



**ACTUALITE SUR LES MECANISMES D 'ACTION  
DES MEDICAMENTS PSYCHOACTIFS :  
Les mésusages et abus de l'association  
buprénorphine et benzodiazépines sont  
explicables par des fluctuations du binding des  
opiacés et des modifications comportementales.  
Intérêt de l 'expérimentation animale pour l'étude  
de pharmacodépendances spécifiques.**

Antoine COQUEREL<sup>(1,2)</sup>, Véronique LELONG-BOULOUARD<sup>(1,2,3)</sup>,  
Claire L 'HIRONDEL<sup>(1)</sup>, Thomas QUENTIN<sup>(1,4)</sup>, Danièle  
DEBRUYNE<sup>(1,4)</sup>, Michel BOULOUARD<sup>(3)</sup>.

(1) CEIP du Nord-Ouest, CHU Côte de Nacre, 14033 Caen Cedex, et Université de CAEN  
(2) EA 3917 Attention Orientation et Fonctions Exécutives UFR médecine, (3) EA 3915 Centre Etudes et de Recherche  
du Médicament de Normandie UFR de Pharmacie (4) Equipe CEA de Méthodologie TEP, centre CYCERON, 14032 Caen.

# La Pharmacodépendance à l'Héroïne et autres opiacés

- En 1999 = entre 146 000 et 178 000 personnes étaient usagers de morphiniques hors indication médicale
- Consommation d'héroïne à la baisse depuis une dizaine d'années
- Mais l'héroïnomanie entraîne des difficultés d'ordre médical et social
  - médical : **abcès, endocardites, contamination virale (HIV, VHB, VHC), surdoses**
  - social : désinsertion du milieu familial et professionnel, criminalité (trafic, vols, prostitution...)

# La substitution aux opiacés

- 3 axes (1995):
  - prévention et réduction des risques
  - axe social (réinsertion, prise en charge psychologique, et vers le sevrage secondaire ?)
  - axe thérapeutique à visée « curative »
- Ces traitements ont contribué à faire baisser la mortalité par overdose (de 500 à 30/an) et améliorer la réinsertion sociale et accompagner la réduction des risques (Steribox®, seringues échangées, etc...)
- 2 médicaments : **buprénorphine haut dosage (BHD) et méthadone**

# La substitution avec BHD

- Buprénorphine Haut Dosage (BHD) : mise sur le marché - en France - en 1996, devient le premier traitement en termes quantitatifs (> 85 % des cas) de la dépendance aux opiacés
- 2003 : entre 83 000 et 100 000 « usagers »
- Problèmes (i) : entre 21 et 25% des quantités remboursés alimentent le marché noir ;  
(ii) Utilisation de cette BHD par voie injectable dans 11% des cas et ....  
(iii) utilisé comme produit de « défonce » dans 54%  
(=> associations +++ ) un nouveau ' STUP ' ?

# Pharmacologie de la BPN

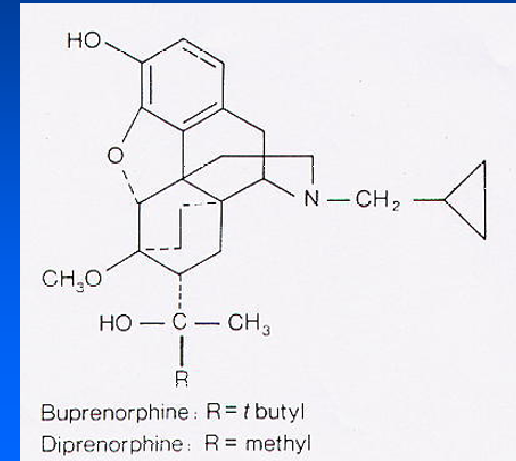
- la BPN - au plan expérimental - est un agoniste partiel des opiacés avec une haute affinité pour les différents types de récepteurs
- elle est utilisée, à faible dosage, comme antalgique de palier II (Temgésic\* : 0,2 - 0,4 mg x 2 ou 3 fois/j)
- la BPN peut provoquer des dépressions respiratoires par voie IV ou si elle est associée à un sédatif => on note de nombreux cas de décès après abus et détournements (dont 2 récents en BN après « sniff » + alcool [OF 09-03-06])

# Buprénorphine : un agoniste / antagoniste

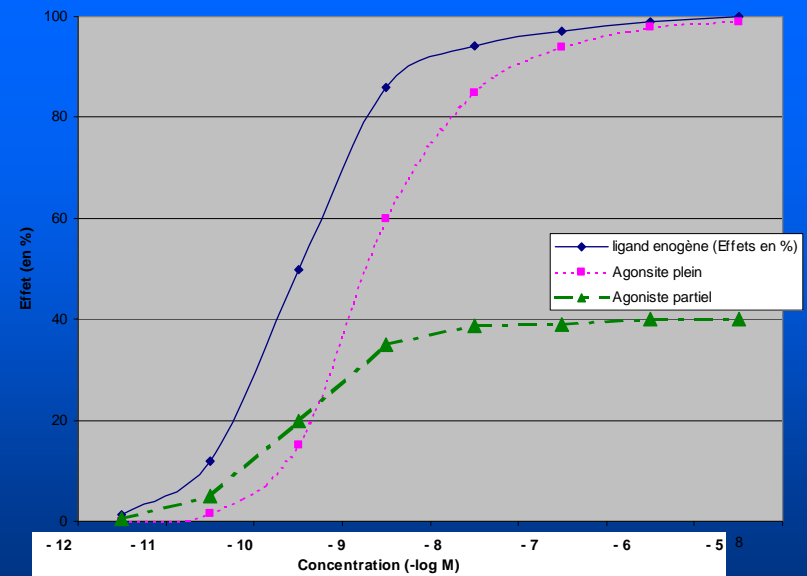
activité dite « **agoniste partielle** » sur les récepteurs **mu** responsables de l'effet analgésique **puissante mais d'efficacité & toxicité limitées** (faible risque de dépression respiratoire)

une activité de type antagoniste sur les récepteurs **delta** (Huang et al., 2001) ; rôle ??...

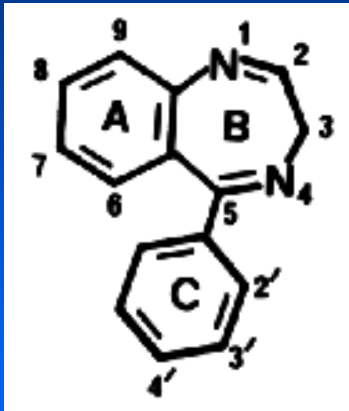
également antagoniste des récepteurs **kappa** +++ (les agonistes sélectifs [ex. Salvinorine A] => hallucinations, euphorie, pas de manque,...)



Relation effet / dose avec un ligand endogène, un agoniste entier et un agoniste partiel



# Propriétés des Benzodiazépines

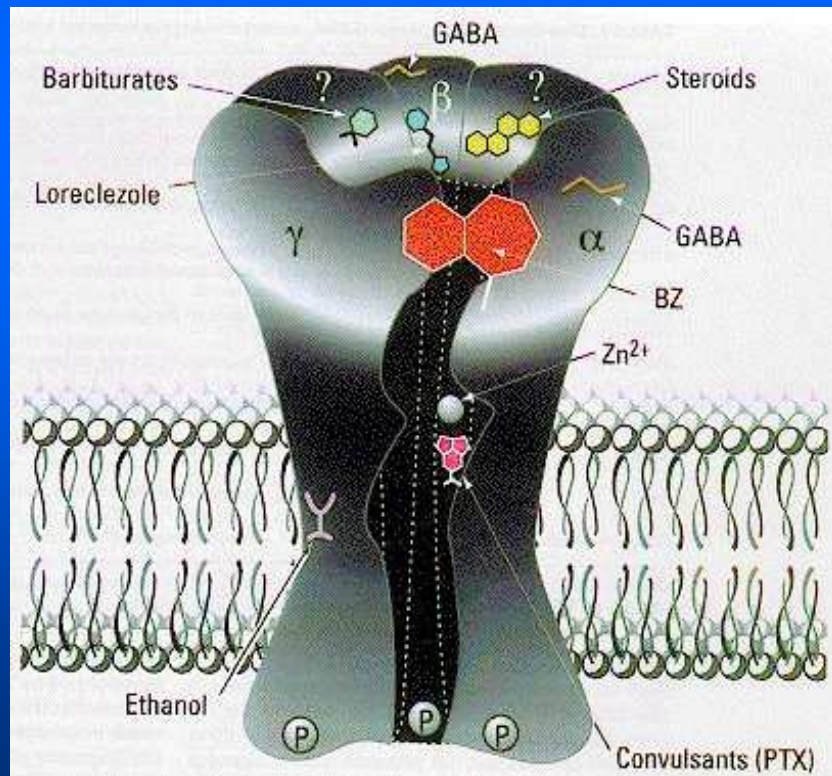


→ au plan pharmacodynamique se lie au complexe canal Chlore récepteur GABA-A => agonistes modulateurs :

→ 5 propriétés pharmacologiques communes

- ✓ Anxiolytiques
- ✓ Hypnotiques / sédatives
- ✓ Anticonvulsivantes
- ✓ myorelaxantes
- ✓ amnésiantes (antérograde)

→ utilisation thérapeutique : médicaments "sûrs" (?), populaires ; ils induisent des dépendances +++ .



# interactions entre Buprénorphine (BPN) et les Benzodiazépines (BZD)

Très utilisée en France, la BPN HD est très souvent associée à la prescription d'une benzodiazépine....

Quels sont les risques liés à l'association ?

