al. (2000). Acute and chronic activation of the mu-opioid receptor with the endogenous ligand endomorphin differentially regulates adenylyl cyclase isozymes. *Neuropharmacology* 39, 364-371.

Nikolaus, S., Antke, C., Kley, K. et al. (2007). Investigating the dopaminergic synapse in vivo. I. Molecular imaging studies in humans. *Rev Neurosci* 18, 439-472.

North, RA. and Egan, TM. (1983). Actions and distributions of opioid peptides in peripheral tissues. *Br. Med. Bull.* 39, 71-75.

O

Ohno, S., Kawana, K. and Nakajin, S. (2008). Contribution of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A8 to morphine-6-glucuronidation and its kinetic properties. *Drug Metab. Dispos.* 36, 688-694.

Oka, K., Kantrowitz, JD. and Spector, S. (1985). Isolation of morphine from toad skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1852-1854.

Olive, MF., Anton, B., Micevych, P. et al. (1997). Presynaptic versus postsynaptic localization of mu and delta opioid receptors in dorsal and ventral striatopallidal pathways. *J. Neurosci.* *17*, 7471-7479.

Olsen, GD. (1975). Morphine binding to human plasma proteins. *Clin. Pharmacol. Ther.* *17*, 31-35.

P

Pan, L., Xu, J., Yu, R. et al. (2005). Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, *Oprm*. *Neuroscience* *133*, 209-220.

Pan, Y. (2005). Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA Cell Biol.* *24*, 736-750.

Pan, Y., Xu, J., Bolan, E. et al. (2005). Identification of four novel exon 5 splice variants of the mouse mu-opioid receptor gene: functional consequences of C-terminal splicing. *Mol. Pharmacol.* *68*, 866-875.

Panagopoulos, NT., Papadopoulos, GC. and Matsokis, NA. (1991). Dopaminergic innervation and binding in the rat cerebellum. *Neurosci. Lett.* *130*, 208-212.

Pasternak, GW. and Wood, PJ. (1986). Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.* *38*, 1889-1898.

Pasternak, GW. (2004). Multiple opiate receptors: déjà vu all over again. *Neuropharmacology* *47 Suppl 1*, 312-323.

Pasternak, GW. (2005). Molecular biology of opioid analgesia. *J Pain Symptom Manage* *29*, S2-9.

Pasternak, GW. (2007). When it comes to opiates, just say NO. *J. Clin. Invest.* *117*, 3185-3187.

Pechnick, RN. (1993). Effects of opioids on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *33*, 353-382.

Pert, CB. and Snyder, SH. (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* *179*, 1011-1014.

Phillis, JW. (2005). Acetylcholine release from the central nervous system: a 50-year retrospective. *Crit. Rev. Neurobiol.* *17*, 161-217.

Poeaknapo, C., Schmidt, J., Brandsch, M. et al. (2004). Endogenous formation of morphine in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 14091-14096.

R

Radomska-Pandya, A., Little, JM. and Czernik, PJ. (2001). Human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Curr. Drug Metab.* *2*, 283-298.

Rempel-Clower, NL., Zola, SM., Squire, LR. et al. (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J. Neurosci.* *16*, 5233-5255.

Roques, BP., Garbay-Jaureguiberry, C., Oberlin, R. et al. (1976). Conformation of Met5-enkephalin determined by high field PMR spectroscopy. *Nature* *262*, 778-779.

Rossi, GC., Pan, YX., Brown, GP. et al. (1995). Antisense mapping the MOR-1 opioid receptor: evidence for alternative splicing and a novel morphine-6 beta-glucuronide receptor. *FEBS Lett.* *369*, 192-196.

Rossi, GC., Leventhal, L., Pan, YX. et al. (1997). Antisense mapping of MOR-1 in rats: distinguishing between morphine and morphine-6beta-glucuronide antinociception. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *281*, 109-114.

Rubovitch, V., Gafni, M. and Sarne, Y. (2003). The mu opioid agonist DAMGO stimulates cAMP production in SK-N-SH cells through a PLC-PKC-Ca⁺⁺ pathway. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *110*, 261-266.

Rudin, A., Lundberg, JF., Hammarlund-Udenaes, M. et al. (2007). Morphine metabolism after major liver surgery. *Anesth. Analg.* *104*, 1409-14, table of contents.

S

Scoville, WB. and Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* *20*, 11-21.

Schulz, S. and Höllt, V. (1998). Opioid withdrawal activates MAP kinase in locus coeruleus neurons in morphine-dependent rats in vivo. *Eur. J. Neurosci.* *10*, 1196-1201.

