



HAL
open science

Mécanisme d'Action de la Cotinine: Interactions Nicotiques, Étude Pharmacocinétique et Pharmacodynamique, Identification et Purification de son Récepteur

Victor Riah

► **To cite this version:**

Victor Riah. Mécanisme d'Action de la Cotinine: Interactions Nicotiques, Étude Pharmacocinétique et Pharmacodynamique, Identification et Purification de son Récepteur. Biochimie [q-bio.BM]. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 1996. Français. NNT: . tel-00424554

HAL Id: tel-00424554

<https://theses.hal.science/tel-00424554>

Submitted on 16 Oct 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre : 1246

THESE

Présentée pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE

TOULOUSE

SPÉCIALITÉ : SCIENCES DES AGRORESSOURCES

par M. RIAH Omar

Mécanisme d'Action de la Cotinine : Interactions Nicotiques, Étude Pharmacocinétique et Pharmacodynamique, Identification et Purification de son Récepteur.

Soutenu le : 6 DÉCEMBRE 1996 Devant le Jury composé de :

M. J.C. DOUSSET	Président.
M. R. CHHHINE	Rapporteur.
M. J. HÉE	Rapporteur.
M. P. BÉNRRD	Examineur.
M. Ph. COURRIÈRE	Examineur.
Mme I. FOURRSTÉ	Examineur.
M. M. HMRMOUCHI	Examineur.
M. G. MALMARY	Examineur.
M. P. VALDIGUIÉ	Examineur.

AVANT-PROPOS ET REMERCIEMENTS Cette thèse est dédiée respectueusement :

À ma femme, pour sa patience et son soutien sans limite, À Wahid, Sihame et Anis mes enfants,

À mes parents, avec ma plus tendre affection, À toute ma famille, À mes amis,

À mes collègues de travail,

Qu'il me soit permis de remercier chaudement tous ceux et celles qui participèrent à cet effort. Et aussi de souhaiter que cet effort contribue au développement de la connaissance et à l'illustration de la complexité du tabagisme, lequel a aujourd'hui besoin de tous les appuis pour mieux comprendre cette accoutumance, reconnue mondialement comme une dépendance au sens total du terme.

À notre directeur de recherche, Monsieur le **Professeur DOUSSET**.

Vous nous avez fait profiter de votre expérience et de votre grande compétence. Vos conseils quotidiens et votre participation active à la réalisation de ce travail, votre foi en la recherche nous ont permis de surmonter les moments difficiles.

L'expression de notre plus profonde gratitude, vous la trouverez non seulement ici mais en toutes circonstances et en tout lieu, vous qui êtes un ami de toujours. Nous vous remercions de bien vouloir présider notre jury.

À Monsieur le **Professeur COURRIÈRE**, qui a bien voulu s'intéresser à notre travail et nous a fait profiter maintes fois de sa profonde connaissance et de son expérience des travaux scientifiques. Nous lui devons de précieux conseils, des observations d'une grande portée. Nous ne saurions trop lui dire toute notre gratitude pour l'attention dévouée avec laquelle il a suivi nos recherches et pour avoir bien voulu juger notre travail.

À Madame le **Professeur FOURASTÉ**, qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire. C'est peu de dire que, grâce à elle, nous avons eu constamment à notre disposition des documents et des locaux pour mener à bien notre travail. Nous avons plaisir à lui exprimer, en plus de la reconnaissance que lui doivent tous ceux qui travaillent sur la cotinine, les remerciements tout particuliers d'un jeune chercheur pour avoir accepté de juger notre travail.

À Monsieur le **Professeur BÉNARD**. Nous avons trouvé auprès de lui l'accueil le plus obligeant. C'est peu de dire que, grâce à lui, nous avons eu constamment à notre disposition les ATLAS STÉRÉOTAXIQUES du cerveau de rat et l'ANALYSEUR d'IMAGES. Il a été pour nous le plus exact des guides. Nous lui exprimons toute notre reconnaissance et le remercions d'avoir accepté de juger notre travail.

À **Monsieur MALMARY**. Nous tenons à le remercier pour avoir voulu juger notre travail.

À Monsieur le **Professeur HMAMOUCI**, qui nous fait l'honneur d'accepter de s'intéresser à notre travail présent et futur. Nous espérons qu'il trouve ici toute notre gratitude et notre reconnaissance pour avoir accepté de juger notre travail.

À Monsieur le **Professeur VALDIGUIÉ**, qui nous fait l'honneur de juger notre travail. Nous espérons qu'il trouve ici notre profond témoignage de reconnaissance et notre grand espoir d'une collaboration future fructueuse.

À Monsieur le **Professeur CHAHINE**, qui nous fait l'honneur de juger ce travail. Nous lui témoignons notre respect pour ses compétences et sa connaissance du sujet de notre travail.

À **Monsieur HÉE**, chef du Département de Biologie de l'Association de Recherche sur les Nicotianées. Nous avons trouvé auprès de lui toute la compréhension, la compétence et la gentillesse. Nous le remercions chaleureusement pour avoir accepté de juger notre travail.

Nous tenons à remercier ici tous ceux et celles avec qui nous avons été en relations à l'occasion de nos recherches :

Les responsables et le personnel du service de biochimie et d'histopathologie du Centre Claudius Régaud,

Messieurs les directeurs, les chercheurs et les techniciens des Laboratoires Zoologie et Parasitologie, tout particulièrement Monsieur le Professeur ÉCALLE et Monsieur PECH.

Synthèse Physico-chimique et Radiobiologique de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, tout particulièrement Monsieur BEN BRAHIM. Oncologie Cellulaire et Moléculaire de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques, tout particulièrement Madame LERMÉ et Monsieur PICAUT. Cinétique

des Xénobiotiques et Biophysique, Monsieur le Professeur OUSTRIN, Monsieur le Professeur HOUIN et tout particulièrement Monsieur LABAT et Monsieur FUNTES.

Physiologie et Hématologie, tout particulièrement le Professeur DUMAS, Madame GARIGUE et Madame NAVARRO-DELMASURE. Chimie Pharmaceutique, en particulier Monsieur le Professeur PAYARD, Madame BAZIARD-MOUYSSET et Mademoiselle KOULOUCHERI. Bactériologie Virologie et Microbiologie Industrielle, tout particulièrement Monsieur le Professeur MICHEL. Nous avons trouvé auprès de lui l'accueil et l'aide dans les moments difficiles. Nous tenons à lui exprimer, ainsi qu'à tous les membres de son équipe, tout particulièrement Madame ROQUES, notre profonde gratitude. Madame MALMARY. Nous avons bénéficié de sa grande compétence dans le domaine des analyses statistiques. Nous lui devons toute notre reconnaissance et la remercions infiniment.

À Monsieur SCHILTZ directeur de la recherche de l'A. R. N. (Association de Recherche sur les Nicotianées) pour avoir retenu ce projet et pour nous avoir fait bénéficier avec grande amabilité de ses compétences dans le domaine des alcaloïdes du tabac.

À Monsieur CASSAN et **Monsieur POTHERAT** pour avoir retenu ce projet et pour l'ensemble du personnel des laboratoires PIERRE FABRE à Toulouse et à Castres pour leurs aides inestimables sans lesquelles ce travail n'aurait pas avancé.

Table des matières

RÉSUMÉ	10
ABSTRACT	12
INTRODUCTION GÉNÉRALE	14
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	15
CHAPITRE 1 : LE TABAGISME : UNE DÉPENDANCE COMME LES AUTRES	15
1.1. LE TABAGISME	
1.1.1. Les constituants de la fumée de tabac	
1.1.2. La nicotine	
1.1.3. La cotinine	
1.1.4. Les autres alcaloïdes	
1.2. LA NICOTINE ET LA DÉPENDANCE AU TABAC	
1.2.1. La dépendance	
1.2.2. Dépendance comportementale et psychologique	
1.2.3. Les marqueurs du tabagisme	
CHAPITRE II : LA LUTTE ANTI-TABAGIQUE : TRAITEMENT ET PRÉVENTION	33
2.1. LES MÉTHODES	
2.1.1. L'auto traitement	
2.1.2. La dynamique de groupe	
2.1.3. Les méthodes comportementales	
2.1.4. L'aide médicamenteuse	
2.1.5. Les autres méthodes	
2.2. LES INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES	
2.3. LE PRONOSTIC	
2.4. LA PRÉVENTION	
2.5. POUR L'AVENIR	
2.6. CONCLUSION	
CHAPITRE III : ACTIVITÉS PHARMACOLOGIQUES ET INTÉRÊTS FONDAMENTAUX ET THÉRAPEUTIQUES DE LA COTININE	52
3.1. EFFETS COMPARABLES À CEUX DE LA NICOTINE	
3.2. EFFETS INVERSES DE CEUX DE LA NICOTINE	
3.3. INTÉRÊTS FONDAMENTAUX ET THÉRAPEUTIQUES DE LA COTININE	

3.4. CONCLUSIONS

CHAPITRE IV : LES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES

61

- 4.1. PRINCIPES COMMUNS DES STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES
- 4.2. L'HÉTÉROOLOGOMÉRISATION COMME SOURCE DE DIVERSITÉ
- 4.3. LES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES À L'ACÉTYLCHOLINE
 - 4.3.1. Classification des récepteurs nicotiniques "Le prototype"
 - 4.3.2. Les nAChRs neuronaux
 - 4.3.2.a. Les nAChRs neuronaux qui ne lient pas l'alpha-bungarotoxine
 - 4.3.2.b. Les nAChRs neuronaux qui lient l'alpha-bungarotoxine
 - 4.3.3. Les sous-unités des nAChRs
 - 4.3.4. Localisation, expression et pharmacologie des sous-unités des nAChRs
- 4.4. COMPLEXITÉ DU PROBLÈME RELATIF À LA DIVERSITÉ DES nAChRs NEURONAUX
- 4.5. DISTRIBUTION RÉGIONALE DES nAChRs NEURONAUX
- 4.6. LE RÉCEPTEUR NICOTINIQUE DES INSECTES
- 4.7. MODULATION DES nAChRs NEURONAUX : "Up et Down Régulation"
- 4.8. DÉSENSIBILISATION DES nAChRs
- 4.9. CONCLUSION

MATÉRIELS ET MÉTHODES

83

- I. LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE
 - II. LES SOLVANTS
 - III. LES RÉACTIFS
 - IV. AUTRES
 - V. LES RADIOLIGANDS
 - VI. L'APPAREILLAGE
 - VII. LES MÉTHODES
- 7.1. Synthèse de la cotinine et de la N-oxide de cotinine
 - 7.2. Étude de l'Activité insecticide
 - 7.3. Étude de la Toxicité chez la souris
 - 7.4. Étude de la Biodisponibilité de la Cotinine Chez le Rat
 - 7.4.1. Conditions expérimentales
 - 7.4.2. Étude du passage de la cotinine dans le SNC
 - 7.4.3. Étude de la régulation du passage par le système cholinergique
 - 7.4.4. Extraction Alcoolique de la Cotinine
 - 7.4.5. Dosage Radio-immunologique de la Cotinine
 - 7.4.6. Purification Préliminaire de l'Extrait Alcoolique
 - 7.4.7. Identification de la Cotinine par CCM
 - 7.4.8. Identification et Dosage de la Cotinine par HPLC
 - 7.4.9. Induction de la Tolérance Chez le Rat
 - 7.4.10. Préparation des membranes de Torpédo
 - 7.4.11. Préparation des membranes de cerveau de rat
 - 7.4.12. Dosage des protéines
 - 7.4.13. Pureté des radioligands
 - 7.4.14. Interaction de la cotinine avec les sites de la [3H]nicotine et de la [1 251]alpha-bungarotoxine

86

87

- 7.4.15. Identification des sites de la [125I]cotinine
- 7.4.16. Études autoradiographiques
- 7.4.17. Purification des Sites de la Cotinine
 - 7.4.17.a. Solubilisation des Sites de la Cotinine
 - 7.4.17.b. Enlèvement du CHAPS
 - 7.4.17.c. Synthèse de la N,n-propyl Carboxamide Cotinine
 - 7.4.17.d. Protocole de synthèse
 - 7.4.17.e. Vérification du produit de synthèse
 - 7.4.17.f. Synthèse de la Colonne d'Affinité
 - 7.4.17.g. Purification par Chromatographie d'Affinité
- 7.4.18. Analyse SDS-PAGE
- 7.4.19. Analyse des Données
 - 7.4.19.a. Méthode de Wadley
 - 7.4.19.b. Méthode de Steel et Peckham
- 7.4.20. Statistiques

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX 112

CHAPITRE I : NATURE DE L'INTERACTION DE LA NICOTINE AVEC SES MÉTABOLITES CHEZ LA MOUCHE 113

Introduction

Matériels et Méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

CHAPITRE II : NATURE DE L'INTERACTION DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE CHEZ LA SOURIS 123

Introduction

Matériels et Méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

CHAPITRE III : ÉTUDE DE LA FIXATION DE LA NICOTINE ET DE LA COTININE SUR LES SITES [3H]NICOTINE ET [125I]ALPHA-BUNGAROTOXINE 134

Introduction

Matériels et Méthodes

Résultats

Discussion

Conclusion

CHAPITRE IV : ÉTUDE DU PASSAGE DE LA COTININE DANS LE CERVEAU ET DE SES INTERACTIONS AVEC LES LIGANDS NICOTINIQUES 143

Introduction

Matériels et Méthodes

Résultats
 Discussion
 Conclusion

CHAPITRE V : NATURE NICOTINIQUE DES SITES DE FIXATION DE
 LA [125I]COTININE

153

Introduction
 Matériels et Méthodes
 Résultats
 Discussion
 Conclusion

CHAPITRE VI : LA [125I]COTININE : UNE NOUVELLE SONDE POUR ÉTUDIER
 LES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES NEURONAUX DE LA COTININE

167

Introduction
 Matériels et Méthodes
 Résultats
 Discussion
 Conclusion

CHAPITRE VII : SOLUBILISATION ET PURIFICATION DE RÉCEPTEUR DE LA
 COTININE DU CERVEAU DE RAT

181

Introduction
 Matériels et Méthodes
 Résultats
 Discussion
 Conclusion

CHAPITRE VIII : MODULATION DES nAChRs NEURONAUX PAR LA NICOTINE
 ET LA COTININE

195

Introduction
 Matériels et Méthodes
 Résultats
 Discussion
 Conclusion

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

211

DISCUSSION GÉNÉRALE

230

CONCLUSION GÉNÉRALE.

231

RESUME

Les études comparatives de la nicotine et de son métabolite obtenu par addition d'une fonction cétone en α par rapport à l'azote du noyau pyrrolidine, la cotinine, ont été réalisées par différentes approches expérimentales : interaction toxique chez la mouche et chez la souris, interaction avec les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine neuronaux et périphériques, étude du passage de la cotinine dans le cerveau et de sa régulation chez le rat, usage de la $[125I]$ cotinine pour étudier les récepteurs de la cotinine, analyse autoradiographique de ces récepteurs, effets de l'administration de nicotine et de cotinine sur la modulation des récepteurs nicotiques à l'acétylcholine neuronaux et purification du récepteur de la cotinine par chromatographie d'affinité.

Les expériences réalisées, dans les conditions adoptées, ont montré que la métabolisation de la nicotine :

1 - atténue sa toxicité de 50 fois, par pulvérisation, chez la mouche et de 250 fois, par voie intrapéritoneale, chez la souris.

2 - donne un produit d'oxydation (cotinine) relativement moins actif et un produit de déméthylation (nornicotine) relativement très actif. Le premier agit avec la nicotine par des mécanismes distincts (supra-additivité ou synergie), alors que le second agit avec la nicotine par des mécanismes communs (additivité ou antagonisme). L'hexaméthonium, un ganglioplégique, ne conférant pas de résistance à la toxicité du mélange de nicotine et de cotinine suggère une toxicité centrale.

3 - atténue son affinité pour les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine périphériques et neuronaux majeurs.

4 - atténue fortement son passage dans le cerveau du rat vigilant et soumet ce passage au contrôle du système nicotinique périphérique.

5 - atténue et modifie ses actions modulatrices sur les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine neuronaux.

6 - augmente sa sélectivité pour certains récepteurs nicotiques à l'acétylcholine neuronaux mineurs.

Ainsi, la métabolisation de la nicotine atténue fortement sa toxicité, réduit ses activités et oriente de façon bénéfique ses propriétés pharmacologiques par une augmentation de sa sélectivité pour certains récepteurs nicotiques à l'acétylcholine neuronaux.

ABSTRACT

The comparative studies of nicotine and its derivative, resulted by ketone grafting at the α position to the nitrogen of the pyrrolidine ring, were investigated by distinct experimental means : toxic interactions in flies and mice, binding to the peripheral and to neuronal nicotinic acetylcholine receptors, blood-brain barrier permeability and its modulation, use of [*125I*]cotinine to study cotinine receptors, autoradiographic distribution of cotinine receptors, nicotine or cotinine induced modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors and affinity chromatography purification of cotinine receptors.

The results of the experiments, performed under our conditions, reveal that nicotine metabolism :

1 - lowers its toxicity by 50, by spraying, in flies and 250 times, by intraperitoneal route, in mice.

2 - produces an oxide derivative (cotinine), relatively low active and a demethyl derivative (nornicotine), relatively very active.

The former acts with nicotine by distinct mechanisms (supra-additive or synergism), while the later acts with nicotine by common mechanisms (additive or antagonism).

Hexamethonium did not protect against nicotine and cotinine mixtures toxicity suggesting a central effect.

3 - lowers its affinity for peripheral and major neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

4 - lowers its ability to pass the blood-brain barrier, in the vigilant rat, and subjects this passage to the control of peripheral nicotinic mechanisms.

5 - lowers and modifies its modulator actions on neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

6 - enhances its selectivity for minor subtypes of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

Thus, nicotine metabolism lowers its toxicity and its activities, and directs beneficially its pharmacological properties by enhancing its selectivity for subtypes of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.

INTRODUCTION GENERALE

Lorsqu'en 1492 les compagnons de Christophe Colomb découvrent l'usage du tabac par les indigènes d'Amérique, ils n'ont pas tardé à les imiter et à l'importer vers l'Europe. Ainsi l'usage et la culture de cette plante se répandirent en Europe vers le XVI^e siècle. Il paraît que les Egyptiens ont connu le tabac bien avant, puisque des restes de feuilles de tabac ont été formellement identifiés par le professeur Metcalfe, spécialiste mondial en anatomie végétale, dans la momie de Ramsès II et que, même s'il s'agissait d'un faux, les datations indiquent au moins un âge antérieur au XVI^e siècle. Très vite, l'usage du tabac a dépassé celui d'autres plantes à fumer comme le chanvre, l'eucalyptus ou la datura qui se retrouvent respectivement au 2^e, 3^e et 4^e rang. Ce succès faisait dire à Fiquier en 1853 : "Cultivé aujourd'hui sous toutes les latitudes, cette plante plaît aux nègres, aux Hottentos, aux Samoyèdes, aux naturels de la Nouvelle-Hollande comme aux peuples les plus civilisés de l'Europe et du Nouveau Monde. On se demande ce qui a valu au tabac cette prodigieuse fortune ? Comment une herbe fétide, fumée par les sauvages de l'Amérique, a-t-elle soumis le monde presque entier à un empire qui ne fait que s'accroître chaque jour ?" C'est à cette question, du moins en partie, que tente de répondre notre travail sur la cotinine.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Le tabagisme une dépendance comme les autres

Bien que le "répertoire" des méfaits liés au tabagisme ne cesse de s'agrandir (Tuchais et Tuchais, 1994), de nouveaux fumeurs sont constamment recrutés parmi les jeunes. Le pourcentage de fumeurs femmes tend à rejoindre celui des hommes. Pratiquement, deux personnes sur trois sont exposées volontairement ou involontairement aux risques liés au tabagisme (Perriot, 1993). L'usage du tabac, est-il donc une dépendance ou uniquement une habitude ? Est-ce que le tabac apporte un confort pour les fumeurs ou s'agit-il simplement d'un effet de mode ?

En 1975 l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) définissait la dépendance comme "un état psychique et parfois physique, résultant de l'interaction entre un organisme vivant et un produit, caractérisé par des réponses comportementales et autres qui comportent toujours une compulsion à prendre le produit sur un rythme continu ou périodique de façon à en ressentir ses effets psychiques, et parfois, à éviter l'inconfort de son absence (sevrage). La tolérance peut être ou non présente". A ce titre, la consommation du tabac peut être considérée comme une dépendance au même titre que celle des autres drogues, dites dures (Le Houezec et Molimard, 1986). Ce point de vue est partagé par de très nombreux auteurs (Besson, 1992; Fiore, 1992; Clarke, 1994). La substance admise comme responsable de cette dépendance physique au tabac est la nicotine (Stolerman, 1994), mais la possibilité de l'intervention d'autres alcaloïdes du tabac (**Tableau 1**), de façon directe (Dar et al., 1993; 1994; Fuxe et al., 1979; Risner et al., 1985; 1988; Andersson et al., 1993), ou vraisemblablement en synergie avec la nicotine (Dousset et al., 1992; Perriot, 1993), n'est pas à exclure.

I.1_LE TABAGISME.

1.1.1. Les constituants de la fumée de tabac.

La fumée de tabac contient plus de 4 000 constituants parmi lesquels des alcaloïdes. Parmi ces alcaloïdes la nicotine (**Tableau 1**).

Tableau 1 : *teneurs comparatives en alcaloïdes dans le tabac manufacturé et la fumée de cigarette.*

Dans Perriot (1993) et modifiée par Hée de l'Association de Recherche sur les Nicotianées (SEITA RECHERCHE).

Alcaloïdes	mg d'alcaloïde par g de tabac	Fumée: µg par cigarette
Nicotine	20	100-2000
Anabasine	0,11	3-12
Anatabine	0,54	3-14
Cotinine	?	9-57
Myosmine	?	9
Harmane	0,1-0,2	10-20
Norharmane	0,1-0,2	10-20
Nornicotine	0,64	27-88

"Un alcaloïde est une substance azotée d'origine végétale, active à faible dose et toxique". Dans la feuille de tabac on trouve à côté de la nicotine d'autres alcaloïdes, comme la nornicotine (dépourvu du radical N-méthyl), l'anabasine (isomère de la nicotine, formé par la transposition de la chaîne N-méthylrique qui transforme le noyau pyrrolidine en noyau pipéridine), la cotinine (formée par auto-

oxydation de la nicotine lors de la fermentation pendant le séchage des feuilles), l'anatabine, la myosmine, l'harmane et le norharmane (**Figure 1**).

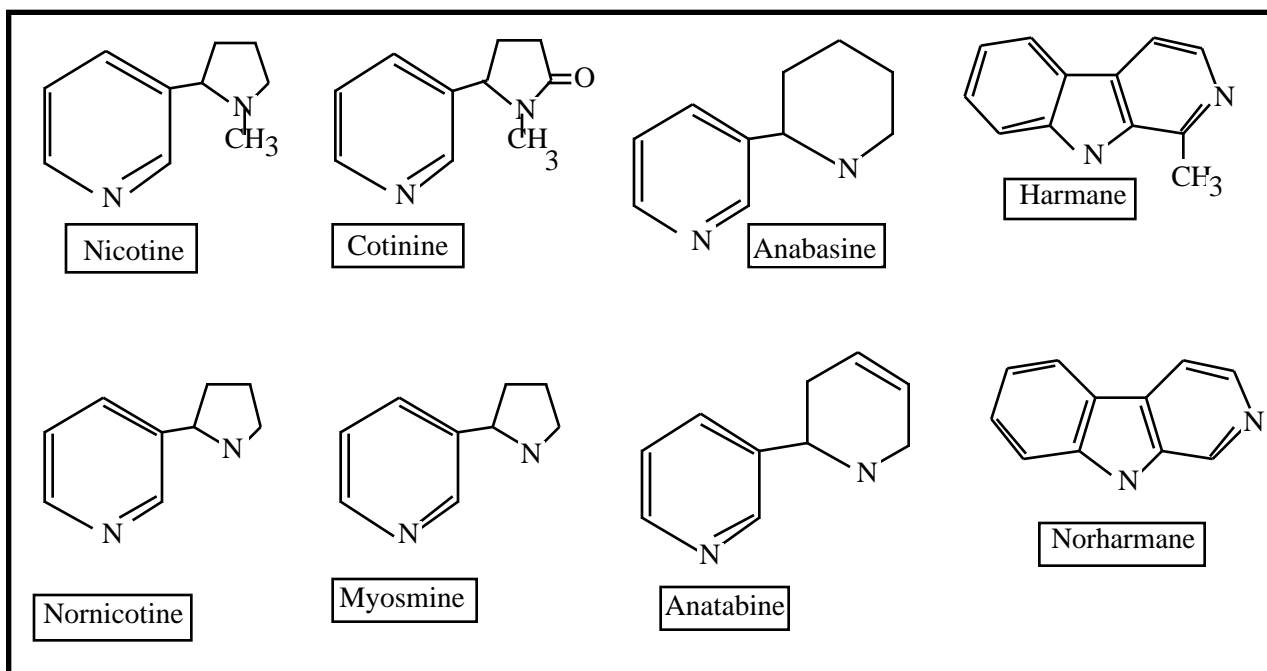


Figure 1 : *Structure des différents alcaloïdes de la feuille du tabac.*

Ces différents alcaloïdes sont présents à l'état de traces (**Tableau 1**). *In vivo*, c'est la nicotine et la cotinine qui présentent un grand intérêt vu leurs concentrations plasmatiques (Bowman et al., 1959; Di Giusto et Eckard, 1988; Benowitz et al., 1983a; Jacob et Benowitz, 1988).

1.1.2. La nicotine.

C'est le principal alcaloïde du tabac. Elle représente 10% du poids sec de la plante (*Nicotiana tabacum* L. et *Nicotiana rustica* L.). La nicotine a été isolée du tabac pour la première fois par Posselt et

Reimann en 1828. Sa formule brute a été établie par Melsens en 1843 et confirmée par Barral en 1847. Sa synthèse a été réalisée par Pictet et Crépieux en 1895 et c'est Kœnig qui détermina sa masse molaire en 1940. On trouve la nicotine dans d'autres plantes comme *Equisetum* (prêle), *Lycopodium* (lycopodes) et *Zinnia elegans* (composée) et sous forme de traces dans d'autres Solanacées telles que la tomate, l'aubergine et la pomme de terre. C'est une base de pKa proche de 8 et sa masse molaire est égale à 162,24. Sa formule brute est C₁₀H₁₄N₂. Sa structure (**Figure 1**) comporte un noyau pyridinique et un noyau pyrrolidinique.

Il existe deux stéréoisomères (L et D-nicotine). La L-nicotine étant beaucoup plus présente et environ 100 fois plus active que la D-nicotine. Liposoluble et hydromiscible, la nicotine possède une grande capacité d'absorption par les membranes. Enfin, elle est liée à 10% aux protéines et son volume de distribution est de 1 à 3 L.kg⁻¹ (**Tableau 2**). Absorbée à travers les muqueuses buccales, nasales et alvéolaires des poumons, 90% de la nicotine passe dans le sang et gagne le cerveau en quelques secondes. Par voie digestive une grande partie de la nicotine est métabolisée lors du premier passage hépatique en cotinine et en N-oxyde de nicotine qui sont supposés être pharmacologiquement inertes.

La nicotine est un poison violent, la dose létale est de 60 mg. Chez les jeunes enfants, qui sont morts après avoir mangé des cigarettes, la dose ingérée toxique a été estimée à 0,5 mg.kg⁻¹. La nicotine se fixe sur les récepteurs cholinergiques dits "nicotiniques" centraux et périphériques, très ubiquitaires. Ces récepteurs appartiennent à la super famille des récepteurs canaux. A forte dose la nicotine les bloque, à faible dose elle les excite et fait libérer, par le neurone d'aval, la noradrénaline, la sérotonine et peut-être aussi la dopamine. La nicotine agirait sur les éicosanoïdes et l'ensemble des prostaglandines. Chez le fumeur chronique, les doses de nicotine absorbées provoquent une vasoconstriction, une tachycardie et une élévation de la pression artérielle (Rosemberg et al., 1980). Ces effets peuvent être bloqués par un ganglioplégique comme l'hexaméthonium.

En conclusion la nicotine est importante en biologie humaine par :

- * La dépendance qu'elle induit chez les fumeurs : proclamée par l'O.M.S. comme un fléau social qui touche une grande partie de la société, avec des conséquences graves sur la santé.
- * Le nombre élevé des maladies cardio-vasculaires attribuées à sa consommation excessive.
- * Les conséquences néfastes sur la santé des bébés lorsque les mamans fument.
- * Les promesses quant à son utilisation comme médicament dans certaines pathologies.

1.1.3. La cotinine.

Il existe relativement peu de travaux sur les effets pharmacologiques de la cotinine qui a été jugée, pendant très longtemps, totalement dépourvue d'activité.

La cotinine est un dérivé oxygéné de nicotine, qui porte un groupe cétonique au niveau du noyau pyrrolidine (**Figure 1**). La cotinine a été obtenue en 1893 par Pinner et signalée par Jonstone et Plimmer dans la feuille de tabac. Elle apparaît par auto-oxydation de la nicotine lors de la fermentation pendant le séchage des feuilles. La cotinine a pour formule brute $C_{10}H_{12}N_2O$, sa masse molaire est de 176,24 et son pKa est de 7,5. C'est donc une base plus faible que son précurseur, elle est très hygroscopique, hydromiscible et liposoluble. La cotinine apparaît chez le fumeur lors de la métabolisation de la nicotine. Elle est le métabolite majeur puisqu'elle représente 70% de ce métabolisme. Elle peut provenir de la fumée, mais en faible quantité (**Tableau 1**). Les caractéristiques pharmacocinétiques de la cotinine, en particulier une demi-vie très longue (15 h), en font un excellent marqueur tabagique (Pomerleau et al., 1990) (**Tableau 2**).

La cotinine est 100 (voie intrapéritonéale) à 1000 (voie intraveineuse) fois moins toxique que la nicotine (Chahine, 1989). Actuellement, on admet que la cotinine est responsable de certaines activités pharmacologiques :

- * Contrairement à la nicotine, la cotinine détermine un relâchement musculaire et une vasodilatation (Smith et al., 1994; Chahine et al., 1996).
- * Comme la nicotine, la cotinine inhibe différentes étapes de la biosynthèse des oestrogènes et des androgènes (Barbieri et al., 1989).
- * Comme la nicotine, la cotinine peut avoir une activité fibrinolytique (Chahine et al., 1990).
- * La cotinine inverse l'effet de la nicotine sur la pression chez le chien anesthésié (Borzelleca et al., 1962).
- * La cotinine et la nicotine ont des effets opposés sur la biosynthèse des prostacyclines (Dejean, 1985; Chahine et al., 1990).
- * La cotinine entraîne une dépression respiratoire (Borzelleca et al., 1962).
- * Ses effets centraux se résument dans son action analgésique, son inhibition de l'éveil, du sens de l'équilibre, de la curiosité et dans son pouvoir potentialisateur des hypnotiques (Chahine, 1989).

En conclusion, la cotinine est importante en biologie humaine par :

- * Sa contribution probable aux phénomènes de la dépendance tabagique.
- * Son opposition aux effets néfastes de la nicotine sur le système cardio-vasculaire.
- * Son utilisation efficace comme marqueur tabagique pour le suivi médical.,
- * Les promesses quant à son utilisation comme médicament dans certaines pathologies.

Tableau 2 : *paramètres pharmacocinétiques de la nicotine et de la cotinine. Dans Albenque (1994).*

Alcaloïde	Nicotine	Cotinine
Absorption	Surtout pulmonaire Dépend du pH	Surtout biosynthétisée
Distribution	Pic plasmatique précoce Liaison aux protéines 10 à 20% Vd = 183 ± 49 L	Pas de pic plasmatique Liaison aux protéines 26% Vd = 88 ± 17 L
Métabolisme	Hépatique : 80% métabolites essentiels : Cotinine 70% Nicotine N-oxyde 4%	Hépatique : 60% métabolites essentiels : Cotinine N-oxyde Trans 3' hydroxycotinine- γ-(3 pyridyl)-γ-oxo N- méthyl butyramide
Élimination	Rénale : (16%) dépend du pH demi-vie = 2h CL _T = 1,3 ± 0,3 L.min ⁻¹	Rénale (17%) : augmente si pH acidifié Demi-vie = 15 ± 4 h CL _T = 0,06 ± 0,01 L.min ⁻¹

1.1.4. Les autres alcaloïdes.

Leur structure est représentée sur la **Figure 1**. Le **Tableau 3** résume leurs actions pharmacologiques aux doses actives, leurs effets mutagènes et/ou tératogènes.

Tableau 3 : Récapitulatif des effets pharmacologiques, mutagènes (test d'Ames ou microsomes de Salmonelle) et tératogènes (test sur embryons de Xénopus) des alcaloïdes du tabac. D'après Borzelleca et al., 1962; Kim et al., 1968; Dawson et al., 1988; Perriot, 1993; Tuchais et Tuchais, 1994... La valeur 100% est attribuée à l'activité de la nicotine.

Alcaloïde	Nicotine	Cotinine	Nornicotine	Anabasine	Myosmine
Contraction de l'iléon	100%	inférieure 1%	5-10%	18%	0,2-0,5%
Réflexe médullaire	100%	inférieure 1%	50%	20%	10%
Effet presseur	100%	~ 0%	20%	20%	?
Effet sur la synthèse des hormones sexuelles	Inhibition de la synthèse des œstrogènes et des androgènes	idem	?	idem	?
Effet mutagène ou tératogène	-(Salmonelle) ++fetax	-(Ames) +/-fetax	-(Ames) ?	-(Ames) ++	-(Ames) ?
Dommmages ADN (E.Coli)	?	-	-	-	Réparable
Échanges de Chromatides Sœurs (ECS)	?	-	± selon dose	-	-
Production de Nitrosamines et radicaux libres	+/-	+/-	++	++	+/-

En conclusion, les auteurs pensent que c'est l'altération du squelette carboné du noyau pyrrolidine qui diminue l'activité nicotine-like (Larson et Haag, 1943; Kim et al., 1968; Yamamoto et al, 1995).

Il existe peu de travaux sur les effets cancérigènes ou promoteurs des alcaloïdes du tabac. La cotinine ne s'est avérée ni cancérigène ni promotrice chez le rat initié au FANFT (N-(4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl)formamide) (Lavoie et al., 1985).

Les études épidémiologiques associent le tabagisme avec les cancers cervicaux. Hellberg et al., (1988) ont montré chez 35 femmes porteuses de tumeurs cervicales, une surconcentration de nicotine et de cotinine dans le mucus cervical par rapport au sérum.

Même si la nicotine et la cotinine ont été retrouvées dans les liquides du sein, leur implication dans ces cancers reste à démontrer (Hill et al., 1979). Dawson et al., (1988) comptent la nicotine et à un degré 100-1000 fois moindre, la cotinine comme tératogènes.

I. 2_ LA NICOTINE ET LA DÉPENDANCE AU TABAC.

Pour un fumeur dépendant, fumer est un besoin, une obligation et toute tentative d'arrêt ou d'interruption même temporaire est suivie d'un inconfort accompagné d'une sensation de manque, d'irritabilité, de difficulté dans le travail et d'insomnie... Ces symptômes de manque se retrouvent chez les abstinents de cigarette, de prise et chique...

1.2.1. La dépendance.

Il existe donc, entre autres, une dépendance physique au tabac caractérisée par la sensation de besoin, de manque, par l'apparition d'anxiété, d'irritabilité, de difficulté de concentration lors du

sevrage tabagique et par la pulsion irrésistible de reprendre une cigarette. Cette dépendance physique au tabac serait due à la nicotine, elle se mesure par le test de Fagerström (**Tableau 4**).

Tableau 4 : *Questionnaire de dépendance à la nicotine. D'après Fagerström et Schneider (1989).*

1. Combien de cigarettes fumez-vous par jour ?	
Moins de 15	0
De 16 à 25	1
Plus de 25	2
2. Quel est le taux de nicotine de vos cigarettes ?	
Moins de 0,8	0
De 0,8 à 1,5	1
Plus de 1,5	2
3. Inhalez-vous la fumée ?	
Jamais	0
Parfois	1
Toujours	2
4. Fumez-vous de façon plus rapprochée au début de la journée ?	
Oui	1
Non	0
5. À quel moment fumez-vous votre première cigarette ?	
Dans la 1/2 h qui suit le lever	1
Plus tard	0
6. Quelle cigarette trouvez-vous la plus indispensable ?	
La première	1
Une autre	0
7. Fumez-vous même si une maladie (grippe, angine...) vous oblige à rester au lit ?	
Oui	1
Non	0
8. Trouvez-vous difficile de ne pas fumer dans les endroits interdits (cinéma...) ?	
Oui	1
Non	0
TOTAL : Il est très souvent utile de reprendre avec le sujet les réponses de cet auto-questionnaire de façon à avoir des renseignements précis.	
De 0 à 4 points : fumeur non ou peu dépendant à la nicotine,	
5-6 points : dépendance moyenne,	
7-8 points : dépendance forte,	
9 points et plus : très forte dépendance.	

1.2.2. Dépendance comportementale et psychologique.

Il existe aussi une dépendance comportementale se traduisant par l'usage de tabac de façon rituelle, gestuelle et réflexes conditionnés ou autres, imbriquée avec une dépendance psychologique liée aux propriétés psychoactives de la nicotine et une dépendance physique liée au besoin de nicotine. Le **Tableau 5** résume les principaux facteurs comportementaux dont il faut tenir compte pour évaluer la dépendance comportementale et psychologique. Le recours à l'aide de psychologues est parfois nécessaire.

Tableau 5 : *Test de dépendance comportementale et psychologique. D'après Lagrue (1992a).*

	Pas du tout	Un peu	Moyen	Beaucoup
Besoin de geste	0	1	2	3
Fumer est un plaisir	0	1	2	3
Fumer vous détend	0	1	2	3
Fumer vous stimule	0	1	2	3
Fumer est un soutien psychologique	0	1	2	3

L'utilisation du tabac apporte la nicotine au niveau du SNC. Le fumeur obtient ainsi les propriétés psychostimulantes de l'alcaloïde. Ce sont le plaisir, les actions euphorisantes et la sensation de bien-être, la diminution des sensations de douleur, l'augmentation de la vigilance, du pouvoir de concentration intellectuelle et de la mémoire immédiate et la stabilisation de l'humeur. Ces effets seraient liés à la fixation de la nicotine sur les récepteurs "nicotiniques", récepteurs à l'acétylcholine présents dans les jonctions neuromusculaires, les ganglions parasymphatiques, la médullosurrénale et

également certaines zones du cerveau, en particulier les voies dopaminergiques (voie nigrostriale et voie mésolimbique) (Koob et Bloom, 1988). La stimulation de ces neurones (qui font partie du système de récompense) induit la libération de dopamine (Kirch et al., 1988), et par son intermédiaire d'autres neurotransmetteurs, expliquant les effets psychoactifs de la nicotine (**Figure 2**).