- ✓ Haut potentiel de **pharmacodépendance**
- ✓ **dépression respiratoire** sévère chez les rongeurs (Gueye & al., 2002).
- ✓ **Décès en France : entre 1996 et 2001, 150 décès** ont été déclarés en rapport avec une association BPN + autres médicaments : des BZD dans 2/3 des cas (Kintz, 2001, 2002)



# interactions Buprénorphine (BPN) - Benzodiazépines (BZD) .... Suite

quels types d'interaction ?

- Pharmacocinétiques : globalement NS !
- Pharmacodynamiques ?

Interactions directes entre BZD et opiacés ? :

- *in vivo* : dose létale d'opiacé et délai de mort sont raccourcis en cas d'association (Matla *et al.*, 1982)
- Analgésie est accrue. (Rodgers *et al.*, 1985)
- *in vitro*, binding mu inchangé sous midazolam, chlordiazepoxyde & diazepam (Cox & Collins, 2001)

On ne connaît pas précisément les mécanismes cellulaires & moléculaires qui sous-tendent ces interactions

# BUTS de nos expériences

3) l'association **BPN + BZD** modifie la mortalité aiguë des animaux

2) Que l'association BPN + CRZ induit des **modifications comportementales** (mémoire, anxiété, activité locomotrice) significatives chez la Souris

3) **démontrer qu'une benzodiazépine - le Clorazépate (CRZ) - peut modifier la régulation des récepteurs opioïdes  $\mu$ , delta et Kappa** lors de traitements courts ou chroniques par la BPN

=> QUANTIFICATIONS DE RECEPTEURS EX VIVO SUR COUPES DE CERVEAUX DE RAT

# 1<sup>è</sup> partie

Modification de la létalité lié à  
l'injection i.p. de  
buprénorphine par association  
à une BZD, le flunitrazéпам  
(FNZ), chez la souris

# Introduction

- Recherche de la DL50 de la buprénorphine
- chez la souris elle est entre 150 et 200 mg/kg par voie intrapéritonéale (IP)
- chez l'homme la mortalité sous BPN (IV ?) est mal connue ; l'association BPN + flunitrazépam (FNZ) était fréquemment impliquée
- => recherche de doses létales de la BPN associée au FNZ

# Flunitrazépam

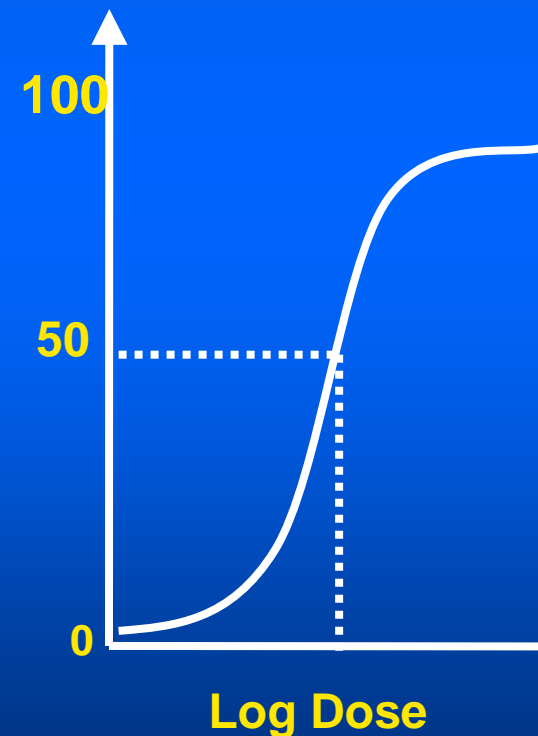
- Rohypnol®: molécule de la famille des benzodiazépines d' action puissante rapide et assez prolongée
- Indication: traitement des insomnies .... sur de courtes durées
- Produit connu pour générer une désinhibition qui favorise le passage à l'acte déviant + perception d'un sentiment d'invincibilité.
- **La consommation a diminué depuis 2001 (restriction par l'USP de l'Afssaps +++)**

# Méthodes d'étude de la létalité aiguë

**Définition de la DL50: «estimation statistique de la dose de produit qui est supposée tuer 50% des animaux d'un lot d'expérience » (Gehring, 1973)**

Détermination de la DL50: lots d'animaux soumis à des doses différentes sur de grands intervalles (10, 20, 40, 80, 160,.... mg/kg)  
Grâce à cette courbe on déduit la DL50 exprimée en mg/kg, on calcule aussi l'écart-type.

% mortalité

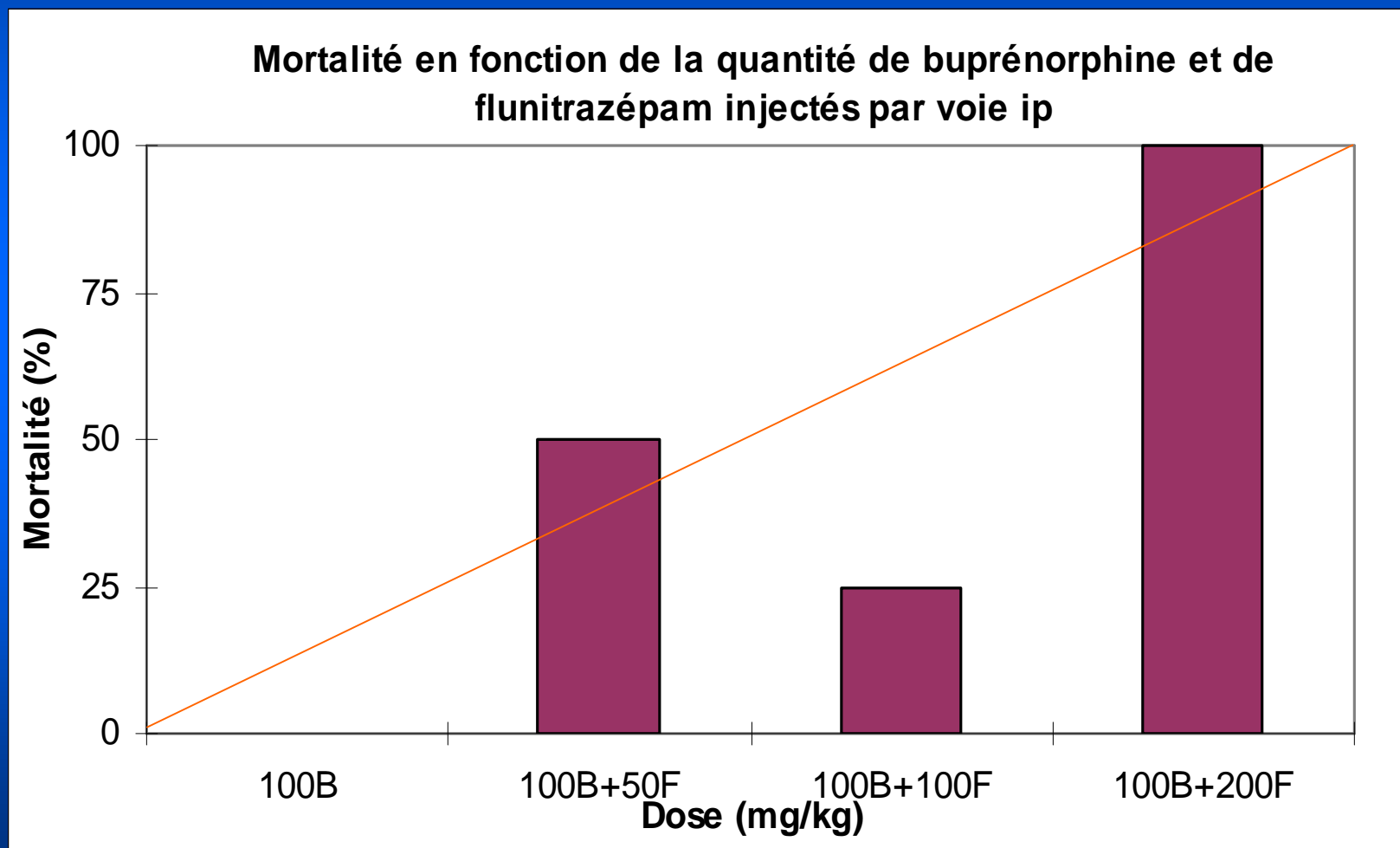


# Matériel et méthodes

- Souris 25 - 35 g
- tests : type  $DL_{50}$  => mortalité aiguë i.p. :  
pour la BPN nous avons obtenu 158 mg/kg
- recherche de potentialisation par BZD
  - **BPN = doses croissantes 25, 50, 100, 200 mg / kg**
  - **FNZ : en association à des dose de 0, 25, 50, 100, 200, 400 mg/kg**  
( $DL_{50} > 1\ 500$  mg/kg ip)

# Mortalité aiguë : résultats

Exemple: BPN :100mg/kg + FNZ (0 ; 50 ; 100 & 200 mg/kg) 4 animaux par groupe





# Conclusion (1) : Létalité

- Le Flunitrazépam augmente la toxicité de la buprénorphine et - pour partie - avec augmentation du délai de survenue du décès (1 à 6 jours vs 12h avec BPN seule)
- SUITES A DONNER sur la mortalité aiguë
  - reprendre des séries avec des lots plus grands, des animaux de sensibilité différente, et d'autres BZD
  - d'autres expériences pour mimer la « réalité » (abstinence temporaire puis IV; « rail », etc)
  - études histologiques et de transductions
  - comparer aux données Neuro-végétatives pré-mortem de Mégarbane, Gueye & Baud (Ann Med Int,2003; 154: 2S64-72)