Sharma, SK., Klee, WA. and Nirenberg, M. (1977). Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *74*, 3365-3369.

Sharom, FJ. (2006). Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem. Cell Biol.* *84*, 979-992.

Sharp, BM., Roy, S. and Bidlack, JM. (1998). Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. *J. Neuroimmunol.* *83*, 45-56.

Shorr, J., Foley, K. and Spector, S. (1978). Presence of a non-peptide morphine-like compound in human cerebrospinal fluid. *Life Sci.* *23*, 2057-2062.

Sibson, NR., Mason, GF., Shen, J. et al. (2001). In vivo (13)C NMR measurement of neurotransmitter glutamate cycling, anaplerosis and TCA cycle flux in rat brain during. *J. Neurochem.* *76*, 975-989.

Sora, I., Takahashi, N., Funada, M. et al. (1997). Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 1544-1549.

- Stain-Textier, F., Boschi, G., Sandouk, P. et al. (1999). Elevated concentrations of morphine 6-beta-D-glucuronide in brain extracellular fluid despite low blood-brain barrier permeability. *Br. J. Pharmacol.* *128*, 917-924.
- Stefano, GB., Digenis, A., Spector, S. et al. (1993). Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 11099-11103.
- Stefano, GB., Goumon, Y., Bilfinger, TV. et al. (2000). Basal nitric oxide limits immune, nervous and cardiovascular excitation: human endothelia express a mu opiate receptor. *Prog. Neurobiol.* *60*, 513-530.
- Stefano, GB., Goumon, Y., Casares, F. et al. (2000). Endogenous morphine. *Trends Neurosci.* *23*, 436-442.
- Stefano, GB. and Kream, RM. (2007). Endogenous morphine synthetic pathway preceded and gave rise to catecholamine synthesis in evolution (Review). *Int. J. Mol. Med.* *20*, 837-841.
- Stefano, GB., Bianchi, E., Guarna, M. et al. (2007). Nicotine, alcohol and cocaine coupling to reward processes via endogenous morphine signaling: the dopamine-morphine hypothesis. *Med. Sci. Monit.* *13*, RA91-102.
- Stewart, PA., Béliveau, R. and Rogers, KA. (1996). Cellular localization of P-glycoprotein in brain versus gonadal capillaries. *J. Histochem. Cytochem.* *44*, 679-685.
- Stumm, RK., Zhou, C., Schulz, S. et al. (2004). Neuronal types expressing mu- and delta-opioid receptor mRNA in the rat hippocampal formation. *J. Comp. Neurol.* *469*, 107-118.
- Suleman, FG., Abid, A., Gradinaru, D. et al. (1998). Identification of the uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform UGT1A6 in rat brain and in primary cultures of neurons and astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* *358*, 63-67.

Suzuki, Y. and Taguchi, K. (1983). Influence of drugs on evoked potentials in the cat cerebellum: III. Effects of morphine hydrochloride (2). *Jpn. J. Pharmacol.* 33, 681-689.

T

Taguchi, K. and Suzuki, Y. (1989). Effects of microiontophoretically-applied morphine on the Purkinje cell in the cerebellum of the cat. *Neuropharmacology* 28, 235-242.

Taguchi, K., Abe, K., Chyuma, T. et al. (2000). Effects of microiontophoretically-applied opioid peptides on Purkinje cells in the cat cerebellum. *Acta Pharmacol. Sin.* 21, 877-884.

Takita, K., Herlenius, EA., Lindahl, SG. et al. (1997). Actions of opioids on respiratory activity via activation of brainstem mu-, delta- and kappa-receptors; an in vitro study. *Brain Res.* 778, 233-241.

Tang, T., Stevens, BA. and Cox, BM. (1996). Opioid regulation of intracellular free calcium in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci. Res.* 44, 338-343.

Taupin, P. (2006). Adult neural stem cells, neurogenic niches, and cellular therapy. *Stem Cell Rev.* 2, 213-219.

Tenconi, B., Lesma, E., DiGiulio, AM. et al. (1996). High opioid doses inhibit whereas low doses enhance neuritogenesis in PC12 cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 94, 175-181.

Terashvili, M., Wu, H., Moore, RM. et al. (2007). (+)-Morphine and (-)-morphine stereoselectively attenuate the (-)-morphine-produced tail-flick inhibition via the naloxone-sensitive sigma receptor in the ventral periaqueductal gray of the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 571, 1-7.