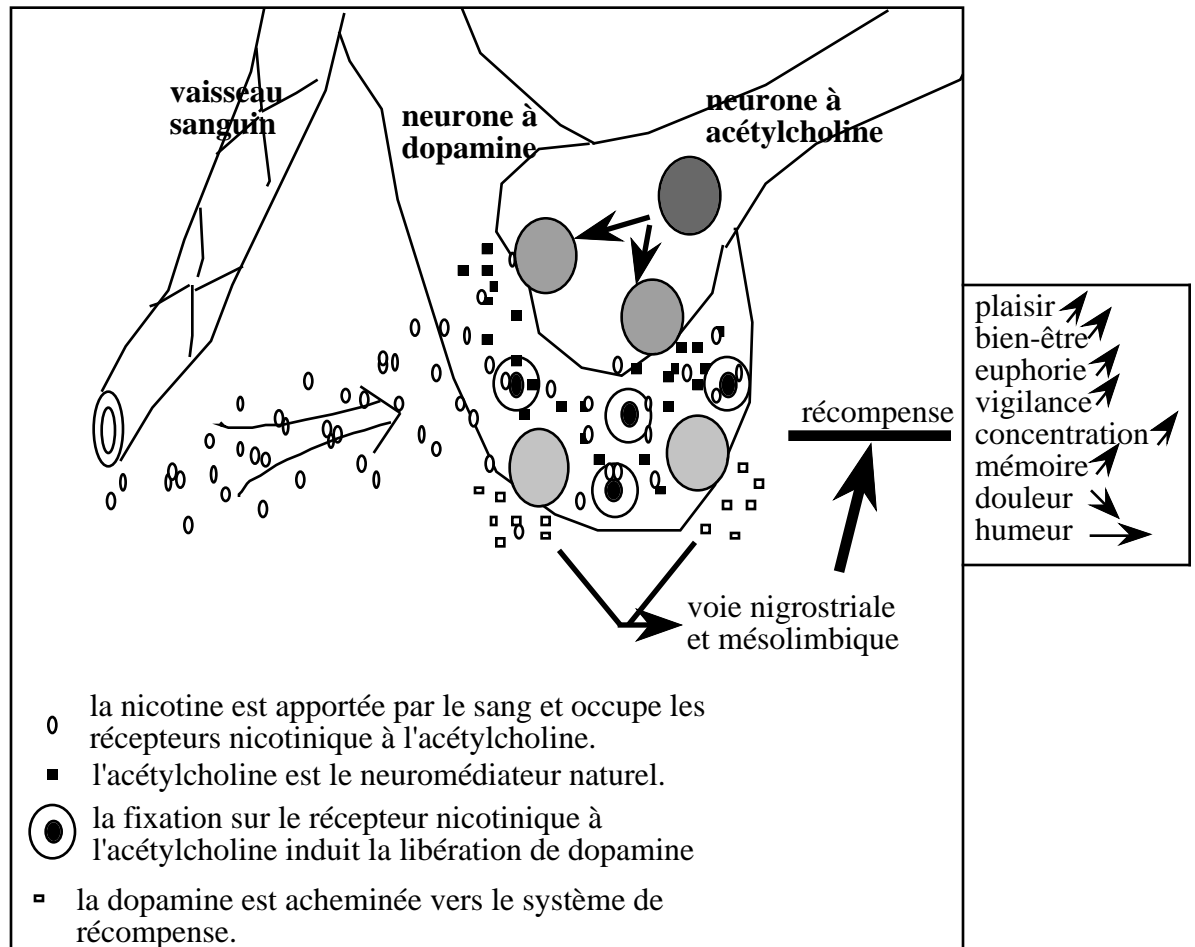


Figure 2 : Schéma d'une synapse entre neurone à acétylcholine et neurone à dopamine.

L'effet renforçateur de la nicotine serait lié à son effet stimulateur de la libération de dopamine.

D'après Lagrue (1992a).

Ces effets immédiats de la nicotine sont recherchés par les fumeurs. Chez d'autres fumeurs, l'effet sera tranquilisant et sédatif. C'est pour ces raisons que la personnalité du fumeur, le stress, l'état d'anxiété et les facteurs sociaux doivent être pris en considération. De cette manière, le comportement toxicomane est multifactoriel. Un schéma général a été proposé par Stolerman (1994) pour intégrer les différents facteurs impliqués dans le maintien du comportement toxicomane (**Figure 3**).

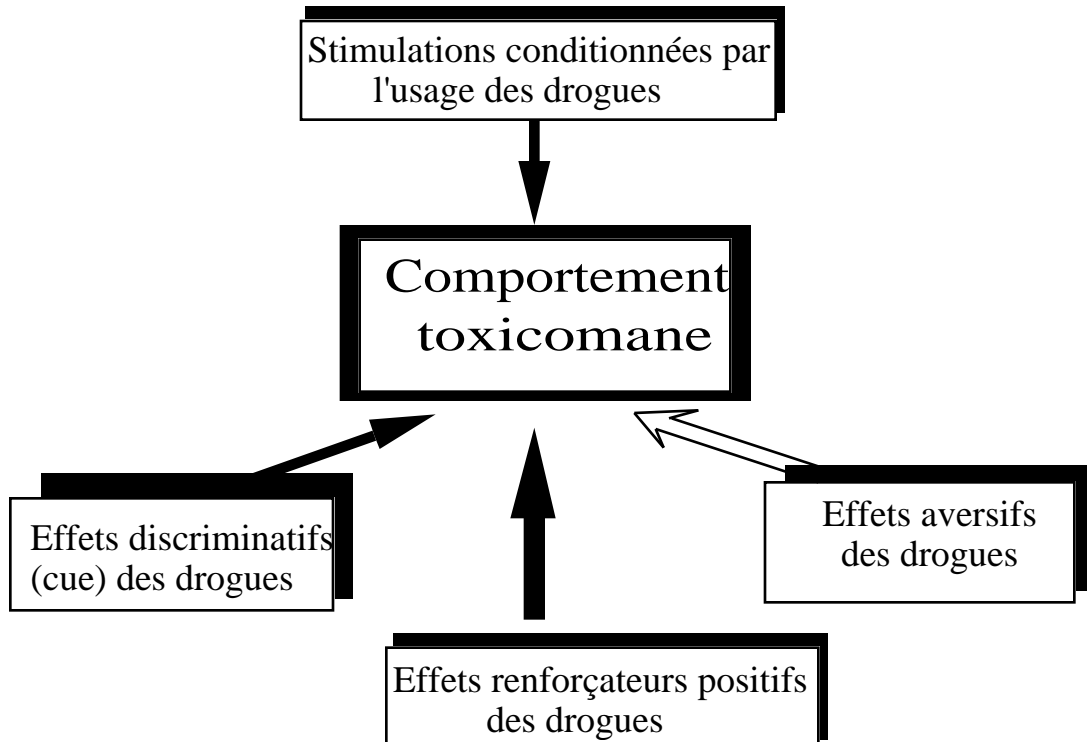


Figure 3 : *Modèle psychopharmacologique de la dépendance. Le comportement toxicomane est contrôlé par quatre fonctions principales communes à plusieurs classes de drogues. D'après Stolerman (1994).*

L'effet renforçateur positif étant le facteur principal du comportement toxicomane. Celui-ci est le résultat d'interaction de la drogue avec plusieurs mécanismes (**Figure 4**).

Pour apprécier l'intensité de ces différents facteurs chez les différents sujets, des tests psychomoteurs ont été établis. Le test de l'EPI (test d'Eysenck) révèle la fragilité psychologique avec anxiété et tendance à l'extraversion des gros fumeurs. Le MMPI (test du Minnesota - ou sa forme

abrégée le Minimult) révèle la tendance dépressive et l'association dépression-anxiété chez les fumeurs.

Les résultats de ces tests sont bien corrélés à ceux du test de Fagerström (Lagrué, 1992).

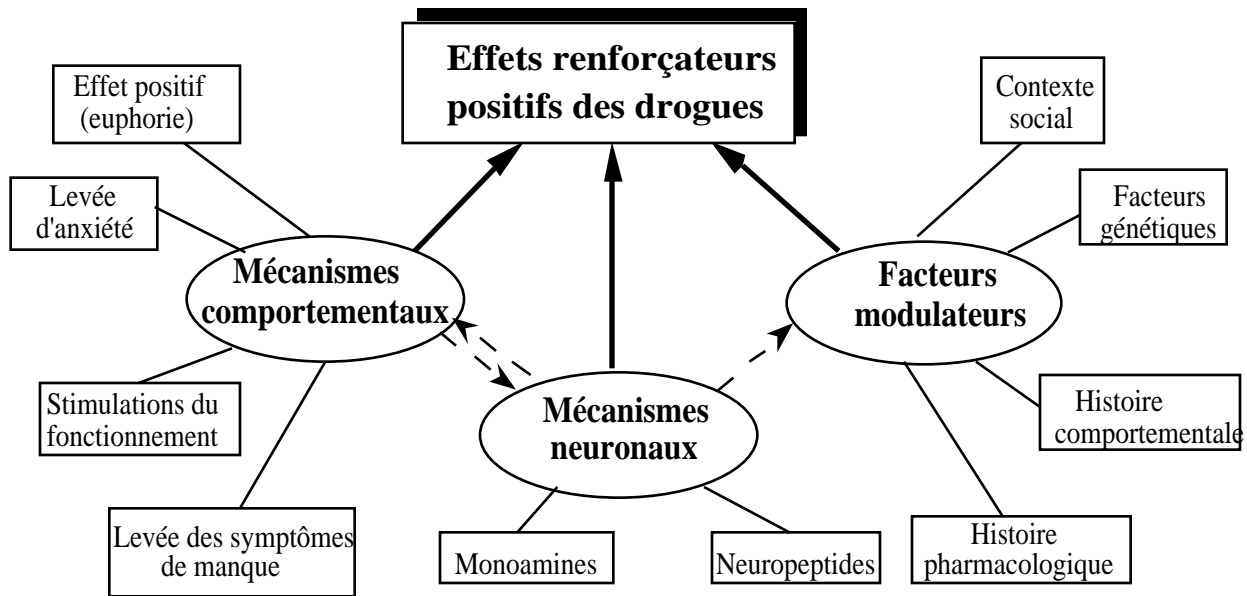


Figure 4 : *Structure détaillée pour l'analyse de l'effet renforçateur positif des drogues, montrant la multiplicité des mécanismes à tous les niveaux. L'importance de ces différents mécanismes varie suivant la classe de drogues considérées. Cependant, des évidences suggèrent des mécanismes communs comme les mécanismes neuronaux (contribution de la dopamine) et de l'histoire pharmacologique du patient (rôle du récepteur NMDA). D'après Stolerman (1994).*

Le "Quit ratio" (rapport de sevrage exprimé par ex-fumeurs/ex-F+F) est d'autant plus faible que l'état dépressif est plus marqué. Ainsi, le traitement de la dépendance tabagique doit tenir compte et prendre en charge l'état dépressif et anxieux du sujet. Le test HAD (Hospital Anxiety Depression) permet d'évaluer les états d'anxiété et de dépression chez les patients (**Tableau 6**).

Tableau 6 : *Questionnaire HAD (Hospital Anxiety Depression Scale 6). Ce questionnaire a pour but de nous aider à mieux percevoir ce que vous ressentez. Répondez rapidement à chacune des 14 questions suivantes et entourez la réponse qui convient le mieux à votre état actuel pour chaque question. D'après Lagrue (1992b).*

A. Je me sens tendu, énervé		A. J'ai une sensation de peur, comme si quelque chose d'horrible allait m'arriver	
• la plupart du temps	3	• oui, très nettement	3
• souvent	2	• oui, mais ce n'est pas trop grave	2
• de temps en temps	1	• un peu, mais cela ne m'importe pas	1
• jamais	0	• pas du tout	0
D. J'ai toujours autant de plaisir à faire les choses qui me plaisent		D. Je sais rire et voir le bon côté des choses	
• oui, toujours	0	• toujours autant	0
• le plus souvent	1	• plutôt moins	1
• de plus en plus rarement	2	• nettement moins	2
• tout est plus difficile	3	• plus du tout	3
D. Je me sens ralenti		A. Je me fais souvent du souci	
• pratiquement tout le temps	3	• très souvent	3
• très souvent	2	• assez souvent	2
• quelquefois	1	• occasionnellement	1
• pas du tout	0	• très occasionnellement	0
A. J'éprouve des sensations d'angoisse et j'ai une boule dans la gorge ou l'estomac noué		D. Je me sens heureux	
• très souvent	3	• jamais	3
• assez souvent	2	• pas souvent	2
• parfois	1	• quelquefois	1
• jamais	0	• la plupart du temps	0
D. J'ai perdu l'intérêt pour mon apparence		A. Je peux rester tranquillement assis à ne rien faire et me sentir détendu	
• totalement	3	• jamais	3
• je n'y fais plus attention	2	• rarement	2
• je n'y fais plus assez attention	1	• oui, en général	1
• j'y fais attention comme d'habitude	0	• oui, quoiqu'il arrive	0
A. J'ai la bougeotte et n'arrive pas à tenir en place		D. Je m'intéresse à la lecture d'un bon livre ou à un bon programme radio ou télé	
• oui, c'est tout à fait le cas	3	• souvent	0
• un peu	2	• assez souvent	1
• pas tellement	1	• rarement	2
• pas du tout	0	• pratiquement jamais	3
D. J'envisage l'avenir avec optimisme		A. J'éprouve des sensations soudaines de panique	
• comme d'habitude	0	• très souvent	3
• plutôt moins qu'avant	1	• assez souvent	2
• beaucoup moins qu'avant	2	• rarement	1
• pas du tout	3	• jamais	0

Ces évaluations permettent de tenir compte de l'état d'anxiété et de dépression du sujet pour adapter le traitement de la dépendance tabagique selon l'arbre de décision suivant (**Figure 5**).

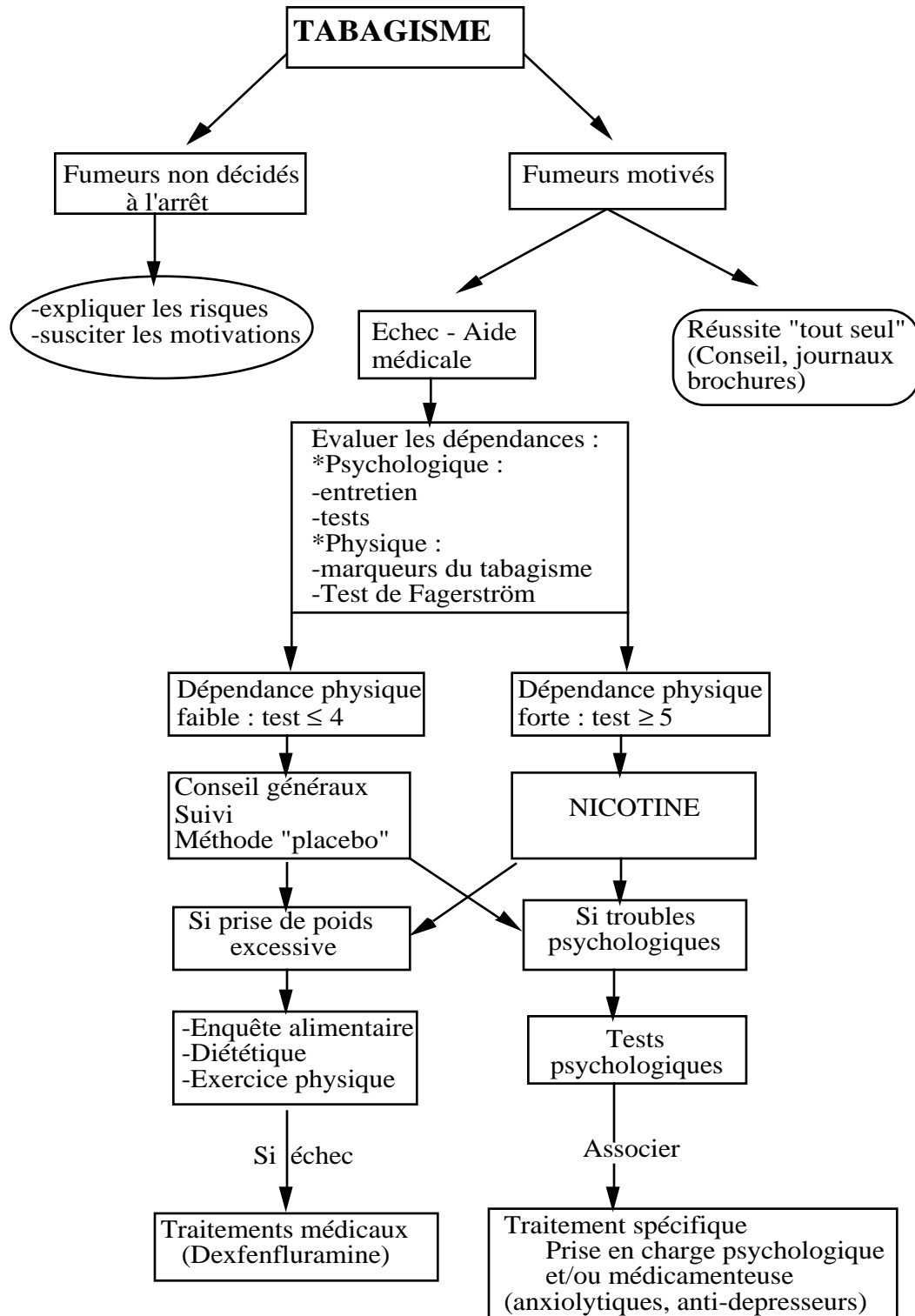


Figure 5 : Arbre de décision pour l'aide au sevrage tabagique. D'après Lagrue (1992a).

Certains sujets ont donc besoin d'une association d'antidépresseurs et/ou d'anxiolytiques avec la nicotine pour le traitement de la dépendance au tabac.

Pour personnaliser au maximum le traitement, un marqueur tabagique objectif est indispensable. En effet, la consommation déclarée n'est pas un reflet fidèle du degré réel de l'intoxication au CO, au goudron et à la nicotine. Le degré réel de l'intoxication dépend non seulement du rendement des cigarettes en goudron et nicotine, mais aussi du mode de consommation du tabac : cigarette, cigare ou pipe. Pour la cigarette, c'est essentiellement le fait d'inhaler ou non la fumée et la profondeur et la fréquence de cette inhalation qui interviennent dans l'intoxication.

1.2.3. Les marqueurs du tabagisme.

Il existe trois marqueurs du tabagisme.

* **Le monoxyde de carbone (CO)** : il est mesuré en ppm grâce à un testeur "CO testeur". Sa demi-vie est courte de 2 à 3 h et ses taux peuvent être très faiblement majorés par la pollution atmosphérique. Chez les fumeurs inhalants, ses taux sont supérieurs à 10 ppm et peuvent atteindre 50, 60 ppm, et plus. C'est un excellent marqueur du tabagisme des 12-24 h précédentes et de l'intensité de l'inhalation.

Chez les non fumeurs son taux est inférieur à 6 ppm.

* **Les thiocyanates** : ils proviennent du HCN, gaz très toxique présent dans la fumée du tabac et transformé par sulfo-conjugaison. La demi-vie du thiocyanate est d'une semaine. Son taux est donc le reflet du tabagisme des 2 à 3 semaines précédentes. Il est facilement dosé par colorimétrie et sa concentration est 5 à 10 fois supérieure dans le plasma, la salive et les urines par rapport au sérum.

Le thiocyanate n'est pas spécifique du tabagisme car son taux peut augmenter suite à la consommation d'aliments riches en glucosides cyanogéniques. Il est peu utilisé actuellement.

* La nicotine et la cotinine : ce sont des marqueurs spécifiques du tabagisme car la feuille de tabac est la seule plante qui contient de la nicotine en quantité appréciable. La demi-vie de la nicotine est très courte (2-4 h), son dosage n'est utilisé qu'à des fins pharmacologiques. La demi-vie de la cotinine est de 15-30 h et on peut la doser, par plusieurs méthodes, dans le sang, la salive et les urines (cotinine/créatinine). La cotinine est donc le marqueur tabagique des 2-3 jours précédents.

La meilleure corrélation avec le questionnaire de Fagerström est obtenue avec la cotinine (Lagrué, 1992a). Cependant, malgré cette bonne corrélation, les nombreuses variations à l'échelon de l'individu (Benowitz et al., 1982) nécessitent son dosage.

Chapitre II : la lutte anti-tabagique, traitement et prévention

Le fumeur dépendant ne peut se passer de fumer même si son état de santé vient à s'aggraver soudainement. De plus, l'aspect psychopharmacologique de la dépendance tabagique ne laisse pas ou peu de liberté au sujet dépendant de s'éloigner de son poison. Les données épidémiologiques montrent que le tabagisme serait responsable de 10% de la mortalité globale, d'un tiers des cancers, de bronchopathies chroniques et d'accidents cardio-vasculaires. Ces risques sont connus de presque tous (Lagrué, 1992a). Malgré les lois et les règlements (suppression de publicité, interdiction dans les lieux publics et de travail), malgré l'augmentation progressive des prix et malgré les campagnes médiatiques et les conseils donnés par les membres du Corps de Santé, le tabagisme ne régresse que très lentement; le nombre de fumeurs reste important et la proportion des fumeurs à forte consommation augmente progressivement. Plus de la moitié des fumeurs souhaite arrêter mais la plupart d'entre eux échouent ou récidivent lors de ces tentatives d'arrêt. Cette contradiction apparente entre la connaissance d'un risque et la poursuite de l'exposition à ce risque s'explique par l'existence d'une dépendance. Comme pour les autres dépendances (alcoolisme, opioïdes...), une conduite thérapeutique s'impose pour traiter le tabagisme. Plusieurs méthodes ont été proposées. Leur but est d'aider le patient à se sevrer du tabac, en prévenant l'apparition d'un syndrome de sevrage lors de l'arrêt du tabac et de l'aider à maintenir une abstinence durable par un soutien psychologique et un traitement adapté pouvant comprendre un traitement spécifique (nicotine) et, si besoin, le traitement des troubles associés (troubles mentaux, prise de poids...). Ces méthodes sont souvent multiples et empiriques. Leur évaluation n'a été qu'exceptionnellement faite avec le sérieux scientifique nécessaire et les études publiées restent souvent peu convaincantes. Comme pour les autres dépendances en général, le pronostic demeure difficile (Paille et al., 1992). Nous citerons ces méthodes, leur technique, leur intérêt et une synthèse pratique de leurs indications thérapeutiques.

2.1. LES MÉTHODES.

2.1.1. L'auto-traitement : c'est décider soi-même de la façon de s'arrêter de fumer, recevoir de brefs conseils et ne plus fumer.

2.1.1.a - L'auto-assistance : "c'est le soutien mutuel entre fumeurs sans l'aide continue des professionnels, de responsables spécialisés ou d'organismes". Elle fait appel à du matériel pédagogique varié (coffrets, livres, brochures ou cassettes). Le matériel d'auto-assistance a fait l'objet d'évaluations peu nombreuses, inexistantes en France, non validées sauf celle de Sutton en 1984, par le dosage du CO alvéolaire. Dans ce cas, le taux d'abstinence est de 0 à 11% avec un recul de 12 à 15 mois. L'ensemble des évaluations met en évidence un taux de réussite voisin de 27% à 6 mois et 18% à un an. Cependant, les réussites avec ces petits moyens peuvent être attribuées au fait que ces fumeurs ont arrêté d'eux-mêmes :

* **Filtres progressifs** : ils sont encore commercialisés dans de nombreux pays. En France, ils ont été commercialisés sous le nom MD 4 puis, jugés inefficaces ils ont été retirés du marché.

* **Cigarettes sans tabac** : on a recensé 5 types : E-Z Quit, FAVOR, JAZZ, cigarettes NTB (en France contiennent du tussilage) et les cigarettes BERTHIOT (association de la lobéline). L'évaluation des cigarettes NTB par Lagrue montre un taux d'abstinence à 3 mois de l'ordre de 40% sans que la comparaison avec les groupes témoins emporte réellement la conviction (Lagrue 1987).

* **Médicaments en vente libre** : ils n'ont pas été évalués et l'innocuité de leurs principes actifs reste à démontrer. Parmi les produits vendus en France on trouve : AFUMYL^R qui montre des résultats après 4-6 semaines, NICOPRIVE^R qui contient l'extrait de Cratageus diminuant la nervosité et l'acide ascorbique compensant la chute fréquente de vitamine C chez les fumeurs. Ses contre-indications et ses effets indésirables sont essentiellement ceux de la quinine. Sa posologie peut atteindre 12 comprimés

par 24 h et pour des durées allant au delà d'un mois pour les gros fumeurs. PARANICO^R contient de l'acide nicotinique (non toxique) à la place de la nicotine et d'autres composés qui corrigeraient le déséquilibre causé par la privation de tabac. PASTABA^R contient un protéinate d'argent qui donne avec la pyridine de la fumée de tabac un combiné à saveur fade qui en dénature l'arôme. Sa posologie est de 15 à 20 pastilles par jour, à sucer lentement, en remplacement des cigarettes. VALERBE^R contient l'extrait de valériane qui modifierait les facultés gustatives et olfactives et entraînerait un dégoût du tabac. Sa posologie usuelle est de 6 gélules par jour.

2.1.1.b - Cesser de fumer par correspondance : ces méthodes (PSYCOL en France) sont fondées sur la réduction progressive du nombre de cigarettes fumées et sur un accroissement de la longueur des mégots. Elles sont associées à une psychothérapie (réflexion sur les inconvénients du tabagisme et les bénéfices du sevrage). Les résultats sont bons, mais les patients sont recrutés sur le critère d'une motivation suffisante. Aucune évaluation scientifique n'a été réalisée. Au niveau international, les résultats sont fort variables (10 à 45% avec un recul de 6 à 15 mois). Soulignons que, d'une manière générale, un arrêt brutal donne toujours de meilleurs résultats (Paille et al., 1992).

2.1.2 - La dynamique de groupe.

2.1.2.a - Le plan de 5 jours : il a été lancé en 1960 aux USA par l'église adventiste du 7ème jour et à but non lucratif. Il peut avoir lieu dans différents endroits (CPAM, entreprises, écoles...) avec remise d'un diplôme à la 3ème séance et un suivi téléphonique après le traitement. Celui-ci consiste à améliorer la connaissance des méfaits du tabagisme et les avantages d'une bonne hygiène mentale et spirituelle par la projection de documentaires, des conférences et des débats. Les patients bénéficient gratuitement de moyens médicaux, d'équipements sportifs et de conseils (médecins, diététiciens, psychologues...). En France, ce programme est proposé par exemple par la ligue Vie et Santé. Le taux

de réussite, toutes études confondues, est en moyenne de 11% à un an, 68% à 3 jours et 24% à 6 mois (Paille et al., 1992).

2.1.2.b - Les thérapies de groupe : c'est une pratique courante dans de nombreuses consultations d'aide au sevrage tabagique. Le patient bénéficie du soutien et de l'expérience du groupe. En France, il s'agit, le plus souvent, d'une prise en charge psychothérapique associée ou non à d'autres méthodes (acupuncture, gomme à la nicotine...). Le taux d'abstinence de 46 essais réalisés depuis 1962 est de 27% (Paille et al., 1992).

2.1.2.c - Les autres programmes

* Les autres programmes éducatifs : à but non lucratif, ils mettent l'accent sur l'éducation pour la santé par des conférences utilisant tous les moyens de communication. L'évaluation de 19 programmes éducatifs en Allemagne, Angleterre, Canada, Norvège, Suède, Tchécoslovaquie, URSS et USA, a montré un taux de réussite de 25% en moyenne à un an mais seuls 3 d'entre eux prennent en considération les marqueurs biologiques (Paille et al., 1992).

* Les programmes commerciaux : il existe trois grands types aux USA

- Smoke Watchers propose un sevrage progressif avec objectifs hebdomadaires.
- Smoke Enders fait appel à une technique systémique très structurée qui insiste sur le renforcement positif et la modification des habitudes (technique comportementale).
- Les centres Schick utilisent le déconditionnement aversif, incluant les chocs électriques de faible intensité et le fumer à saturation (technique comportementale).

En France, ces programmes sont proposés par "victoire sur le tabac" sous la forme de stages de dynamique de groupe et un suivi téléphonique jusqu'à un an. D'autres organismes privés comme SOS tabac...proposent des programmes de sevrage animés par des médecins et/ou des psychologues. C'est

donc, le plus souvent, une prise en charge psychothérapique du patient associée ou non à d'autres méthodes comme l'acupuncture et la gomme à la nicotine...

Les évaluations sont rares et les résultats souvent surestimés (Paille et al., 1992). Les études analysées montrent de 21 à 40% de réussite avec un recul de 4 mois à 4 ans, mais sans validation biologique ou, parfois en ne tenant pas compte de tous les sujets.

* Les médias et les programmes communautaires : ces méthodes d'action sont souvent préventives. Elles touchent un grand public et permettent aux fumeurs de cesser leur intoxication. Cependant, l'efficacité de ces programmes est limitée car il n'y a pas de suivi et de soutien après l'arrêt du programme. La journée sans tabac de 1980 aux USA a permis à plus d'un million de participants une abstinence à 11 mois. Une journée mondiale sans tabac est actuellement organisée chaque année avec le double objectif de convaincre les jeunes de ne pas commencer et d'inciter les fumeurs à s'arrêter. Si les médias paraissent plutôt créer ou changer la perception des fumeurs, les programmes communautaires pourraient surtout motiver les individus. Ces programmes peuvent associer des médias locaux (radio, télévision, journaux...) et intéresser une petite ville, une entreprise, une école, les professionnels de la santé, les forces armées, la population active...

2.1.3 - Les méthodes comportementales :

2.1.3.a - Le déconditionnement aversif : cette méthode repose sur l'hypothèse de l'association de la cigarette avec des sensations désagréables, car fumer résulte d'un véritable conditionnement.

- **Le fumer rapide** : épisodes successifs de fumer accéléré, interrompus par des périodes de repos et de répétition cognitive. Dans 11 études validées par au moins un marqueur biologique, le taux de réussite est inférieur à 28% (Paille et al., 1992).

- **Le fumer à saturation** : dans cette méthode, le sujet doit doubler ou tripler sa consommation de cigarettes sans modifier la vitesse à laquelle elles sont fumées.

- **Le fumer à la chaîne** : il s'agit de fumer sans discontinuer pendant plusieurs heures ou de fumer un nombre précis de cigarettes par séance.

- **Le fumer aversif à rythme anormal ou fumer focalisé** : le sujet doit fumer normalement mais en se concentrant sur les aspects négatifs de la cigarette comme l'irritation, la toux... Cette technique donne en moyenne 26% de réussite à un an.

- **La rétention de la fumée ou saturation gustative** : dans cette technique, il faut garder la fumée 30 secondes dans la bouche en respirant normalement par le nez et en se concentrant sur la sensation désagréable de la fumée. Dans l'étape suivante, le patient concentre son attention sur ses poumons. Après 20 secondes, il inhale des vapeurs brûlantes et exhale la fumée par voie nasale. Un repos de 5 minutes est accordé avant la cigarette suivante. L'expérience est poursuivie jusqu'à ce que l'impression d'inconfort et de nausée entraîne la perte de l'envie de fumer. Le traitement est reproduit pendant cinq jours consécutifs.

- **La sensibilisation indirecte** : se base sur l'obtention d'un comportement d'évitement faisant appel à l'imagination du sujet. On demande au fumeur d'imaginer qu'il reçoit une stimulation pénible quand il a envie de fumer ou d'imaginer des conséquences positives s'il ne fume pas.

- **Le choc électrique** : il est délivré au moment où le fumeur a envie de fumer. Les résultats ont été jugés médiocres et cette technique n'a pas suscité de nouvelles études depuis 1977.

- **La méthode du bracelet** : le fumeur porte un bracelet en élastique au poignet qui sert de pense-bête, ou qu'il doit faire claquer sur sa peau en cas de besoin impérieux de fumer, avant d'adopter un comportement alternatif tel que mâcher un chewing-gum. La méthode semble intéressante bien que peu d'évaluations soient disponibles.

En général, les méthodes aversives donnent d'assez mauvais résultats, très variables selon les études du fait des différences de méthodologie selon les essais et du manque général de rigueur (Paille

et al., 1992). Ces méthodes aversives ont été abandonnées dans des pathologies comme l'alcoolisme, du fait de leur faible efficacité à long terme.

2.1.3.b - L'auto-prise en charge ou maîtrise de soi : la maîtrise de soi est fondée sur le renforcement positif, s'oppose aux méthodes aversives et diffère de l'auto-traitement (Paille et al., 1992). Elle regroupe des techniques comportementales faisant participer activement le patient à son traitement. Celui-ci doit faire attention à ses propres actes de fumeur et noter leur survenue. Il doit prendre conscience de son propre environnement et de son désir de le changer, reconnaître les automatismes installés de longue date déclenchés par l'environnement ou par des mécanismes internes, et développer la capacité de les briser. Le principe de cette méthode repose sur le fait que lorsqu'un fumeur commence à s'intéresser à son comportement, ce dernier a beaucoup de chance de changer, même si le sujet n'en a pas l'intention ou ne le désire pas initialement.

- **L'auto-observation** : il s'agit de repérer pendant une semaine le nombre de cigarettes fumées par jour, le moment, le lieu, l'activité du moment, son humeur et le besoin ressenti pour chaque cigarette fumée (Paille et al., 1992).

- **La diminution de la nicotine ou sevrage progressif** : on peut baisser les taux de nicotine des cigarettes à l'aide de filtres ou en changeant de marque de cigarettes qui permettent de réduire de 30% puis de 60% et de 90% le taux de nicotine en trois semaines. D'autres protocoles existent (Paille et al., 1992).

- **Le contrôle des stimuli** : cette méthode d'auto-prise en charge cherche à refouler les comportements indésirables en modifiant les situations courantes au cours desquelles les stimuli apparaissent (fin de repas, prise de café...) et sont renforcées par certaines associations. Il existe très peu d'études où le contrôle des stimuli est le facteur essentiel (Paille et al., 1992).

- **Les contrats** : un contrat implicite est passé entre le fumeur et le programme auquel il participe ou entre le fumeur et son médecin. Le but du contrat est de renforcer la motivation du fumeur par un engagement sous forme de caution, le plus souvent modeste, ou de contrat social avec les pairs. Le remboursement partiel de la caution sous condition de poursuivre l'abstinence influencerait l'arrêt à long terme (Paille et al., 1992).

- **La désensibilisation systématique et la relaxation** : l'anxiété déclenche, le plus souvent, les signaux précédant la prise de cigarette. Ces signaux peuvent être désensibilisés, par exemple par des exercices de relaxation lorsque l'envie de fumer apparaît (Paille et al., 1992).

- **La diminution des stimulations environnementales** : on peut atténuer ces stimulations par un isolement en chambre noire et insonorisée. Le sujet est au repos et allongé sur un lit pendant 24 heures. Le patient reste en contact phonique avec un moniteur qui lui fait entendre des messages sur les dangers du tabac et les moyens de maîtriser les désirs de fumer (Paille et al., 1992).

Les résultats de ces méthodes d'auto-prise en charge sont souvent durables et d'environ 25-30% à un an.

- **D'autres techniques comportementales** : par des jeux de rôle et de vidéothérapie par exemple, le patient apprend à repérer, analyser et à se préparer aux situations difficiles.

2.1.4 - L'aide médicamenteuse

2.1.4.a - Les gommes à mâcher à la nicotine : commercialisées en France sous le nom de NICORET[®], elles apportent temporairement une quantité connue de nicotine pour éviter les phénomènes de manque survenant à l'arrêt du tabac. Elles permettent aussi d'éviter les autres composés nocifs de la fumée de tabac (Paille et al., 1992). Ce sont des résines échangeuses d'ions tamponnées à pH 8,5 pour permettre la libération lente de la nicotine par mastication et son absorption maximale par la muqueuse buccale,

évitant ainsi sa dégradation hépatique survenant après déglutition. L'absorption de la nicotine par la muqueuse buccale est plus lente (15-30 minutes), plus progressive, plus régulière et moins importante que l'absorption pulmonaire à partir de la fumée de tabac. NICORET[®] 2 mg donne une nicotémie suffisante pour éviter les symptômes de sevrage tels que l'irritabilité, l'agitation, l'anxiété, l'impatience, les difficultés de concentration... Une gomme à 2 mg fournit une dose systémique de 0,86 mg. Chez les grands dépendants, la gomme à 4 mg pourrait être utile mais elle n'est pas commercialisée en France. Ces gommes ne peuvent être obtenues que sur ordonnance médicale car leur utilisation doit être faite selon des règles précises, de plus l'arrêt de la cigarette est impératif. Le médecin fixera une posologie dégressive et le traitement ne devrait pas, en principe dépasser six mois. Les excitants (café, thé, alcool, Coca-Cola...) doivent être proscrits car ils diminuent l'absorption de la nicotine par la muqueuse buccale et lorsque la thérapeutique est stabilisée à 1 ou 2 gommes par jour, on peut tenter un arrêt. Le traitement de longue durée (6 à 12 mois) pourrait améliorer les résultats. Le risque théorique de développer une dépendance à la gomme paraît très faible car la mastication ne remplace pas le désir de fumer, le goût est souvent jugé désagréable et elle ne produit pas l'excitation cérébrale immédiate observée avec la cigarette. Les sujets abandonnent la gomme à 3 mois et ceux qui continuent à 12 mois (10 à 20%) semblent très fortement dépendants et fumeraient en même temps (Paille et al., 1992).

Les effets indésirables, locaux ou systémiques sont rares et essentiellement liés à une mauvaise utilisation du médicament. Ils peuvent être atténués en mâchant la gomme très lentement pour régler le débit de nicotine. C'est donc un problème de technique de mastication qu'il faut acquérir et qui est souvent à l'origine des échecs thérapeutiques. Les effets buccaux classiques sont l'hypersialorrhée, l'irritation, les aphtes, les douleurs de la cavité buccale, du pharynx et des muscles masticateurs, les traumatismes dentaires, l'obstacle lié aux prothèses. Les effets gastro-intestinaux sont caractérisés par des éructations secondaires à l'hypersialorrhée, des nausées et vomissements, des troubles de la

digestion, une anorexie. Il s'y associe des risques d'insomnie, d'irritabilité, de vertiges, de céphalées... Cependant, en cas de surdosage volontaire, le risque d'intoxication est très faible car l'absorption de la nicotine déglutie est lente, incomplète, et la nicotine subirait une forte dégradation hépatique.

Les contre-indications absolues sont l'infarctus du myocarde récent, les troubles du rythme graves, les douleurs angineuses sévères ou en cours d'aggravation. Les porteurs d'affections des articulations temporo-mandibulaires en évolution, les femmes enceintes ou susceptibles de le devenir, les mères allaitant ne pourront pas bénéficier de ce traitement.

Les contre-indications relatives sont l'inflammation buccale ou pharyngée et les antécédents d'œsophagie ou d'ulcère peptique. Les porteurs de prothèse dentaire peuvent éprouver des difficultés à mastiquer. NICORET[®] ne contient pas de sucre.