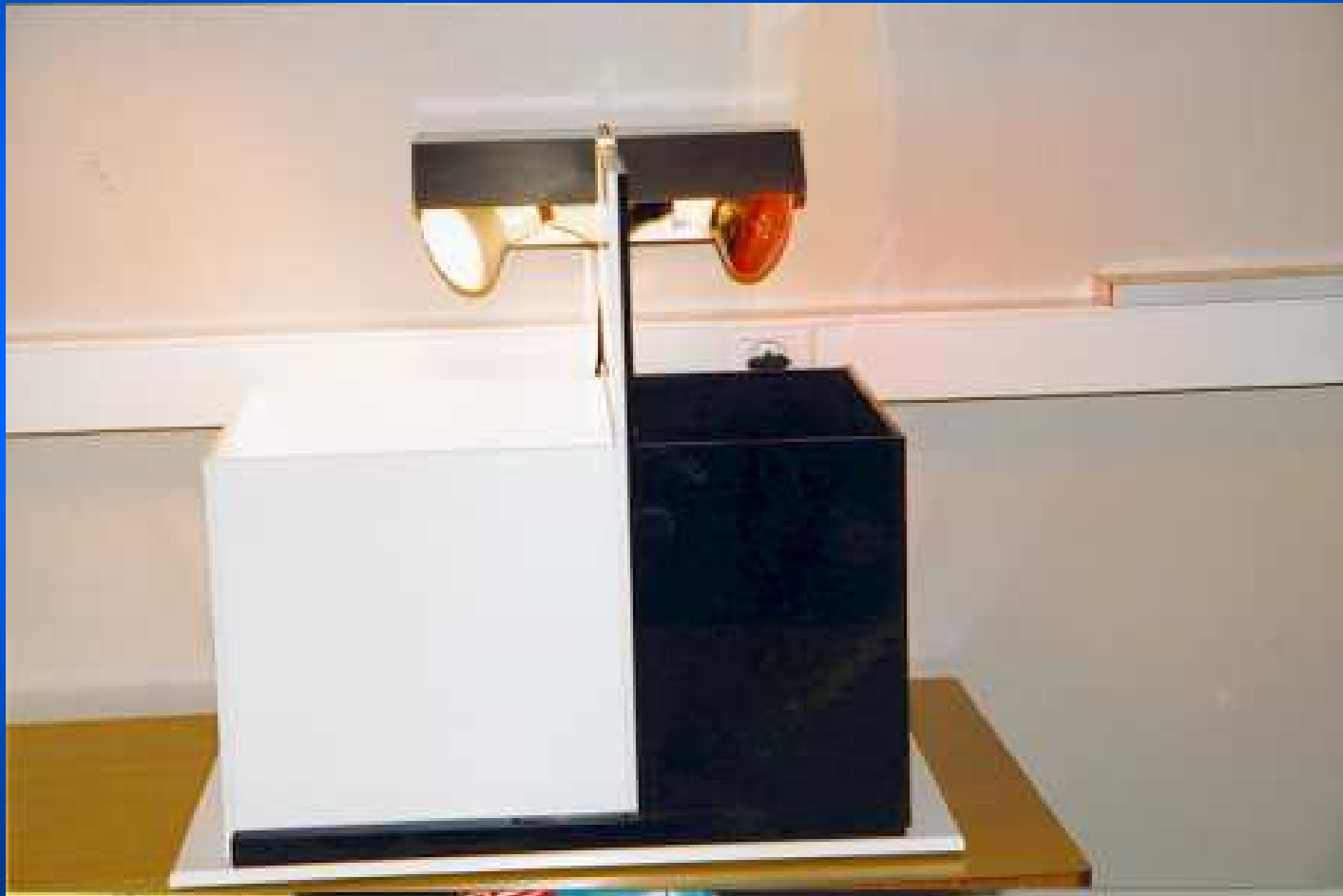
# Deuxième partie

## **Les tests comportementaux chez la souris**

# Matériel et méthodes

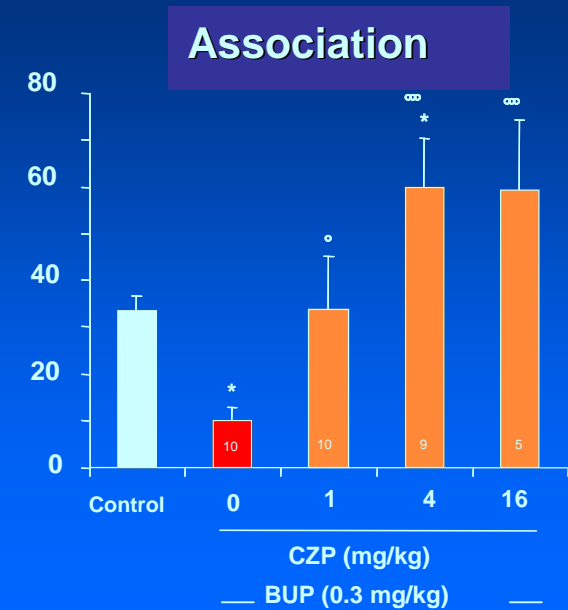
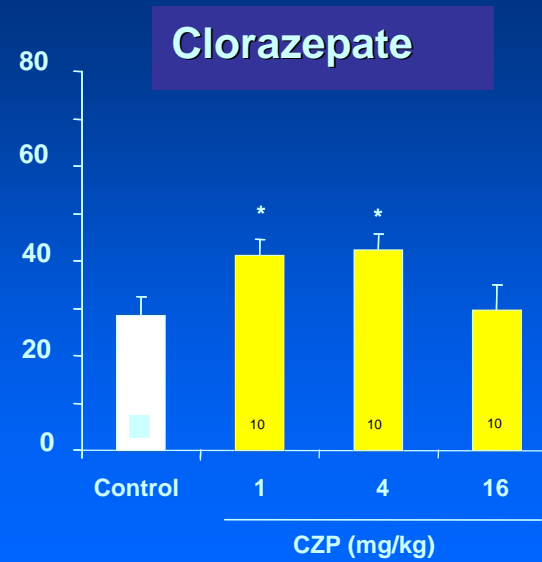
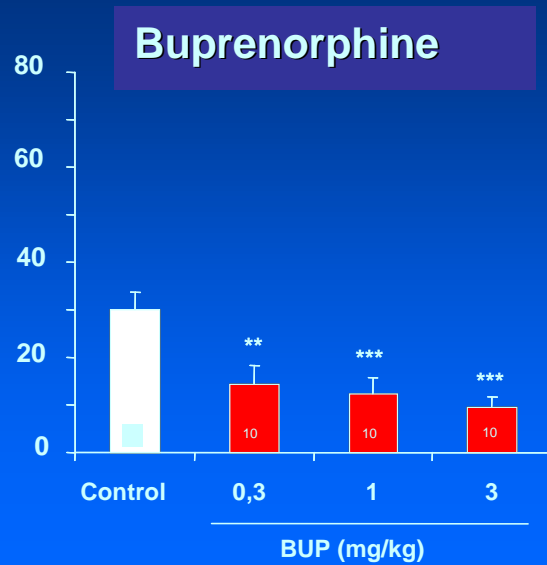
- Souris 20 - 30 g
- tests :
  - activité locomotrice
  - boîte noire et blanche
  - labyrinthe en Y
  - évitement passif
- traitements et posologies
  - **BPN = 0,3 ; 1 et 3 mg / kg**
  - **CRZ : en association à BPN 0,3 mg/kg :  
4 doses de 0, 1, 4 et 16 mg/kg**

## Tests Comportementaux d'anxiété chez la Souris : compartiments noir et blanc

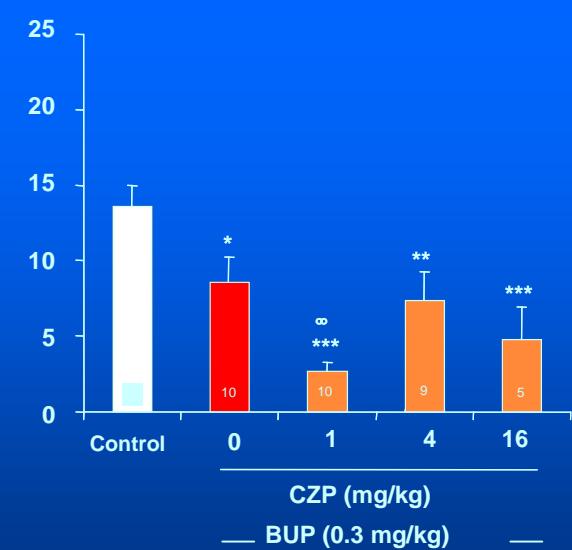
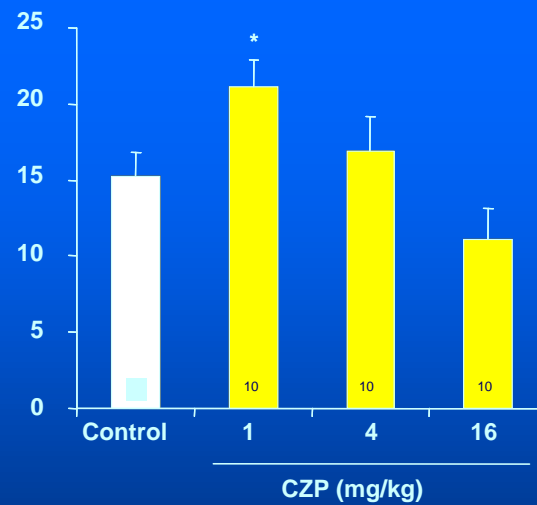
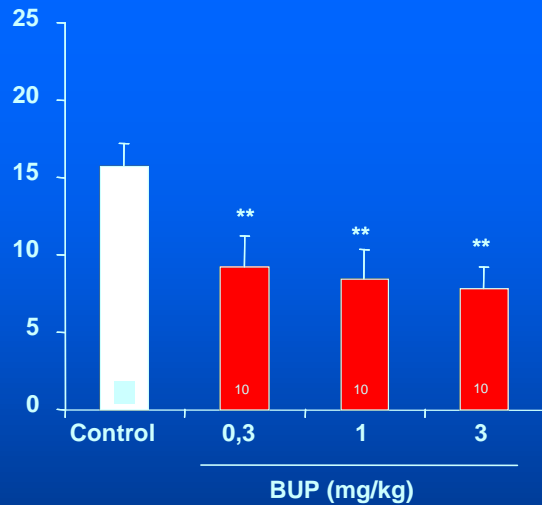