Terenius, L. and Wahlström, A. (1975). Search for an endogenous ligand for the opiate receptor. *Acta Physiol. Scand.* 94, 74-81.

Ticku, MK. and Huffman, RD. (1980). The effects of acute and chronic morphine administration on GABA receptor binding. *Eur. J. Pharmacol.* 68, 97-106.

V

Vaccarino, AL. and Kastin, AJ. (2001). Endogenous opiates: 2000. *Peptides* 22, 2257-2328.

Valle, L., Puig, MM. and Pol, O. (2000). Effects of mu-opioid receptor agonists on intestinal secretion and permeability during acute intestinal inflammation in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 389, 235-242.

van Dorp, ELA., Romberg, R., Sarton, E. et al. (2006). Morphine-6-glucuronide: morphine's successor for postoperative pain relief? *Anesth. Analg.* 102, 1789-1797.

van Ree, JM., Gerrits, MA. and Vanderschuren, LJ. (1999). Opioids, reward and addiction: An encounter of biology, psychology, and medicine. *Pharmacol. Rev.* 51, 341-396.

van de Wetering, K., Zelcer, N., Kuil, A. et al. (2007). Multidrug resistance proteins 2 and 3 provide alternative routes for hepatic excretion of morphine-glucuronides. *Mol. Pharmacol.* 72, 387-394.

Vaughan, CW. and Christie, MJ. (1997). Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro. *J. Physiol. (Lond.)* 498 (Pt 2), 463-472.

Virgintino, D., Robertson, D., Errede, M. et al. (2002). Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *J. Histochem. Cytochem.* 50, 1671-1676.

von Bohlen Und Halbach, O. (2007). Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 329, 409-420.

W

- Weber, M., Modemann, S., Schipper, P. et al. (2006). Increased polysialic acid neural cell adhesion molecule expression in human hippocampus of heroin addicts. *Neuroscience* 138, 1215-1223.
- Weitz, CJ., Lowney, LI., Faull, KF. et al. (1986). Morphine and codeine from mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 9784-9788.
- Weitz, CJ., Faull, KF. and Goldstein, A. (1987). Synthesis of the skeleton of the morphine molecule by mammalian liver. *Nature* 330, 674-677.
- Williams, JT., Christie, MJ. and Manzoni, O. (2001). Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* 81, 299-343.
- Willis, WDJ. (1985). The pain system. The neural basis of nociceptive transmission in the mammalian nervous system. *Pain Headache* 8, 1-346.
- Willis, WD. and Westlund, KN. (1997). Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14, 2-31.
- Wood, JD. and Galligan, JJ. (2004). Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 16 Suppl 2, 17-28.
- Wu, D., Kang, YS., Bickel, U. et al. (1997). Blood-brain barrier permeability to morphine-6-glucuronide is markedly reduced compared with morphine. *Drug Metab. Dispos.* 25, 768-771.

Y

Yamada, H., Ishii, K., Ishii, Y. et al. (2003). Formation of highly analgesic morphine-6-glucuronide following physiologic concentration of morphine in human brain. *J. Toxicol. Sci.* *28*, 395-401.

Yeh, SY., Gorodetzky, CW. and Krebs, HA. (1977). Isolation and identification of morphine 3- and 6-glucuronides, morphine 3,6-diglucuronide, morphine 3-ethereal sulfate, normorphine, and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. *J. Pharm. Sci.* *66*, 1288-1293.

Yew, DT., Luo, CB., Shen, WZ. et al. (1995). Tyrosine hydroxylase- and dopamine-beta-hydroxylase-positive neurons and fibres in the developing human cerebellum n immunohistochemical study. *Neuroscience* *65*, 453-461.

Yoshida, S., Ohta, J., Yamasaki, K. et al. (2000). Effect of surgical stress on endogenous morphine and cytokine levels in the plasma after laparoscopic or open cholecystectomy. *Surg. Endosc.* *14*, 137-140.

Z

Zadina, JE., Hackler, L., Ge, LJ. et al. (1997). A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* *386*, 499-502.

Zelcer, N., van de Wetering, K., Hillebrand, M. et al. (2005). Mice lacking multidrug resistance protein 3 show altered morphine pharmacokinetics and morphine-6-glucuronide antinociception. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 7274-7279.

Zhang, L., Ong, WY. and Lee, T. (1999). Induction of P-glycoprotein expression in astrocytes following intracerebroventricular kainate injections. *Exp. Brain. Res.* *126*, 509-516.

Zhang, Y., Pan, Y., Kolesnikov, Y. et al. (2006). Immunohistochemical labeling of the mu opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain. Res.* *1099*, 33-43.