Une méta-analyse de 14 essais contrôlés randomisés a montré un taux d'abstinence de 27% à 6 mois. De plus, toutes les études récentes ont montré que les substituts de la nicotine étaient d'autant plus actifs que les sujets étaient plus dépendants. Lorsque les patients sont très dépendants (score de Fagerström ≥ 6), ces gommes doivent être utilisées en association avec un soutien psychologique.

2.1.4.b - Les patchs de nicotine délivrent par voie transdermique, des doses constantes de nicotine sur 24 heures (7 à 21 mg). Ils permettent une montée rapide de la nicotémie, leur utilisation est facile et ils améliorent l'observance du traitement. Il existe plusieurs types de timbres différant par leur dosage en nicotine : NICOTINEII TTS[®], NICOPATCH[®] de 10, 20 et 30 cm² libérant respectivement 7, 14 et 21 mg de nicotine par 24 heures. La nicotémie atteinte est de 7 (20 cm²) et 10 ng.ml⁻¹ (30 cm²). TABAZUR[®]30 est un système de 7 cm² à 30 mg de nicotine libérant 22 mg de nicotine par 24 heures. Ces patchs sont prescrits selon des schémas thérapeutiques précis.

On observe une légère accélération du rythme cardiaque chez 3 à 7% des patients sans modification de la vascularisation ni de la température cutanée. Les effets secondaires conduisent à

l'abandon du traitement dans 3 à 9% des cas. Ce sont le plus souvent des prurits, œdèmes ou érythèmes modérés et localisés au niveau du site de l'application. Peu de cas d'allergie de contact ou d'eczéma généralisé ont été rapportés. Les contre-indications sont celles du NICORET^R. Une grande prudence d'emploi doit être observée en cas d'hypertension artérielle, d'angor stable, d'insuffisance circulatoire cérébrale, d'artériopathie oblitérante, d'insuffisance cardiaque, d'hyperthyroïdie et de diabète, d'insuffisance rénale et hépatique, d'ulcère gastroduodéal. Dans ces pathologies, les patchs à la nicotine ne sont à proposer qu'en deuxième intention, après échec des autres traitements. Compte-tenu du risque cardio-vasculaire lié à la nicotine, il est impératif de s'assurer que le fumeur a arrêté de fumer dès le début du traitement. Les patchs permettent d'éviter la prise de poids immédiate mais qu'en est-il lors de l'arrêt du patch ? Ils semblent limiter le besoin de tabac et les symptômes de sevrage. Cependant, à 6 mois et 1 an il n'y a plus de différence significative avec le placebo. À long terme, leur efficacité s'estomperait sans un soutien psychologique constant et une grande volonté du fumeur (Paille et al., 1992).

2.1.4.c - la clonidine : BARCLID^R ou CATAPRESSAN^R est un antidépresseur d'action centrale, agoniste des récepteurs α -2 présynaptiques. Elle semble capable de réduire significativement les symptômes de sevrage et l'envie de fumer. Ses contre-indications sont l'hypotension artérielle, la dépression et elle présente d'autres effets secondaires comme la sécheresse de la bouche, la somnolence...

2.1.4.d - Les autres médicaments utilisés dans le sevrage tabagique sont :

- **La lobéline** : c'est un alcaloïde extrait des feuilles de Lobelia. Ses effets sont comparables à ceux de la nicotine mais à des degrés moindres. Elle ne passe pas la barrière hématoencéphalique. Elle a été longtemps utilisée comme substance anti-tabagique bien que son efficacité soit limitée. Ses effets indésirables sont les nausées, vomissements, constipations, céphalées, vertiges et tremblements. Ces

effets apparaissent surtout en début de traitement chez les grands fumeurs qui n'ont pas diminué significativement leur consommation de tabac (syndrome nicotine-lobéline). Les contre-indications sont l'association aux digitalines, la grossesse et l'allaitement. La posologie est de 6 comprimés en 3 fois, pendant 15 jours.

- **Les antagonistes des récepteurs nicotiques** : ils empêchent les actions de la nicotine sans avoir d'effets propres. Leur principe est de permettre "l'extinction pharmacologique" du comportement tabagique. Il faut les utiliser après le sevrage pour éviter un déclenchement brutal d'un syndrome de sevrage. Ils pourraient également être utilisés dans le cadre d'un déconditionnement puisque la nicotine de la cigarette ne peut plus produire son effet renforçateur (**Figure 6**). On peut cependant prévoir une faible efficacité de ces méthodes vu que les antagonistes sélectifs centraux n'ont pas encore été suffisamment développés pour éviter les effets secondaires. Le chef de file des antagonistes nicotiques est la mécamylamine, amine ayant un effet ganglioplégique et bloquant la transmission cholinergique du système nerveux central en diminuant l'affinité des récepteurs. Elle a des effets indésirables liés à l'effet ganglioplégique central et périphérique : tremblements, crises convulsives voire épisodes de confusion mentale...Il n'y a pas d'études réelles avec ce produit, les résultats à court terme ne sont guère interprétables. Il semblerait que le fumeur, en présence de mécamylamine, essaye de surmonter une sensation de blocage partiel des récepteurs nicotiques. La mécamylamine induirait une diminution de l'appétence envers le tabac mais ses effets secondaires nombreux ne permettrait pas son usage (Clarke, 1994).

_ **Le propranolol** : Avlocardyl^R par son action bêta-bloquante pourrait diminuer les manifestations cliniques de l'hypercatécholaminergie du sevrage tabagique.

- **Les tranquillisants** : ils n'ont pas d'effets spécifiques, mais peuvent diminuer l'hyperexcitabilité du syndrome de sevrage. Les benzodiazépines ou de nouveaux anxiolytiques comme la Buspirone peuvent

être utilisés à des doses rapidement dégressives. À long terme, ils peuvent être utilisés dans les états d'anxiété ou d'hyperexcitabilité persistante.

- **Les antidépresseurs** : la doxépine est un antidépresseur tricyclique. Elle a donné des résultats aux USA peu concluants dans le sevrage tabagique. Les antidépresseurs ont donc leur place habituelle au cours des dépressions survenant lors de l'abstinence. Ceux à action sérotoninergique pourraient présenter un intérêt pour moduler les phénomènes d'adaptation au stress.

- **La dexfenfluramine** : l'arrêt de la consommation tabagique s'accompagne fréquemment d'une prise de poids corporel qui constitue un handicap sérieux au succès du sevrage. Cette prise de poids est plus importante chez la femme que chez l'homme et augmente avec l'âge. Elle s'expliquerait par le fait que **la nicotine augmente le métabolisme de base** (alors que l'arrêt de tabac le diminue), que le sevrage tabagique entraîne **une compensation alimentaire au profit des glucides** et à un moindre degré, **la baisse de l'activité physique**.

La dexfenfluramine ou Isoméride^R semble efficace sur la prise de poids après sevrage et pourrait agir, du fait de son mécanisme d'action sérotoninergique, sur le contrôle de la compensation alimentaire glucidique. Ce traitement doit être associé à une information et à des conseils hygiéno-diététiques permettant au sujet de mieux contrôler la compensation alimentaire. Ce problème de prise de poids ne se manifeste pas pendant les traitements de substitution à la nicotine mais il est reporté à l'arrêt de la nicotine.

Notons que l'utilisation des antagonistes des récepteurs dopaminergiques (**Figure 6**) est une approche théoriquement faisable pour obtenir une extinction des effets renforçateurs de la nicotine, mais cette approche n'a pas bénéficié de beaucoup d'attention et les effets secondaires seraient inacceptables (Clarke, 1994).

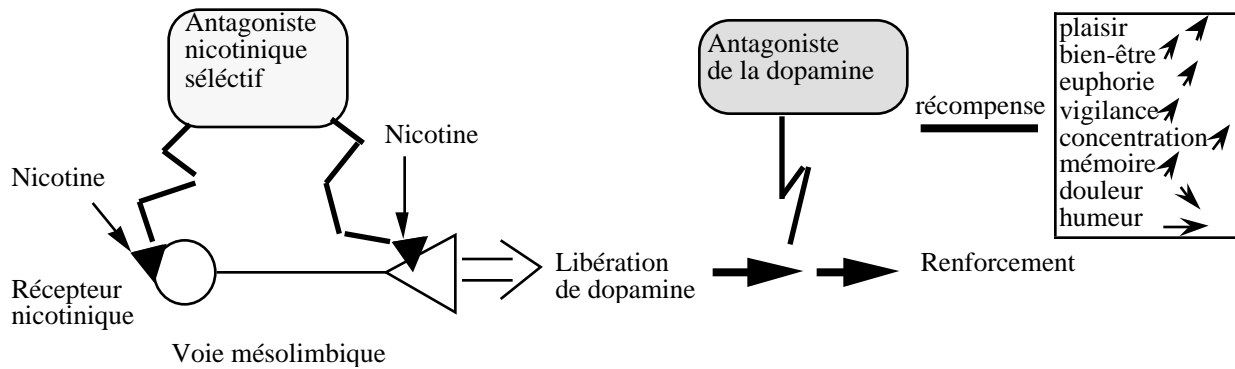


Figure 6 : *Modèle illustrant quelques cibles pour l'intervention avec les antagonistes potentiels dans l'aide au sevrage tabagique. D'après Clarke, 1994.*

2.1.5 - Les autres méthodes :

2.1.5.a - L'acupuncture : cette méthode établit des connexions entre les différentes parties du corps. Elle met en jeu plusieurs systèmes neurogènes et hormonaux (sérotonine, enképhaline, endorphine). L'hypothèse d'une intervention des endorphines dans le sevrage des toxicomanies a fait évoquer la possibilité d'une action bénéfique de certains points "morphine-like" dans les pathologies de la dépendance. En France, cette technique tient une place privilégiée dans la plupart des consultations anti-tabac. Cette technique a évolué de la méthode classique (points corporels) à l'auriculopuncture, nasopuncture et électro-acupuncture. Les résultats des études les mieux conçues ne montrent aucune différence significative avec les points placebo (Paille et al., 1992).

2.1.5.b - L'homéopathie : elle est souvent utilisée avec d'autres méthodes mais n'a pas fait l'objet d'évaluation. Citons Chamomilla, Ignatia, Tabacum, Teinture mère d'Avena Sativa et Spigelia.

2.1.5.c - L'hypnose : bien que cette méthode connaisse beaucoup de succès aux USA, l'évaluation des résultats de l'hypnose individuelle, sur 19 essais, montre des médianes d'abstinence inférieures à 20% à 1 an. Pour l'hypnose de groupe elle est de 34% à 6 mois (Paille et al., 1992).

2.2.LES INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES.

Elles dépendent de l'importance des composantes psychologiques et physiques du sujet (voir **Figure 5**). Pour le patient, il s'agit de la prise de conscience de l'importance du problème et de l'émergence d'une motivation forte pour arrêter de fumer. Pour le médecin, il s'agit d'abord de la prise en charge du patient et de l'apport d'un soutien médical, notamment psychologique, au long cours. Ce soutien comprend trois étapes :

2.2.1. Étape de l'éveil, de la motivation et de la préparation au sevrage : elle comporte des conseils hygiéno-diététiques, des informations sur les méfaits du tabagisme et les avantages du sevrage. Le médecin dédramatise le sevrage qui est souvent vécu au départ comme une épreuve insurmontable et angoissante.

2.2.2. Étape du sevrage : si le score de Fagerström est supérieur ou égal à 6, une aide médicamenteuse est nécessaire (nicotine ou clonidine) en association, à des degrés adaptés pour chaque sujet, avec des méthodes "béquilles psychologiques".

2.2.3. Étape du maintien d'une abstinence durable : c'est la plus difficile, la dépression et l'envie de fumer semblent être les facteurs de rechute incontestables. Le manque n'est pas modifié par les gommes de nicotine ou les patchs contrairement aux autres symptômes de sevrage. Il faut attendre de nouvelles formes par inhalation, pour lesquelles les premiers travaux sont d'ailleurs contradictoires. Ceci explique l'efficacité, à court terme, des produits de substitution mais leur rôle plus modeste à long terme. D'ailleurs, les risques à long terme de ces produits de substitution ne sont pas encore bien connus. **Le point essentiel demeure l'aspect comportemental et psychologique qui impose un soutien prolongé.** Il se fera sous la forme d'entretiens réguliers qui permettront de faire le point avec le patient sur ses difficultés, de les analyser, et, le cas échéant, d'adapter la thérapeutique (entourage, compensation alimentaire, dépression et anxiété...).

2.3. LE PRONOSTIC.

Il est en général faible et difficile en matière de toxicomanie. Pour le tabagisme, on peut retrouver certains facteurs pronostics : les gros fumeurs très dépendants de la nicotine, la poursuite d'un environnement tabagique, la persistance d'un important besoin de fumer après le sevrage, un stress important associé à une faible confiance, les difficultés personnelles associées (socio-familiales et professionnelles) sont incontestablement des facteurs de mauvais pronostic. Il n'y a cependant aucune fatalité. L'émergence d'une motivation claire et forte, une évaluation précise de la dépendance de chaque patient, l'apport d'un soutien psychologique régulier et au long cours, la recherche de substituts, l'évitement de situations pièges, la résolution d'un certain nombre de difficultés personnelles ou environnementales permettent une évolution favorable.

2.4. LA PRÉVENTION.

C'est un point essentiel de la lutte contre le tabagisme. On distingue communément trois niveaux de prévention (Paille et al., 1992) :

2.4.1. La prévention primaire : elle consiste en une information judicieuse, la création d'un environnement adapté (en particulier législatif), et la mise en œuvre de techniques appropriées pour empêcher la survenue du tabagisme.

2.4.2. La prévention secondaire : elle s'attache au dépistage (clinique et biologique) le plus précoce possible. Il s'agit là d'une tâche essentielle des médecins et généralistes.

2.4.3. La prévention tertiaire : elle a pour but de prévenir la rechute chez les sujets sevrés.

La prévention primaire est incontestablement le temps le plus important de la prévention et doit bénéficier de tous les efforts, car le sevrage est d'autant plus difficile que la dépendance est plus forte et le tabagisme plus ancien. Elle repose sur une information de qualité concernant le tabagisme et ses conséquences, sur la modification au long cours des comportements personnels et sociaux vis-à-vis du tabac et sur le développement d'une politique nationale de prévention. Sur ce point, la loi Evin de 1991 sur l'interdiction de la publicité sur l'alcool et le tabac, si elle ne peut prétendre résoudre l'ensemble des problèmes, est une contribution importante à l'édifice de prévention. Le véritable moyen de résoudre le problème du tabagisme est donc, incontestablement, de **faire porter les efforts vers les enfants et les adolescents** au moment où ils apprennent ces comportements. Actuellement, les campagnes insistent essentiellement sur l'acquisition de capacité de résistance à la pression de l'environnement, sans prendre en considération la motivation pour cette résistance. C'est sans doute une des voies qu'il faudrait atteindre dans le futur pour développer la maturation psychologique des adolescents et, à travers eux, les modes d'expression et de communication entre jeunes et avec les adultes.

Le rôle du médecin généraliste est très important. Il n'est pas seulement diagnostique et thérapeutique. Il est l'interlocuteur privilégié de prévention (primaire, secondaire et tertiaire) qui peut délivrer à ses patients des informations personnalisées de qualité, ce qui en fait un acteur de premier plan en matière de prévention.

Enfin, des programmes de sevrage tabagique (et autres toxicomanies) devraient être systématiquement associés au traitement de certaines pathologies pour lesquelles le tabac (et/ou l'alcool) constitue un facteur de risque important comme les complications pulmonaires, cardiaques, vasculaires, cancers des voies aéro-digestives supérieures...

2.5. POUR L'AVENIR.

Il est indispensable de développer la prévention, d'améliorer la prise en charge et le suivi des fumeurs et sur le plan médicamenteux, de développer d'autres formes galéniques à base de nicotine ou autres produits de substitution.

2.5.1. Les solutions nasales de nicotine (spray) : elles reposent sur la très grande rapidité d'absorption de la nicotine par voie transnasale, ce qui permet d'obtenir des pics de nicotémie voisins de ceux atteints par les cigarettes. Cependant, bien que le spray puisse être particulièrement intéressant chez les fumeurs présentant des contre-indications à la gomme et au patch, le risque de développer une dépendance au spray est élevé du fait qu'il maintient l'effet bolus.

2.5.2. Les inhalateurs de vapeur de nicotine sont en cours de préparation. Le volume d'inhalation compense la faible concentration en nicotine.

2.5.3. Les pastilles à la nicotine qui se maintiennent dans les joues et se dissolvent lentement dans la bouche.

2.5.4. La clonidine par voie transdermique a également fait l'objet d'études préliminaires.

2.6. CONCLUSION.

Dans l'avenir, il serait peut-être intéressant d'associer plusieurs méthodes délivrant lentement ou rapidement de la nicotine de substitution pour optimiser son profil pharmacocinétique et pharmacodynamique après sevrage tabagique. Des études doivent être entreprises pour comparer l'efficacité de ces produits, leur intérêt et leur place respective dans le sevrage tabagique selon l'effet thérapeutique recherché. Il est aussi très important d'évaluer les activités et la contribution probable des différents métabolites de la nicotine dans la dépendance tabagique. Ces évaluations permettraient de savoir si certains métabolites de la nicotine pourraient prolonger les effets de la nicotine. Cette

connaissance, même si elle ne vise pas l'évaluation de la contribution de ces métabolites dans le développement de la dépendance tabagique elle-même, pourrait contribuer à la compréhension des raisons de la rechute. La cotinine, dans cette perspective, pourrait être une voie de recherche très importante du fait de l'émergence, dans les dernières décennies, d'un certain nombre de travaux relatifs à ses activités pharmacologiques. Une évaluation de l'utilisation de la cotinine dans l'aide au sevrage tabagique a rapporté que ce métabolite pourrait être actif (Keenan et al., 1994). Il est donc indispensable d'évaluer et de développer des formes galéniques pour ce métabolite qui présente l'avantage d'être 250 à 1000 fois moins toxique que la nicotine et dont le spectre d'activité est différent de celui de la nicotine, en particulier sur le système cardio-vasculaire (Chahine, 1989).

Chapitre III : activités pharmacologiques et intérêts fondamentaux et thérapeutiques de la cotinine

La cotinine, principal métabolite de la nicotine, va être d'une part présente en quantité supérieure à celle de la nicotine et va persister bien plus longtemps que cette dernière dans l'organisme. Il est donc important de connaître les effets propres de la cotinine et de pouvoir discuter de leurs conséquences. Cependant, la plupart des études ont été jusqu'alors réalisées *in vitro* et/ou sur des organes isolés de nombreuses espèces animales. Nous ne pouvons en tirer que des hypothèses quant à l'effet obtenu *in vivo*. Dans la plupart de ces études, la cotinine induit certains des effets de la nicotine mais à des doses 10 à 1000 fois supérieures à celles de la nicotine. Cependant, si l'on tient compte de la toxicité relative de ces deux alcaloïdes, on s'aperçoit qu'ils sont actifs à des rapports comparables (Chahine, 1989). Plus encore, certains travaux ont rapporté que la cotinine, à des doses communément rencontrées chez les fumeurs, produit des effets spécifiques ou même inverses de ceux de la nicotine. Quels sont ces effets et quelles sont leurs conséquences dans le tabagisme ?

3.1. EFFETS COMPARABLES À CEUX DE LA NICOTINE.

* **Toxicité** : bien que 50 à 1000 fois moins toxique que la nicotine, la cotinine montre les mêmes symptômes d'intoxication chez la mouche (Bruniquel et al., 1992) et chez la souris (Chahine, 1989). Ni la nicotine ni la cotinine ne présentent une toxicité différée (Chahine, 1989). De plus, ces deux alcaloïdes agissent de manière supra-additive chez l'insecte (Bruniquel et al., 1992).

* **Effet antinociceptif** : la nicotine exerce cet effet par augmentation de la libération de la β -endorphine (Larson et al., 1968; Fuxe et al., 1990) ou par la stimulation Ca^{2+} dépendante de la transcription du gène de la proenkephaline A impliquant les gènes *c-fos* et *jun* (Galzi et Changeux,

1995). La cotinine produit un effet antinociceptif chez la souris et son effet est bloqué par la mécamylamine et la naloxone (Erenmemisoglu et Tekol, 1994).

* **Réduction du renouvellement de la sérotonine** : le système sérotoninergique de l'hippocampe peut être impliqué dans les propriétés anxiolytiques de la nicotine (Fuxe et al., 1979). La cotinine est plus active que la nicotine dans le renouvellement de la sérotonine (Fuxe et al., 1979). Elle semble donc renforcer l'action de la nicotine à cet égard.

* **Atténuation de l'incoordination motrice induite par l'éthanol** : les effets de la nicotine et de la cotinine sont bloqués par l'hexaméthonium (antagoniste des récepteurs nicotiniques). Ceci suggère un mécanisme d'action cholinergique similaire pour la nicotine et la cotinine. Dans ce test, la cotinine est moins active que la nicotine (Dar et al., 1993; 1994).

* **Contraction de la musculature lisse intestinale** : chez les animaux, la cotinine comme la nicotine entraînent une contraction du jéjunum et du duodénum. La cotinine est quantitativement moins active que la nicotine dans la contraction des muscles lisses de l'intestin (Kim et al., 1968; Chahine, 1989).

* **Stéroïdogénèse** : la nicotine et la cotinine inhibent la stéroïdogénèse des cellules de Leydig. Les grands fumeurs présentent une forte réduction des niveaux de testostérone (Patterson et al., 1990) et les femmes qui fument voient leur taux d'oestrogènes réduit par inhibition de la biosynthèse. Cette activité est due à une action directe des alcaloïdes nicotiniques (nicotine, cotinine et anabasine) sur l'aromatase (Barbieri et al., 1989).

* **Réduction de la fréquence des battements des cils nasaux** : cette activité peut favoriser les infections bactériennes à la base de bronchites chroniques ... (Agius et al., 1995).

* **Réduction des symptômes de manque chez les abstinents** : un arrêt de la consommation de tabac provoque des symptômes de manque (sevrage) se traduisant par une irritabilité, une insomnie, des

difficultés de concentration, de l'anxiété...etc. La nicotine modulerait l'état d'anxiété selon le schéma suivant (**Figure 7**).

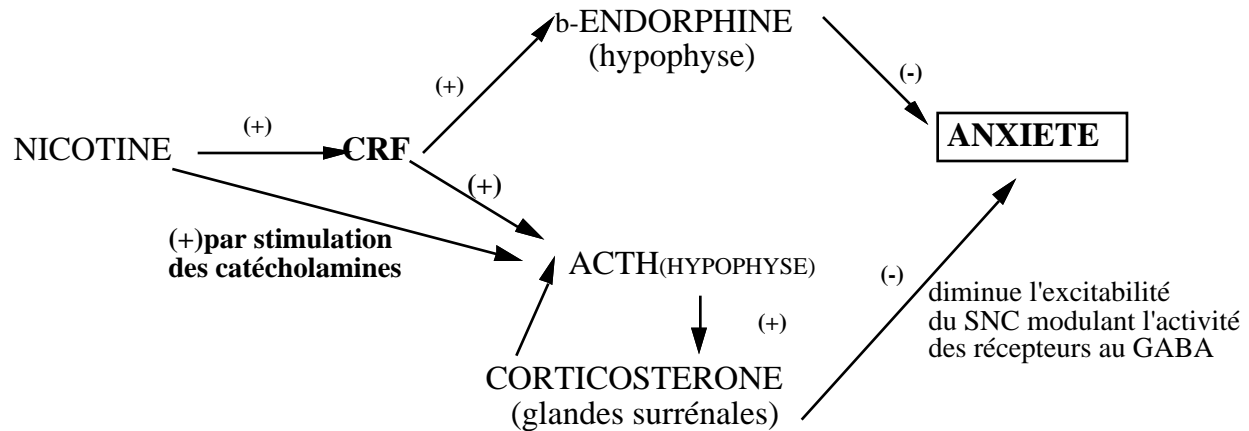


Figure 7 : *Explication du phénomène d'anxiété lié à la nicotine. D'après Pomerleau et Pomerleau (1990).*

Une étude a rapporté que la cotinine, aux doses habituellement rencontrées chez les fumeurs, peut réduire les symptômes de sevrage chez les abstinents (Keenan et al., 1994).

3.2. EFFETS INVERSES DE CEUX DE LA NICOTINE.

* **Effets sur le système cardio-vasculaire** : la cotinine est hypotensive à fortes doses chez le chien anesthésié (10-500 mg.kg⁻¹) (Borzelleca et al., 1962) et à faibles doses (34 µg-100 mg) chez le rat anesthésié (Dominiak et al., 1985). Cet effet serait lié à son action directe ou indirecte sur la relaxation du muscle vasculaire. *In vitro*, la cotinine relaxe les vaisseaux sanguins du lapin (Chahine, 1989) et module les effets cardio-vasculaires de la nicotine (Chahine et al., 1996). Les effets de la cotinine antagonisent les effets de la nicotine en supprimant ses actions muscariniques et nicotiniques. Le système nerveux parasympathique ne semble pas jouer un rôle primordial dans les effets hypotenseurs de la cotinine puisque l'atropine et la diphénylhydramine ne modifient pas significativement la chute

tensionnelle induite par la cotinine (Borzelleca et al., 1962; Chahine, 1989). Chez le rat, la cotinine n'a pas d'effet sur la pression sanguine mais baisse significativement le rythme cardiaque. Cet effet ne semble pas résulter de la modification de l'activité des barorécepteurs essayée par la phényléphrine (Smith et al., 1994).

Chez le fumeur, les expériences ne sont pas pour le moment réellement concluantes et, la cotinine ne semble pas avoir véritablement d'effets sur la pression artérielle (Benowitz et al., 1983). Cependant, à long terme, ces effets pourraient influencer la pression artérielle du fumeur et pourraient expliquer l'existence d'une pression artérielle inférieure chez le fumeur par rapport au non fumeur.

* **Effets sur le système respiratoire** : la cotinine induit une dépression respiratoire chez le chien anesthésié et décérébré. Cette activité peut être d'origine directe sur la musculature lisse vasculaire (relaxation) ou indirecte (Borzelleca et al., 1962).

* **Effets sur le système immunitaire** : la nicotine déprime le système immunitaire en affectant la transduction du signal induite par l'interaction antigène-récepteur des lymphocytes. La cotinine s'avère inoffensive à cet égard (Geng et al., 1995).

* **Effets sur les niveaux d'aldostérone sérique** : la réduction des taux d'aldostérone pourrait faire intervenir une inhibition directe de sa synthèse dans les glandes surrénales mais il pourrait s'y ajouter aussi un effet central au niveau de l'hypophyse (libération d'ACTH) qui régule le fonctionnement des glandes surrénales (Andersson et al., 1993). L'aldostérone intervient dans le système rénine-angiotensine qui contrôle la tension artérielle. La nicotine et la cotinine, à des doses qui n'affectent pas les niveaux de l'hormone lutéinisante (LH) (effet sur la circulation sanguine), affectent différemment les niveaux de l'aldostérone (Andersson et al., 1993).

* **Effets sur les niveaux de prolactine sérique** : l'inhibition des cellules à prolactine de l'antéhypophyse par des agonistes D2 dopaminergiques est impliquée dans le sevrage. La nicotine et la

cotinine, à des doses qui n'affectent pas les niveaux de l'hormone lutéinisante (LH) (effet sur la circulation sanguine), affectent différemment les taux de prolactine. Cependant, la cotinine produit une inhibition à 5 et 30 min et une stimulation à 10 min des taux sériques de prolactine (Andersson et al., 1993).

* **Effets sur la biosynthèse de la prostacycline PGI-2** : cette molécule est vasodilatatrice et inhibitrice de l'aggrégation plaquettaire. La cotinine s'oppose (stimule) aux effets de la nicotine sur la biosynthèse de la prostacycline PGI-2 (Chahine et al., 1990).

* **Effets sur les thromboxanes** : ni la nicotine ni la cotinine n'affectent la biosynthèse des thromboxanes (Dejean, 1985; Chahine, 1989).

* **Effets sur la libération de la noradrénaline** : la noradrénaline est le neurotransmetteur du système sympathique qui augmente la fréquence cardiaque et entraîne une vasoconstriction, ce qui augmente la pression artérielle. La nicotine (stimule) et la cotinine (inhibe) ont des effets opposés sur la libération de noradrénaline. Cependant, la nicotine est de 100 à 500 fois plus active que la cotinine (Chahine et al., 1993).

En conclusion, la cotinine par ses propriétés pharmacologiques pourrait contribuer aux effets "bénéfiques" de la nicotine et s'opposerait aux effets "nocifs" de la nicotine, en particulier sur le système cardio-vasculaire.

3.3. INTÉRÊTS FONDAMENTAUX ET THÉRAPEUTIQUES DE LA COTININE.

C'est très prétentieux et hypothétique de parler de la cotinine dans les thérapeutiques. En effet, les maladies du Système Nerveux Central (SNC) sont complexes et impliquent souvent une pluralité de

voies neuro-endocrines toutes interconnectées. Pour ces raisons, il est très difficile qu'un médicament ait l'effet "désiré" sans avoir aussi de nombreux autres effets secondaires "non désirés".

Cette complexité est accompagnée d'une pluralité des sous-types de récepteurs, et c'est en utilisant des produits spécifiques que l'on va obtenir un effet plus précis. La nicotine a beaucoup d'activités pharmacologiques (**Figure 8**). Son utilisation comme médicament, à l'exception du traitement de la dépendance tabagique, est peu probable vu sa faible sélectivité et ses effets secondaires (Lüllmann et al., 1995).

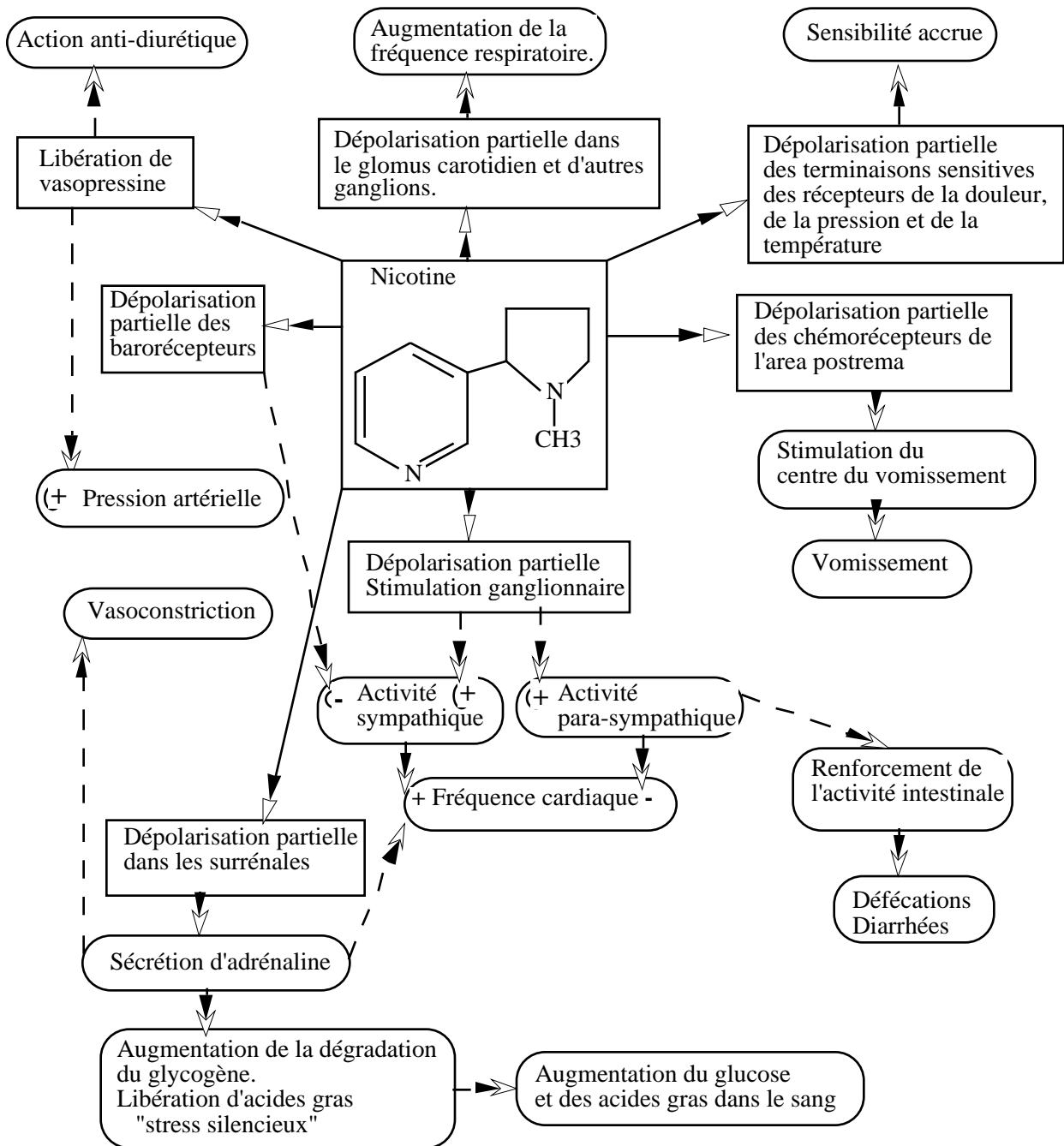


Figure 8 : Schéma récapitulatif des effets attribués à la nicotine. D'après Lüllmann et al., (1995).

Par comparaison, la cotinine produit peu d'activités pharmacologiques et sa toxicité est au moins 100 fois plus faible que celle de la nicotine. Les considérations d'ordre pharmacocinétique et pharmacodynamique ne paraissent pas être des facteurs limites de son utilisation. En effet la cotinine traverse la barrière hématoencéphalique (BHE) (Bowman et al., 1964), et ses effets centraux pourraient

être médiés par des mécanismes cholinergiques (Dar et al., 1993; 1994). Son intérêt ne réside donc pas uniquement dans son utilisation thérapeutique dans l'accoutumance tabagique et cardio-vasculaire, mais c'est aussi un outil de recherche pour une meilleure compréhension du fonctionnement du SNC et probablement du rôle joué par la nicotine dans la prévention des processus de développement de certaines maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson. Cependant, la nature du récepteur médiateur des activités pharmacologiques de la cotinine devrait être identifiée pour une meilleure évaluation de la place de la cotinine dans les thérapeutiques actuelles.

La maladie de Parkinson est associée à une destruction des neurones dopaminergiques du Locus niger. Ces neurones relient la "substantia nigra" au "corpus striatum". Ils participent au contrôle des activités motrices extrapyramidales par inhibition de l'activité des neurones cholinergiques. La maladie se caractérise par un déficit en dopamine et un excès en acétylcholine. La nicotine augmente la libération de dopamine et on a démontré que les fumeurs ont moins de risque de développer la maladie de Parkinson (Kirch et al., 1988). Les effets de la cotinine sur la libération de dopamine n'ont pas été testés.

La maladie d'Alzheimer se caractérise par un déclin graduel des fonctions intellectuelles. Elle est provoquée par une dégénérescence du système cholinergique accompagnée d'un manque d'acétylcholine au niveau du cortex.

3.4. CONCLUSIONS

Les agonistes et antagonistes des nAChRs peuvent améliorer les symptômes des pathologies du SNC (Tabagisme, Parkinson et Alzheimer...) et cardio-vasculaires (athérosclérose et l'infarctus du

myocarde). L'agoniste le plus connu (l'acétylcholine) est rapidement détruit par l'acétylcholinestérase, proche des sites de libération. Son utilisation thérapeutique est donc impossible. La dopamine ne traverse pas la barrière hématoencéphalique, et c'est son précurseur la L-DOPA qui est utilisé. La nicotine, par ses multiples effets secondaires (**Figure 8**) très "néfastes" sur le système cardiovasculaire aurait peu d'utilité, à l'exception peut-être du sevrage des grands consommateurs de tabac et lorsqu'il n'y a pas de contre-indications. Son métabolite, par ses propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques pourrait peut-être être utilisé. Cependant, peu (ou pas) d'études ont été consacrées à l'effet de la cotinine sur la libération des neurotransmetteurs.

Chapitre IV : les récepteurs nicotiques

En 1914 Dale classa les effets de l'acétylcholine en deux groupes : ceux correspondant aux effets de la nicotine, observés d'abord par Langley (1892), inhibés par le curare et ceux correspondant aux effets de la muscarine, inhibés par l'atropine. Le concept de récepteurs muscariniques (mAChRs) et nicotiques (nAChRs) s'imposa entre 1932 et 1936. Il s'agit de deux groupes de récepteurs structurellement différents.

Les mAChRs sont composés de 7 hélices α transmembranaires, sont monomériques et couplés aux protéines G.

Les nAChRs sont polymériques, forment un canal sélectif aux cations Na^+ , K^+ et Ca^{2+} . Ils sont localisés au niveau du SNC, des ganglions du système nerveux autonome, de la plaque motrice des muscles squelettiques et de l'organe électrique de certains poissons comme les *Torpinidées*.

Les nAChRs appartiennent à la superfamille des récepteurs CANAUX IONIQUES LIGAND-DÉPENDANTS (**Figure 9**).

La stimulation produite par les médiateurs dits "excitateurs" comme la sérotonine, l'acide glutamique, l'acide aspartique ou la nicotine provoque une ouverture du canal et une dépolarisation de la cellule (canal perméable aux cations) (Maricq et al., 1991). Si la dépolarisation est suffisante (seuil d'excitabilité), il y aura propagation d'un potentiel d'action de neurone à neurone (Nakanishi, 1992). La stimulation produite par les médiateurs dits "inhibiteurs" (glycine ou GABA) provoque une hyperpolarisation de la cellule (ces canaux sont sélectifs des anions Cl^- , PO_4^{3-}) et un arrêt du signal (Betz, 1990).