# Test de la boîte noire et blanche

% de temps passé du côté blanc

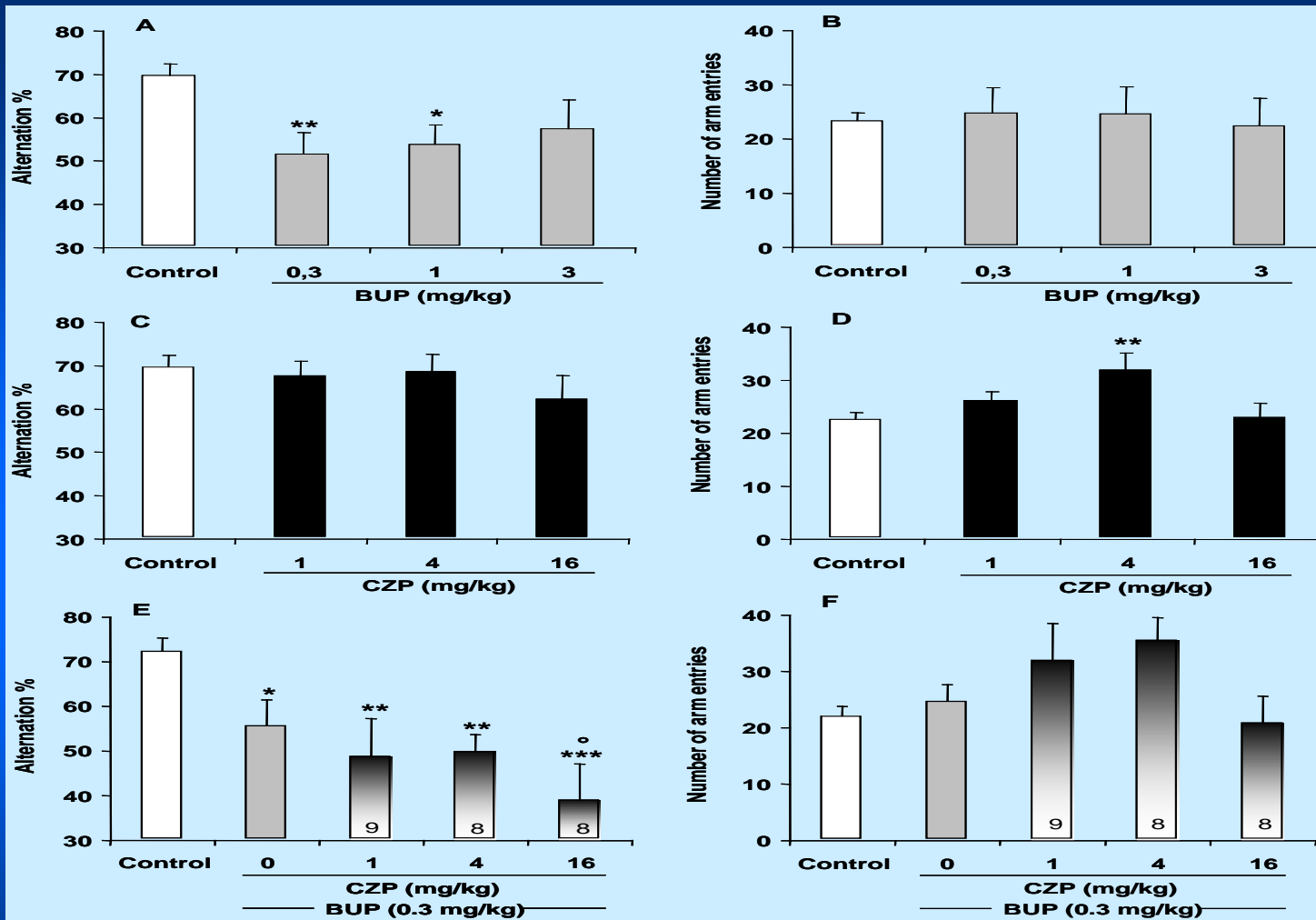


Nombre de transitions



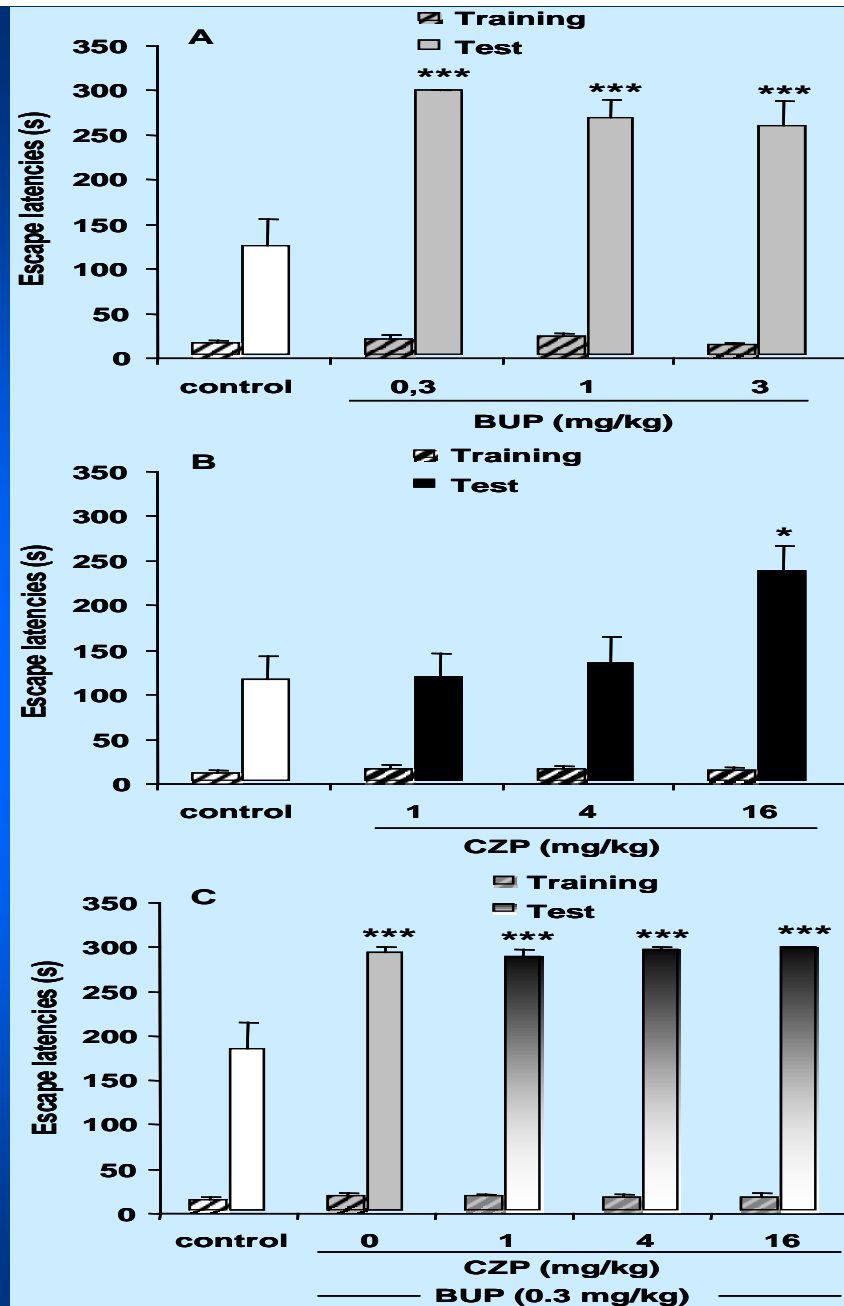
**Effet de la buprénorphine, du clorazépatate dipotassique et de l'association sur le comportement d'anxiété**

# Activités dans le labyrinthe en Y



Paradigme d'alternance (% de temps passé et Nb d'entrées) dans le labyrinthe en Y

Test  
d'évitement  
passif :  
injections des  
ttt 30 ' avant  
la session n°2  
(test de  
récupération  
mnésique)



Les phases ' a ' et ' b ' : injections avant ou après la « session 1 » ne sont pas présentées

# Conclusions (2)

COMPORTEMENT chez la souris : les effets comportementaux pourraient impliquer les différents types de récepteurs ( $\mu$ , Delta, Kappa)

- la BPN paraît anxiogène et l'association BPN + CRZ est anxiolytique
- désinhibition avec BPN + faible dose de CRZ
- sédation si doses fortes (=> risques vitaux)
- pas d'effet amnésiant significatif.