- Zheng, M., McErlane, KM. and Ong, MC. (1998). High-performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry analysis of morphine and morphine metabolites and its application to a pharmacokinetic study in male Sprague-Dawley rats. *J. Pharm. Biomed. Anal* *16*, 971-980.
- Zhu, W., Pryor, SC., Putnam, J. et al. (2004). Opiate alkaloids and nitric oxide production in the nematode *Ascaris suum*. *J. Parasitol.* *90*, 15-22.
- Zhu, W., Cadet, P., Baggerman, G. et al. (2005). Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J. Immunol.* *175*, 7357-7362.
- Zhu, W., Mantione, KJ., Shen, L. et al. (2005). Tyrosine and tyramine increase endogenous ganglionic morphine and dopamine levels in vitro and in vivo: cyp2d6 and tyrosine hydroxylase modulation demonstrates a dopamine coupling. *Med. Sci. Monit.* *11*, BR397-404.
- Zhu, W., Mantione, KJ., Casares, FM. et al. (2006). Alcohol-, nicotine-, and cocaine-evoked release of morphine from invertebrate ganglia: model system for screening drugs of abuse. *Med. Sci. Monit.* *12*, BR155-61.

Liste des publications

1- Muller A, Glattard E, Taleb O, Kemmel V, Laux A, Mieke M, Delalande F, Roussel G, Van Dorsselaer A, Metz-Boutigue M-H, Aunis D & Goumon Y. **Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse Cerebellum** (2008) PLoS ONE 3(2): e1641. doi:10.1371/journal.pone.0001641

2- Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, Gasnier C, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters ID, Van Dorsselaer A, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH. **Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules.** *J Biol Chem.* 2006;281(12):8082-9.

3- Glattard E, Muller A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Stefano GB, Goumon Y. **Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators.** *Med Sci Monit.* 2006 ;12(6):SR25-7.

4-Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller A, Zhang D, Kemmel V, Delalande F, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F, Goumon Y. **Levels and origin of circulating endogenous morphine in patients with septic conditions** (en soumission).

Liste des communications

Communication orale

35^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie à Strasbourg, le 11 septembre 2008.

Communication dans la session "Points chauds en neuroendocrinologie".

Titre: "Etude de la morphine endogène chez les mammifères".

Posters

Muller A., Glattard E., Delalande F., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. & Goumon Y. "Synthesis of Morphine-6-Glucuronide in SH-SY5Y cells". **Neurex annual meeting**. Bâle (Suisse), mars 2006

Muller A., Glattard E., Delalande F., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. & Goumon Y. "Synthesis of Morphine-6-Glucuronide in SH-SY5Y cells". **5th Forum of European Neuroscience Societies**. Vienne (Autriche), juillet 2006

Muller A., Glattard E., Delalande F., Aunis D., Laux A., Metz-Boutigue M.H. & Goumon Y. "Endogenous morphine as a new neuromediator". **Neurex annual meeting**. Fribourg (Allemagne), juin 2007.

Muller A., Glattard E., Delalande F., Aunis D., Metz-Boutigue M.H. & Goumon Y. "Synthesis of Morphine-6-Glucuronide in SH-SY5Y cells". **6th Forum of European Neuroscience Societies**. Vienne (Autriche), juillet 2006

Goumon Y., Muller A., Glattard E., Stefano G.B., Aunis D. & Metz-Boutigue M.H. "Discovery of a new neuroendocrine mediator: characterization of endogenous morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules". **Neurex annual meeting**. Bâle (Suisse), juin 2006

Goumon Y., Muller A., Glattard E., Stefano G.B., Aunis D. & Metz-Boutigue M.H. "Discovery of a new neuroendocrine mediator: characterization of endogenous morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules". **5th Forum of European Neuroscience**. Vienne (Autriche), juillet 2006

Glattard E, Muller A, Roussel G, Delalande F, Taleb O, Kemmel V, Aunis D et Goumon Y. "Endogenous morphine as a new neuromediator?" **14^{ème} conférence de la SNIP** (Society of NeuroImmune Pharmacology) à Charleston (SC, USA), mars 2008

Glattard E, Welters ID, Lavaux T, Muller A, Zhang D, Kemmel V, Laux A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F et Goumon Y. Study of the variation of morphine levels during human sepsis : A possible role of endogenous morphine secretion by neutrophils. **14^{ème} conférence de la SNIP** (Society of NeuroImmune Pharmacology) à Charleston (SC, USA), mars 2008