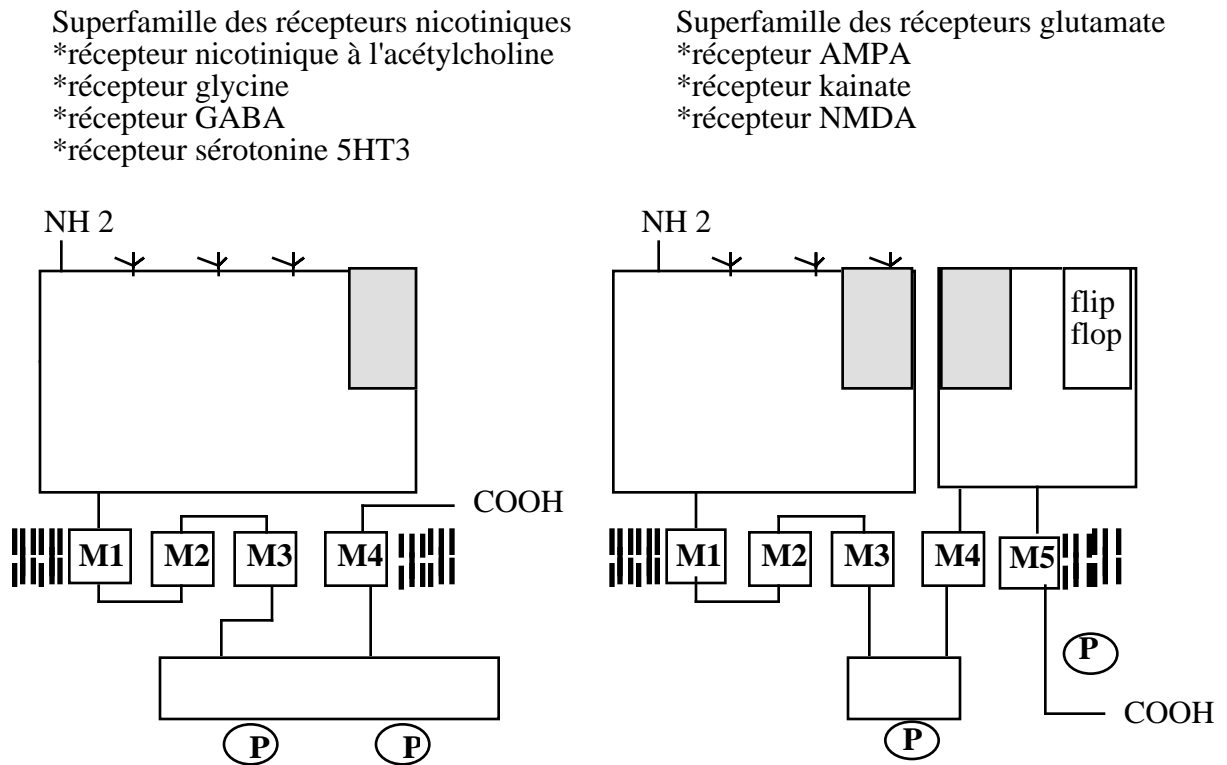


Figure 9 : *Modèle de l'organisation transmembranaire des sous-unités des récepteurs canaux Ligand-dépendants. D'après Galzi et Changeux (1995).*

Notion de réponse biphasique : à faibles doses, la nicotine stimule la transmission ganglionnaire. Ceci expliquerait ses effets sur l'éveil, l'attention et la vigilance produits par une consommation de tabac. À fortes doses, la nicotine agit en bloquant les ganglions. La dépolarisation membranaire est si forte qu'un potentiel d'action ne peut plus se produire pendant un certain temps (période réfractaire). Ceci expliquerait ses effets de relaxation et de diminution du stress.

4.1. PRINCIPES COMMUNS DES STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES.

Les récepteurs-canaux des neurotransmetteurs forment des hétérooligomères avec 5 sous-unités. Sur la base de leurs séquences en acides aminés, ces récepteurs peuvent être regroupés à l'intérieur de 2 sous-familles : la famille des récepteurs nicotiniques et la famille des récepteurs au glutamate. La première de ces 2 familles comprend les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChRs), à la sérotonine (5HT₃), au GABA et à la glycine. Ils se composent de sous-unités de 450 à 700 acides aminés et montrent des séquences homologues (25 à 60 %) avec des distributions similaires des domaines hydrophobes et hydrophiles (Cockroft et al., 1992; Maricq et al., 1991) (**Figure 9**). La preuve en faveur d'une telle sous-division de sous-unités en domaines fonctionnels est fournie par des études d'une série de sous-unités chimériques fonctionnelles (Eislé et al., 1993). Les membres du second groupe, la sous-famille des récepteurs au glutamate (sous-types NMDA, AMPA, kainate), sont composés de larges sous-unités polypeptidiques de 900 à 1500 résidus avec des séquences homologues (18-70%) (Seeburg, 1993, Nakanishi, 1992). Leur organisation transmembranaire reste conjecturale mais des données utilisables sont en accord avec ce modèle.

4.2. L'HÉTÉROOLIGOMÉRISATION COMME SOURCE DE DIVERSITÉ.

D'après les principes communs à l'organisation tridimensionnelle, les canaux ioniques ligand-dépendants présentent une large diversité de spécificités pharmacologiques, de sélectivités ioniques et cinétiques, lesquelles ont pour origine les différences dans les séquences d'acides aminés (au niveau des sous-unités) et les combinaisons multiples portant sur l'assemblage des nombreuses sous-unités à l'intérieur des hétérooligomères fonctionnels (Role, 1992, Sargent, 1993, Seeburg, 1993). Dans le cas des récepteurs nicotiniques, il existe 8 sous-unités α différentes connues, 4 sous-unités β , une γ , une δ , une ϵ ; celles-ci ayant été identifiées par clonage moléculaire. Suivant les organes, elles peuvent

s'associer avec une stoechiométrie fixée (muscle, organe électrique...) ou une stoechiométrie générale (cerveau; homooligomérisation ou hétérooligomérisation). De même, au moins 16 sous-unités sont connues pour les récepteurs à la glycine ainsi que pour les récepteurs au glutamate (Seeburg, 1993).

4.3. LES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES À L'ACÉTYLCHOLINE.

Les nAChRs sont des hétérooligomères formés de 5 sous-unités. Leur masse moléculaire est voisine de 300 KDa. Plusieurs sous-unités constitutives des nAChRs ont été identifiées dans le SNC (Luetje et Patrick, 1991 ; Role, 1992 ; Sargent, 1993). Différentes combinaisons de ces sous-unités forment des récepteurs différents. Ces récepteurs diffèrent par leur conductance, leur susceptibilité à la phosphorylation, à l'activation par les ligands nicotiniques et leur distribution (Role, 1992).

4.3.1. Classification des nAChRs.

Le prototype est le nAChR du muscle et de l'organe électrique du poisson Torpedo. C'est une protéine pentamérique de 300 KDa rencontrée dans les muscles squelettiques et dans les organes électriques de certains poissons, formée de cinq sous-unités suivant la stoechiométrie : $2(\alpha 1), \beta 1, \chi, \delta$ ou ε (Karlin, 1993) (**Figure 10**).

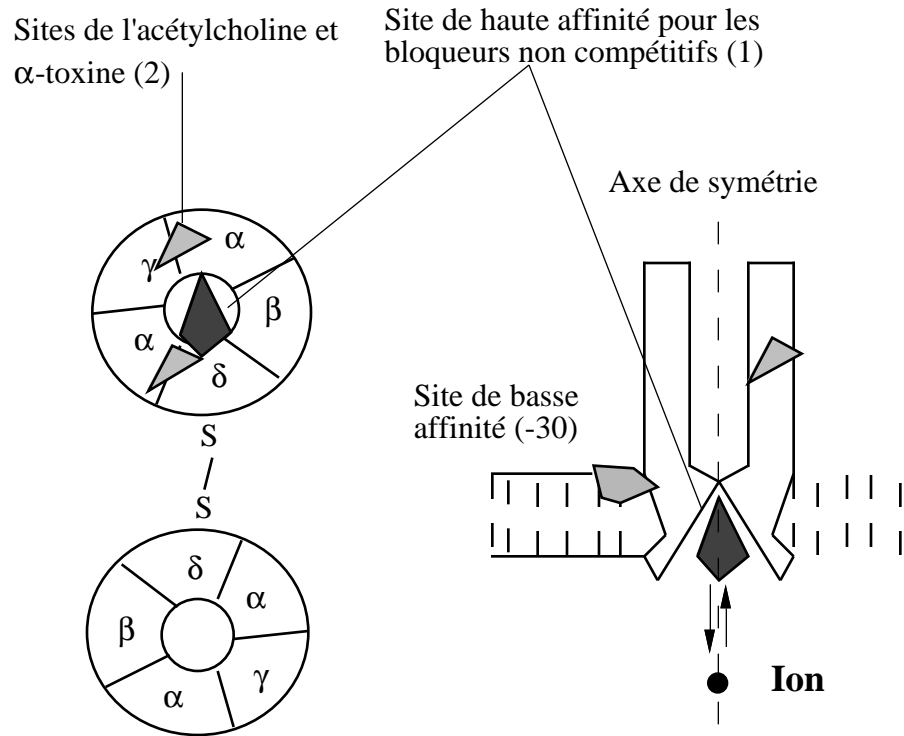


Figure 10 : *Schéma du récepteur nicotinique périphérique. D'après Galzi et Changeux (1995).*

Les sous-unités sont très conservées au cours de l'évolution. Ce prototype lie l' α -Bgt (toxine de venin de serpent) avec une très haute affinité ($K_d < 1$ nM) (Bruniquel et al., 1992). Les deux sous-unités α portent les sites de liaison pour l'acétylcholine et présentent de la coopérativité positive (n de Hill = 1.5). Les antagonistes non compétitifs se lient à un site de haute affinité situé dans le canal ionique. Ils inhibent le passage des ions par encombrement stérique. D'autres sites de basse affinité (allostériques) se trouvent à l'interface lipide-protéine.

4.3.2. Les nAChRs neuronaux : ces récepteurs ont rapidement divergé au cours de l'évolution. Sept sous-unités α ($\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 6, \alpha 7, \alpha 8$) et 3 sous-unités β ($\beta 2, \beta 3, \beta 4$) ont été identifiées dans les neurones (Deneris et al., 1989; Role, 1992; Lindstrom, 1995). Le domaine transmembranaire des sous-unités peut contenir des hélices α et des feuilletts β . Ces récepteurs ont été classés en deux groupes selon leur aptitude à lier l' α -bungarotoxine (**Figure 11**).

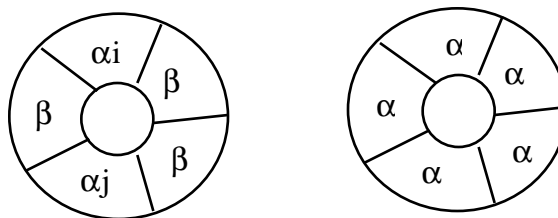


Figure 11 : *Structure des récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine neuronaux. D'après Galzi et Changeux (1995).*

4.3.2.a. Les nAChRs neuronaux qui ne lient pas l' α -bungarotoxine

Ils sont constitués de deux types de sous-unités α et β . La stoechiométrie est $2(\alpha)3(\beta)$ (**Figure 11** gauche). Les combinaisons des sous-unités α_i ($i=2$ à 6) et des sous-unités β_2 , β_3 , β_4 ont été mises en évidence (Cooper et al., 1991; Galzi et Changeux, 1995; Lindstrom, 1995).

Le sous-type $\alpha_4\beta_2$ prédomine dans le SNC. Il contribue majoritairement (90%) à la liaison de haute affinité de la nicotine dans le cerveau (Flores et al., 1992). Il est probablement impliqué dans la pharmacodépendance tabagique car il est "up-régulé" par un traitement à la nicotine (Flores et al., 1992; Sanderson et al., 1993; Ochoa, 1994). Les sous-unités α_3 , β_4 et α_5 peuvent se combiner pour former des récepteurs post-synaptiques ganglionnaires fonctionnels (Vernalis et al., 1993).

La sous-unité α lie le ligand tandis que la sous-unité β a une fonction structurale (Role, 1992). Des études plus récentes (Cohen et al., 1996) sur les nAChRs $\alpha_3\beta_2$ et $\alpha_3\beta_4$ ont conclu que les premiers 120 résidus de β_4 et de β_2 contribuent à la conformation du site de liaison de l'agoniste.

4.3.2.b. Les nAChRs neuronaux qui lient l' α -bungarotoxine

Ce sont des récepteurs homomériques ou hétéromériques constitués des sous-unités α_7 et α_8 (**Figure 11** droite). Les homomériques ont été exprimés dans les oocytes du *Xenope* (Schoepfer et al.,

1990; Couturier et al., 1990; Gerzanich et al., 1994). Des études de liaison avec l' α -bungarotoxine (α Bgt) montrent que (Keyser et al., 1993) :

- Le récepteur homomérique $\alpha 7$ est le sous-type prédominant dans le cerveau de poulet.
- Les homomères $\alpha 8$ sont par contre, prédominants dans la rétine de poulet.
- Les hétéromères $\alpha 7\alpha 8$ sont mineurs dans le cerveau et la rétine.

Dans le neurone, ces nAChRs sont localisés extrasynaptiquement. Du fait qu'ils se désensibilisent rapidement, leur fonctionnement est resté obscur pour les techniques classiques d'électrophysiologie (Vijayaraghavan et al., 1992). Leur affinité pour l' α Bgt est moindre que celle des nAChRs périphériques. Le Kd est de 2 nM ($\alpha 7$) et 20 nM ($\alpha 8$) (Keyser et al., 1993; Lindstrom, 1995).

4.3.3. Les sous-unités des nAChRs

Les sous-unités des nAChRs sont des protéines membranaires composées de 4 domaines (**Figure 12**). Ce schéma structural se retrouve dans tous les récepteurs-canaux.

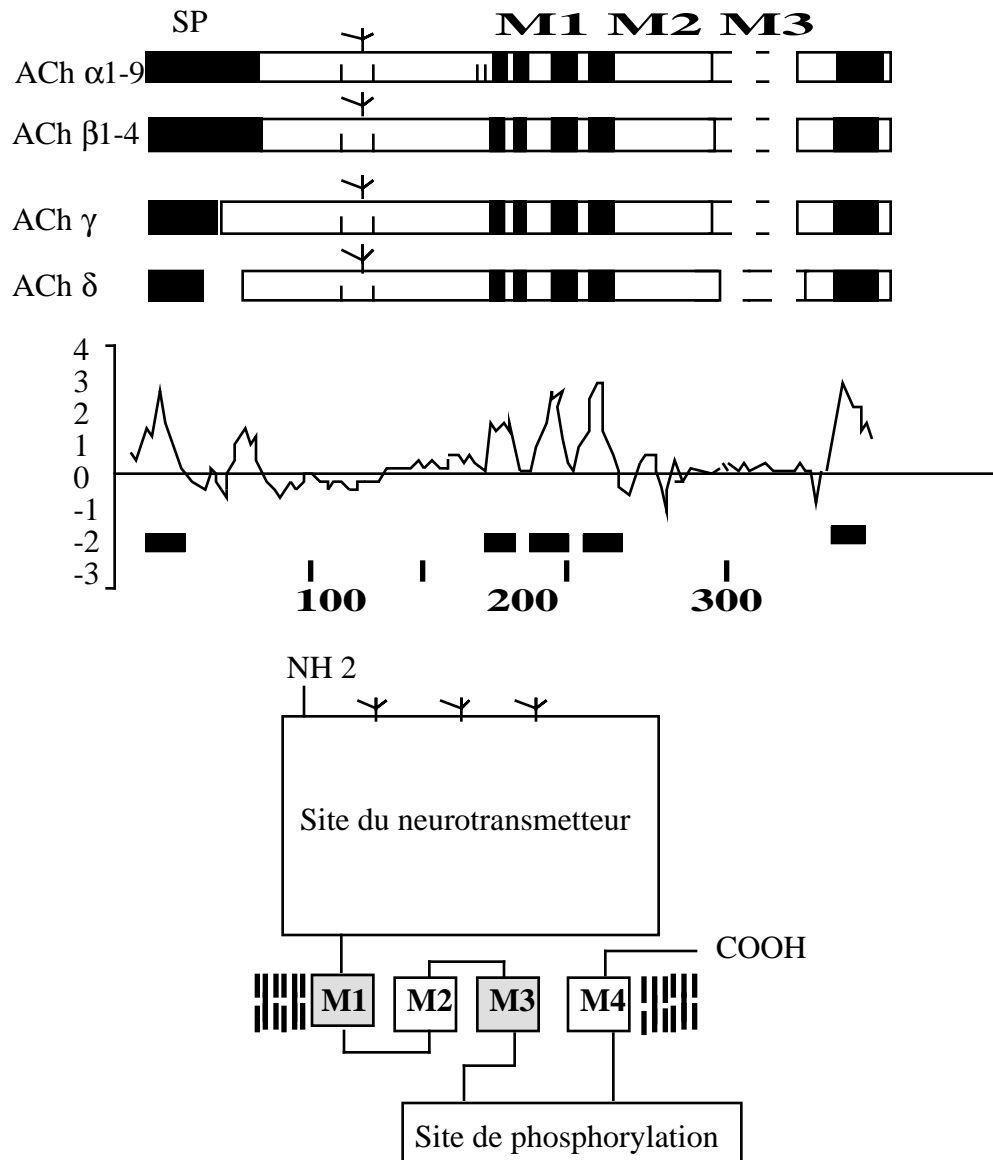


Figure 12 : Représentation schématique de la structure des sous-unités des nAChRs. D'après Galzi et Changeux, 1995.

Haut : conservation des différentes sous-unités, des sites de glycosylation et des cystéines 192 et 193.

Milieu : caractère hydrophobe des domaines M1 à M4 des sous-unités.

Bas : organisation d'une sous-unité dans la membrane cytoplasmique.

* **Domaine 1 (extracellulaire)** : hydrophile, il est relativement bien conservé. Il contient un ou plusieurs sites de glycosylation. Il est exposé à la fente synaptique. Les deux cystéines cys192 et cys193 sont caractéristiques des sous-unités α . Elles contribuent à la conformation du site et à la liaison de l'agoniste. On ne les trouve pas dans les sous-unités β .

* **Domaine 2 (intramembranaire)** : ce domaine est hydrophobe et divisé en quatre sous-domaines (M1, M2, M3 et M4). Ces sous-domaines sont constitués de 19 à 27 acides aminés et forment la partie transmembranaire de la protéine. M2 est le plus conservé à travers l'évolution. De nombreuses études suggèrent qu'il contribue à la formation du canal ionique (**Figure 13**).

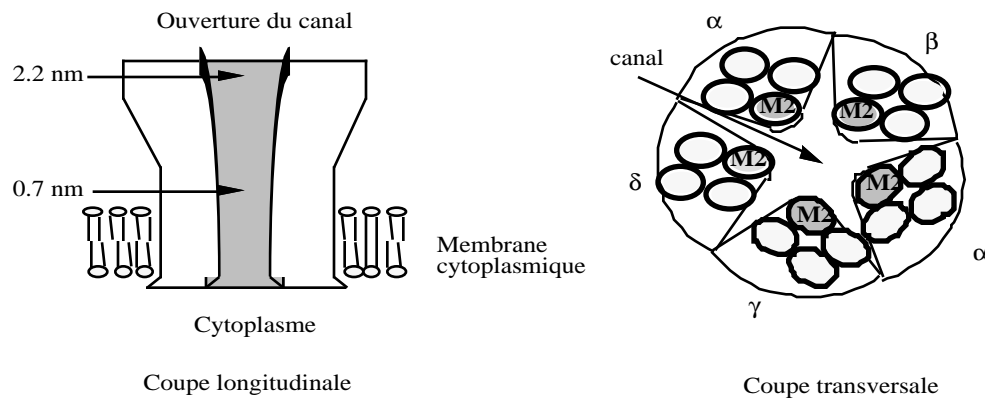


Figure 13 : Coupes longitudinale et transversale du canal ionique du nAChR montrant le segment M2 de chaque sous-unité dans le canal ionique. D'après Gies (1993).

M2 contient quelques résidus hydroxylés (Ser, Thr), Leu et contribue aux sites de liaison de haute affinité des antagonistes non compétitifs. Ses résidus (Glu, Asp) chargés négativement forment dans chaque nAChR des anneaux localisés du côté cytoplasmique, synaptique et intermédiaire. Les charges négatives de ces anneaux contrôlent le flux des ions (Galzi et Changeux, 1995) (**Figure 14**).

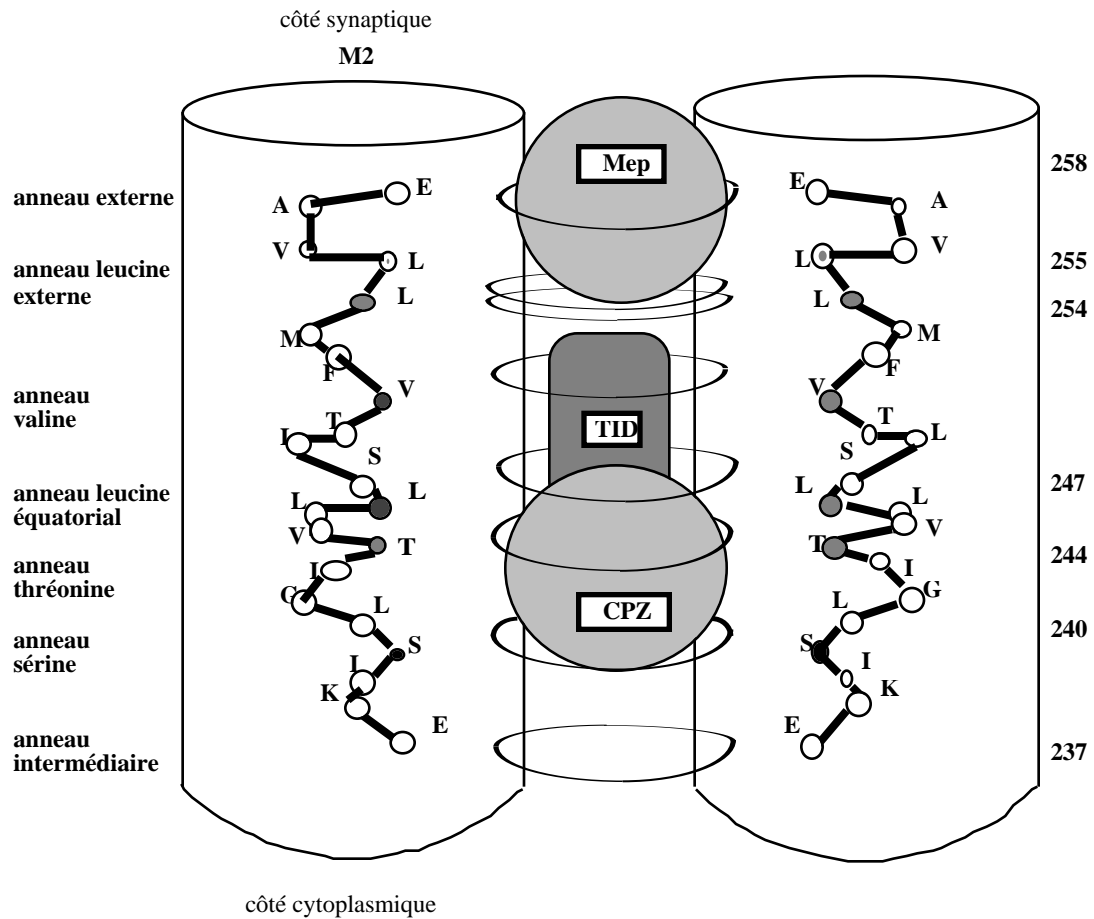


Figure 14 : Modèle du site de haute affinité pour les antagonistes non compétitifs à l'intérieur du canal. D'après Galzi et Changeux, 1995.

Le domaine M2 et la numérotation correspondent à ceux d'un récepteur $\alpha 7$ homooligomérique. Le domaine M2 est arrangé en α -hélice et forme dans le sens N-terminal vers C-terminal, les intermédiaires chargés négativement sérine, thréonine, leucine équatoriale, valine, deux leucines adjacentes externes et les anneaux externes chargés négativement. L'anneau interne chargé négativement (position 234 de la structure primaire) n'est pas montré. Le site de liaison de la chlorpromazine (CPZ) s'étend au delà des anneaux thréonine, sérine et leucines équatoriales. Celui de

trifluorométhyl-iodophényl-diazirine (TID) chevauche celui de CPZ et s'étend vers le côté C-terminal jusqu'à l'anneau des valines. Le site d'incorporation covalente de la moutarde de meproadifene (Mep) est l'anneau externe des glutamates. Le site d'incorporation du TPMP ou triphényl-méthyl-phosphonium (non montré) est l'anneau thréonine.

* **Domaine 3 (cytoplasmique)** : hydrophile, il est exposé au cytoplasme. Il est moins conservé et sa phosphorylation régule le fonctionnement du récepteur.

* **Domaine 4 (extracellulaire ou C-terminal)** : il est hydrophobe et constitué de 20 résidus. Il porte le groupement COOH terminal.

4.3.4. Localisation, Expression et Pharmacologie des sous-unités des nAChRs.

Les sous-unités des nAChRs sont très semblables structurellement. Cependant, il existe des différences au niveau de leur masse molaire, leur localisation, leur cinétique et leur aptitude à former des canaux fonctionnels *in vitro* (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles des sous-unités des nAChRs

Sous-unités	Masse molaire (daltons)	Localisation	Canaux fonctionnels
$\alpha 1$	50 000	"plaque motrice"	avec $\beta 1$, γ , δ ou ϵ
$\alpha 2$		noyau interpédonculaire (mRNA)	
$\alpha 3$	57 000 +/- 1	habenula médiane (mRNA)	$\beta 2$, $\beta 4$
$\alpha 4$	51 000	Tout le cerveau	$\beta 2$, $\beta 4$
$\alpha 5$	49 000	Cerveau et ganglions	$\alpha 3$, $\alpha 4$
$\alpha 6$			pas de rôle fonctionnel "in vitro"
$\alpha 7$	60 000	Tout le cerveau (plus prédominants que les $\alpha 8$)	$\alpha 7$, $\alpha 8$
$\alpha 8$	60 000	Tout le cerveau (prédominants dans la rétine)	$\alpha 7$, $\alpha 8$
$\beta 1$	53 700	"plaque motrice"	avec $\alpha 1$, γ , δ ou ϵ
$\beta 2$	79 000	Tout le cerveau	$\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$
$\beta 3$			pas de rôle fonctionnel "in vitro"
$\beta 4$	52 000 +/- 1	habenula médiane	$\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$

Les propriétés pharmacologiques de différents nAChRs exprimés dans l'oocyte du Xenope ont été rapportées par Role (1992) et Le Novère et al., (1993) (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Propriétés pharmacologiques de nAChRs exprimés dans l'oocyte de *Xenope* (les gènes sont ceux du rat à l'exception de $\alpha 8$). D'après Role (1992) et Le Novère et al., (1993).

Canaux	Profil pharmacologique	Blocage par l' α -Bgt
$\alpha 2\beta 2$	$N > D = A > C$	(-)
$\alpha 3\beta 2$	$D = A > N > C$	(-)
$\alpha 4\beta 2$	$A = N > D > C$	(-)
$\alpha 2\beta 4$	$C > N > A > D$	(-)
$\alpha 3\beta 4$	$C > N = A = D$	(-)
$\alpha 4\beta 4$	$C > N > A > D$?
$\alpha 7$	$N > C > D > A$	Blocage
$\alpha 8$	$N = A$?

A=Acétylcholine; N= nicotine; C= cytosine; D= DMPP (1,1-dimethyl-4-phenyl-piperazinium iodide).

Il faut noter que la pharmacologie des nAChRs peut varier en fonction de multiples facteurs. Plusieurs états du récepteur ont été décrits (**Figure 15**). Actuellement, ces récepteurs sont considérés comme des protéines allostériques pouvant intégrer des messages de plusieurs systèmes de transmission cellulaires (Galzi et Changeux, 1995).

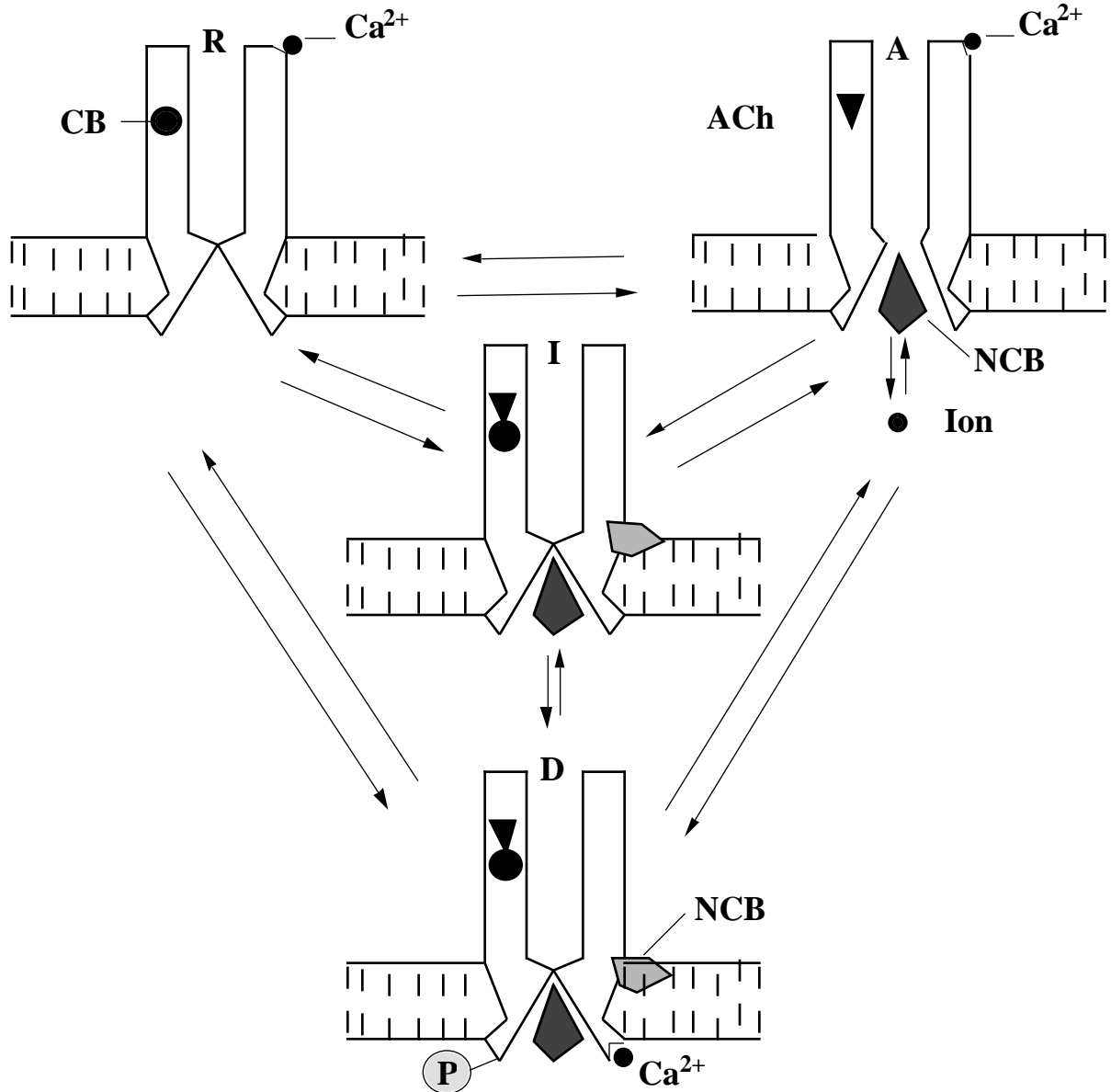


Figure 15 : *Modèle à quatre états minimum de transitions allostériques du nAChR. D'après Galzi et Changeux, 1995. ACh : acétylcholine; CB : antagoniste compétitif; NCB : antagoniste non compétitif; P : phosphorylation; R : repos; A : actif; I : intermédiaire ou rapidement désensibilisé; D : lentement désensibilisé et stabilisé à l'équilibre.*

4.4. COMPLEXITÉ DU PROBLÈME RELATIF À LA DIVERSITÉ DES nAChRs NEURONAUX.

Les études les plus récentes ont abouti à l'émergence d'un thème fondamental dans la biologie des récepteurs : "tous les récepteurs canaux ligand-dépendants présentent une diversité considérable au niveau structural et fonctionnel". Cette diversité semble évidente étant donné le nombre de combinaisons possibles entre les sous-unités et l'étendue des canaux ioniques activés par chaque transmetteur.

Une simple réflexion sur la diversité liée au nombre de combinaisons possibles entre les sous-unités souligne la complexité du problème. Sachant que l'on connaît 7 sous-unités α et 3 sous-unités β , et en supposant pour simplifier qu'un nAChR neuronal inclue seulement 1 type de sous-unité α et 1 type de sous-unité β , on obtient 21 versions possibles pour la stoechiométrie $3\alpha 2\beta$. En outre, s'il existe des nAChRs neuronaux hétéro α et hétéro β , on obtient 1323 combinaisons possibles et si la stoechiométrie $2\alpha 3\beta$ est permise, le nombre total de solutions potentielles est 4410 (Role, 1992).

Cependant, ces calculs sont très hypothétiques, car certaines combinaisons sont exclues *in vivo*, lors de l'assemblage qui suit des règles complexes (Vernalis et al., 1993). En outre, il est probable que beaucoup d'autres gènes codant pour des sous-unités restent encore à découvrir et que la connaissance des différents gènes des nAChRs présents dans un neurone soit insuffisante pour prédire quels sous-types de récepteurs y sont présents (Steinbach et Ifune, 1989).

Cette diversité dans les types de sous-unités et dans leurs combinaisons confère aux canaux ioniques des propriétés fonctionnelles différentes. On connaît par exemple des différences liées à la composition en sous-unités dans la conductance du canal, dans la cinétique de son temps d'ouverture, dans sa sensibilité aux agonistes et aux antagonistes et dans son taux de désensibilisation (Role, 1992).

De plus, les nAChRs sont distribués dans différentes régions cérébrales selon les combinaisons entre leurs sous-unités constitutives.

4.5. DISTRIBUTION RÉGIONALE DES nAChRs NEURONAUX.

Les études autoradiographiques de Clarke et al., (1985) ont montré que la nicotine tritiée et l'acétylcholine tritiée se lient pratiquement au même niveau dans le cerveau de rat. Pour ces auteurs, la *[3H]nicotine* se fixe préférentiellement dans le thalamus, alors que pour d'autres (Abood et al., 1980), elle se lie surtout au niveau de l'hippocampe et de l'hypothalamus sur des sites de nature non cholinergique. Les études de liaison de la *[3H]nicotine* dans le cerveau de rat permettent de distinguer plusieurs populations de sites (Sloan et al., 1984). Les sites nicotiques de haute affinité pour la nicotine semblent prédominer dans le thalamus du singe, contrairement aux sites de basse affinité liant la *[125I]α-Bgt* qui sont situés, pour Cimino et al., (1992) principalement dans les noyaux thalamiques, l'habenula médiale et dans la lamina I du cortex. Ces sites pourraient représenter les sites par lesquels la nicotine exerce ses actions pharmacologiques centrales. Cependant, l'analyse de la distribution de nombreux gènes codant pour ces sous-unités réalisée par hybridation in situ a révélé des localisations plus complexes des sous-unités à l'intérieur du cerveau. Ainsi, bien que les études biochimiques aient surtout mis en évidence le rôle des sous-unités $\alpha 4$ et $\beta 2$ dans le CNS et celui de $\alpha 3$ et $\beta 4$ dans la périphérie, les études moléculaires ont révélé un profil plus complexe. Par exemple, l'hybridation in situ chez le rat indique que les expressions de $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ se recouvrent en partie dans le noyau interpedonculaire. C'est également le cas pour $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$, $\beta 3$ et $\beta 4$ dans l'habenula médiane. De même, chez le poulet, les études d'hybridation in situ ont révélé l'expression de $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\beta 2$ dans les mêmes neurones centraux. Chez les oiseaux, c'est l'analyse par "polymerase chain reaction" qui a révélé l'expression de $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 1$ et $\beta 4$ dans les ganglions périphériques.

En fait, la plupart des régions du CNS expriment relativement fortement un ou deux gènes codant pour les sous-unités α , les autres sous-unités α étant absentes ou présentes à de faibles niveaux. L'expression de $\beta 4$ est extrêmement moins prononcée que celle de $\beta 2$ dans le CNS (Role, 1992). Par exemple, $\alpha 4\beta 2$ prédomine dans l'hippocampe et dans le locus niger, alors que $\alpha 3\beta 2$ coexiste avec $\alpha 4\beta 2$ dans l'aire tegmentale ventrale (Ochoa, 1994).

4.6. LE RÉCEPTEUR NICOTINIQUE DES INSECTES.

Dans le SNC, le neurotransmetteur exciteur majoritaire chez l'insecte est l'acétylcholine alors que chez les vertébrés c'est le glutamate (Gundelfinger, 1992; Gundelfinger et Hess, 1992). De plus, les nAChRs sont plus abondants que les mAChRs dans le SNC des insectes. Pour les vertébrés, l'inverse est vrai (Gundelfinger et Hess, 1992). Plusieurs sous-unités α -like et β -like ont été identifiées chez l'insecte, soulignant l'ubiquité et la multiplicité (homo et hétérooligomérisation) des récepteurs nicotiniques (Gundelfinger, 1992; Schuster et al., 1993). 3 gènes ont été identifiés codant pour les sous-unités α : ALS (alpha-like subunit), D $\alpha 2$ (Drosophila α -like subunit 2) et D $\alpha 3$ (Drosophila α -like subunit 3) qui auraient un rôle dans la liaison du ligand car ils présentent les cystéines Cys192 et Cys193. 2 autres gènes codent pour les sous-unités structurales : ARD (nicotinic acétylcholine receptor from Drosophila), appelé aussi AChR64B pour sa localisation chromosomique (position 64B) et SBD (Second β subunit from Drosophila). L'homologie structurale entre les sous-unités des nAChRs des insectes et des vertébrés (**Figure 16**) est très forte, de 33 à 50% (Gundelfinger, 1992).

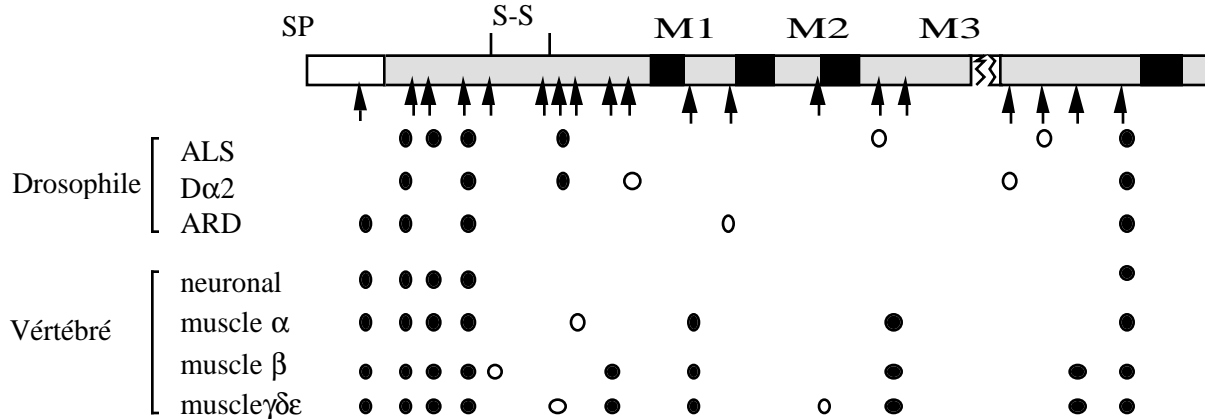


Figure 16 : *Comparaison de la structure des gènes des nAChRs. D'après Gundelfinger et Hess (1992). Les flèches marquent la position des introns représentée sur une structure rappelant les sous-unités des nAChRs. Les cercles pleins sont les introns présents dans au moins deux gènes ou groupes de gènes. Les cercles vides sont les introns uniques à un gène ou groupe de gènes. SP : peptide signal; M1 à M4 domaines transmembranaires. S-S : pont disulfure très conservé.*

Ces sous-unités peuvent former des récepteurs mixtes (α) insecte / (β) vertébré fonctionnels répondant à l'acétycholine et à la nicotine (Bertrand et al., 1994). Cependant, la comparaison des profils pharmacologiques (affinité pour l' α Bgt) suggère des différences pharmacologiques des récepteurs chez la drosophile (Gundelfinger, 1992; Bertrand et al., 1994) et des différences pharmacologiques des récepteurs des insectes et des vertébrés (Ohana et Gershoni, 1990).