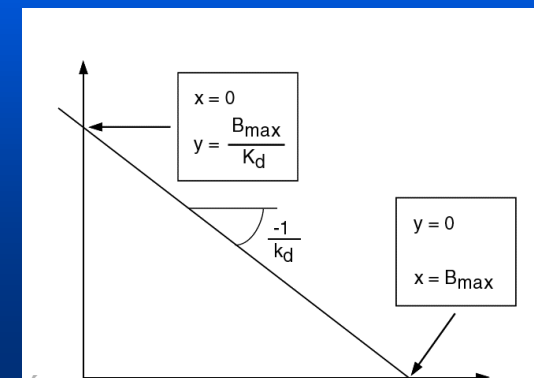
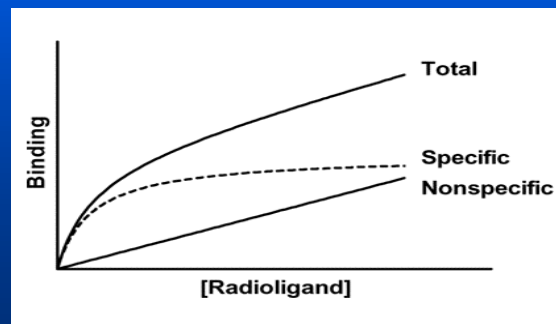
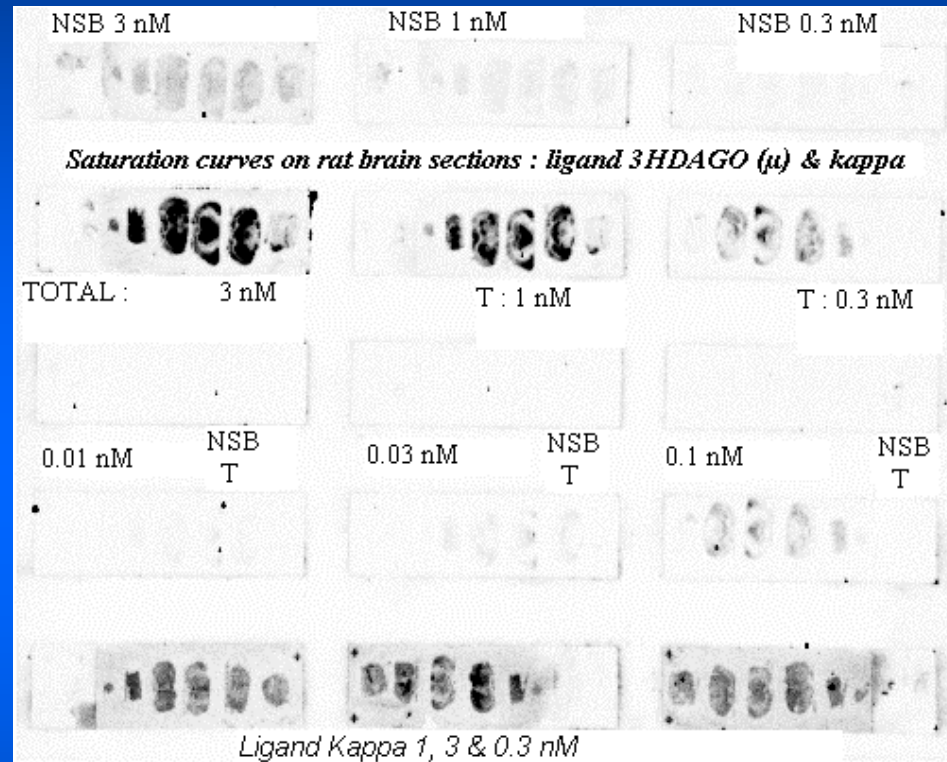
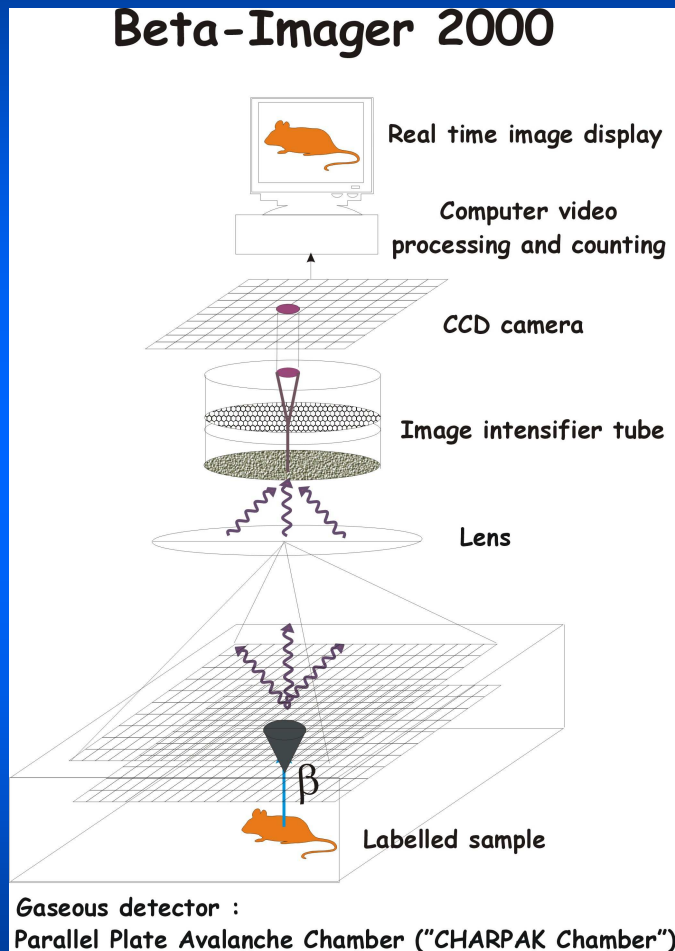
**Si l'on suppose la propriété 'anxiogène' de la BPN vérifiée chez l'homme la demande de BZD paraîtrait difficilement évitable.**



**3<sup>e</sup> partie :**  
**Recherche de modification  
des récepteurs aux opiacés**

**Binding sur coupes de  
cerveaux de rats exposés à la  
BPN  $\pm$  le clorazépate (CRZ)**

# (M&M-3) Principe de la quantification directe des ligands tritiés avec le $\beta$ -Imager 2000 (BIOSPACE)

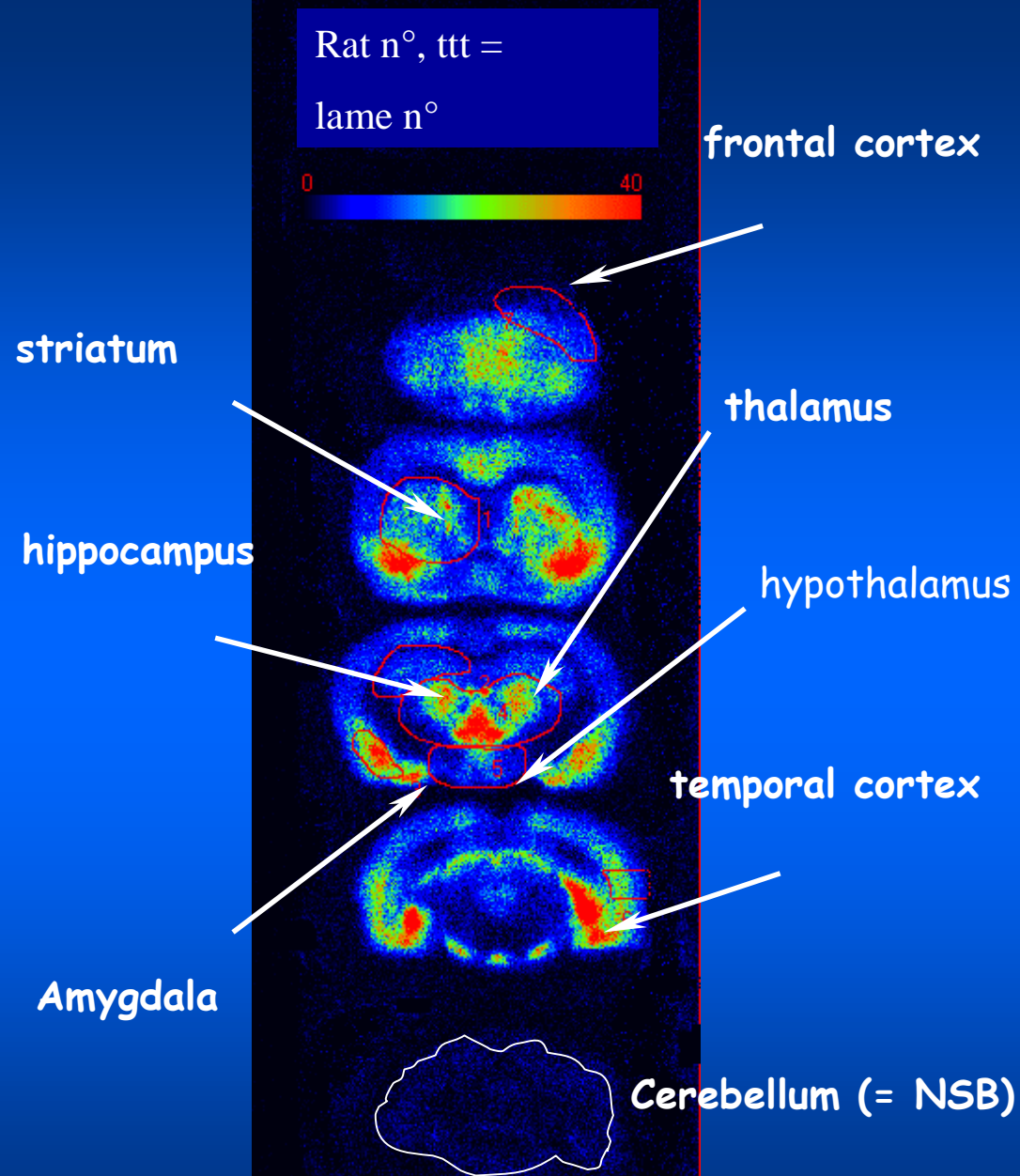


# Méthodes

- Le  $\beta$ -imager 2000 est un radio-imageur temps réel => quantification absolue et immédiate des signaux (dont le 3H).