Goumon Y, Muller A, Glattard E, Aunis D et Metz-Boutigue MH. Characterization of endogenous morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. **6th Forum of European Neuroscience Societies**. Vienne (Autriche), juillet 2006

Goumon Y, Muller A, Glattard E, Aunis D, Stefano GB et Metz-Boutigue MH. Identification de la morphine-6-glucuronide dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines. **35^{ème} Congrès de la Société de NeuroEndocrinologie** à Strasbourg, septembre 2008

Laux A, Glattard E, Muller A, Welters ID, Lavaux T, Kemmel V, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F et Goumon Y. Etude de la morphine endogène chez des patients atteints de chocs septiques. **35^{ème} Congrès de la Société de NeuroEndocrinologie** à Strasbourg, septembre 2008

Annexe: Publication III (revue)

Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators

Glattard E, Muller A, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Stefano GB, Goumon Y.

Med Sci Monit. 2006 ;12(6):SR25-7

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Rethinking the opiate system? Morphine and morphine-6-glucuronide as new endocrine and neuroendocrine mediators.

Elise GLATTARD, Arnaud MULLER, Dominique AUNIS, George B. STEFANO

Medical Science Monitor, 2006, vol. 12, n° 6, Special report, pages 25-27

Annexe: Publication III : pages 178-...

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.medscimonit.com/abstracted.php?level=5&icid=451277>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Résumé

Au milieu des années 80, de la morphine endogène, ayant une structure identique à la morphine produite par le pavot, a été caractérisée dans le SNC de mammifères. Au niveau physiologique, plusieurs études montrent qu'un stress induit l'apparition de morphine sanguine et cérébrale, suggérant que la morphine endogène représente un nouveau médiateur de la réponse au stress.

Mes travaux sur la morphine endogène ont débuté en 2004 dans l'équipe « Neuropeptides Bioactifs » qui s'intègre dans l'Unité Inserm 575, avec comme modèle d'étude les cellules chromaffines. Ces cellules catécholaminergiques sont responsables de la sécrétion de nombreux peptides bioactifs, ainsi que des catécholamines dans la circulation sanguine lors des états de stress. Les travaux réalisés sur les cellules chromaffines ont permis de montrer que seul de la Morphine-6-Glucuronide (M6G) est présente dans les granules de sécrétion de ces cellules. La M6G, qui est normalement issue du catabolisme de la morphine dans le foie, est décrite comme étant plus analgésique que la morphine. Nous avons également montré que cette M6G était sécrétée par ces cellules suite à une stimulation nicotinique et se liait à la PEBP (PhosphatidylEthanolamine Binding Protein). La M6G intragranulaire pourrait représenter un nouveau médiateur neuroendocrine et être libérée dans la circulation sanguine lors des états de stress.

La présence de la M6G en tant que nouveau médiateur neuroendocrine périphérique nous a incité à étudier sa présence dans le système nerveux central (SNC), où sont présents la majorité des récepteurs opioïdes μ capables de lier la morphine et la M6G. J'ai dans un premier temps utilisé comme modèle d'étude la lignée neuronale humaine SH-SY5Y pour laquelle la néosynthèse de morphine a été décrite en 2005. Nous avons ainsi pu montrer la présence de morphine et de M6G dans ces cellules. D'autre part, la morphine est sécrétée de façon calcium-dépendante suite à une stimulation nicotinique. Une étude électrophysiologique a montré qu' 'à des concentrations faibles (10^{-10} M), la morphine et la M6G sont capables d'évoquer des courants membranaires pouvant être bloqués par la naloxone.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à un système intégré: le cerveau de souris. Des approches de microscopie et de protéomique nous ont permis de détecter et de quantifier la morphine endogène dans différentes zones du cerveau de souris. La morphine est présente dans l'hippocampe, le cortex, le bulbe olfactif et le cervelet. Dans le cervelet des études en microscopie électronique ont montré une immunoréactivité dans des cellules en corbeille et leurs terminaisons qui font des synapses sur les corps cellulaires des cellules de Purkinje. Dans l'hippocampe la morphine est présente principalement dans des astrocytes, mais également dans des progéniteurs neuronaux de la zone sous-granulaire du gyrus denté. Des approches de cultures cellulaires ont confirmé la néosynthèse de morphine par des neurones, et ont montré que les astrocytes sont capables de recapter de la morphine.

En conclusion, nos travaux montrent que la morphine endogène cérébrale possède toutes les caractéristiques d'un neurotransmetteur.