4.7. MODULATIONS DES nAChRs NEURONAUX "Up-régulation" et "down-régulation".

Les récepteurs nicotiniques neuronaux sont soumis à des mécanismes de régulation. Quand la plupart des récepteurs aux drogues sont exposés de façon chronique à leur agoniste spécifique, leur

nombre diminue. On appelle ce phénomène la "down-régulation" (Creese et Sibley, 1981) et elle peut être également provoquée par la suppression des mécanismes d'inactivation de l'agoniste (inhibition d'enzymes de clivage de l'agoniste ou blocage de l'élimination de l'agoniste). L'administration chronique d'un antagoniste induit une sous-exposition du récepteur à l'agoniste, et conduit de ce fait, à une augmentation du nombre de récepteurs. Ce phénomène est appelé "up-régulation" (Creese et Sibley, 1981). La down et l'up-régulation des nAChRs centraux et périphériques existent après un traitement chronique de rats avec des inhibiteurs de la cholinestérase (Costa et Murphy, 1983; Collins et al., 1990) ou après une administration chronique de nicotine (Marks et al., 1983; 1992; Pauly et al., 1991; Flores et al., 1992; Sanderson et al., 1993; Collins et al., 1994) ou d'antagonistes nicotiques (Collins et al., 1990; 1994).

Cependant, le traitement chronique par la nicotine qui est un agoniste des récepteurs nicotiques, augmente le nombre des sites de liaison, alors que l'affinité pour les ligands cholinergiques reste inaltérée. On ne sait pas si ces sites sont présynaptiques, postsynaptiques ou les deux. Ce phénomène d'up-régulation en réponse à l'administration chronique de nicotine est très particulier car :

- * seuls les récepteurs nicotiques centraux sont up-régulés (et pas les périphériques).
- * les récepteurs cholinergiques muscariniques ne sont pas up-régulés.
- * l'up-régulation se produit pour certains types de nAChRs neuronaux.
- * les sites de liaison de l' α -Bgt ne sont pas up-régulés, ils le sont seulement dans certaines régions du cerveau par de très fortes doses de nicotine ou ils sont down-régulés selon le mode d'administration (chronique ou subchronique, animal vigilant ou anesthésié...).
- * l'up-régulation est un phénomène régio-sélectif (Marks et al., 1992; Sanderson et al., 1993).

Cette up-régulation des nAChRs est associée à la tolérance chez les rongeurs et pourrait impliquer une augmentation de la synthèse des récepteurs. Certains auteurs ont en effet mentionné que la nicotine induit une transcription rapide des gènes de réponse précoce (Greenberg et al., 1986; Ochoa, 1994).

D'autres auteurs ont suggéré que l'augmentation des sites de liaison de haute affinité (sous l'effet d'un traitement subchronique à la nicotine) était due à une interconversion des sites de haute affinité et des sites de basse affinité, plutôt qu'à une synthèse de nouveaux sites de liaison de la nicotine (Romanelli et al., 1988). Des données plus récentes, semblent indiquer que les récepteurs up-régulés adoptent une conformation qui ralentit leur départ de la surface et leur dégradation (Peng et al., 1994). Il semblerait donc que l'up-régulation soit liée à des modifications post-transcriptionnelles induites par la nicotine sans modification du taux de transcription (Marks et al., 1992; Ochoa, 1994).

4.8. DÉSENSIBILISATION DES nAChRs.

À l'état désensibilisé, un nAChR est capable de lier les agonistes cholinergiques, mais ceux-ci sont incapables d'activer les mécanismes du récepteur impliqués dans la réponse biologique. La désensibilisation aiguë et la désensibilisation chronique des nAChRs sont évoquées pour expliquer les effets de la nicotine sur le cerveau des fumeurs.

La désensibilisation aiguë spécifique (ou tachyphylaxie) à la nicotine est un phénomène réversible et rapide aussi bien dans son développement que dans le retour à l'état normal (Porchet et al., 1988). C'est une propriété intrinsèque des récepteurs nicotiques qui implique une interaction directe et spécifique entre le récepteur et le ligand. Le nombre de récepteurs à la nicotine reste inchangé au cours de ce phénomène qui semble intervenir dans le développement de la tolérance journalière à différents effets de la nicotine (comme la relaxation musculaire ou l'activation de la perception).

La désensibilisation chronique se produit après une exposition prolongée à la nicotine. Cette désensibilisation, chez l'homme, apparaît après des expositions à la nicotine de plusieurs jours, mois, voire plusieurs années. Ce phénomène est moins rapide à s'établir et à rétablir l'état normal que la désensibilisation aiguë. Ce mécanisme est également moins réversible et pourrait être responsable de la tolérance aux effets de récompense et d'aversion (comme la nausée ou l'étourdissement) produits par la nicotine.

Le phénomène d'up-régulation des nAChRs neuronaux devrait normalement se produire après une exposition chronique à un antagoniste mais pas à un agoniste tel que la nicotine. Pour expliquer ce paradoxe, on suppose que la nicotine agit d'abord en tant qu'agoniste mais qu'à long terme, elle induit la désensibilisation des récepteurs, agissant ainsi comme un antagoniste fonctionnel. Une autre hypothèse intéressante pour expliquer le phénomène de désensibilisation des nAChRs induite par la nicotine, est que le rôle d'antagoniste fonctionnel pourrait être joué par un métabolite de la nicotine comme la cotinine (Schwartz et Kellar, 1983b).

Il est donc probable qu'il existe dans le cerveau un équilibre entre les formes désensibilisées et non désensibilisées des récepteurs, comme c'est le cas pour les nAChRs du muscle et de l'organe électrique de poisson (**Figure 15**). De plus, on ne sait pas si les différents sous-types de récepteurs du cerveau présentent les mêmes caractéristiques de désensibilisation que leurs homologues périphériques et si les propriétés de désensibilisation des nAChRs neuronaux ne varient pas selon leur localisation dans le cerveau. La réponse à ces questions pourrait permettre d'expliquer les différences observées dans les comportements de tolérance. En effet, la tolérance en termes cellulaires et moléculaires pourrait être liée à différents profils de désensibilisation des nAChRs neuronaux selon leur localisation et à des changements d'état de phosphorylation de ces récepteurs (Miles et al., 1987; Smith et al., 1987; Ochoa, 1994).

4.9. CONCLUSION.

Le nAChR est la cible pharmacologique de toute approche pharmacologique de la dépendance tabagique. Cette cible est hétérogène vu la multiplicité des nAChRs. Cette multiplicité expliquerait le spectre très large des actions de la nicotine. La caractérisation de la contribution de chacune de ces cibles dans les effets de la nicotine permettra probablement de cibler un effet particulier de la nicotine. Par exemple, on pense actuellement que le nAChR contenant la sous-unité $\alpha 3$ est responsable de la libération de la noradrénaline (Clarke et Reuben, 1996). Dès lors, le développement de nouvelles drogues nicotiniques sélectives et l'identification des cibles pharmacologiques des métabolites connus de la nicotine, comme la cotinine, s'imposent comme démarches scientifiques défendables. La deuxième alternative présente un second intérêt, puisqu'elle permettra d'évaluer la contribution des métabolites de la nicotine au spectre des actions de la nicotine.

C'est dans cette perspective que nous avons envisagé ce travail.

MATERIELS ET METHODES

I_ LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

1.1. Les insectes.

Notre étude a porté sur deux espèces de mouches de la famille des calliphoridées, vulgairement appelées mouches à viande. L'espèce *Calliphora vomitoria* (C.v.) ou mouche bleue de la viande mesure 9 à 14 mm et l'espèce *Lucilia caesar* (L.c.) ou mouche impériale, de couleur verte, mesure 6 à 11 mm. Les mouches ont été maintenues dans un bêcher de 250 ml grâce à une gaze, à la température ambiante, l'humidité de l'air était de 72%. Les mouches avaient libre accès à une solution de glucose.

1.2. Le poisson *Torpinidae*.

C'est l'organe électrique de ce poisson qui nous a servi pour l'étude des nAChRs périphériques.

1.3. Les souris.

Notre étude a porté sur les souris Swiss mâles et femelles pesant 24-34 g. Elles proviennent de notre élevage ou ont été achetées (Centre d'élevage DEPRÈS FRANCE). Elles ont été maintenues au rythme de la lumière naturelle à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Elles avaient libre accès à la nourriture (Rat chow A04) et à l'eau. Les souris ont été maintenues au moins trois jours à l'endroit de l'expérimentation avant la manipulation.

1.4. Les rats.

Nous avons utilisé des rats Sprague Dawley (IFFA-CREDO FRANCE) mâles ou femelles dont le poids est indiqué dans RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX. Les rats ont été maintenus au moins trois jours avant l'expérimentation à la température de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ au rythme de la lumière naturelle. Ils ont reçu de l'eau et de la nourriture standard (A04) "*ad libitum*".

II_ LES SOLVANTS.

Tous les solvants utilisés sont de qualité rigoureusement pure (RP). Ils proviennent de :

Acétone (CARLO ERBA).

Acide chlorhydrique (PROLABO).

Ammoniac (PROLABO).

Azote liquide.

Benzène (SIGMA).

Dichlorométhane (PROLABO).

Ethanol (SIGMA).

Hydrate 3-((3-Cholamidopropyl)-diméthyl-ammonio)-1-propansulfonate (**CHAPS**) (ALDRICH).

Liquide de scintillation INSTA-GEL (PACKARD Camberra Company).

Méthanol (SIGMA).

Urine humaine de non fumeur (Stagiaire).

III_ LES RÉACTIFS.

Acide carboxylique (+/-)-trans-4-cotinine (carboxycotinine) (ALDRICH).

Bis (N,N'-Methylene-bis-acrylamide) (BIO-RAD).

Bleu de bromophénol (MERCK).

Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (ALDRICH).

Ether anesthésique (GIFRER BARBEZAT FRANCE).

Gel Sépharose EAH 4-B (PHARMACIA BIOTECH) (bras espaceur de 10 atomes).

Glycérol (SIGMA CHEMICAL Co.).

Glycine (PROLABO).

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) (ALDRICH).

Hydrochloride N'-(3-Diméthylaminopropyl)-N-éthyl-carbodiimide (EDC) (ALDRICH).

Hydroxyl ammonium (PROLABO).

Persulfate d'ammonium (MERCK).

Propylamine (ALDRICH).

Réactif de dosage des protéines (DC Protein Assay) (BIO-RAD).

Sodium dodécyle sulphate (SDS) (PROLABO).

Acrylamide (99,9%) (BIO-RAD).

IV_ AUTRES.

Adsorbant Bio-Beads SM-2 (BIO-RAD).

Filtres WHATMAN en microfibre de verre de type GF/B de diamètre 25 mm (POLYLABO).

Isopentane (SIGMA).

Ligands : nicotine et nornicotine sont de Sigma. La cotinine et la N-oxide de cotinine ont été synthétisées respectivement selon Bowman et Mc Kennis (1963) et Dagne et Castagnoli (1972).

Marqueurs de masse molaire (Standard de SIGMA).

Membrane de dialyse SPECTRAPOR (Seuil de coupure : 6 000-8 000) (SPECTRUM MEDICAL INDUSTRIES).

Plaques de silice pour CCM ALUGRAM SIL G/UV 254 (MACHEREY-NAGEL).

V_ LES RADIOLIGANDS.

La $[^{125}I]$ cotinine (BEHRING DPC):

Activité spécifique = $3500 \cdot 10^{10} \text{ Bq.g}^{-1}$ (3500 Ci.g^{-1}). Quantité fournie = $5,5 \cdot 10^4 \text{ Bq}$ ($5,5 \mu\text{Ci}$)

lyophilisée. Masse molaire = 458 g.mole^{-1} . Stockage à 4°C 8 semaines maximum. Pureté > 90%.

La $[^{125}I]\alpha$ -bungarotoxine (α -Bgt) (AMERSHAM) :

Activité spécifique = $220 \cdot 10^{10} \text{ Bq.mmole}^{-1}$ ($220 \text{ Ci.mmole}^{-1}$). Quantité fournie = 106 Bq dans 200 μl ($106 \mu\text{Ci}$). Stockage à 4°C dans de la sérum albumine de bovin (BSA) 1 mg.ml^{-1} en présence d'azide de sodium 0,02%. Pureté > 95%.

La $[^3H]$ nicotine (NEN DUPONT DE NEMOURS) :

Activité spécifique = $78,4 \cdot 10^{10} \text{ Bq.mmole}^{-1}$ ($78,4 \text{ Ci.mmole}^{-1}$). Quantité fournie = $2,5 \cdot 10^6 \text{ Bq}$ dans 250 μl ($250 \mu\text{Ci}$). Stockage à -20°C dans l'éthanol absolu. Pureté > 95%.

VI_ L'APPAREILLAGE.

Analyseur d'images (Densitomètre) BIOCROM (version 1.50 b).

Appareil HPLC (Spectra-Physics), équipé d'un distributeur automatique d'échantillon.

Centrifugeuse (BECKMAN Model J2-21 rotor JA-20).

Compteur à scintillation (BECKMAN).

Compteur Gamma Crystal 5400 Series (PACKARD).

Cuve d'électrophorèse (BIO-RAD)

Cuve millipore à 12 trous (MILLIPORE).

Développeur RX XP 505 (3M).

Microtome (tissue TEK II MILES).

Ordinateurs PC (IBM) ou Macintosh (Apple).

Pompe péristaltique (GILSON MEDICAL ELECTRONICS).

Spectromètre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (BRUKER AM 300). Homogénéisateur (BIRKMANN POLYTRON).

Spectrophotomètre (VITATRON).

Spectrophotomètre infrarouge 298 (PERKIN-ELMER).

Ultracentrifugeuse (BECKMAN).

VII_ LES MÉTHODES.

7.1. Synthèse de la cotinine.

La cotinine et la N-oxide cotinine, utilisées dans ce travail, ont été synthétisées et identifiées par des méthodes chimiques et spectrales comme décrit respectivement par Bowman et Mc Kennis (1963) et Dagne et Castangoli (1972).

7.2. Étude de l'activité insecticide chez la mouche à viande.

On se place dans les conditions où sont généralement utilisés les insecticides. Nous avons pulvérisé 1 ml d'eau distillée (H₂O) sur les mouches témoins ou 1 ml d'H₂O contenant une concentration donnée d'un alcaloïde ou d'un mélange d'alcaloïdes, sur les autres.

7.3. Étude de la toxicité chez la souris Swiss.

Nous avons choisi la voie intrapéritonéale (ip.) pour l'injection des alcaloïdes ou leur mélange à la souris Swiss. Les souris ont reçu 10 ml.kg⁻¹ de solution isotonique (NaCl 0,9%) contenant une concentration donnée d'alcaloïde. L'étude s'est déroulée aux mêmes heures (14h-16h). La mortalité a été contrôlée jusqu'à 18 h et le lendemain matin.

7.4. Étude de la biodisponibilité de la cotinine chez le rat Sprague Dawley.

7.4.1. Conditions expérimentales.

Chaque animal ne sert qu'une seule fois pour un temps ou une dose de drogue pour éviter l'accoutumance et le conditionnement.

Chaque traitement est réalisé sur un lot de 5 rats dont trois serviront pour l'extraction de la cotinine et son dosage par HPLC et RIA. Les 2 autres rats serviront pour l'étude autoradiographique.

Les rats ont été traités le matin vers 9-10 h.

Les rats sont endormis par de l'éther anesthésique (GIFRER-BARBEZAT) dans une enceinte saturée .

Le sang est prélevé par canulation de la carotide, recueilli dans des tubes héparinés (VACUTAINER BECTON-DICKINSON) . Les rats sont ensuite sacrifiés par étirement spinal, les cerveaux prélevés, lavés dans une solution isotonique (NaCl 0,9%) et plongés environ 30 secondes

dans de l'isopentane (SIGMA) maintenu à -35°C par de l'azote liquide (Clarke et al., 1985) pour une congélation rapide qui permet d'éviter toute dégradation des tissus au cours de la congélation et la conservation à -20°C (Herkenham et Pert, 1982).

Le même cerveau prélevé sert pour le dosage HPLC, RIA et CCM.

7.4.2. Étude du passage de la cotinine dans le système nerveux central (SNC) chez le rat.

Les voies intra-péritonéale (ip.), sous-cutanée (sc.) et intra-veineuse (iv.) ont été testées.

Trois temps 5; 20 et 60 min ont été testés par voie sc..

Ces essais ont montré que les quantités de cotinine détectables dans le système nerveux central (SNC) sont supérieures par voie sc. et iv. par rapport à la voie ip. et supérieures au temps 20 min par rapport aux temps 5 et 60 min. Les rats ont ensuite reçu trois doses de cotinine 1; 10 et 70 mg.kg^{-1} par voie sc. et ont été sacrifiés au temps 20 min.

7.4.3. Étude de la régulation du passage de la cotinine dans le SNC par le système cholinergique chez le rat.

Les rats ont reçu les drogues et les doses suivantes :

_ cotinine 1; 10 ou 70 mg.kg^{-1} en coadministration avec la nicotine $0,1\text{ mg.kg}^{-1}$.

_ cotinine 70 mg.kg^{-1} en coadministration avec la mécamylamine ou l'hexaméthonium (1 mg.kg^{-1}).

Ces groupes ont été sacrifiés au temps 60 min.

7.4.4. Extraction alcoolique de la cotinine.

Il s'agit d'extraire un composé polaire (la cotinine) d'un liquide physiologique (le plasma) ou d'un organe (le cerveau) en vue d'un dosage quantitatif radioimmunologique (RIA), chromatographique HPLC et une étude qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM). On a donc appliqué la technique d'extraction par le méthanol qui a été rapportée pour l'extraction d'autres alcaloïdes comme la nicotine, la cytosine et la lobéline (Reavill et al., 1990).

- **Mode opératoire** : 1 g de cerveau est décongelé, homogénéisé au broyeur mécanique dans de l'eau distillée (0,5 ml) en présence de 10 µl de 2-phenylimidazole (ALDRICH) comme standard interne. Le volume est ajusté avec du méthanol (SIGMA) à 2,5 ml et agité mécaniquement au vortex. Après une centrifugation de 5 min à 4°C et 4000 rpm, le surnageant est transféré dans un tube à hémolyse. Le culot est lavé deux fois avec 1,25 ml de méthanol. Les surnageants sont transférés dans un tube à hémolyse et le volume final est de 5 ml. Le surnageant final est agité horizontalement au vortex équipé d'un plateau horizontal pendant environ 18 h avant une ultracentrifugation de 10 mn à 4°C et 105 000 g.

Le sang prélevé est centrifugé 10 mn à 4°C et 4000 rpm. 1 ml de plasma obtenu est ajusté à 5 ml avec du méthanol, agité au vortex sur un plateau horizontal pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 min à 4°C et 4000 rpm, le surnageant est évaporé au rota vapeur sous pression réduite à 40°C et repris dans 400 µl d'urine humaine de non-fumeur.

7.4.5. Dosage radioimmunologique (RIA) de la cotinine.

Le principe du dosage est fondé sur la compétition entre la cotinine et la cotinine marquée à l'iode 125 (*[125I]cotinine*) pour les mêmes sites anticorps (Ac1). Après une incubation pendant un temps donné, un second anticorps (Ac2), couplé au polyéthylène-glycol (PEG), permet, après incubation et centrifugation, la séparation de la cotinine fixée et de la cotinine libre. Le culot est séparé du surnageant par aspiration et compté. La concentration de cotinine de l'échantillon est lue par rapport à une courbe d'étalonnage. La radioactivité mesurée est inversement proportionnelle à la concentration de cotinine à doser.

Mode opératoire : la trousse est utilisée conformément aux instructions données par le fournisseur. Etant donné que cette trousse utilise une gamme d'étalonnage préparée dans l'urine, la cotinine extraite du cerveau et du plasma a été reprise dans l'urine de non-fumeur. Cette urine a été contrôlée pour les taux de cotinine naturellement détectés chez les non fumeurs. De plus, des rats témoins, traités de la même manière, ont été inclus dans l'étude et un dosage HPLC a été réalisé chez les mêmes individus. Dans ce dosage HPLC les extraits alcooliques n'ont pas été repris dans l'urine.

La concentration de la gamme d'étalonnage varie de 0 à 15 000 ng.ml⁻¹. On incube 50 µl de standard, échantillon ou contrôle pendant 30 min avec 100 µl de *[125I]cotinine* et 100 µl d'antisérum polyclonal anti-cotinine (Ac1). On ajoute 1 ml de solution de précipitation contenant le second anticorps couplé au PEG (Ac2-PEG). On incube 10 min à température ambiante. Les échantillons sont centrifugés, la radioactivité du culot (*[125I]cotinine-Ac1-Ac2-PEG*) est comptée dans un compteur Gamma.

Caractéristiques de la trousse :

- _ Quantité de $[125I]$ cotinine livrée : 5,5 μ curies (204 Bq) lyophilisée.
- _ Activité spécifique : 3500 Ci.g⁻¹.
- _ Le lyophilisât est repris dans 10 ml d'eau distillée .
- _ Activité au moment du marquage : 100000 cpm dans l'essai .
- _ Maximum de liaison : 40 à 50 % .

7.4.6. Purification préliminaire de l'extrait alcoolique cérébral.

Cette purification a pour but de rompre les liaisons cotinine-protéine gênantes pour la séparation de la cotinine sur couche mince et pour son dosage par HPLC.

Pour séparer les alcaloïdes des autres constituants de l'extrait méthanolique, on les transforme en sels. Les alcaloïdes sont ensuite libérés sous forme de bases libres par l'ammoniac. A l'état de bases libres, ils vont être entraînés par le dichlorométhane.

Mode opératoire : 200 μ l (CCM) ou 4,5 ml (HPLC) de phase alcoolique ont été évaporés au rota vapeur sous pression réduite à 40°C. L'extrait sec est repris dans 0,5 ml d'HCl 5% (PROLABO). On agite pour reprendre la totalité du résidu. Dans une ampoule à décantier, la solution est alcalinisée avec 1 ml d'ammoniac 1 N (PROLABO) jusqu'à l'obtention d'un pH=9. On agite 2 fois le mélange avec à chaque fois 10 ml de dichlorométhane (PROLABO) pour entraîner la totalité des alcaloïdes. L'agitation doit se faire doucement et soigneusement pour éviter l'émulsion. Les phases organiques ont été recueillies par décantation et concentrées au rota vapeur à 40°C sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Les résidus ont été repris dans 10 μ l d'éthanol 95% (SIGMA) pour la CCM ou dans 200 μ l de phase mobile pour l'HPLC.

Les alcaloïdes résistent à une température de 100°C pendant 3 h. Ils ne sont pas détériorés par l'ammoniac. Le dichlorométhane permet de reprendre la majorité des composés polaires, cependant il peut rester des alcaloïdes dans la phase aqueuse. Dans notre étude, les valeurs du dosage RIA permettront de savoir si des pertes significatives ont été subies au cours de cette purification.

7.4.7. Identification de la cotinine par chromatographie sur couche mince.

La chromatographie sur couche mince est une méthode d'analyse rapide fondée sur la séparation des constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile (le solvant) le long d'une phase stationnaire (la plaque). Une migration différentielle des solutés est obtenue par leur partition entre la phase mobile et la phase fixe. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention (affinité du soluté pour la phase fixe) et à une force de mobilité (entraînement par la phase mobile qui dépend de la solubilité de la molécule dans cette phase). Une chromatographie d'adsorption où la phase stationnaire est le gel de silice (gel de silice 0,25 mm avec indicateur de fluorescence) a été utilisée. Le gel de silice est un adsorbant fort avec une forte bipolarité électrique. L'adsorption est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée .

Mode opératoire : sur une plaque de silice on a déposé 5 fois 1 µl des substances à séparer à 2 cm du bord inférieur et 1,5 cm des bords latéraux et avec un espacement de 1 cm entre les dépôts. Après séchage complet des dépôts, on a placé la plaque dans une cuve de développement saturée d'un mélange de solvants appropriés jusqu'à une hauteur de 1 cm environ. Quand le front du solvant a parcouru une distance suffisante, on retire la plaque en prenant soin de marquer le front de migration. On a laissé sécher la plaque à température ambiante.

Identification de la cotinine : on a identifié la cotinine sous lumière ultra violette (UV) à 254 nm par son Rf. Ensuite, on a coloré la plaque par le tétraiodobismuthate de potassium plus connu sous le nom de réactif de Dragendorff qui colore les alcaloïdes en orange.

Le solvant de migration : ce système (200 ml) est constitué de

- _ NH₄OH 10 ml (PROLABO).
- _ Acétone 80 ml (CARLO ERBA).
- _ Benzène 100 ml (SIGMA).
- _ Éthanol (95%) 10 ml (SIGMA).

Dans ces conditions, le Rf de la cotinine est de 0,47 (Stalhandske, 1969). Le réactif de Dragendorff a permis d'identifier la cotinine témoin mais pas celle extraite du cerveau de rat. Cette coloration a un seuil de détection pour la cotinine que nous avons estimé ≥ 50 ng.

7.4.8. Identification et quantification de la cotinine par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

Il s'agit de séparer différents composés par une technique de séparation dynamique. L'HPLC est fondée sur le partage de la molécule entre deux phases non miscibles : le solvant ou phase mobile et la colonne ou phase stationnaire. La phase stationnaire est composée par divers supports de faible granulométrie. La phase mobile est un solvant pur ou un mélange adapté de solvants. L'échantillon à analyser est injecté en tête de colonne où il se dissout dans le liquide vecteur. Les constituants du mélange à analyser sont séparés à la sortie de la colonne et sont détectés par divers procédés (UV, radioactivité, enzymologie ...). L'HPLC a l'avantage d'être en même temps une technique d'analyse qualitative et quantitative. Nous avons utilisé la silice comme phase stationnaire. Le principe de son

fonctionnement est l'adsorption. Elle peut être modifiée par le greffage de groupements fonctionnels hydrophobes en C₁₈. Elle opère selon le mode appelé phase inverse dans lequel les composés les moins polaires sont les plus fortement retenus.

Mode opératoire : nous avons utilisé une phase mobile à pH=6,1 décrite par Hariharan et al., (1988) contenant :

_ Acide citrique	30 mM (Prolabo).
_ Phosphate de potassium dibasique	30 mM (Prolabo).
_ Sodium heptanesulfonate	1 mM (Sigma).
_ Acétonitrile	50 ml.L ⁻¹ (Prolabo).
_ 2-phenylimidazole (standard interne)	1 µg (10 µl de 100 µg.ml ⁻¹)

Nous avons utilisé un détecteur UV à 260 nm et une gamme d'étalonnage constituée de 9 concentrations allant de 1 à 150 ng.ml⁻¹ réalisées dans de l'eau apyrogène. Le dosage RIA nous a permis d'estimer ces concentrations. La colonne est une Hypersil HPLC column (100 x 4,6 mm) BDS C₁₈ 3 µm (SHANDON HPLC). La boucle d'injection est de 20 µl. Le débit de la phase mobile est de 1,5 ml.min⁻¹, le temps d'analyse est de 20 min et la pression de 175 bars. Le débit et la pression n'ont pas été strictement identiques pour tous les échantillons mais, le temps de rétention de la cotinine et son évolution au cours de la journée ont été contrôlés avec précision en début et en fin de manipulation.

7.4.9. Induction de la tolérance chez le rat Sprague Dawley.

Les rats ont été gardés au moins trois jours pour leur adaptation à une température de 20 ± 2°C au rythme de la lumière naturelle et avaient libre accès à la nourriture (A04) et à l'eau.

Les rats ont reçu au total 11 injections intrapéritonéales, 1 injection par jour pendant 3 jours puis 2 injections par jour pendant 4 jours. Les rats ont été sacrifiés par étirement spinal 48 heures après l'arrêt du traitement.

7.4.10. Préparation des membranes de poisson Torpedo.

Après avoir tué le poisson, les organes électriques sont récupérés, coupés en petits morceaux (environ 10 g), puis mis dans de l'azote liquide et enfin au congélateur à -80°C afin de les conserver.

Les membranes de Torpedo ont été homogénéisées dans le tampon phosphate 50 mM à pH 7,4 et filtrées sur une gaze, avant de subir une centrifugation à 10 000 rpm, 20 min puis une ultracentrifugation à 22 000 rpm, 60 min. Les culots membranaires (microsomes) ont été congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

7.4.11. Préparation des membranes de cerveau de rat Sprague Dawley.

Après avoir sacrifié les animaux par dislocation des vertèbres cervicales, les cerveaux ont été prélevés et rincés dans une solution isotonique de NaCl (0,9%) à 4°C. Les cerveaux entiers ou six régions cérébrales, obtenues par dissection grossière de 2 à 3 cerveaux, incluant le cortex, le cervelet, la medulla-oblongata (bulbe), le cerveau moyen (thalamus et hypothalamus), la caudate-putamen et l'hippocampe ont été homogénéisés à 4°C avec un homogénéiseur Polytron (5 fois 20 secondes) dans 10 volumes (g.ml^{-1}) (cas des rats naïfs) ou 20 volumes (cas des rats tolérants) de tampon tris-HCl contenant les constituants suivants (mM) à pH 7,4 : Tris-HCl 50; NaCl 120; KCl 5; CaCl_2 2; MgCl_2 1 et azide de sodium (préservatif) 0,02%. L'homogénat a été centrifugé 10 min à 4°C à 105 000 g. Le culot membranaire a été remis en suspension et incubé dans un volume identique d'eau distillée 1 à 2 heures à 4°C pour enlever toute trace de ligand endogène (Bylund, 1992). Le culot d'une deuxième

centrifugation identique a été réhomogénéisé dans le tampon tris-HCl à 4°C et centrifugé. Le culot final a été remis en suspension dans 10 volumes de tampon. Les membranes ont été stockées par fractions de 1,5 ml à -80°C jusqu'à leur utilisation. Dans ces conditions, les sites de la *[125I]cotinine* sont stables plus d'un an à -20 °C et plus de deux ans à -80 °C.

7.4.12. Dosage des protéines.

Les protéines membranaires ont été dosées par la méthode de Bradford (1976) en utilisant le réactif coloré (bleu de coomassie). Dans ces conditions, la concentration en protéines est comprise entre 2 et 4 mg.ml⁻¹. Les protéines solubilisées ont été précipitées à l'acide trichloroacétique (10%; 18h à 4°C) et dosées par la méthode de Lowry (Microlowry test) à l'aide du réactif coloré (DC Protein Assay BIO-RAD). La sérum albumine bovine a été utilisée pour la courbe d'étalonnage.

7.4.13. Pureté des produits radioactifs.

7.4.13.a. *[125I]cotinine*.

Ce produit radioactif lyophilisé est dissout dans 5 ml d'eau distillée et stocké à 4°C. Sa pureté est déterminée par chromatographie sur colonne de Séphadex G-25 M (PHARMACIA). Le volume mort de la colonne étant de 2,5 ml, nous avons déposé au sommet de cette colonne une solution de 200 µl de *[125I]cotinine* et 2300 µl d'eau distillée. Nous avons récolté des fractions de 500 µl que nous avons compté (Compteur Gamma, PACKARD).

Tous les résultats présentés ont été obtenus avec un radioligand dont la pureté est supérieure à 90%. La purification de ce radioligand (si nécessaire) a été développée au cours de ce travail. Dans ce cas, nous avons utilisé une colonne de silice et une élution par un gradient discontinu de méthanol-chloroforme allant de 0 à 10% de méthanol.

7.4.13.b. [125I]alpha-bungarotoxine (alpha-Bgt).

La [125I]alpha-Bgt est conservée à 4°C diluée dans la BSA 0,1% et l'azide de sodium 0,02% à une concentration finale inférieure à 80 nM. Sa pureté est déterminée également par chromatographie sur colonne de Séphadex G-25 M. Sa pureté est supérieure à 90%. La purification de la [125I]α-Bgt (si nécessaire) a été réalisée par cette même colonne.

7.4.13.c. [3H]nicotine.

La [3H]nicotine est stockée à -20°C dans l'éthanol (100%) à une concentration inférieure à 200 nM. Sa pureté a été estimée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur plaque de silice en utilisant un mélange de solvants : chloroforme-méthanol-ammonium hydroxyde (9-1-0.1) comme éluant. Après avoir saturé la cuve avec ce mélange, nous avons préparé la plaque CCM. Sur cette plaque, nous avons effectué un dépôt de 5 µl de nicotine froide, servant de contrôle, et un dépôt voisin de 5 µl de nicotine froide et 5 µl de [3H]nicotine. Après avoir séché ces dépôts au sèche-cheveux, nous avons introduit la plaque CCM dans la cuve où se fera la migration. La migration terminée (30-60 min), nous avons marqué le front de migration du solvant, nous avons séché la plaque et visualisé les tâches au fluorimètre à 250 µm. Nous avons entouré au crayon les tâches obtenues pour la mesure de la distance de migration de chaque dépôt. Ces mesures faites, nous avons calculé le Rf qui est le rapport de la distance de migration du dépôt sur la distance de migration du solvant. La nicotine, dans ce système a un Rf de $0,7 \pm 0,1$. Nous avons découpé la plaque CCM en portions identiques. Chaque portion a été comptée dans un pot à scintillation de 5 ml en présence de 4 ml de liquide à scintillation INSTA-GEL. Après comptage, le pureté a été estimée par le rapport de la radioactivité (en cpm) de la tâche de la nicotine sur la somme de la radioactivité de la plaque. L'estimation donne une pureté supérieure à 87% après un an de stockage.

7.4.14. Interaction de la cotinine avec les sites de la $[125I]\alpha$ -Bgt et de la $[3H]$ nicotine.

En général pour les deux radioligands, les essais de compétition ont été réalisés en triplicata et les essais de saturation en quadruplicata pour la liaison totale (en absence d'inhibiteur) et en duplicata pour la liaison non spécifique (en présence d'inhibiteur). Le volume d'incubation était de 100 μ l à l'exception des expériences de saturation des sites de la $[3H]$ nicotine où il est de 500 μ l. Les filtres et la radioactivité totale ont été comptés directement dans les tubes à hémolyse pour la $[125I]\alpha$ -Bgt (Compteur Gamma, PACKARD) ou dans 3 ml de liquide de scintillation (INSTA-GEL) pour la $[3H]$ nicotine (Compteur à Scintillation, BECKMAN).

7.4.14.a. $[125I]\alpha$ -Bungarotoxine.

L'incubation se fait à 37°C pendant 2-3 h (Marks et Collins, 1982). La concentration en protéines est de 0,5 mg.ml⁻¹ en présence de BSA 1 mg.ml⁻¹. La concentration du radioligand est fixe, 1-4 nM, dans les expériences de compétition et varie de 0,1 à 10 nM dans les expériences de saturation. La nicotine mM permet de déterminer la liaison non spécifique. L'incubation a été arrêtée par filtration sous vide et 4 lavages par 5 ml de tampon tris-HCl froid. Les filtres ont été préalablement trempés dans une solution de polyéthylèneimine 0,5 % pour réduire la liaison non spécifique sur les filtres.

7.4.14.b. $[3H]$ nicotine.

L'incubation se fait à 4°C pendant 90 min (Anderson et Arneric, 1994). La concentration en protéines est de 0,6 mg.ml⁻¹, la concentration du radioligand est constante, 5-10 nM dans les expériences de compétition, et varie de 0,1 à 50 nM dans les expériences de saturation. La liaison non spécifique a été déterminée en utilisant la nicotine 10 μ M. L'incubation est arrêtée par filtration sous vide et 3 lavages par 5 ml de tampon tris-HCl froid. Les filtres sont préalablement trempés dans une solution de polyéthylèneimine 0,1 % pour réduire la liaison non spécifique sur les filtres.

7.4.15. Identification des sites de liaison de la [125I]cotine.

Toutes les expériences de cinétique et de compétition ont été réalisées en triplicata dans un volume de 100 µl à une concentration fixe du radioligand 67 pM et de protéines 1 mg.ml⁻¹. L'incubation a été réalisée dans un tube à hémolyse à 4°C ou à température ambiante (RT).

Toutes les expériences de saturation ont été réalisées en quadruplicata dans un volume de 250 µl, la concentration du radioligand varie de 10 à 600 pM. La concentration en protéines est de 0,25-5 mg.ml⁻¹.

La radioactivité a été comptée directement dans des tubes à hémolyse (Compteur Gamma PACKARD). Les incubations ont été arrêtées par filtration sous vide et 3 lavages par 5 ml de tampon tris-HCl froid. Les filtres en fibre de verre de type GF/B ont été trempés dans le même tampon. Généralement, une concentration 1 à 10 mM de l'inhibiteur a été testée. Les inhibiteurs sélectionnés ont été utilisés à des concentrations plus faibles pour définir la concentration inhibant 50% de la liaison du radioligand (IC₅₀) (Cheng et Prussof, 1973).

7.4.16. Études autoradiographiques

7.4.16.a. Conditionnement des cerveaux.

Les rats sont sacrifiés par étirement spinal (rats naïfs et rats tolérants) ou anesthésiés par du chloroforme (voir étude de la biodisponibilité de la cotinine chez le rat). Les cerveaux ont été prélevés rapidement et lavés dans une solution isotonique (NaCl 0,9%) à 4°C, puis plongés dans de l'isopentane maintenu à -35°C par de l'azote liquide (Herkenham et Pert, 1982). Des coupes rostro-caudales ou sagittales ont été obtenues au cryostat (tissue TEK II MILES) thermostaté à -15°C. Les coupes ont été montées sur des lames gélatinées. Les lames ont été gélatinées par 3 trempages dans 500 ml d'eau contenant 5 g de gélatine et 0,25 g de chrome d'alun à 50°C et séchées à l'air une nuit. Les coupes ont

été placées une nuit au dessiccateur à 4°C et peuvent être stockées à -80°C, dans un dessiccateur, pendant plus de 24 heures (Clarke et Pert, 1984; Clarke et al., 1985).

7.4.16.b. Préincubation.

Cette étape est nécessaire pour la $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ mais n'est pas nécessaire pour la $[3H]\text{nicotine}$ (Clarke et al., 1985) et la $[125I]\text{cotinine}$. Les coupes sont préincubées 30 min à température ambiante avec de la BSA 1 mg.ml^{-1} en absence (liaison totale) ou en présence de nicotine 1 mM (liaison non spécifique) ou cotinine 1 mM ou 1 μM .

7.4.16.c. Incubation.

Les coupes sont incubées 2 h avec la $[125I]\alpha\text{-Bgt}$, 20 min avec la $[3H]\text{nicotine}$ à température ambiante ou 60 min à 4°C avec la $[125I]\text{cotinine}$, en présence (liaison non spécifique LNS) ou non (liaison totale, LT) de l'inhibiteur pour la définition de la LNS. La différence entre la LT et la LNS permet d'obtenir la liaison spécifique du radioligand. La LNS a été définie en présence de nicotine mM ($[125I]\alpha\text{-Bgt}$) ou 10 μM ($[3H]\text{nicotine}$) (Clarke et al., 1985). Pour la $[125I]\text{cotinine}$, la LNS est déterminée avec la nicotine ou la cotinine mM.