- \* procédure de quantification :

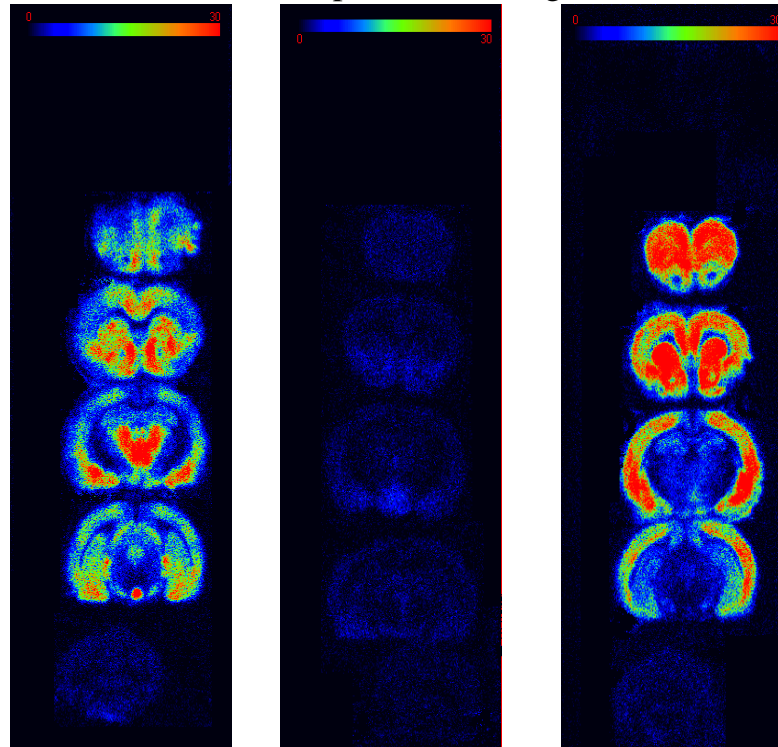
- localisation des régions d'intérêt (ROI).
- Mesure de la Radioactivité de la ROI => transfert (tableur -> XL).
- Courbes de saturation et de Scatchard => Bmax & Kd.



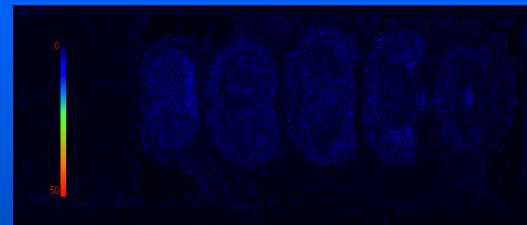
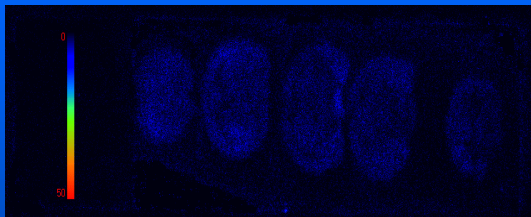
# Aspect des coupes avec les 3 ligands

et exemple de modifications du binding  $\mu$  induites après administration aiguë de BPN

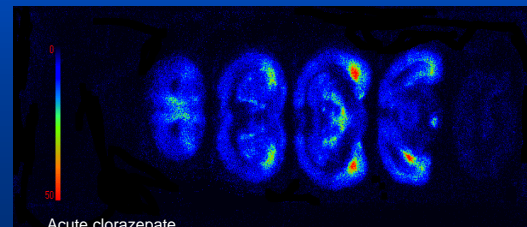
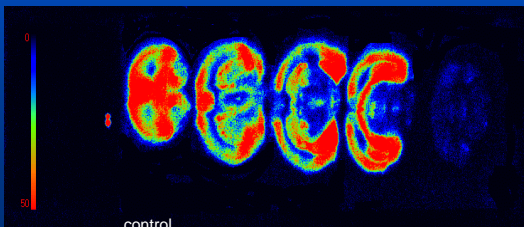
Beta-imager counting of the specific binding of  $\mu$  (DAMGO), Kappa (U-69593) and Delta (Deltorphine II) 3H-ligands on rat brain sections



NSB



Total



## Resultats (3-I-1)

## (3-I) Récepteurs $\mu$

Rats témoins : l'affinité est de  $3.0 \pm 0.2$  nM ;

Bmax fluctue selon la région : 400 fmol/mm<sup>3</sup> (Thalamus )  
1800 (Amygdale temporale)

après administration aiguë de médicaments Bmax  
décroit

**BPN = - 62%** , **CRZ = -36 %** et **BPN + CRZ = - 34 %**

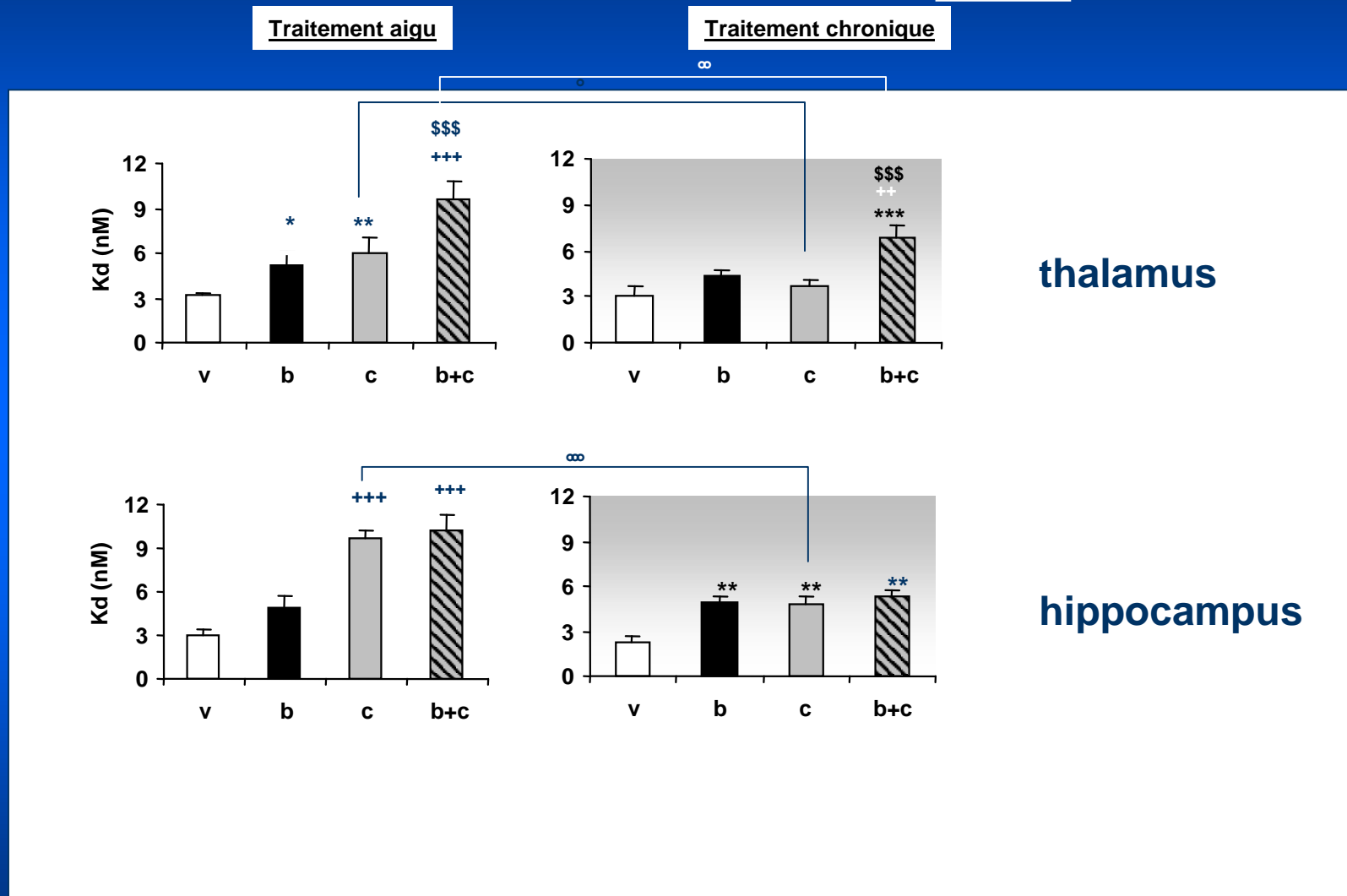
Avec les traitements chroniques

les modifications tendent à s'atténuer et deviennent anatomiquement dépendantes. **La diminution des Bmax n'est plus significative versus témoins.**

en revanche, l'affinité décroît : BPN seul : NS ; **dans les groupes CRZ et BPN + CRZ le Kd passe de 5 à 10 nM en moyenne**