7.4.16.d. Arrêt de l'incubation.

Les coupes ont été lavées 4 fois pendant 30 s ($[3H]\text{nicotine}$ et $[125I]\text{cotinine}$) ou 6 fois pendant 30 min ($[125I]\alpha\text{-Bgt}$) dans 500 ml de tampon tris-HCl 50 mM ($[125I]\alpha\text{Bgt}$) ou 500 ml de tampon tris-HCl contenant du CaCl_2 5 mM ($[3H]\text{nicotine}$ et $[125I]\text{cotinine}$), séchées sous un filet d'air frais, puis stockées 24 heures dans un dessiccateur, afin d'éliminer toute trace d'humidité sur les coupes.

7.4.16.e. Exposition et développement.

Les coupes sont alors placées (pour obtenir des images) ou non (pour quantification rapide) sous film autoradiographique (X-OMAT AR, KODAK) en présence d'étalons radioactifs (microscales, AMERSHAM) et exposées dans des cassettes à rayons X (KODAK) pendant 12-14 semaines à -80°C (*[3H]nicotine*) ou 2-5 semaines à température ambiante (*[125I]α-Bgt* et *[125I]cotinine*). Les films sont alors développés automatiquement dans un développeur RX-XP 505 (3M) ou manuellement (Clarke et al., 1985).

7.4.16.f. Quantification.

Les autoradiogrammes ainsi obtenus sont alors quantifiés par densitométrie, grâce aux étalons et un analyseur d'images BIOCOM (version 1.50 b).

Lorsque les coupes sont destinées à la quantification rapide, elles sont grattées et récupérées dans des tubes à hémolyse (*[125I]cotinine* et *[125I]α-Bgt*) ou dans des flacons à scintillation (*[3H]nicotine*) et comptées (Clarke et al., 1985).

7.4.17. Purification des sites de la cotinine

7.4.17.a. Solubilisation des sites de la *[125I]cotinine*.

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C. Les cerveaux de 5 rats mâles (sacrifiés par étirement spinal) sont prélevés rapidement, lavés dans du NaCl 0,9%, puis homogénéisés dans 10 ml.g⁻¹ de cerveau dans le tampon Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) . L'homogénat est centrifugé à 45 000 g pendant 10 min et le culot est soumis à la même opération. Le culot final est mis à incuber 90 min sous agitation dans 100 ml de

tampon tris 50 mM, PMSF 1 mM, EGTA 1 mM, CHAPS 10 mM. Une dernière centrifugation de 30 min à 40 000 g est réalisée et le surnageant final est récupéré.

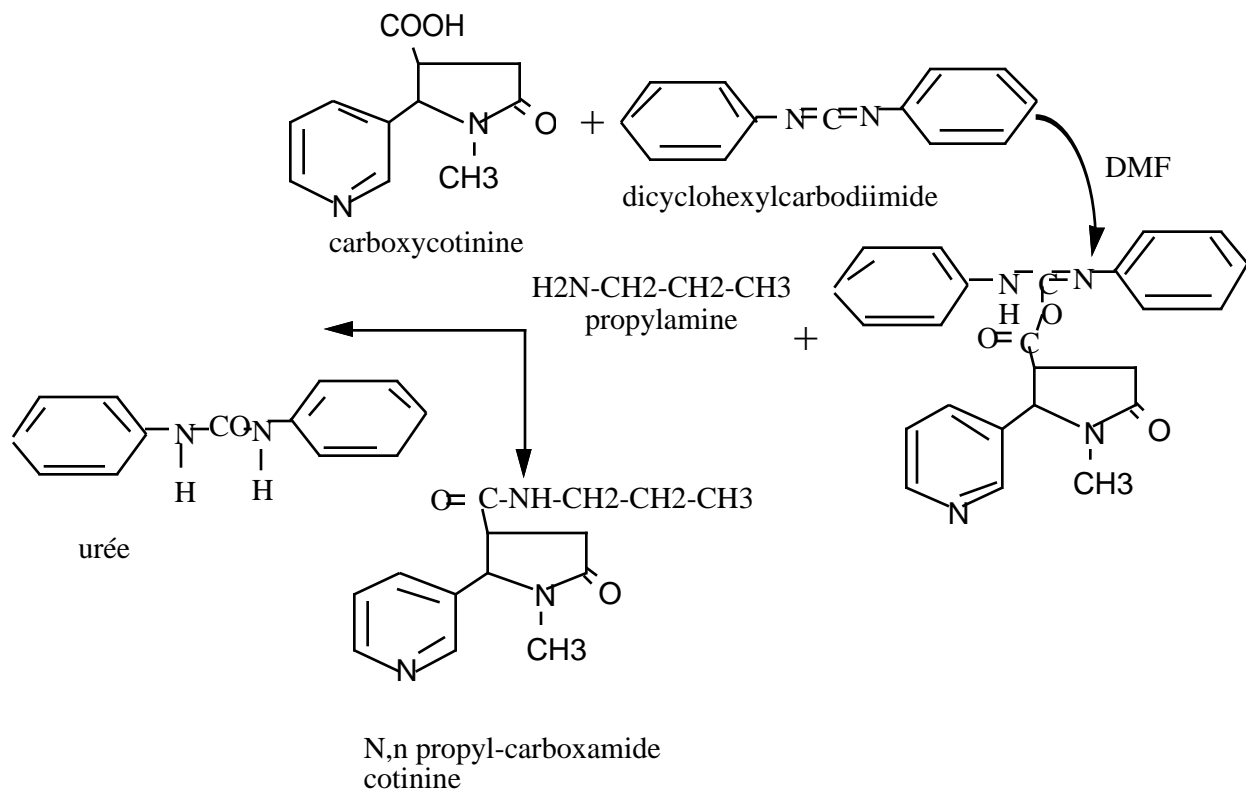
7.4.17.b. Enlèvement du CHAPS par l'adsorbant Bio-Beads SM-2.

La concentration de CHAPS 10 mM est supérieure à la concentration micellaire critique (CMC). Le détergent a été enlevé par adsorption sur des billes de Bio-Beads suivant le protocole de Holloway (1973). Les billes sont mises en solution avec le tampon Tris-HCl pH=7,4, sous agitation et dégazées. On décante l'excès de solvant, et on ajoute 20 g de billes mouillées aux 100 ml de protéines solubilisées. On laisse incuber sous agitation à 4°C pendant une nuit. La solution de protéines est récupérée par filtration.

7.4.17.c. Synthèse de la N,n-propyl carboxamide cotinine.

7.4.17.d. Protocole de synthèse.

La carboxycotinine 2,3 mmole, la propylamine 3,4 mmole et 1,3 dicyclohexylcarbodiimide 2,5 mmole sont incubés dans 20 ml diméthylformamide à température ambiante pendant 4 heures sous agitation dans un ballon fermé. Le précipité est filtré sur filtre Wathman (GF/B). Plusieurs précipitations avec des solvants organiques (chloroforme, éther...) ont été réalisées.

Réaction de synthèse :**7.4.17.e. Vérification du produit de synthèse.**

L'analyse CCM (plaque de silice; méthanol/chloroforme 10%-90%) a montré 2 produits de synthèse majoritaires (Rf 1=0,59 et Rf 2=0,71), un 3^{ème} produit, en très faible quantité, (Rf 3=0,91) et la carboxycotinine (Rf=0,15). Une colonne de silice a été utilisée pour séparer ces 4 produits sur un gradient discontinu de méthanol/chloroforme allant de 0% à 10% méthanol. La structure de la N,n-propyl-carboxamide cotinine (supposée être le produit de Rf 2=0,71) a été obtenue par IR (avec le Nujol), et RMN du ¹H et ¹³C (avec du chloroforme deutéré CDCl₃).

7.4.17.f. Utilisation de la carboxycotinine pour la préparation de la colonne d'affinité.

Schéma de synthèse:

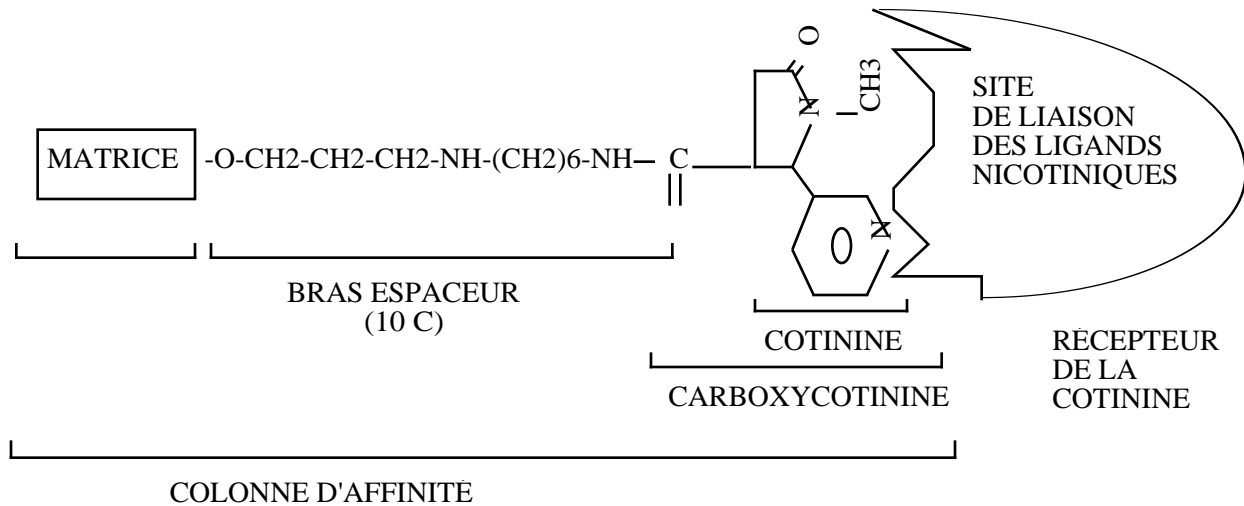


Schéma de la colonne d'affinité synthétisée et site de liaison probable des ligands nicotinniques et de la cotinine.

Protocole de synthèse.

A partir de 15 ml de gel EAH Sépharose 4B lavé par 80 ml de NaCl 0,5 M par ml de gel, on fait le couplage entre la carboxycotinine en excès (20 fois la concentration du bras espaceur) et le gel. La carbodiimide (0,1 M) permet la formation de liaison amide entre la fonction carboxylique du ligand et la fonction amine portée par le bras espaceur du gel. La réaction a été faite pendant 24 heures sous agitation, à température ambiante. L'excès de ligand est éliminé par trois lavages successifs en alternant 100 ml de tampon acétate 100 mM; NaCl 500 mM (pH 4) et du tampon tris-HCl 100 mM; NaCl 500 mM (pH 8,3) (PHARMACIA).

Le gel est alors dégazé et placé dans la colonne puis tassé avec un flux de 0,6 ml.min⁻¹ en évitant la formation de bulles d'air. Il est conservé à 4°C dans l'éthanol (20%).

7.4.17.g. Purification par chromatographie d'affinité.

Premier tour de colonne.

Les protéines solubilisées (100 ml) sont concentrées dix fois par dialyse de flux dans des membranes de dialyse ou "boudins" (SPECTRAPOR seuil de coupure : 6 000-8 000). 1,6 ml du matériel concentré (20 mg protéines) est déposé sur la colonne et élué par 10 fois 5 ml de tampon Tris-HCl 50 mM CHAPS 1mM (pH 7,5) (Fractions de 1 à 10), 10 fois 5 ml de même tampon contenant de la cotinine 1mM (Fractions de 11 à 20), 10 fois 5 ml de même tampon contenant 0,2 M NaCl (Fractions de 21 à 30). La colonne est ensuite lavée par 100 ml de tampon d'éluion. La colonne est régénérée par 3 lavages alternatifs par les deux tampons à haut et à bas pH utilisés lors de la synthèse de la colonne (tampon acétate et tris-HCl). Finalement le gel est rééquilibré dans le tampon d'éluion et conservé à 4°C en présence d'éthanol (20%) (PHARMACIA).

Les fractions de 5 ml sont recueillies avec un flux de 0,4 ml.min⁻¹ (67% flux du tassement) à l'aide d'une pompe péristaltique (GILSON). On mesure la concentration en protéines de chaque fraction par la méthode de Lowry (Microlowry test), sensible pour de faibles concentrations en protéines. La gamme étalon est réalisée avec de la sérum albumine bovine (SAB).

Les protéines des fractions 11 à 20 obtenues lors du premier tour de colonne sont d'abord précipitées pour pouvoir être dosées. 2 ml de chaque fraction sont précipités par incubation avec de l'acide trichloro-acétique (TCA) 10% pendant 48 h , puis centrifugés à 15 000 g (toutes les étapes sont faites à 4°C). Après 3 lavages du culot avec de l'éther-éthanol (1-2 v/v) et aspiration, le culot est repris dans 200 µl de tampon tris-HCl 50 mM; CHAPS 1mM; pH=7,5.

Deuxième tour de colonne.

5 passages par la colonne d'affinité (premier tour) ont été réalisés. Les fractions 11 à 20, de 4 de ces 5 passages ont été concentrées par dialyse de flux à 4°C et dialysées contre 5 litres d'eau distillée

(12 heures) (4 changements). Le matériel est ensuite lyophilisé et repris dans 2 ml de tampon d'éluion. 1,6 ml ont été repassés par colonne (deuxième tour) et ont subi les mêmes opérations décrites lors du premier tour. Les fractions 11 à 20, éluées par la cotinine 1 mM au second tour, ont été concentrées, dialysées, lyophilisées et stockées à -20°C jusqu'à l'analyse SDS-PAGE.

7.4.18. Analyse SDS-PAGE

Le matériel lyophilisé des protéines du deuxième tour ainsi que les protéines de départ et du premier tour ont été analysés par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) selon Laemli et Favre (1973). Les échantillons sont préparés dans le tampon de dépôt (80 mM Tris-HCl , pH=6,8 ; 10% glycérol; 0,02% Bleu de bromophénol; 2% SDS) et soumis à électrophorèse dans un gel de polyacrylamide à 12% (25 V 30 minutes et 30 V 2 h 30 min). Après migration , le gel est coloré par le bleu de Coomassie ou par le nitrate d'argent.

7.4.19. Analyse des données

Les données de la toxicité chez l'insecte et chez la souris ont été exprimées en fraction survivante. Chez les insectes, le logarithme de la fraction survivante a été utilisé pour la linéarisation (Steel et Peckham 1979). Les données ont été analysées par deux méthodes :

7.4.19.a. Méthode de Wadley (1945).

* Phase préliminaire

Elle consiste en l'établissement des courbes dose-effet des produits à étudier. On considère deux produits Pa et Pb pour lesquels on a tracé les courbes dose-effet. On calcule ensuite l'activité (insecticide) relative (A.I.R) par la formule:

$$\text{A.I.R} = (\text{DL}_{50}\text{Pa}/\text{DL}_{50}\text{Pb} + \text{DL}_{90}\text{Pa}/\text{DL}_{90}\text{Pb})/2.$$

* Mise en évidence de la synergie

On fait plusieurs mélanges de Pa et Pb qui diffèrent par les concentrations utilisées. On va convertir la doses de Pb en doses de Pa par le calcul suivant $\boxed{\text{dose Pa} = \text{dose Pb} \times \text{A.I.R}}$

Ainsi on peut calculer la dose totale de Pa dans le mélange .

Dès lors on peut calculer le pourcentage de mortalité théorique du mélange. Ceci suggère que l'effet est dû à la simple somme des deux produits Pa et Pb. Par l'expérimentation, si la mortalité engendrée par le mélange est supérieure à la mortalité théorique, on peut conclure qu'il y a synergie (interaction supra-additive) dans l'effet des Pa et Pb. Si la mortalité expérimentale n'est pas différente de la mortalité théorique, on dit qu'il y a additivité dans l'effet des Pa et Pb (pas de synergie). Si la mortalité expérimentale est inférieure à la mortalité théorique, on dit qu'il y a interaction antagoniste dans l'effet des Pa et Pb.

7.4.19.b. Méthode de Steel et Peckham (1979).

Il est très difficile d'additionner de façon simple deux effets (exemple les rayons de deux sphères ne s'additionnent pas de façon simple). De plus, cette méthode n'intègre dans son analyse que les doses actives des produits.

* Si les courbes dose-effet sont linéaires on obtient un isobogramme linéaire (**Figure** gauche ci-dessous).

* Si les courbes dose-effet ne sont pas linéaires, le calcul du mode I et du mode II permet de tracer une enveloppe dite d'additivité (**Figure** droite ci-dessous).

Un mélange qui donne un effet à droite de cette ligne indiquerait une sub-additivité (antagonisme), à gauche de cette ligne indiquerait une supra-additivité (synergie). Le mélange qui donne un point sur la ligne d'additivité indiquerait un effet additif des produits Pa et Pb.

Mode II : à la dose de Pa correspond un certain effet. À cet effet correspond une dose équivalente de Pb. Cette dose équivalente de Pb doit être augmentée pour avoir l'effet maximal. Le mode II fait correspondre à chaque dose de Pa une augmentation de dose de Pb. Avec ces deux tracés (Mode I et II) on obtient l'enveloppe d'additivité.

Les mélanges dont l'effet se situe dans l'enveloppe de la zone d'additivité agissent de manière additive. La zone qui se situe à gauche de cette enveloppe correspond à la zone de la supra-additivité (ou synergisme). La zone se situant à droite de cette enveloppe correspond à la zone de la sub-additivité (antagonisme ou inhibition). Au delà de ces limites on est dans la zone de protection.

7.4.19.c. Toutes les autres données obtenues dans ce travail ont été ajustées (si nécessaire) par itération grâce à un programme de régression non linéaire Enzfitter (Leatherbarrow, 1987) comparable au programme Ligand de Munson et Rodbard (1980).

Dans les cas d'un modèle apparent à un site, les IC₅₀ ont été estimés graphiquement (Cheng et Prussof, 1973). Les données de compétition ont été, parfois, transformées en saturation et les constantes de dissociation, (K_d) ont été estimées par itération. Dans cette transformation, le lié (B) = inhibition (en % ou en fmole.mg⁻¹ protéine) et le libre (F) = concentration de l'inhibiteur (Bylund, 1986).

7.4.19.d. Méthode de SWILLENS (1992) : cette méthode permet une détermination directe de la concentration totale en récepteurs (B_{max}) à partir d'une courbe d'inhibition compétitive (homologue) par :

$$\boxed{B_{max} = IC_{50} B_{s,o} / L} \text{ avec } B_{s,o} = B_{t,o} - \alpha L \text{ où } B_{t,o} \text{ est la liaison totale, } \alpha \text{ le taux de liaison non}$$

spécifique et L la concentration du radioligand.

7.4.20. Statistiques

Les données de la toxicité ont été testées par la loi normale (si np et $n(p-1) \geq 5$) ou directement comparées par la **Table** de Mainland, Herrera et Sutcliffe (si np ou $n(p-1) < 5$) (Schwartz, 1994). n est égal au nombre de mouches et p à la fraction survivante.

Les résultats sur la biodisponibilité de la cotinine ont été comparé par le test de Student après une analyse de variance (ANOVA) à une ou à deux voies.

Dans les études de liaison des radioligands (compétition et saturation), le test de Student a été utilisé pour tester la signification du modèle un site ou deux sites. Le t de Student est égal au rapport du χ_{i2} un site sur le χ_{i2} deux sites.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Chapitre I : Nature de l'interaction de la nicotine avec ses métabolites chez la mouche

La nicotine est un puissant insecticide de contact. Elle est directement absorbée par la cuticule, mais son utilisation en tant qu'insecticide a été abandonnée à cause de sa toxicité pour les animaux supérieurs. La nicotine est vite métabolisée en plusieurs dérivés dont la cotinine (70% du pool des métabolites) est le produit de l'oxydation et la nor nicotine (<5%) est le produit de la déméthylation (Bowman et Mc Kennis, 1963; Bowman et al., 1964). La cotinine a été rapportée agir en synergie avec la nicotine dans l'activité insecticide chez *Lucilia caesar* (*L. c.*) (Bruniquel et al., 1992a). *In vivo*, la cotinine est à son tour métabolisée en plusieurs dérivés dont la N-oxyde de cotinine (Bowman et Mc Kennis, 1963). Cette dernière pourrait avoir contribué aux activités insecticides et synergiques de la cotinine qui ont été rapportées par Bruniquel et al., (1992a). La présente étude voudrait : i) vérifier cette dernière hypothèse, ii) comparer l'activité insecticide des dérivés de la nicotine chez *L. c.* et *Calliphora vomitoria* (*C. v.*) et iii) étudier la nature de l'interaction de la nicotine avec ses dérivés dans cette activité. Pour ce faire, nous avons comparé l'effet expérimental et l'effet théorique des mélanges de nicotine et de ses dérivés prédit par deux méthodes d'analyse. La méthode de Wadley (1945) consiste à traduire la dose du métabolite en dose équivalente de nicotine grâce au facteur activité relative c'est-à-dire $(DL_{50} \text{ nicotine} / DL_{50} \text{ dérivé} + DL_{90} \text{ nicotine} / DL_{90} \text{ dérivé}) / 2$. Cette méthode ne tient pas compte de l'aspect de la courbe dose- effet. Steel et Peckham (1979) ont suggéré qu'une simple addition des effets n'a pas toujours un sens et que l'aspect de la courbe dose-effet doit être pris en compte. Ils ont proposé une méthode d'analyse qui localise l'effet d'un mélange dans le diagramme de l'isoeffet ou isobologramme. De plus leur méthode propose une interprétation mécanistique de l'interaction des composés du mélange. À cet égard, la nicotine est connue pour ses actions sur les récepteurs

nicotiques (nAChRs), alors que les sites d'action de ses dérivés ne sont pas encore connus. La cotinine a une faible affinité pour les sites des nAChRs périphériques de *Torpedo marmorata* (Bruniquel et al., 1992b) et son affinité pour les nAChRs centraux est encore débattue (Sloan et al., 1984; Anderson et Arneric, 1994). Les insectes ont la particularité d'utiliser majoritairement l'acétylcholine comme neurotransmetteur et le nAChR dans le système nerveux central (SNC) (le glutamate est utilisé à la périphérie) alors que pour les vertébrés c'est l'inverse (Gundelfinger et Hess, 1992). La présente étude est une investigation des mécanismes d'action de la nicotine et de ses dérivés chez l'insecte.

Matériels et Méthodes.

On pulvérise 1 ml d'eau distillée (le contrôle) ou 1 ml d'eau distillée contenant les doses désirées de l'alcaloïde (l'effet) sur les mouches *Lucilia caesar L. c.* ou *Calliphora vomitoria C. v.*. La mortalité est présentée en logarithme décimal de la fraction survivante pour la linéarisation. Seules les expériences où la survie du contrôle est de 100% ont été utilisées.

Résultats.

Pour évaluer l'activité insecticide de la nicotine et de ses dérivés, les courbes dose-effet ont été établies. La **Figure 17** montre la survie des mouches *L.c.* (**Figure 17a**) et *C. v* (**Figure 17b**) à des concentrations croissantes de nicotine ou de cotinine (**Figure 17c**).

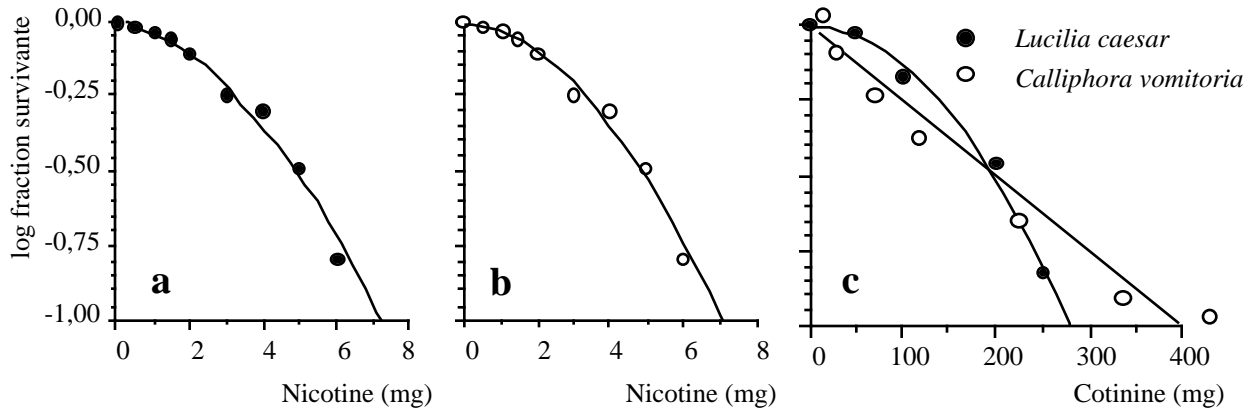


Figure 17 : *Activité insecticide de la nicotine et de la cotinine chez les mouches C. v. et L. c.*

La mortalité a été recensée 48 h après la pulvérisation. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes avec un coefficient de variation inférieur à 7%.

Les courbes sont des polynômes de second degré (coefficient de détermination supérieur 0,99) sauf celle de la cotinine chez C. v.

Les déterminations des doses létales 50% et 90% (DL_{50} et DL_{90}) de la nicotine, la cotinine, la nornicotine et la N-oxyde de cotinine sont résumées dans le **Tableau 9**.

Tableau 9 : Comparaison de l'activité insecticide de la nicotine et de ses métabolites.

Les valeurs de la DL_{50} et de la DL_{90} ont été calculées à partir des courbes dose-effet après itération par le programme Enzfitter. L'activité insecticide relative (A.I.R.) a été calculée par la méthode de Wadley ($A.I.R. = (DL_{50} \text{ nicotine} / DL_{50} \text{ dérivé} + DL_{90} \text{ nicotine} / DL_{90} \text{ dérivé}) / 2$). Les valeurs de A.I.R. sont exprimées en % par rapport à l'activité de la nicotine à l'exception de A.I.R. de la N-oxyde de cotinine qui a été calculée par rapport à la nicotine (valeurs de gauche) et par rapport à la cotinine (valeurs de droite). Toutes les valeurs sont en mg.

produit	C. v.		L. c.		A.I.R.(%)	
	DL_{50}	DL_{90}	DL_{50}	DL_{90}	C. v	L. c.
nicotine	3,9	7,3	3,9	7,3	100	100
cotinine	125	400	160	280	2	3
nornicotine	5,8	9,2	6,6	10,5	73	64
N-oxyde de cotinine	2550	4550	880	1650	0,2-70,4-18	

Pour évaluer la nature de l'interaction de la nicotine avec ses dérivés, nous avons pulvérisé des mélanges de nicotine et de ses dérivés sur les mouches C. v. et L. c. (**Tableau 10**).

Tableau 10 : Analyse de la nature de l'interaction de la nicotine avec ses dérivés par la méthode de Wadley (1945).

	contenu en nicotine		mortalité	
mélanges d'alcaloïdes	=dose nicotine+ dose dérivé x R. I. A.		<i>L. c.</i>	
	<i>L. c.</i>	<i>C. v.</i>	théorique.....	expérimentale
			théorique...	expérimentale
<u>nicotine+cotinine</u>				
(1)=0,5+5***	0,65.....	0,6	5.....	0
(2)=0,75+10	0,95.....	1,05	8.....	14
(3)=2+33	2,66.....	2,99	31.....	89 ^b
(4)=4+33	4,66.....	4,99	64.....	100 ^b
<u>nicotine+nornicotin</u>				
e	2,92.....	3,92	35.....	10 ^b
(5)=1+3	3,28.....	NT	41.....	47
(6)=2+2				
<u>nicotine+N-oxyde de cotinine</u>				
(7)=0,5+50**	0,7.....	0,6	6.....	17
<u>cotinine+N-oxyde de cotinine</u>				
(8)=5+50**	0,4.....	0,2	4.....	24 ^b
<u>nicotine+cotinine+N-oxyde de cotinine</u>				
(9)=(7)+(8)**	0,9.....	0,7	7.....	55 ^{hs}

Probabilité : a et * $P < 0,05$; b et ** $P < 0,01$; c et *** $P < 0,001$; hs, hautement significatif.

a; b; c et hs comparaison des valeurs théoriques et expérimentales. *, **, ***, comparaison des valeurs expérimentales de *L. c.* et *C. v.*.

Les mélanges de nicotine et de cotinine donnent des mortalités identiques (mélanges 1 et 2

Tableau 10) chez *L. c.* ou supérieures (mélanges 1 à 4 chez *C. v.* et mélanges 3 et 4 chez *L. c.*

Tableau 10) à celles déterminées théoriquement. Les mélanges de nicotine et de nornicotine donnent des mortalités inférieures (mélange 5 **Tableau 10)** ou identiques (mélange 6 **Tableau 10)** à celles déterminées théoriquement. Les mélanges de nicotine et de N-oxyde de cotinine donnent des mortalités identiques à celles déterminées théoriquement (mélange 7 **Tableau 10)**. Les mélanges de cotinine et de N-oxyde de cotinine (mélange 8 **Tableau 10)** donnent des mortalités identiques (chez *C. v.*) ou supérieures (chez *L. c.*) à celles déterminées théoriquement. Les mélanges de nicotine, de cotinine et de N-oxyde de cotinine (mélange 9 **Tableau 10)** donnent des mortalités supérieures à celles déterminées théoriquement. Ces résultats suggèrent un antagonisme entre la nicotine et la nornicotine quand le rapport nornicotine/nicotine est supérieur à 1 et une interaction additive quand le rapport est égal à 1. Ils suggèrent une interaction supra-additive entre la nicotine et la cotinine, exception faite pour les mélanges 1 et 2 chez *L. c.*, et un effet additif entre la nicotine et la N-oxyde de cotinine. Cette dernière, montre une interaction supra-additive avec la cotinine chez *L. c.* et un effet additif chez *C. v.*. Enfin, la nicotine, la cotinine et la N-oxyde de cotinine montrent des interactions supra-additives chez les deux espèces de mouches. Cependant, l'effet du mélange 9 est égal à la somme des effets des mélanges 7 et 8 chez *L. c.* ou est supérieur chez *C. v.* (**Tableau 10)**. Ainsi, même si la N-oxyde de cotinine est un synergiste potentiel de la cotinine chez *L. c.* et du mélange de nicotine et de cotinine chez *C. v.*, ce dérivé de la cotinine ne contribue pas aux activités insecticides et synergiques de cette dernière évaluées dans ce travail. En effet, *in vivo*, la dose 33 mg de cotinine utilisée dans les mélanges 3 et 4 (**Tableau 10)** ne peut générer une dose significative de cotinine N-oxyde.

Pour étayer l'hypothèse d'une interaction supra-additive entre la nicotine et la cotinine, les effets des mélanges de nicotine et de cotinine produisant 80% (mélange 3 **Tableau 10)** et 100% (mélange 4 **Tableau 10)** de l'activité insecticide ont été analysés par la méthode de Steel et Peckham (1979) (**Figure 18)**.

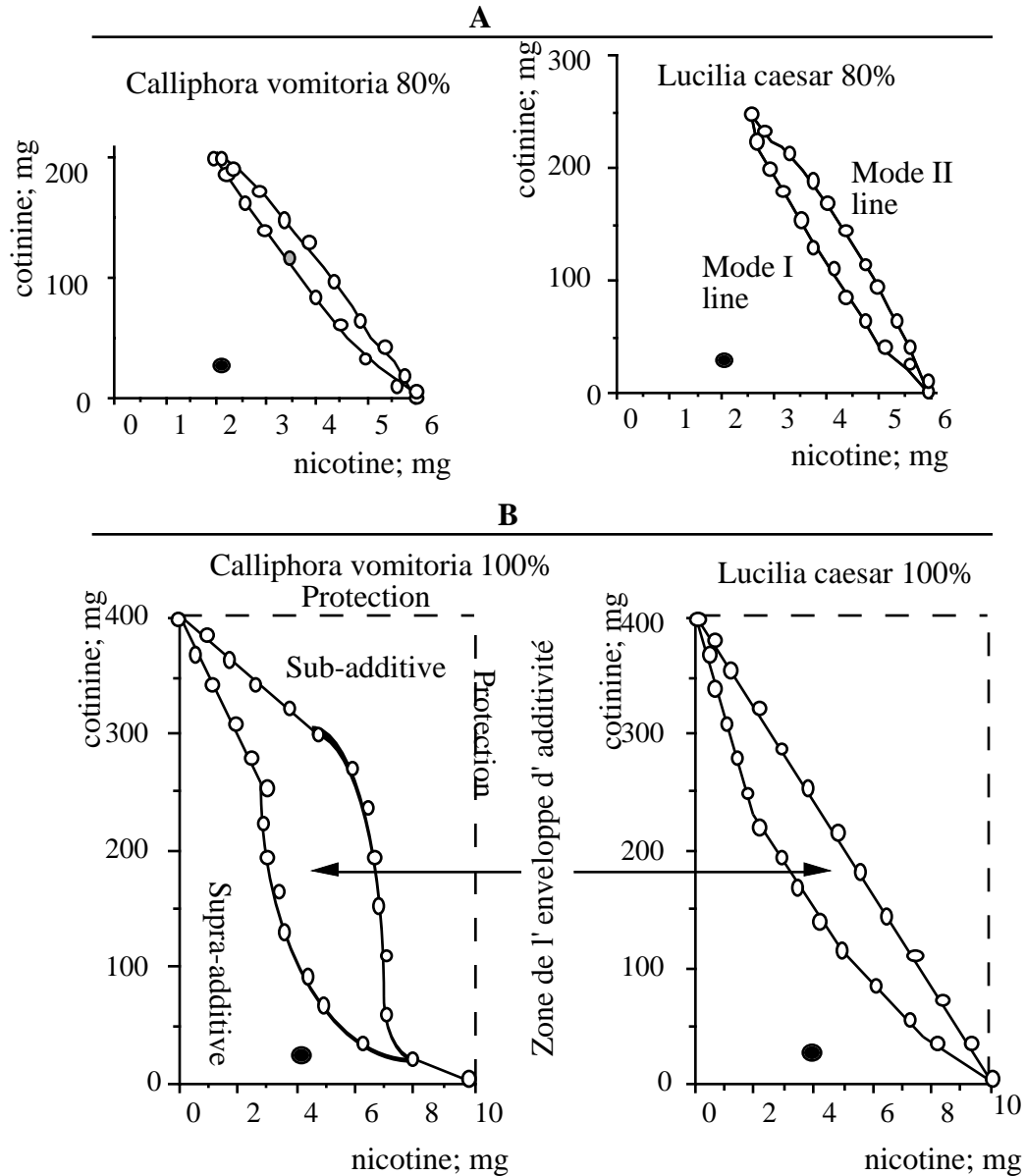


Figure 18 : *Analyse de l'interaction de la nicotine et de la cotinine dans leur activité insecticide chez C. v. et L. c. par la méthode de Steel et Peckham (1979).*

Les courbes des modes I et II ont été calculées selon la méthode de Steel et Peckham et l'effet des mélanges 3 et 4 (Tableau 10) est représenté par le point plein.

Discussion.

La présente étude a permis d'évaluer l'activité insecticide de la nicotine et de ses dérivés majeurs et de déterminer la nature de leur interaction avec la nicotine dans cette activité.

Les résultats obtenus (**Tableau 9**) avec la nicotine sont comparables à ceux qui ont été rapportés chez *L. c.* (Bruniquel et al., 1992a). Cette étude montre que la nicotine a la même activité sur les deux espèces de mouches utilisées (**Tableau 9**). La présente étude montre que la cotinine a également une activité comparable à celle qui a été rapportée chez *L. c.* (Bruniquel et al. 1992a) et suggère une légère différence de sensibilité des deux mouches à l'effet de la cotinine. *L. c.* étant 1,5 fois plus sensible que *C. v.* (**Tableau 9**). En général, dans les conditions expérimentales adoptées, l'activité insecticide relative de la cotinine est comparable à sa toxicité relative aiguë par voie intrapéritonéale chez la souris (Chahine, 1989). Le **Tableau 9** montre que l'activité de la nornicotine et la N-oxyde de cotinine est différente. La nornicotine est plus active (A. I. R \geq 64%) que la N-oxyde de cotinine (A. I. R. \leq 0,4%). La N-oxyde de cotinine est un dérivé en aval de la cotinine, son activité est encore plus faible que celle de la cotinine (A. I. R. 18% par rapport à la cotinine) (**Tableau 9**). La nornicotine se trouve sur une autre voie de détoxification (voie de déméthylation), son activité demeure importante. Ainsi, ce travail montre que la **voie d'oxydation** de la nicotine est **plus efficace** que la **voie de déméthylation** dans les mécanismes de détoxification de la nicotine. Ce travail suggère qu'*in vivo*, la nornicotine pourrait contribuer à l'activité insecticide de la nicotine, alors que la cotinine n'y contribuerait pas et que la N-oxyde de cotinine ne contribuerait pas à l'activité insecticide de la cotinine.

La présente investigation a permis également d'étudier la nature de l'interaction de la nicotine avec ses dérivés naturels. Les résultats obtenus avec les mélanges de nicotine et de cotinine suggèrent une interaction supra-additive chez les deux espèces de mouches, en accord avec ce qui a été rapporté

chez *L. c.* (Bruniquel et al., 1992a). De plus, ce travail montre que le mélange de nicotine et de cotinine est plus actif chez *C. v.* que chez *L. c.* (mélanges 1 et 2 **Tableau 10**). Ce résultat souligne que la simple addition des effets n'obéit pas à des règles simples. En effet, la comparaison des effets des produits appliqués séparément, ne prédit pas l'effet des mélanges des mêmes produits. Dans notre cas, *L. c.* est 1,5 fois plus sensible que *C. v.* (**Tableau 9**) à l'effet de la cotinine, alors qu'elle est plus résistante à l'effet des mélanges de nicotine et de cotinine (mélanges 1 et 2 **Tableau 10**). L'effet des mélanges de nicotine et de nornicotine est inférieur (mélange 5 **Tableau 10**) ou égal (mélange 6 **Tableau 10**) à l'effet prédit chez *L. c.*. Chez les deux espèces de mouches, la nicotine et la cotinine agissent de manière supra-additive (synergisme), alors que la nicotine et la nornicotine montrent des interactions diamétralement opposées. La nornicotine peut antagoniser (inhiber) les effets de la nicotine (mélange 5 **Tableau 10**) ou agir de manière additive (mélange 6 **Tableau 10**) avec la nicotine. La N-oxyde de cotinine agit de manière additive avec la nicotine chez les deux espèces de mouches (mélange 7 **Tableau 10**), mais elle agit de manière supra-additive avec la cotinine chez *L. c.* et additivement chez *C. v.* (mélange 8 **Tableau 10**). Ainsi, ce travail montre que la **nornicotine** et la **nicotine** agissent par des **mécanismes communs** alors que la **nicotine** et la **cotinine** agissent par des **mécanismes différents**. Ce travail montre également qu'*in vivo*, la N-oxyde de cotinine ne contribue ni à l'activité insecticide (**Tableau 9**) ni à l'activité synergique (**Tableau 10**) de la cotinine. Cependant, la simple addition des effets n'obéit pas toujours à des règles simples (Steel et Peckham, 1979, **Tableau 10**), nous avons analysé par une autre méthode la nature de l'interaction de la nicotine et de la cotinine pour produire 80% (**Figure 18A**), 100% (**Figure 18B**) de l'activité insecticide. Nous avons calculé, par la méthode de Steel et Peckham "dite des isobogrammes" l'enveloppe d'additivité de l'activité insecticide de la nicotine et de la cotinine (**Figure 18**). L'effet des mélanges 3 et 4 testés (**Tableau 10**) tombe dans la zone de la supra-additivité.