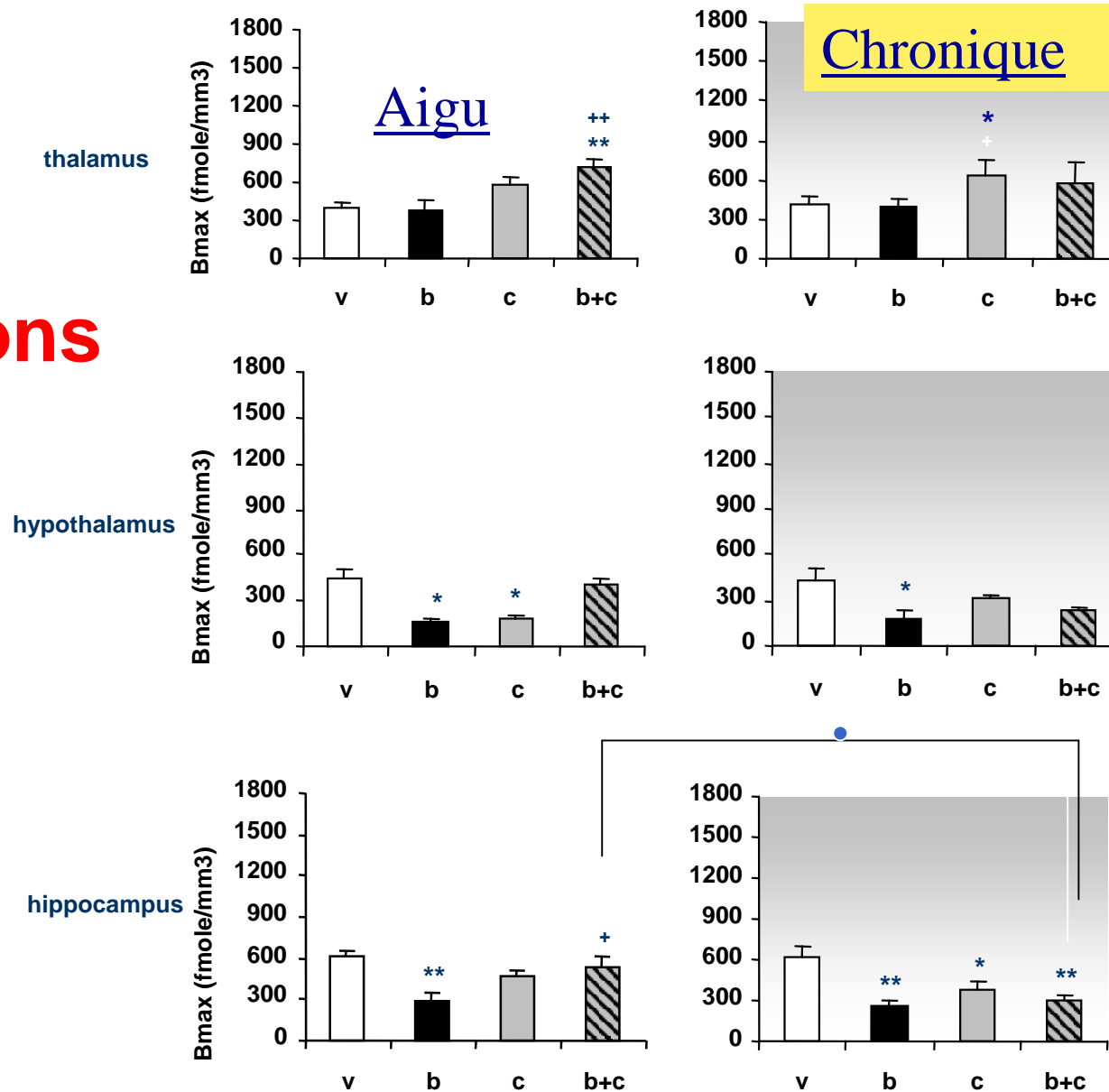
# RESULTATS 3-I-2 : Etudes régionales des effets de BPN et/ou CRZ sur l'affinité $\mu$

$K_D$



# RESULTATS (3-I-3) : Effets de BPN et/ou CRZ sur les sites $\mu$

fluctuations  
du  
Bmax



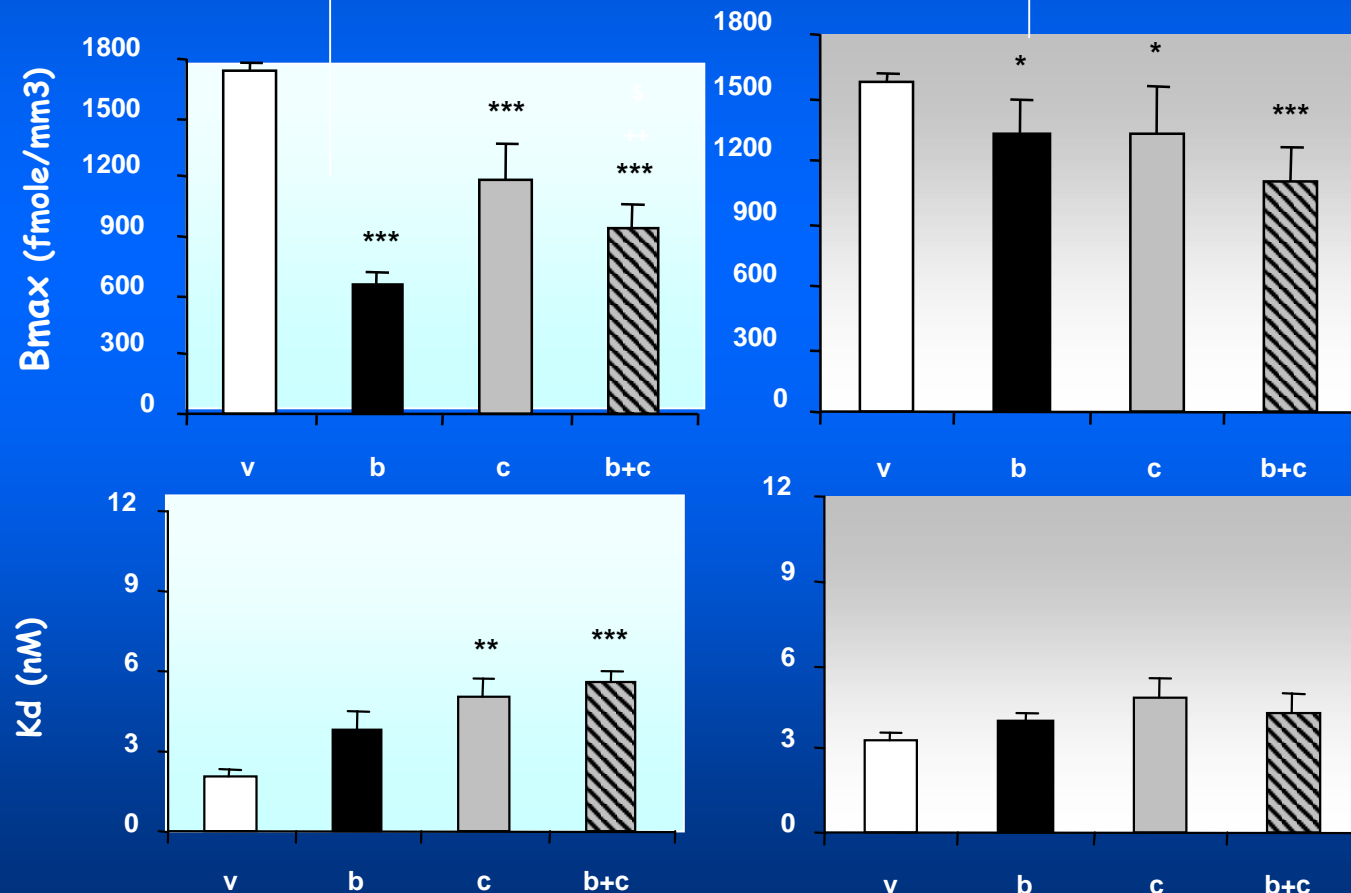
# Resultats (3-I-4) : EFFETS AIGUS ≠ EFFETS CHRONIQUE

## Ex. une région riche en R- $\mu$ : l'Amygdale Temporale

traitement aigu

Traitement chronique

V : Vehicle  
B : Buprenorphine  
C : Clorazepate  
B+C : BPN+CRZ



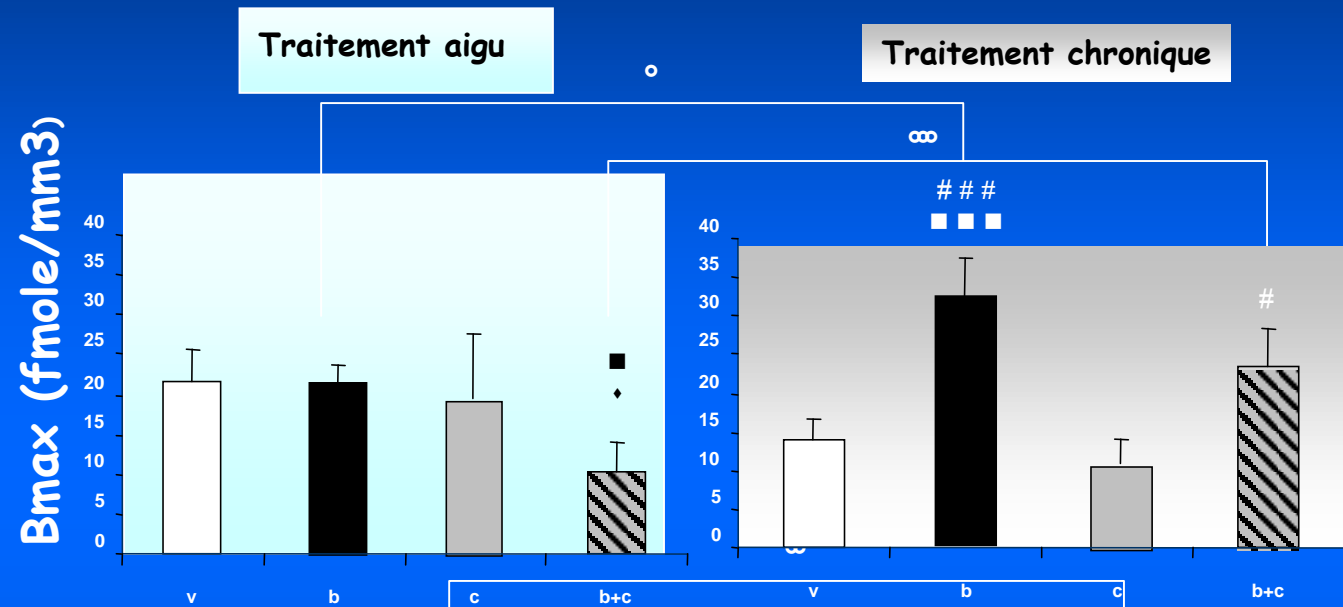


# Binding : Résultats 3-II :

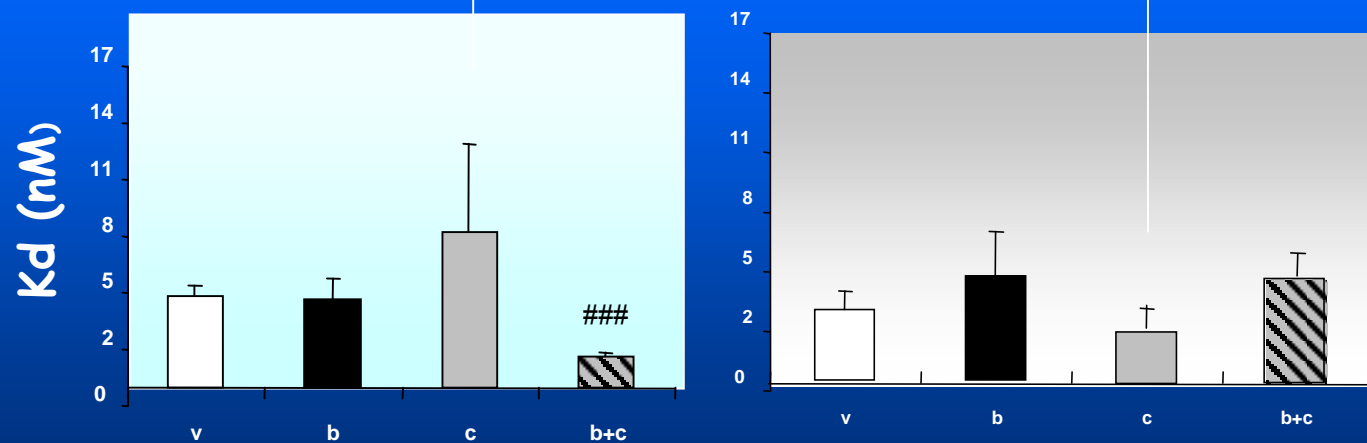
## Récepteurs kappa dans le nucleus accumbens

**Bmax**

V : Vehicle  
B : Buprenorphine  
C : Clorazepate  
B+C : BPN+CRZ



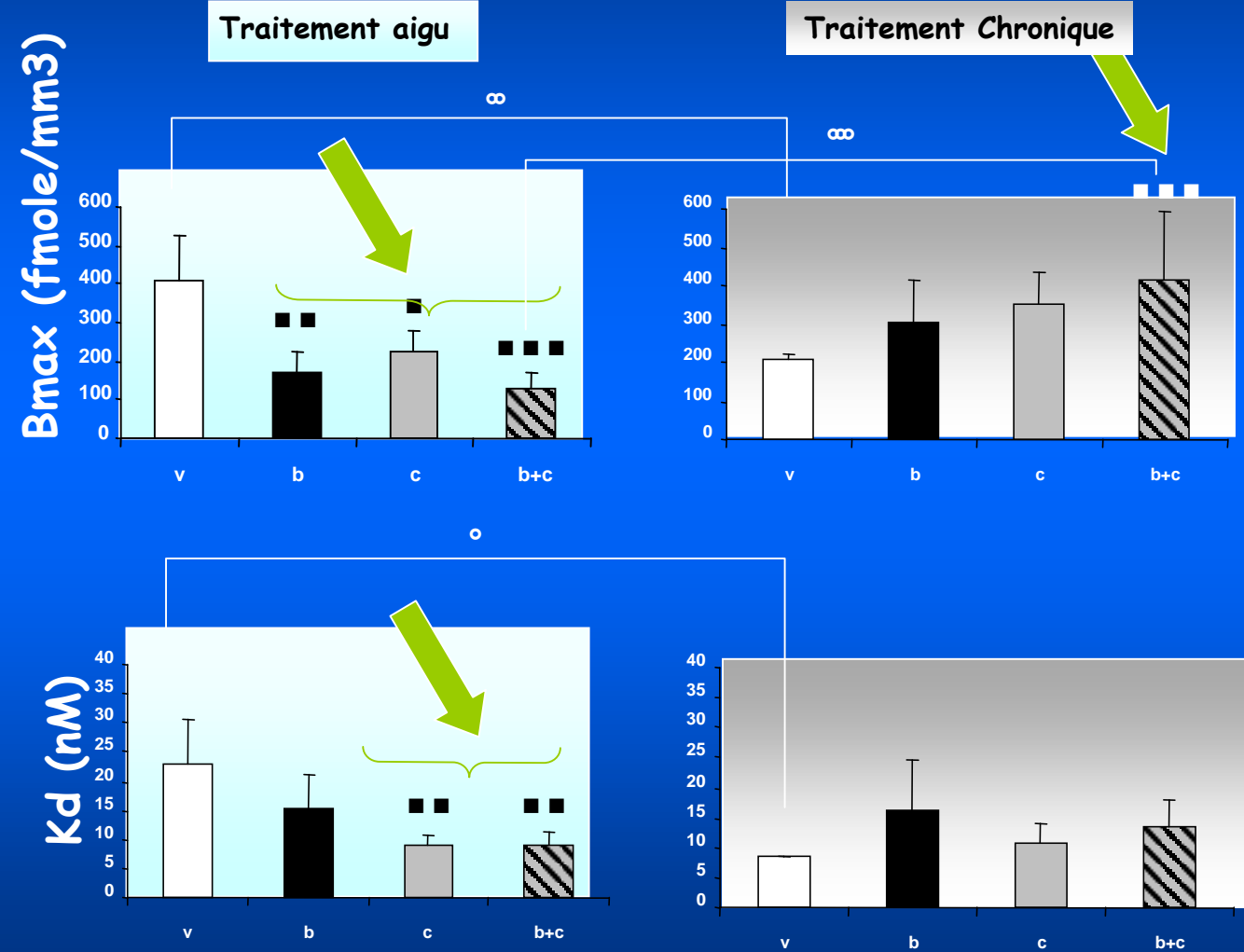
**Kd**



# Resultats III :

## Récepteurs Delta dans le N. accumbens

V : Vehicle  
 B : Buprenorphine  
 C : Clorazepate  
 B+C : BPN+CRZ



# Conclusions (3)

1) **BINDING** : des résultats surprenants sur les modifications de Binding, très nets sur les récepteurs  $\mu$ ,

(i) le CRZ seul,

(ii) modifications « régions dépendantes » et

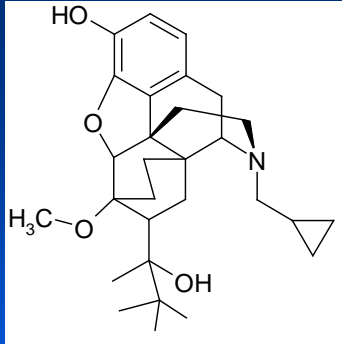
(iii) des différences nettes entre les conséquences des administrations aiguës et chroniques de BZD et de l'association BZD + BPN.

2) l'association CRZ+ BPN diminue la 'down regulation' de façon aiguë et entraîne une désensibilisation accrue en chronique

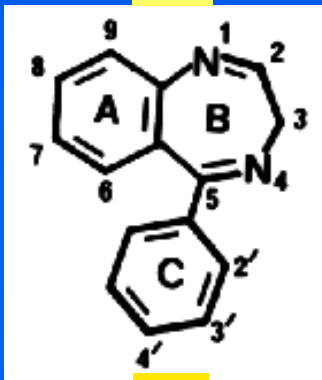
3) dissociation entre les effets sur Kd et sur Bmax surtout avec R-K et R-D

**Globalement, l'association BPN + CRZ induit des effets  $\mu$  équivalents à ceux de la MORPHINE & antagonisme K+D**

# CONCLUSION GENERALE



+



=



Addictions ∞

L'exemple que nous avons développé d'interactions pharmacodynamiques entre BPN et BZD nous amène à proposer des solutions pour l'étude des pharmacodépendances et toxicité sévères liées aux mésusages des médicaments et substances psychoactives

- au plan technique

la recherche clinique étant exclue pour des raisons éthiques => **obligation d'études animales à partir des données épidémiologiques** (CEIP, USP, OFDT,) **études PK et PD** avec modélisations et **analyses ex vivo** (binding, transduction, **histologie** quantitative,)

- au plan stratégique : financement hors EPST, via l'état, l'Afssaps (% vente ?), MILDT, OFDT, CE (EMEA, OEDT), OMS...

*Remerciements : à Bruno PHILOXENE & Mathilde LECHEVALIER pour leur aide technique*