Conclusion.

L'analyse par la méthode de Steel et Peckham des résultats de la présente étude supporte la conclusion que les dérivés **déméthylés** de la nicotine **gardent l'activité insecticide** et agissent avec la nicotine par des **mécanismes superposables** (additivité), alors que les dérivés **oxydés** de la nicotine **perdent** l'activité insecticide et agissent avec la nicotine par des **mécanismes non superposables** (supra-additivité ou synergie).

Les actions de la nicotine et de la cotinine pourraient faire intervenir des **niveaux d'action biochimiques et/ou cellulaires différents**. Ainsi, la greffage de la fonction cétone en α par rapport au noyau pyrrolidine de la nicotine, modifie les propriétés pharmacodynamiques de la molécule. Ces modifications pourraient résulter de l'action de la cotinine sur des sites récepteurs nicotiniques (distincts de ceux de la nicotine) ou d'une autre famille.

Chapitre II : Nature de l'interaction de la nicotine et de la cotinine chez la souris *Mus Musculus*

L'étude de la nature de l'interaction de la nicotine et de ses métabolites, dans l'activité insecticide, a montré que la nicotine et la cotinine agissent de manière supra-additive (voir Chap. I). Cette conclusion a ouvert de nouvelles perspectives dans l'élucidation des activités de la cotinine et par conséquent de la nicotine. Elle a également contribué à la compréhension de la nature de l'interaction de ces deux alcaloïdes. La démonstration de la supra-additivité par la méthode de Steel et Peckham (1979) a suggéré que les niveaux d'action biochimiques et/ou cellulaires de ces deux alcaloïdes ne sont pas identiques. Les mécanismes d'activation du récepteur nicotinique (nAChR) (Yamamoto et al., 1995) et la pharmacologie de ces récepteurs (Ohana et Gershoni 1990) sont différents chez les mammifères et les insectes. Ces différences expliquent pourquoi la nicotine est relativement moins insecticide, alors qu'elle est très toxique chez les mammifères (Yamamoto et al., 1995). La présente étude voudrait comparer la toxicité de la nicotine et de la cotinine chez la souris *Mus musculus* et établir la nature de leur interaction. C'est donc une investigation sur les mécanismes d'action de ces deux alcaloïdes chez les mammifères.

Matériels et Méthodes.

Des souris mâles et femelles (25-30 g) ont reçu entre 14h et 16h les doses désirées d'alcaloïdes dans 10 ml.kg⁻¹ de solution isotonique (NaCl 0,9%). Les symptômes d'intoxication ont été identifiés et la mortalité a été recensée jusqu'à 18 h et le lendemain matin. Les résultats sont présentés en fraction survivante.

Résultats.

Effet du temps.

Les études de toxicité sur les souris ont montré que la nicotine agit plus rapidement que la cotinine. En effet, comme le montre la **Figure 19**, 100% des souris sont tuées moins de 10 minutes après avoir reçu une dose létale de nicotine. Dans le même temps, on constate que 99% des souris qui ont reçu une dose létale de cotinine sont tuées entre 10 et 120 minutes. Lorsque les souris ont reçu un mélange de nicotine et de cotinine létal, la mort survient entre 4 minutes et 20 minutes dans 77% des cas. L'effet 50% (EC_{50}) de la cotinine est 15 min., celui de la nicotine est de 2 min. et celui de leur mélange se situe au milieu avec un EC_{50} à 9 min.

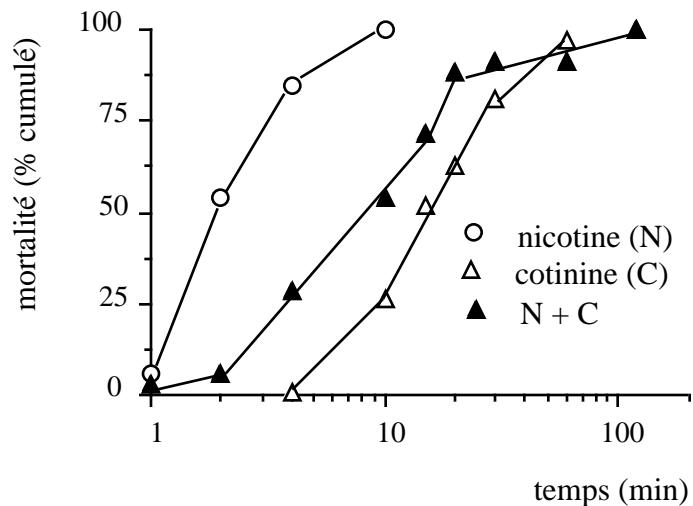


Figure 19: Effet du temps sur la mortalité provoquée par des doses létales de nicotine, de cotinine et de leur mélange par voie intrapéritonéale chez la souris *Mus musculus*.

Les valeurs représentent le pourcentage cumulé de la mortalité observée en fonction du temps pour chaque traitement.

Effet de la dose.

Nous avons tracé les courbes dose-effet de la nicotine et de la cotinine chez les souris mâles et femelles. La nicotine base libre est instable, nous avons utilisé le tartrate acide de nicotine.

Les droites dose-effet de la nicotine sont présentées sur la **Figure 20**. Les droites dose-effet de la cotinine sont présentées sur la **Figure 21**. Les valeurs représentent la moyenne de 10-20 souris.

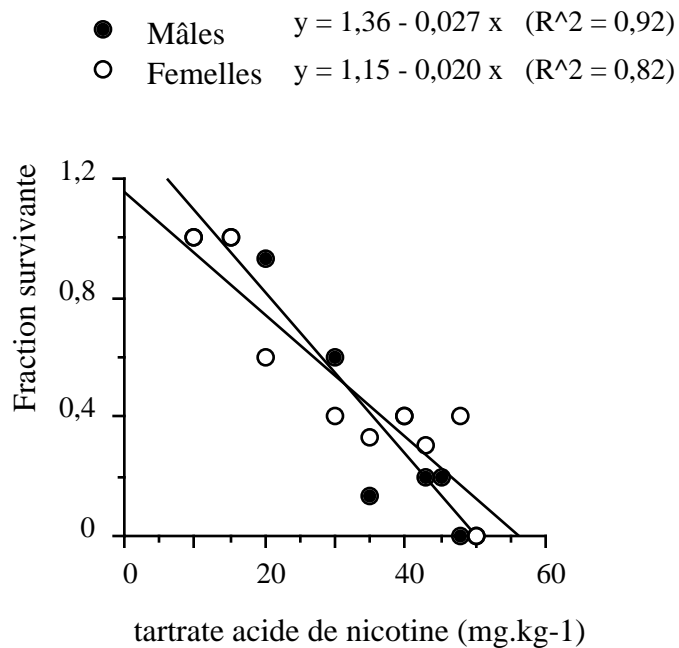


Figure 20 : Comparaison de la toxicité de la nicotine par voie intrapéritonéale sur les souris

Mus musculus mâles et femelles.

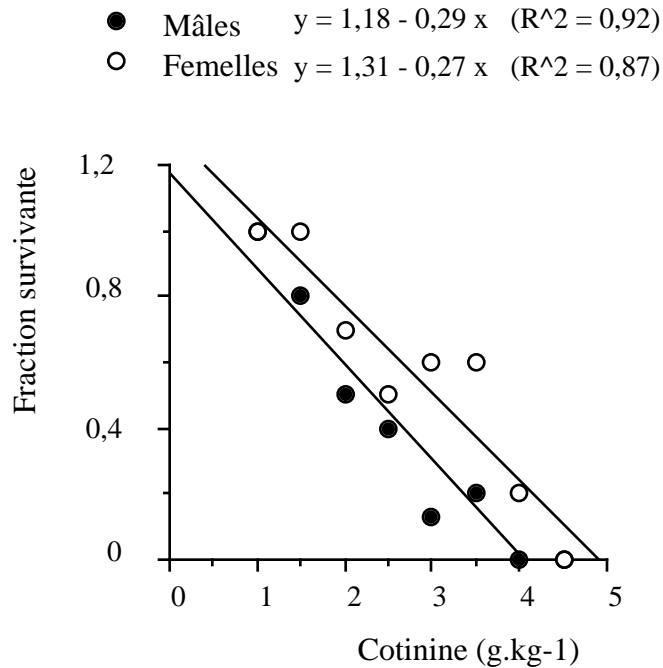


Figure 21 : Comparaison de la toxicité de la cotinine par voie intrapéritonéale sur les souris *Mus musculus* mâles et femelles.

Comparaison de l'activité de la nicotine et de la cotinine.

A partir de ces droites, on détermine les DL_{50} et les DL_{90} de la nicotine et de la cotinine chez les souris mâles et femelles (**Tableau 11**). Pour les mâles, la DL_{50} et la DL_{90} ($\mu\text{g.g}^{-1}$ souris) de la nicotine sont respectivement de 8,8 et 15,8. Pour les femelles, elles sont de 9,8 et 18,2. Celles de la cotinine pour les mâles sont respectivement de 2030 et 3610 et pour les femelles, sont respectivement de 2420 et 4360.

Tableau 11 : *Comparaison de la toxicité de la nicotine et de la cotinine par voie intrapéritonéale sur les souris *Mus musculus* mâles et femelles.*

Pour la nicotine, les valeurs ont été calculées par transformation des doses de tartrate acide de nicotine en doses de nicotine base libre. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE [n détermination]. Elles sont exprimées en mg.kg^{-1} souris.

drogue	mâle	femelle	activité relative (%) mâle.....femelle
	DL ₅₀DL ₉₀	DL ₅₀DL ₉₀	
nicotine	8,8 \pm 1...15,8 \pm 1,9 [3]	9,8 \pm 2,1...18,2 \pm 3,8 [3]	100....100
cotinine	2030 \pm 480...3610 \pm 854 [5]	2420 \pm 925...4360 \pm 1666 [3]	0,44....0,41

En utilisant l'équation de Wadley (Wadley, 1945), la toxicité relative de la cotinine est voisine de 0,4% (**Tableau 11**). Ces résultats montrent que la nicotine serait 240 fois plus toxique que la cotinine chez les souris mâles et femelles. Ainsi, la métabolisation de la nicotine en cotinine atténue sa toxicité. Cette méthode de calcul montre qu'il n'y a pas de différence significative dans la sensibilité des souris mâles et femelles à l'activité toxique de la nicotine et de la cotinine, bien que la droite de la cotinine chez les souris femelles soit légèrement décalée vers la droite (**Figure 21**).

Étude de la nature de l'interaction de la nicotine et de la cotinine dans la toxicité par la méthode de Wadley (1945).

Toutes les données sont inscrites dans le **Tableau 12**. La première colonne montre la composition et les doses utilisées dans les mélanges. La deuxième colonne montre les mortalités théoriques, calculées en traduisant les doses de cotinine en doses équivalentes de tartrate acide de nicotine, obtenues en multipliant les doses de cotinine par la valeur de la toxicité relative (0,44% chez les mâles et 0,41 chez les femelles) et compare la mortalité expérimentale à celle obtenue théoriquement.

Tableau 12 : Analyse de la nature de l'interaction de la nicotine et de la cotinine dans la toxicité par voie intrapéritonéale sur la souris *Mus musculus* par la méthode de Wadley.

mélange	mortalité (%)	
	mâle	femelle
nicotine + cotinine	théorique.....expérimentale	théorique.....expérimentale
I = 15+2000	33..... 40	NT
II = 15+2750	39.....100*	NT
III = 15+3000	NT	41.....100* ^(a)
IV = 30+1000	54.....80	NT
V = 27,5+2000	58.....100*	NT

*NT = non testé. *, $P \leq 0,01$ entre valeur théorique et valeur expérimentale.*

^(a), ce groupe a reçu 30 mg.kg⁻¹ souris d'hexaméthonium, 20 min avant l'administration du mélange indiqué.

On constate, d'après la méthode de Wadley, que la mortalité attendue chez les souris mâles (mortalité théorique) pour les deux mélanges II et V de nicotine et de cotinine utilisés est respectivement de 39% et de 58% (**Tableau 12**). Dans le même temps, la mortalité expérimentale est de 100% pour les deux mélanges testés. Il semblerait donc, d'après la méthode de Wadley, qu'il y a une interaction supra-additive entre ces deux alcaloïdes dans leur toxicité chez la souris mâle.

Étude de la nature de l'interaction de la nicotine et de la cotinine dans la toxicité par la méthode de Steel et Peckham (1979).

Etant donné que la nicotine et la cotinine ont des courbes dose-effet linéaires (**Figure 20, 21**), l'effet de leurs mélanges sera prévisible par un isobologramme linéaire (Steel et Peckham, 1979). Les isobologrammes pour les souris mâles et les souris femelles sont présentés sur la **Figure 22**.

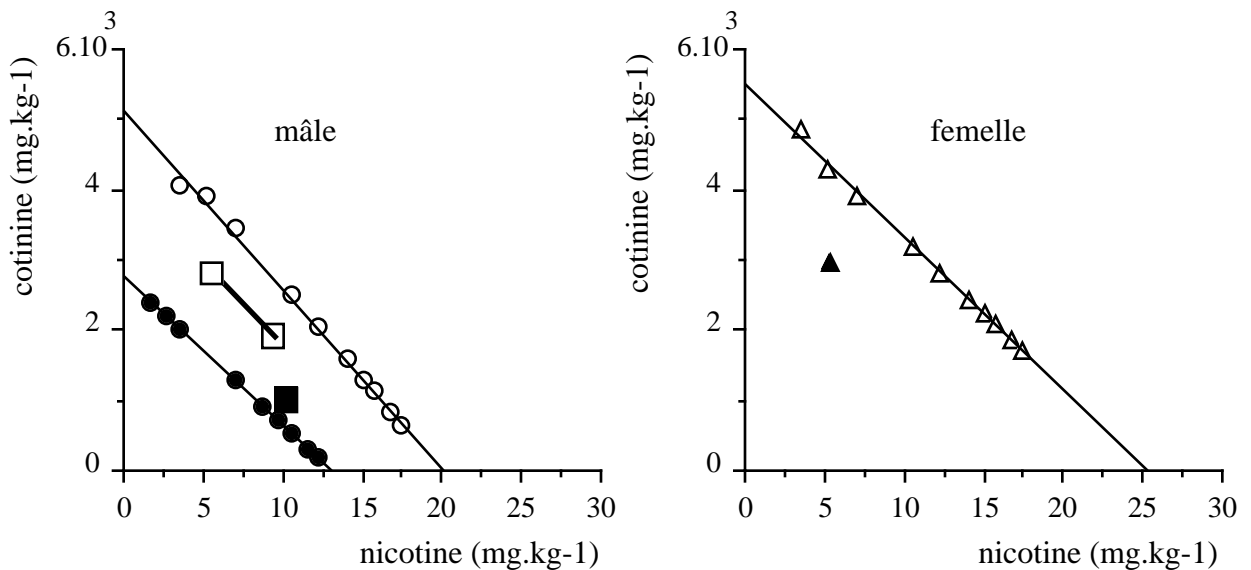


Figure 22 : *Analyse de la nature de l'interaction de la nicotine et de la cotinine dans leur toxicité par voie intrapéritonéale sur les souris *Mus musculus* mâles et femelles par la méthode de Steel et Peckham (1979).*

Les isobologrammes de la nicotine et de la cotinine pour produire 100% (ronds vides) et 80% (ronds pleins) chez la souris mâle et 100% (triangles vides) chez la souris femelle ont été obtenus par la méthode de Steel et Peckham (1979). Les mélanges produisant 100% (carrés vides) et 80% (carré plein) de l'effet ont été testés chez la souris mâle. L'effet de l'hexaméthonium sur l'activité du mélange testé chez la souris femelle est montré (triangle plein). Tous les mélanges ont été testés chez 10 souris.

D'après cette méthode, tous les points qui se situent à gauche de la ligne d'additivité indiquent une supra-additivité (Steel et Peckham, 1979). On constate que les mêmes mélanges de nicotine et de cotinine testés par la méthode de Wadley (II et V **Tableau 12**) se trouvent dans la zone de la supra-additivité par rapport à l'isobogramme 100% (carrés vides). Le mélange qui produit 80% de la toxicité (IV **Tableau 12**) se trouve sur la droite de l'additivité (carré plein). Par cette méthode on montre également une interaction supra-additive entre la nicotine et la cotinine.

Effet de l'hexaméthonium sur la toxicité du mélange de nicotine et de cotinine.

L'effet du traitement des souris, 20 min auparavant, par l'hexaméthonium ne modifie pas la toxicité du mélange testé chez les souris femelles (III **Tableau 12**). L'analyse de l'effet de ce mélange par la méthode de Steel et Peckham montre qu'il produit un effet dans la zone de la supra-additivité (triangle plein **Figure 22**). Ainsi, l'hexaméthonium ne confère aucun effet hétéroprotecteur vis-à-vis de la toxicité du mélange de nicotine et de cotinine, alors qu'il est un hétéroprotecteur de la toxicité de la nicotine (résultats non montrés; Barrass et al., 1969).

Discussion.

Nous avons caractérisé au cours de cette étude, la toxicité de la nicotine et de la cotinine chez la souris, ainsi que leur mode d'interaction.

Les résultats obtenus montrent que la **nicotine** est 250 fois **plus toxique que la cotinine**. Ceci est en accord avec les travaux rapportés dans la littérature. En effet Chahine (1989) a rapporté des valeurs de DL_{50} comparables. La détermination de l'activité relative de la cotinine chez la mouche et chez la souris permet de faire abstraction de la voie d'administration (i.p. chez la souris et pulvérisation chez la mouche). Cette détermination montre que la cotinine est 5-7 fois plus active chez la mouche que chez la souris, alors que la nicotine ne montre virtuellement aucune sélectivité pour le récepteur nicotinique de type insecte ou de type mammifère (activité comparable). L'activité plus importante de la cotinine chez la mouche pourrait s'expliquer par une plus grande affinité de la cotinine pour le récepteur nicotinique des insectes. En effet, la pharmacologie du récepteur nicotinique est différente chez les insectes et chez les vertébrés (Ohana et Gershoni, 1990). De plus, Yamamoto et al., (1995) ont montré que la délocalisation du doublet de l'azote du groupement 3-pyridyl amino méthyle de la nicotine par la présence d'un groupement électrophile confère une plus grande activité agoniste pour les récepteurs nicotiniques de type insecte par rapport à ceux de type mammifère. Il serait donc **probable** que la **cotinine agisse par le récepteur nicotinique** chez l'insecte et le mammifère.

La **cotinine** agit plus **tardivement** et son activité s'étale entre 4 et 60 min avec **un effet 50% (EC_{50}) à 15 min**. La **nicotine** agit plus **rapidement** et son activité ne s'étale pas dans le temps (<10 min) avec un **EC_{50} à 2 min**. Ces pics d'activité rappellent la biodisponibilité de ces deux alcaloïdes (Plowchalk et al., 1992). Au contraire, l'effet de leur mélange se situe au milieu avec **un EC_{50} à 9 min**.

Ni la nicotine ni la cotinine ne montrent de différences dans leur activité suivant le sexe (**Tableau 11**). Cependant la droite dose-effet de la cotinine (**Figure 21**) et (par conséquent)

l'isobogramme (**Figure 22**) chez la souris femelle sont légèrement décalés vers la droite par rapport à ceux obtenus chez la souris mâle. Ces résultats suggèrent une **légère résistance des souris femelles aux effets de la cotinine**.

Nous avons étudié le mode d'interaction de ces deux alcaloïdes dans leur toxicité, en utilisant deux méthodes d'analyse. Les résultats obtenus, par la méthode de Wadley (1945), fondée sur une addition simple des effets, et la méthode de Steel et Peckham (1979), fondée sur les isoeffets, montrent que la nicotine et la cotinine agissent de manière supra-additive chez la souris (**Tableau 12; Figure 22**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez la mouche (Bruniquel et al., 1992a; Chap. I). La démonstration d'une **interaction supra-additive** par la méthode de Steel et Peckham indique que ces deux alcaloïdes agissent à des **niveaux cellulaires et/ou biochimiques distincts** (Steel et Peckham, 1979).

La différence quantitative dans l'activité de la nicotine et de la cotinine, observée dans cette étude, est en accord avec d'autres études. En effet, plusieurs auteurs (Risner et al., 1985 , Golberg et al., 1989; Chahine, 1989) ont rapporté la faible activité de la cotinine par rapport à la nicotine. Cependant, ces même travaux et d'autres (Andersson et al., 1993) ont rapporté que les **effets comportementaux** centraux de la nicotine et de la cotinine peuvent être **différents**. Les résultats de notre étude et de ces travaux suggèrent l'existence probable de sites d'action distincts pour la nicotine et la cotinine. Cependant, même si les **propriétés pharmacodynamiques** de la nicotine et de la cotinine semblent différentes, nos résultats (**Figure 19**) et d'autres travaux (Plowchalk et al., 1992) indiquent que les **propriétés pharmacocinétiques** de ces deux alcaloïdes sont également différentes. Ces dernières pourraient contribuer à la différence des activités de la nicotine et de son métabolite. En effet les **propriétés pharmacocinétiques** d'une drogue peuvent **moduler** ses **propriétés pharmacodynamiques** (Stolerman, 1991; 1993; 1994).

Conclusion.

Notre étude montre que la **nicotine** est environ 250 fois **plus toxique que la cotinine, sans contribution significative du facteur sexe** dans la sensibilité des souris. **L'interaction** de ces deux alcaloïdes est **supra-additive** comme le montrent les méthodes de Wadley (1945) et de Steel et Peckham (1979). **L'hexaméthonium** ne modifie pas la sensibilité des souris au mélange de nicotine et de cotinine. De plus, la souris a moins de récepteurs nicotiques, cibles pharmacologiques de la nicotine et probablement de la cotinine, dans le SNC que la mouche (Gundelfinger et Hess, 1992). Ce résultat est en accord avec les propriétés pharmacologiques des récepteurs nicotiques des insectes et des mammifères (Yamamoto et al., 1995). Il est donc probable que la nicotine et la cotinine agissent d'avantage sur **des récepteurs nicotiques neuronaux** que **périphériques**. Ces résultats étant acquis, on peut admettre l'hypothèse que la **cotinine** agit par des **récepteurs nicotiques différents** de ceux de la **nicotine** pour expliquer l'interaction supra-additive (ou synergie).

Chapitre III : Etude de la fixation de la nicotine et de la cotinine sur les sites [3H]Nicotine et [125I]alpha-bungarotoxine

La nicotine et la cotinine agissent à des niveaux cellulaires et/ou biochimiques distincts chez les insectes et chez les mammifères. De plus, la comparaison de leurs activités insecticide et toxique a suggéré la contribution du récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) dans la médiation des effets de ces deux alcaloïdes. Pour la nicotine, il est communément admis qu'elle agit par ce récepteur. Pour la cotinine, quelques études ont établi son affinité pour les sites [3H]nicotine (Sloan et al., 1984; Anderson et Arneric, 1994), mais pour les sites [125I]alpha-bungarotoxine ([125I]alpha-Bgt), il existe peu de travaux (Bruniquel et al., 1992b). Dans la présente investigation, nous avons comparé l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites de fixation de ces deux radioligands, disponibles pour marquer les sites du nAChR. Nous avons choisi les nAChRs de *Torpedo marmorata* pour évaluer l'affinité de la nicotine et la cotinine pour les sites du nAChR périphérique et les nAChRs du cerveau de rat pour évaluer l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites du nAChR neuronal. Il faut noter, tout d'abord, que ces deux radioligands permettent de marquer, sans controverse, le nAChR périphérique (Lindstrom, 1995). Au niveau du SNC, la multiplicité des sous-types de nAChRs, caractérisés par d'autres techniques : biologie moléculaire, électrophysiologie,..., (Role, 1992; Sargent, 1993; Galzi et Changeux, 1995), pourrait remettre en doute l'usage de la technique "interaction ligand-récepteur" pour étudier la multiplicité. Ces considérations ont été développées par Swillens et al., (1995).

Cependant, il est communément admis que dans le cerveau de rat, la [3H]nicotine marque avec une haute affinité un sous-type dominant (90%) : le $\alpha 4\beta 2$ -nAChR (Nakayama et al., 1990; Flores et al., 1992; Lindstrom, 1995) et que la [125I]alpha-Bgt, marque avec une haute affinité le sous-type $\alpha 7$ -

nAChR (Peng et al., 1993; Lindstrom, 1995). Les sites de fixation de ces deux radioligands ont été visualisés par autoradiographie, dans le cerveau de rat (Clarke et al., 1985). Ainsi, la présente étude permet d'évaluer *in vitro* l'interaction de la nicotine et de la cotinine avec les nAChRs périphériques et neuronaux de ces deux radioligands.

Matériels et méthodes.

Nous avons comparé l'interaction de la nicotine et de la cotinine sur les mêmes préparations et dans les mêmes conditions expérimentales décrites, en détail, dans Chap. MATÉRIELS ET MÉTHODES. La préparation biologique et le radioligand sont incubés en présence (compétition) et en absence (liaison totale) du compétiteur dans les conditions décrites dans la littérature. Pour la *[3H]nicotine* nous avons adopté les conditions décrites par Anderson et Arneric (1994) et pour la *[125I]alpha-Bgt*, nous avons adopté les conditions décrites par Marks et Collins (1982) (étude sur extraits protéiques) et par Clarke et al., (1985) (étude sur coupe de cerveau de rat). Le poids des rats utilisés dans cette étude était de 450-500 g.

Résultats.

* Sites de la *[125I]alpha-Bgt* périphériques.

La comparaison de l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites de la *[125I]alpha-Bgt* montre un IC_{50} pour la nicotine de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M et un IC_{50} de $4 \cdot 10^{-4}$ M pour la cotinine. De plus, contrairement à la nicotine, la cotinine inhibe environ 60% de la liaison spécifique du radioligand (**Figure 23**).

* Sites de la *[3H]nicotine* périphériques.

La comparaison de l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites de la $[3H]$ nicotine montre un IC_{50} pour la nicotine de 10^{-3} M et un IC_{50} de $4 \cdot 10^{-1}$ M pour la cotinine. De plus, contrairement à la nicotine, la cotinine inhibe environ 60% de la liaison spécifique du radioligand (**Figure 24**).

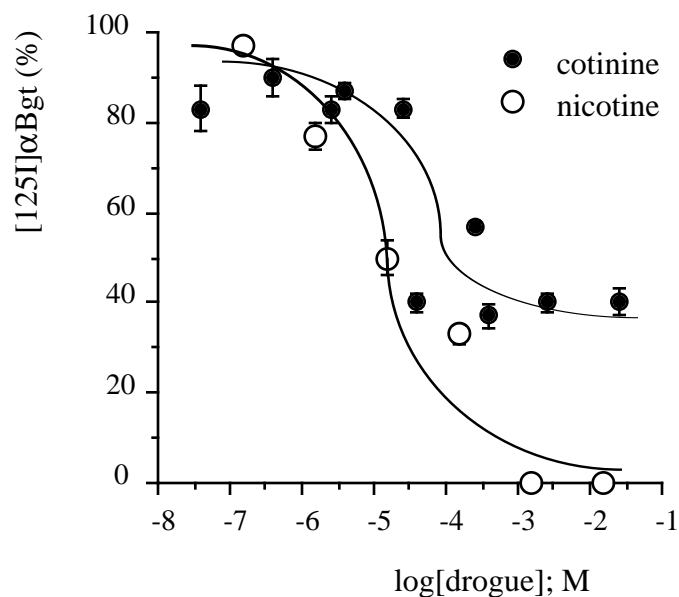


Figure 23 : Compétition de la nicotine et de la cotinine pour les sites de liaison de la $[125I]$ alpha-Bgt membranaires de *Torpedo marmorata*. Moyenne \pm SE de 5-8 expériences réalisées en triplicate.

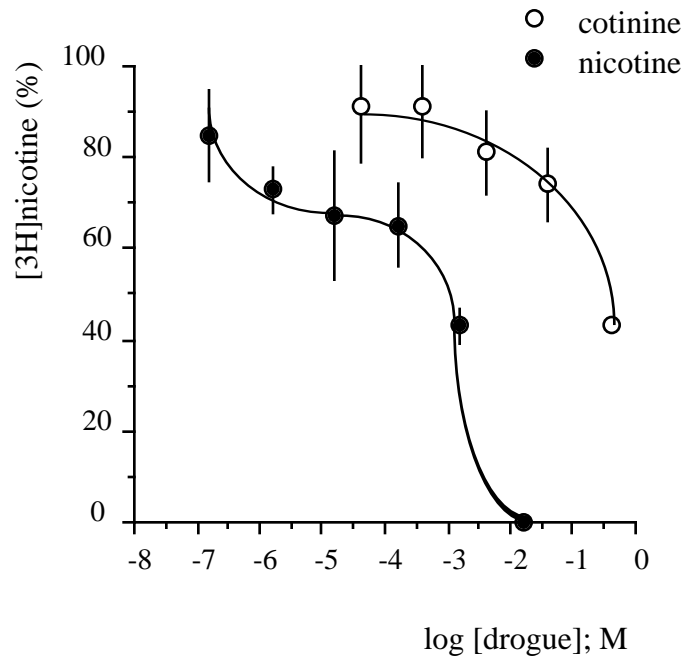


Figure 24 : Compétition de la nicotine et la cotinine pour les sites de liaison de la [3H]nicotine membranaires de *Torpedo marmorata*. Moyenne \pm SE de 5-7 expériences réalisées en triplicate.

* Sites neuronaux de la [125I]alpha-Bgt.

La comparaison de l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites de la [125I]alpha-Bgt neuronaux montre un IC_{50} pour la nicotine voisin de 10^{-4} M et un IC_{50} pour la cotinine supérieur à 10^{-2} M. De plus, la cotinine et la nicotine inhibent 100% de la liaison spécifique du radioligand (**Figure 25**).

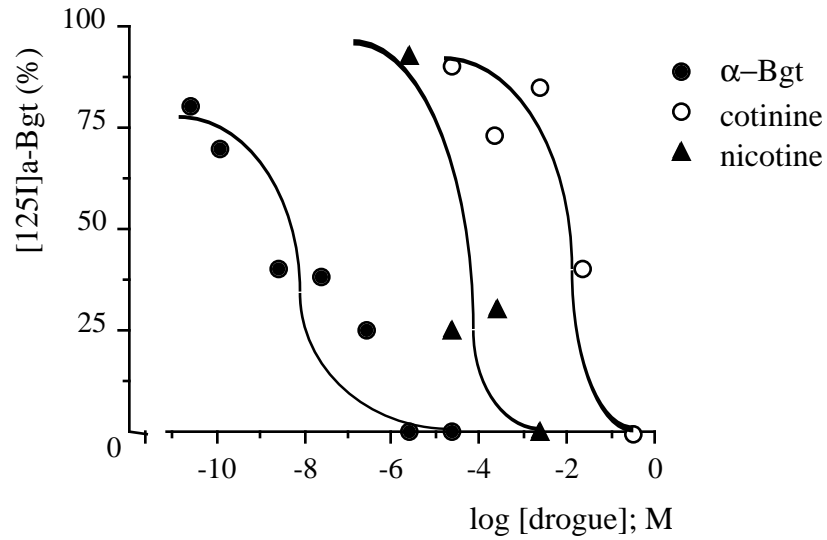


Figure 25 : Compétition de la nicotine, l'alpha-Bgt et la cotinine pour les sites de liaison de la [125I]alpha-Bgt membranaires de cerveau de rat.

Chaque valeur est la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicata.

Ces estimations ont été visualisées par imagerie autoradiographique (**Figure 26**).

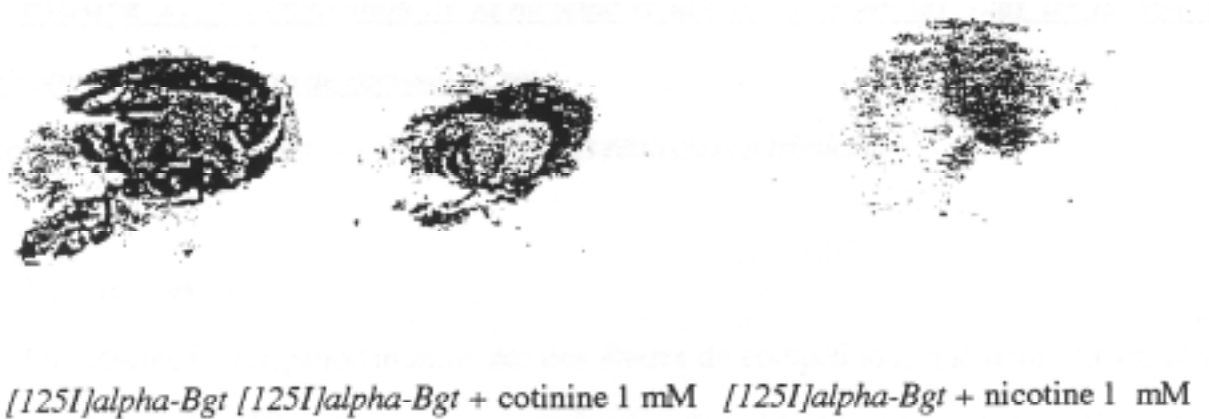


Figure 26 : Images autoradiographiques de la compétition de la nicotine et de la cotinine pour les sites [125I]alpha-Bgt.

Au mM, la nicotine mais pas la cotinine inhibe la liaison du radioligand. Ce résultat est comparable à celui obtenu sur membranes (**Figure 25**).

* Sites neuronaux de la $[3H]nicotine$.

La comparaison de l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites de la $[3H]nicotine$ neuronaux montre un IC_{50} pour la nicotine voisin de 10^{-7} M et un IC_{50} voisin de 10^{-3} M pour la cotinine. De plus, la cotinine et la nicotine, inhibent 100% de la liaison spécifique du radioligand (**Figure 27**).

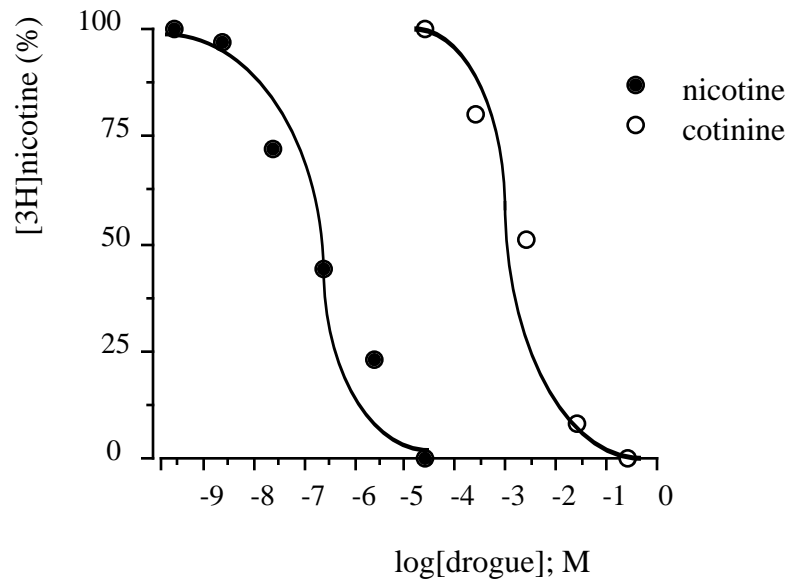


Figure 27 : Compétition de la nicotine et la cotinine pour les sites de liaison de la $[3H]nicotine$ membranaires de cerveau de rat.

Chaque valeur est la moyenne de 3-4 expériences réalisées en triplicata.

Discussion.

La présente investigation montre, par des études de compétition, que d'une façon générale la cotinine a une faible affinité pour les sites de fixation de la $[3H]nicotine$ et de la $[125I]alpha-Bgt$. De plus, la **cotinine** est un **compétiteur partiel** pour les sites de fixation de ces deux radioligands au niveau périphérique alors que c'est un **compétiteur total** pour les sites de fixation de ces deux radioligands au niveau central (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites nicotiniques.

drogue	sites [3H]nicotine		sites [125I]alpha-Bgt					
	périphériques		neuronaux		périphériques		neuronaux	
	site (%)	IC ₅₀	site (%)	IC ₅₀	site (%)	IC ₅₀	site (%)	IC ₅₀
nicotine	100.....	1 mM	100.....	100 nM	100.....	25 µM	100.....	100 µM
cotinine	60.....	400 mM	100.....	1 mM	60.....	400 µM	100.....	10 mM

Au niveau des sites de *Torpedo*, les résultats montrent que la cotinine inhibe environ 60% de la liaison spécifique de ces deux radioligands (**Tableau 13**). En effet, le nAChR périphérique possède deux sites structurellement différents, constitués des sous-unités α/γ et α/δ . Ces sites ont également des fonctionnements différents selon que c'est la sous-unité γ ou δ qui contribue avec la sous-unité α à la formation de site (Blount et Merlie, 1989). Ces résultats, suggèrent une sélectivité de la cotinine pour un seul type des deux sites nicotiniques de *Torpedo*. La cotinine a une affinité plus importante pour un des deux sites de [125I]alpha-Bgt (IC₅₀ = 400 µM) que pour un des deux sites de la [3H]nicotine (IC₅₀ = 400 mM). Cette différence d'affinité de la cotinine pour le site de liaison du radioligand suggère une différence dans l'état du site selon que le radioligand est un agoniste ([3H]nicotine) ou un antagoniste ([125I]alpha-Bgt). L'affinité de la cotinine est virtuellement et considérablement diminuée (1 000 fois) lorsque le radioligand est un agoniste ([3H]nicotine).

Au niveau des sites neuronaux, les résultats obtenus sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature pour les sites de la [3H]nicotine (Sloan et al., 1984; Anderson et Arneric, 1994). Pour les sites de la [125I]alpha-Bgt, peu ou pas de travaux ont été rapportés sur les interactions de la cotinine avec ces sites. Les résultats de cette étude montrent que la cotinine est un compétiteur total (100%

d'inhibition) de la liaison de ces deux radioligands (**Tableau 13**). La cotinine a une affinité plus faible pour les sites de la *[125I]alpha-Bgt* ($IC_{50} = 10$ mM) que pour les sites de la *[3H]nicotine* ($IC_{50} = 1$ mM). L'étude autoradiographique (**Figure 26**) confirme l'estimation obtenue pour l' IC_{50} de la cotinine pour les sites de la *[125I]alpha-Bgt* (**Figure 25, Tableau 13**).

La différence dans l'activité de liaison, déterminée dans cette étude, de la nicotine et la cotinine est en accord avec les effets comportementaux de ces deux alcaloïdes. La cotinine, aux fortes doses, produit des effets comportementaux similaires à ceux de la nicotine (Risner et al., 1985; Goldberg et al., 1989; Chahine, 1989). Aux faibles doses, la cotinine produit des effets comportementaux distincts de ceux de la nicotine (Risner et al., 1985; Goldberg et al., 1989; Andersson et al., 1993; Chahine et al., 1993).

Conclusion.

Cette étude a montré que la **cotinine** a une **faible affinité** pour les **sites** nicotiques centraux et périphériques marqués par la *[3H]nicotine* et la *[125I]alpha-Bgt*. Elle suggère, en accord avec d'autres études (Blount et Merlie, 1989) que les deux sites α/δ et α/γ du récepteur nicotinique périphérique sont morphologiquement, fonctionnellement et pharmacologiquement distincts comme le révèlent les études de compétition avec la cotinine. La cotinine serait **sélective pour un des deux sites**.

Cette étude, suggère que la cotinine a une **faible affinité** pour les **sites nicotiques centraux** de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt*. Ces résultats sont en accord avec les effets comportementaux de la nicotine et de la cotinine (aux fortes doses de cotinine) (Risner et al., 1985, Goldberg et al., 1989; Chahine, 1989). Cependant, les effets spécifiques de la cotinine, à faible dose (Risner et al., 1985, Goldberg et al., 1989; Andersson et al., 1993) et son interaction supra-additive

avec la nicotine chez la mouche (Chap. I) et la souris (Chap. II) suggèrent des **mécanismes d'action spécifiques pour ces deux alcaloïdes.**

Chapitre IV : Etude du passage de la cotinine dans le cerveau et de ses interactions avec les ligands nicotiques

L'étude de la fixation de la cotinine sur les sites nicotiques périphériques et centraux, marqués par la *[3H]nicotine* et la *[125I]alpha-bungarotoxine*, a suggéré que les sites *[3H]nicotine* centraux, en particulier, pourraient être des médiateurs des activités centrales de la cotinine, à forte dose. Cependant, la pénétration de la cotinine dans le système nerveux central (SNC) est controversée. De plus, la quantification de ses concentrations cérébrales et la modulation de sa pénétration dans le cerveau n'ont pas été rapportées.

L'objectif de cette étude est de quantifier, par trois méthodes : chromatographie HPLC et CCM et par un dosage radioimmunologique (RIA), les concentrations cérébrales de la cotinine. Pour ce faire, nous avons synthétisé une cotinine pure pour cette étude. En effet, la cotinine commerciale pourrait contenir de 0,08% de nicotine (Goldberg et al., 1989) jusqu'à 0,3% (Communication Personnelle de Dr. Bruno David Institut de Recherche Pierre Fabre). Cette synthèse a donc pour objectif de fournir une cotinine non contaminée par la nicotine pour étudier son passage dans le cerveau.

Nous avons également évalué la contribution du système cholinergique nicotinique central et périphérique dans la régulation du passage de la cotinine dans le cerveau.

Matériels et méthodes.

Les rats Sprague-Dawley (327±26 g) (IFFA CREDO FRANCE) ont été hébergés au moins trois jours avant l'expérimentation. Ils ont reçu, par différentes voies (iv., ip. et sc.) des doses différentes de cotinine (1, 10 et 70 mg.kg⁻¹) et ont été sacrifiés aux temps 5, 20 et 60 min. Les rats ont été anesthésiés,

le cerveau et le sang ont été prélevés pour l'extraction de la cotinine par le méthanol. Cette extraction méthanolique a été utilisée pour d'autres alcaloïdes (Reavill et al., 1990). La cotinine a été visualisée par CCM selon Stalhandske (1969) et par HPLC selon Hariharan et al., (1988) et quantifiée par HPLC avec le 2-phénylimidazole comme standard interne et par RIA.

L'effet de la nicotine (agoniste nicotinique), de l'hexaméthonium (antagoniste nicotinique périphérique) et de la mécamylamine (antagoniste nicotinique central) sur les concentrations de la cotinine ont été évalués par les mêmes techniques.

Résultats.

* Identification et évaluation de la pureté de la cotinine : le spectre HPLC de la cotinine synthétisée montre qu'elle est pure (**Figure 28**). Aucune impureté n'a été détectée par IR, RMN et CCM (**Figure 29**)...Les spectres obtenus sont conformes à ceux de la littérature.

Cotinine (C₁₀H₁₂N₂O) :

IR : Kbr (v, cm⁻¹) : 3500 (-OH, produit hygroscopique); 1685 (C=O); 1485 (C=C).

¹H.RMN CDCl₃ (δ, ppm) : 1,91 (m, 2H, H₄); 2,53 (m, 2H, H₃); 2,69 (s, 3H, N-CH₃); 4,58 (t, 1H, H₅, J=6Hz); 7,35 (dd, 1H, H₅, J=4,8 & 7,8 Hz); 7,35 (m, 1H, H₄); 8,51 (d, 1H, H₂, J=2,2 Hz); 8,60 (dd, 1H, H₆, J=1,6 & 4,8 Hz).

¹³C.RMN CDCl₃ (δ, ppm) : 27,72 (N-CH₃ et C₄, CH₂); 29,48 (C₃, CH₂); 61,61 (C₅, CH); 123,53 (C₅, CH); 133,32 (C₄, CH); 136,08 (C₃, C); 149,18 (C₂, CH); 174,82 (C₂, C=O).

N-oxyde de cotinine (C₁₀H₁₂N₂O₂) :

IR : Kbr (v, cm⁻¹) : 3420 (-OH, solvant EtOH); 1670 (C=O); 1280 (N-->O).

¹H.RMN CDCl₃ (δ, ppm) : 1,9 (m, 1H, H₄); 2,54 (m, 3H, H₃, 1H₄); 2,73 (s, 3H, N-CH₃); 4,48 (m, 1H, H₅); 7,10 (m, 1H, H₅); 7,33 (m, 1H, H₄); 8,13 (m, 1H, H₂); 8,18 (m, 1H, H₆).

¹³C.RMN CDCl₃ (δ, ppm) : 27,53 (CH₂, C₄); 28,23 (CH₃, N-CH₃); 29,38 (CH₂, C₃); 61,32 (CH, C₅); 123,35 (CH, C₅); 126,39 (CH, C₅); 137,53 (CH, C₂); 138,57 (CH, C₆); 141,03 (CH, C₃).

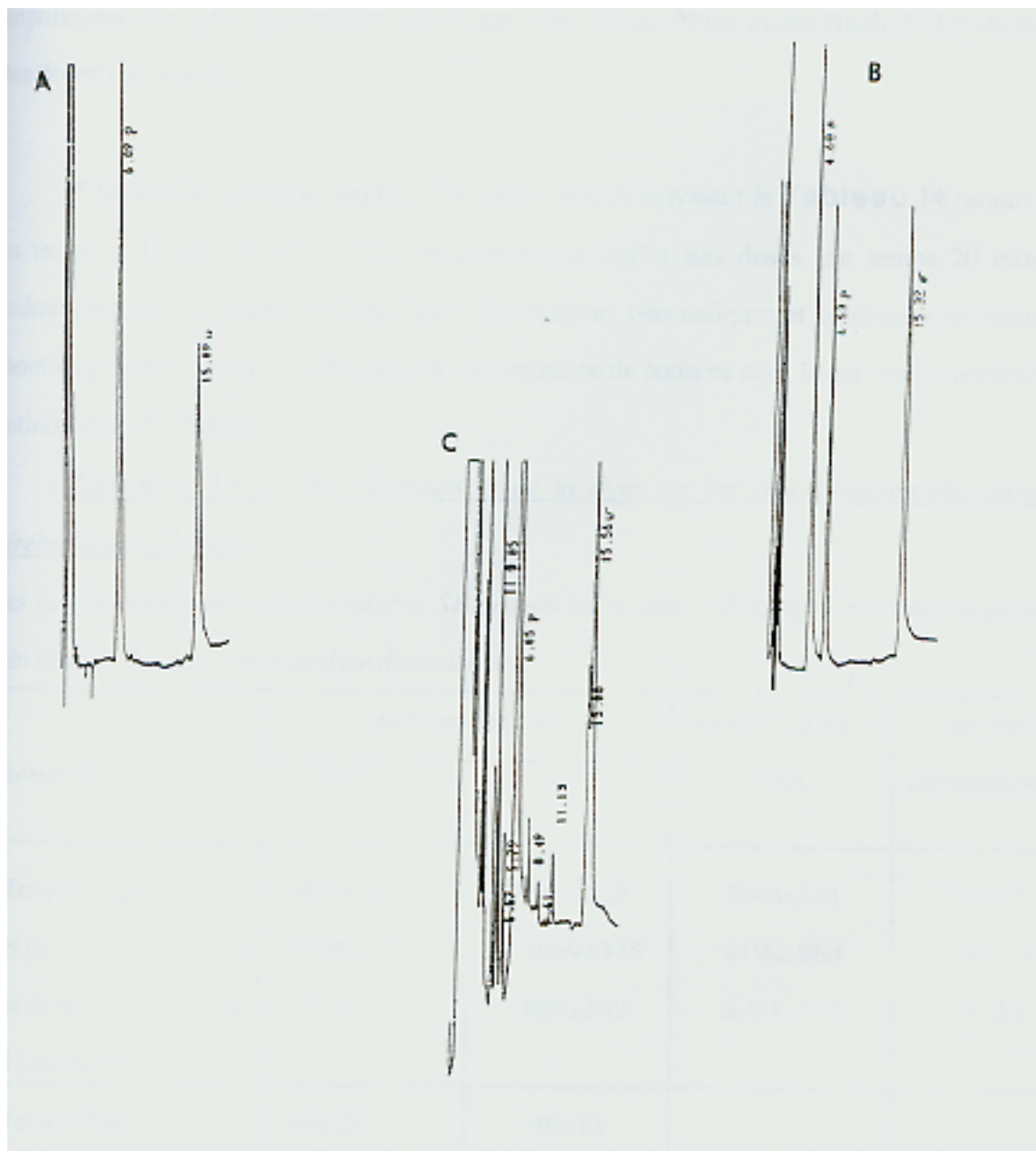


Figure 28 : *Identification et quantification de la cotinine par HPLC. (A) pic a : cotinine : 392 ng/temps de rétention 6,89; pic b : 2-phénylimidazole, étalon interne, 39,2 ng/temps de rétention 15,89 min (B) pic a cotinine 96 ng/temps de rétention 6,53 min; pic b : étalon interne, 39,2 ng/temps de rétention 15,32 min; pic c : nicotine 312 ng/temps de rétention 4,60. (C) extrait d'un rat traité par la cotinine 70 mg.kg⁻¹.*

Des essais préliminaires ont montré que les concentrations cérébrales de cotinine sont plus importantes ($P < 0,01$) par voie sc. et iv. que par voie ip. Nous avons étudié l'effet du temps et des doses par voie sc.

* Quantification du passage de la cotinine dans le cerveau : le **Tableau 14** montre l'effet du temps (à la dose de 70 mg.kg^{-1} de cotinine) et l'effet des doses (au temps 20 min après l'administration de la cotinine) sur les concentrations plasmatiques et cérébrales de cotinine. Il montre également l'évolution du rapport concentration de cotinine dans le cerveau/concentration de cotinine dans le plasma.

Tableau 14 : Effet du temps et de la dose sur les concentrations plasmatiques et cérébrales de la cotinine.

Les valeurs représentent la moyenne \pm SE de trois individus. * $P < 0,05$ par rapport au temps 5 min (test de Student après analyse de variance).

traitement		cerveau (ng.ml^{-1})		plasma (ng.ml^{-1})	rapport
		HPLC	RIA	RIA	cerveau/plasma
effet du temps (min)	5	874 \pm 138	633 \pm 112	5084 \pm 331	0,17
	20	1089 \pm 107	1069 \pm 345	4198 \pm 864	0,26*
	60	897 \pm 122	828 \pm 199	3711 \pm 327	0,24
à la dose 70 (mg.kg^{-1})	1	49 \pm 28	48 \pm 13	-	-
	10	216 \pm 48	291 \pm 94	-	-
	temps 20 min				

Les valeurs obtenues par HPLC et par RIA sont très voisines. L'inspection de l'évolution des concentrations plasmatiques et cérébrales par leur rapport (**Tableau 14**), montre un passage de la cotinine dans le cerveau. Ce passage est détectable par HPLC, RIA et par CCM (**Figure 29**). La coloration au Dragendorff n'a pas permis de colorer les tâches de la cotinine.

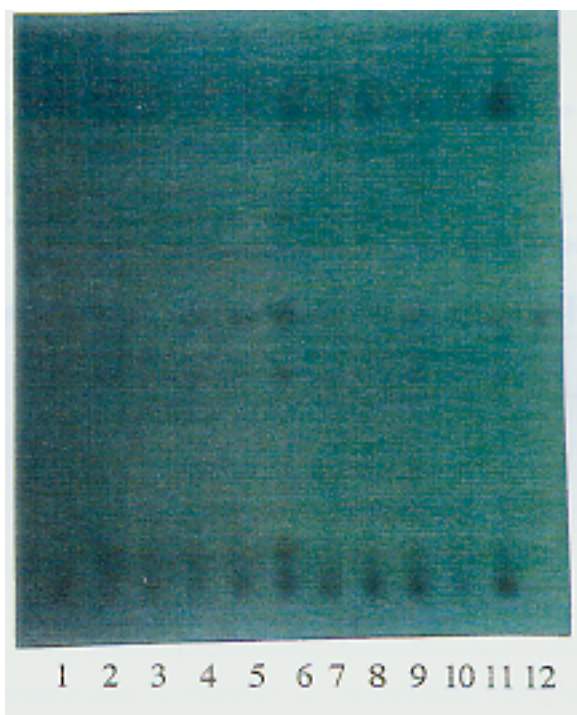


Figure 29 : *Identification de la cotinine des extraits de cerveau de rat par CCM.*

Piste 1, 2 et 3 : Rats contrôle; Piste 4, 5 et 6 : Effet du temps 5, 20 et 60 min; Piste 7 et 8 : Effet de la mécamylamine et de l'hexaméthonium sur le passage de la dose 70 mg. Kg⁻¹; Piste 9, 10 et 11: Effet de la nicotine (0,1 mg.kg⁻¹) sur le passage de 1, 10 et 70 mg.mg⁻¹ cotinine. Piste 12 : cotinine témoin.

Interaction de la cotinine avec les ligands nicotiques.

La co-administration de nicotine (0,1 mg.kg⁻¹) avec la cotinine (1 mg.kg⁻¹) augmente très fortement (P < 0,01) les concentrations de cotinine dans le cerveau, avec une baisse faible (P < 0,05)

des concentrations plasmatiques de cotinine (**Tableau 15**). La co-administration de mécamylamine (1 mg.kg⁻¹) avec la cotinine baisse faiblement ($P < 0,05$) les concentrations plasmatiques et cérébrales de cotinine (**Tableau 15**). La co-administration d'hexaméthonium (1 mg.kg⁻¹) avec la cotinine baisse très fortement ($P < 0,01$) les concentrations cérébrales de cotinine, avec une baisse légère ($P < 0,05$) des concentrations de cotinine plasmatiques (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Interaction de la cotinine avec les ligands nicotinniques dans son activité de passage dans le cerveau.

Chaque valeur est la moyenne \pm SE de trois individus. * $P < 0,05$. ** $P < 0,01$ (test de Student après analyse de variance).

cotinine co-administrée avec (mg.kg ⁻¹)	rapport =	
	[cotinine] co-administrée / [cotinine] administrée seule cerveau	plasma
rien	0,96 \pm 0,24	1 \pm 0,09
nicotine (0.1)	47 \pm 12**	0,37 \pm 0,17*
mécamylamine (1)	0,51 \pm 0,21*	0,71 \pm 0,05*
hexaméthonium (1)	0,02 \pm 0,02**	0,62 \pm 0,07*

Ces résultats suggèrent que le passage de la cotinine dans le cerveau est stimulé par la nicotine, n'est pas affecté par la mécamylamine et totalement inhibé par l'hexaméthonium. Ces résultats sont comparables par HPLC et RIA et ont été visualisés par CCM (**Figure 29**). La co-administration de nicotine (0,1 mg.kg⁻¹) avec la cotinine 10 et 70 mg.kg⁻¹ n'affecte pas significativement les concentrations cérébrales de cotinine (**Figure 29**).

Discussion.

Dans les conditions expérimentales adoptées dans cette étude, les résultats obtenus montrent que la **cotinine passe dans le cerveau**. Le passage de la cotinine a été rapporté, par analyse autoradiographique qualitative, chez la souris (Schmitterlöw et al., 1966, Waddel et al., 1976). Une étude par PET (Positon Electron Tomography) sur un sujet humain a rapporté que ce passage n'était pas significatif (Halldin et al., 1992).

Dans la présente étude, nous avons quantifié ce passage chez le rat par deux méthodes d'analyse. Les deux méthodes (HPLC et RIA) montrent des résultats comparables (**Tableau 14**). Ces résultats ont également pu être visualisés par CCM (**Figure 29**). La quantité de cotinine analysée par CCM (inférieure ou égale à 20% de la quantité analysée par HPLC) est trop faible pour obtenir une coloration par le réactif de Dragendorff (seuil pour la cotinine voisin de 50 ng). Cependant, la cotinine a bien été identifiée par son Rf par HPLC (**Figure 28**) et par CCM (**Figure 29**). À partir de la coloration de Dragendorff de la tâche de cotinine témoin, on peut estimer que nous avons déposé moins de 20 ng de cotinine dans les analyses CCM. Il est aussi probable que toute la cotinine déposée n'ait pas migré (effet du dépôt, **Figure 29**). Dans ces conditions expérimentales, on peut estimer que nous avons extrait une quantité de cotinine inférieure ou égale $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de cerveau. Dans les mêmes conditions, nous avons estimé, par HPLC et RIA, que nous avons extrait une quantité de cotinine de $15\text{-}20 \mu\text{g.g}^{-1}$ cerveau. Cette quantité de cotinine que nous avons extraite du cerveau, suggère que le passage de cotinine est faible. Cette conclusion est en accord avec l'évolution du rapport des concentrations de cotinine cérébrales et plasmatiques (**Tableau 14**). Ce rapport est au maximum de l'ordre de 0,26 alors que pour la nicotine, un rapport de 0,65 a été rapporté (Reavill et al., 1990). Il est donc probable que la cotinine passe moins bien dans le cerveau que la nicotine. Cette conclusion est également en accord

avec des prévisions fondées sur le coefficient de partition et les constantes d'ionisation de la nicotine et de la cotinine (Li et al., 1992).

Dans cette étude, nous avons également testé l'effet d'agents nicotiques sur le passage de la cotinine. Dans les conditions expérimentales adoptées, les quantités de **cotinine cérébrales** dosées, **varient** significativement en fonction de la nature de **l'agent nicotinique** testé. Le passage est significativement ($P < 0,01$) stimulé par la nicotine (agoniste nicotinique), alors qu'il est légèrement inhibé ($P < 0,05$) par la mécamylamine (antagoniste nicotinique central) et totalement inhibé par l'hexaméthonium (antagoniste nicotinique périphérique) ($P < 0,01$). Ces résultats suggèrent la contribution de sites nicotiques dans la modulation du passage de la cotinine. Les taux plasmatiques de cotinine sont légèrement inhibés ($P < 0,05$) en présence de ces alcaloïdes. L'inhibition plus importante observée en présence d'hexaméthonium, par rapport à la mécamylamine (**Tableau 15**), ne peut s'expliquer par la baisse des taux plasmatiques de cotinine (**Tableau 15**). Ces résultats suggèrent la contribution des sites nicotiques périphériques, par rapport aux sites centraux, dans la modulation du passage de la cotinine. Le mécanisme intime de la modulation du passage de la cotinine par les sites nicotiques n'est pas expliqué. Cependant, la nicotine et la cotinine ont des effets différents sur les taux plasmatiques d'aldostérone et de prolactine (Andersson et al., 1993) et les fonctions endocriniennes sont modulables par les nAChRs (Fuxe et al., 1990). Ces hormones de l'axe hypophyse-surrénale ont été impliquées dans la régulation endogène de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Long et Holoday, 1985). Il est donc probable que la **nicotine et la cotinine passent différemment la barrière hématoencéphalique. Cependant, le passage de la cotinine dépend de l'état d'activation des nAChRs périphériques.**

Conclusion.

Dans nos conditions expérimentales, les résultats montrent que le **passage** de la **nicotine** est **supérieur** à celui de la **cotinine**. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature, bien qu'aucune quantification directe du passage de la cotinine n'ait été rapportée. Ces résultats suggèrent que le **passage** de la **cotinine** est **soumis** au contrôle du système cholinergique nicotinique. Le système **nicotinique périphérique** semble jouer un **rôle plus prépondérant** que le système **nicotinique central**. Le mécanisme intime de la modulation du passage n'est pas expliqué, mais il est probable qu'il résulterait d'un effet sur les **hormones de la surrénale** qui ont été rapportées responsables de la modulation de la perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Long et Holoday, 1985). Les effets différents de la nicotine et de la cotinine sur ces hormones (Andersson et al., 1993) pourraient expliquer le passage plus restreint de la cotinine par rapport à la nicotine. Ces résultats semblent suggérer que **la nicotine et la cotinine affecteraient différents sites nicotiniques. Les effets de la nicotine et de la cotinine sur les fonctions de la surrénale pourraient être directs ou indirects** en particulier le nAChR peut moduler les fonctions endocriniennes (Fuxe et al., 1990). Il est donc aussi probable que ces deux alcaloïdes affectent le passage d'autres substances (exogènes ou endogènes).

Enfin, la nature de ces mécanismes pourrait être différente chez l'homme et chez le rat expliquant, peut-être, l'absence de passage de la cotinine chez le sujet humain (Halldin et al., 1992). Mais, il est aussi probable qu'une dilution isotopique, involontaire, a contribué à la baisse de la signification du passage de l'isotope de la cotinine.

Les résultats de cette étude permettent d'estimer que, par administration sc. de 1 mg.kg^{-1} de cotinine chez le rat, la quantité cérébrale serait de 250 ng.g^{-1} cerveau (soit $1,5 \text{ nmol.g}^{-1}$ cerveau ou $1,5 \text{ }\mu\text{M}$ si on considère $1 \text{ g de cerveau} = 1 \text{ ml}$). Ces valeurs pourraient être différentes, vu les étapes d'extraction et la présence de sites de liaison. Ces limites correspondraient aux doses physiologiques de

cotinine couramment rapportées chez les fumeurs de tabac. Cependant, les fumeurs de marijuana et de tabac ont des taux plasmatiques de cotinine plus bas que ceux des fumeurs de tabac seul (Vunakis et al., 1988). Il est donc probable que des interactions complexes se produisent entre ces diverses drogues comme pour le cas du tabac et de l'alcool (Dar et al., 1993; 1994).

Chapitre V : Nature nicotinique des sites de fixation de la [125I]cotinine

Les effets psychoactifs de la nicotine pourraient jouer un rôle dans l'induction et le maintien de la dépendance tabagique (Ochoa, 1994). Ces effets de la nicotine résulteraient de sa fixation sur les récepteurs nicotiques (nAChRs). La multiplicité des nAChRs dans le neurone (Role, 1992; Sargent, 1993; Galzi et Changeux, 1995) souligne la multiplicité et la complexité des effets attribués à la nicotine (Ochoa, 1994). Cette complexité serait accrue par la contribution de certains des métabolites aux effets de la nicotine (Fuxe et al., 1979; Risner et al., 1989; Goldberg et al., 1989; Dar et al., 1994...). Parmi ceux-ci, certains comme la nornicotine, produisent des effets semblables à ceux de la nicotine (Risner et al., 1985; 1988; Goldberg et al., 1989). D'autres métabolites, comme la cotinine, produisent aux doses physiologiques des effets centraux différents de ceux de la nicotine (Risner et al., 1985; Goldberg et al., 1989; Chahine, 1989; Andersson et al., 1993). Nous avons montré que la nicotine et la cotinine pouvaient avoir différents mécanismes d'action chez l'insecte (Chap. I) et la souris (Chap. II), que la cotinine a une faible affinité pour les sites nicotiques de la [3H]nicotine et de la [125I]alpha-Bgt (Chap. III) et que ses concentrations physiologiques ($\geq \mu\text{M}$) ne suffiraient peut-être pas pour activer ces sites. La conséquence de ces considérations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques est l'hypothèse de l'existence de sites centraux spécifiques à la cotinine. Cette hypothèse a été vérifiée par l'usage d'un nouveau radioligand, la [125I]cotinine.

Matériels et méthodes.

Nous avons caractérisé la fixation de ce radioligand dans les mêmes préparations membranaires de l'organe électrique du poisson *Torpedo* et du cerveau de rat qui ont servi pour étudier la fixation de la $[3H]nicotine$ et de la $[125I]alpha\text{-Bgt.}$

Résultats.

Dans les mêmes conditions expérimentales, ce radioligand ne donne pas de liaison spécifique dans les membranes de l'organe électrique du poisson *Torpedo*, la liaison totale = liaison non spécifique = 80 cpm. Pour les membranes de cerveau de rat, la liaison spécifique est de 500-600 cpm (radioactivité totale 12 000 à 15 000 cpm, pureté $\geq 90\%$). Nous avons d'avantage caractérisé la fixation de ce radioligand dans les préparations membranaires de cerveau de rat.

* Cinétique de fixation du radioligand : la **Figure 30** montre que la fixation de ce radioligand est réversible avec deux constantes de dissociation cinétique (K_d) très voisines.

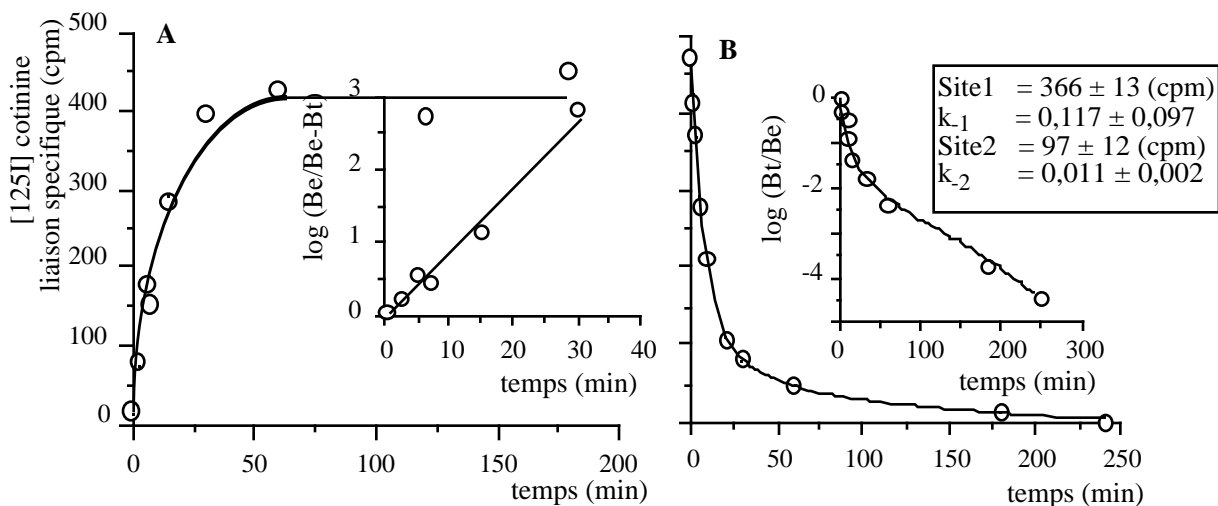


Figure 30 : Cinétique de la fixation de la $[125I]cotinine$ sur les membranes de cerveau de rat.

En A, la fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de 10 mM de cotinine (liaison non spécifique, LNS), pendant un temps croissant. Les valeurs correspondent à la moyenne de la $LS = LT - LNS$ de

5-8 expériences. En B, la fraction membranaire a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul ou en présence de 10 mM de cotinine jusqu'à l'équilibre. La dissociation du radioligand de ses sites a été réalisée par dilution volumétrique (1:100). Les valeurs correspondent à la moyenne de la $LS = LT - LNS$ de 3-8 expériences.

* Effet de la quantité de protéines sur la fixation du radioligand : la **Figure 31** montre que la fixation du radioligand est linéairement dépendante de la quantité de protéines dans l'intervalle $[0,2-1,8 \text{ mg.ml}^{-1}]$.

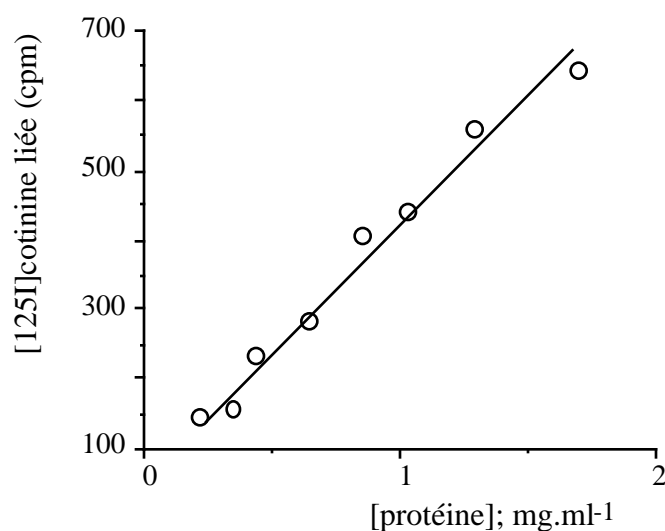


Figure 31 : Effet de la concentration en protéines sur la fixation du radioligand.

La fraction membranaire ($0,02$ à $1,7 \text{ mg.ml}^{-1}$ protéines) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, *LT*) ou en présence de 10 mM de cotinine (liaison non spécifique, *LNS*), jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne de la $LS = LT - LNS$ de 3-5 expériences réalisées en triplicata.

* Saturabilité des sites de fixation du radioligand : la **Figure 32** montre que les sites de fixation du radioligand sont saturables avec une constante de dissociation à l'équilibre $K_d = 0,26 \pm 0,06$ nM et un nombre de sites $B_{max} = 20 \pm 2$ fmole.mg⁻¹ protéines.

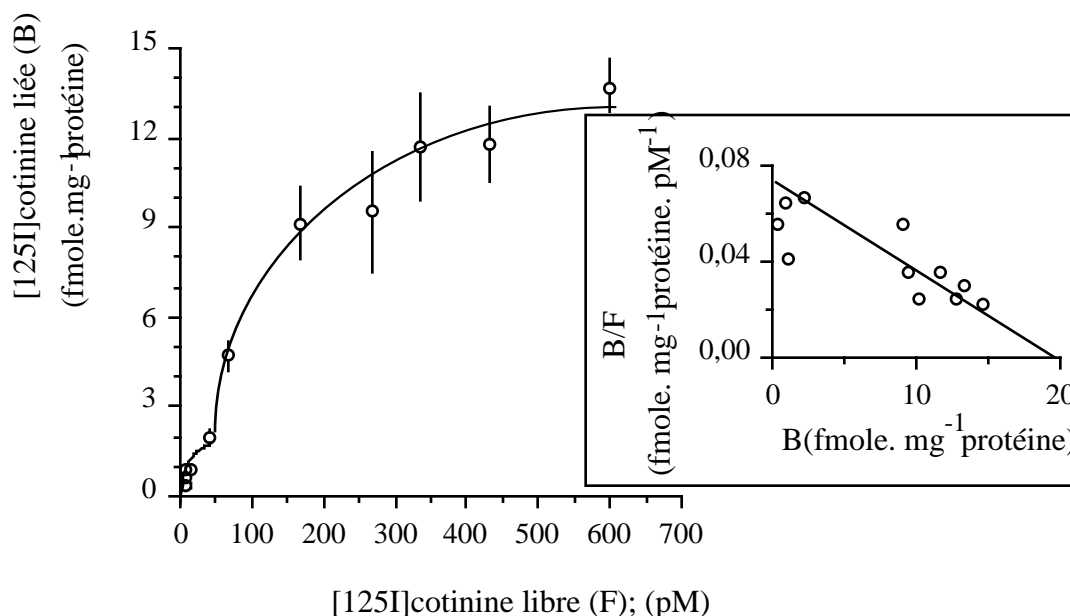


Figure 32 : Saturabilité des sites de fixation du radioligand dans les membranes de cerveau de rat.

La fraction membranaire (0,2-0,5 mg.ml⁻¹ protéines) a été incubée en présence de 7 à 650 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de 10 mM de cotinine (liaison non spécifique, LNS), jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne de la $LS = LT - LNS$ de 4 expériences réalisées en triplicata.

* Comparaison des constantes de dissociation estimées par des études de cinétique et de saturation : le **Tableau 16** montre que le radioligand a un (étude de saturation) ou deux (étude cinétique) sites de fixation. Cependant, les deux constantes de dissociation estimées dans les études de cinétique ne sont pas très différentes (10 fois), la deuxième ($K_d = 0,29$ nM) est comparable à celle obtenue par l'étude de saturation ($0,26 \pm 0,06$ nM).

Tableau 16 : *Comparaison des valeurs du K_d obtenues dans les études de cinétique, de saturation et de compétition.*

Les valeurs de K_d (nM), de B_{max} (fmole.mg⁻¹ protéines) et la proportion de sites en % correspondent à la moyenne \pm SD estimée par le programme Enzfitter (Leatherbarrow 1987). ND, non détecté.

Site	étude cinétique		étude de saturation		compétition de la cotinine	
	K_d	%	K_d	B_{max}	K_d	%
1	0,03.....20		ND		0,08 \pm 0,01.....17 \pm 3	
2	0,29.....80		0,26 \pm 0,06.....20 \pm 2		(1,1 \pm 0,5)10 ⁶75 \pm 8	

* Profil nicotinique des sites de fixation du radioligand : le GABA, la glycine, l'atropine, le carbachol et l'hexaméthonium, à des concentrations supérieures ou égales au mM n'inhibent pas la liaison du radioligand (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Profil pharmacologique nicotinique pour les sites du radioligand.

La fraction membranaire a été incubée en présence de 67 pM de radioligand et d'une concentration supérieure ou égale à 1 mM de chaque inhibiteur indiqué (GABA, acide gamma amino butyrique; DMPP, diméthyl phényl pipérazinium iodide). Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM (écart à la moyenne) de n (indiqué entre parenthèses) expériences réalisées en triplicata.

drogue	inhibition	drogue	inhibition
	% \pm SEM [n]		% \pm SEM [n]
GABA.....	-15 \pm 25 [3]	carbachol.....	5 \pm 8 [3]
glycine.....	-12 \pm 11 [3]	arécoline.....	47 \pm 22 [4]
dopamine.....	23 \pm 14 [3]	hexaméthonium.....	10 \pm 4 [2]
atropine.....	-1 \pm 9 [3]	lobéline.....	25 \pm 16 [3]
muscarine.....	-51 \pm 14 [2]	DMPP.....	47 \pm 10 [2]

À des concentrations supérieures au mM, la dopamine, la lobéline, l'arécoline et le DMPP inhibent moins de 50% la liaison du radioligand, la muscarine la stimule d'environ 50% (**Tableau 17**) et l'oxotrémorine l'inhibe à 100% (**Figure 33**).

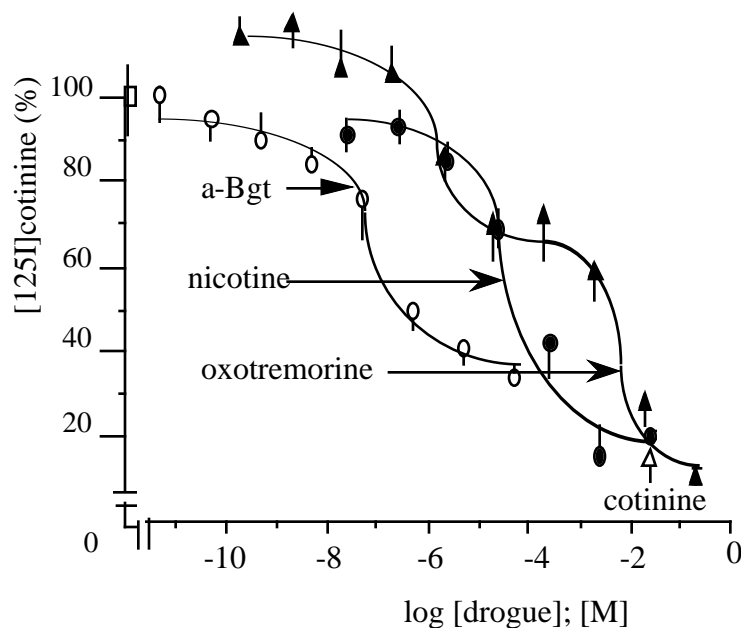


Figure 33 : *Profil pharmacologique nicotinique pour les sites du radioligand.*

La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, *LT*) ou en présence de concentrations croissantes d'*alpha-Bgt* (*m*), de nicotine (**Z**), d'oxotrémorine (*s*) ou de cotinine 20 mM (liaison non spécifique, *LNS*) (**Δ**) jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de 5 expériences réalisées en triplicata.

* Profil pharmacologique d'un sous-type de sites nicotiniques du radioligand : la nicotine, l'*alpha-Bgt* (**Figure 33**), la cotinine (**Figure 34**), l'anabasine et l'acétylcholine (**Tableau 18**) inhibent environ 100% de la liaison du radioligand. Les données de la cotinine, l'acétylcholine et l'oxotrémorine ont été significativement modélisées à deux sites, celles de la nicotine, l'anabasine et l'*alpha-Bgt* à un site (**Tableau 18**).

Tableau 18 : Profil pharmacologique d'un sous-type de sites nicotiniques pour le radioligand.

La fraction membranaire (1 mg.ml⁻¹ protéines) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de différentes concentrations de compétiteurs : oxotrémorine, acétylcholine, anabasine, alpha-Bgt, nicotine ou cotinine jusqu'à l'équilibre (1-2 h). Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs représentent la moyenne ±SEM ou la moyenne ± SD estimée par le programme Enzfitter (Leatherbarrow 1987). L'IC₅₀ a été estimé graphiquement (Cheng et Prussof 1973). Le nombre d'expériences est indiqué [n].

drogue	inhibition % ± SEM [n]	IC ₅₀ (M)	K _d (M) moyenne ± SD	Site % ± SD
oxotrémorine	99 ± 6 [5]10 ⁻²	(2 ± 0,5).10 ⁻⁶(1)(9 ± 3).10 ⁻³(2)	29 ± 2 63 ± 4
acétylcholine	100 ± 8 [3]10 ⁻²	(10 ± 0,3).10 ⁻⁶(1)(4,5 ± 0,5).10 ⁻³(2)	64 ± 1 41 ± 1
anabasine	87 ± 7 [3]2.10 ⁻⁴	(41 ± 10).10 ⁻⁶(1)	96 ± 5
alpha-Bgt	73 ± 7 [5]5.10 ⁻⁷	(0,26 ± 0,06).10 ⁻⁶(1)	80 ± 6
nicotine	100 ± 10 [5]2.10 ⁻⁴	(30 ± 10).10 ⁻⁶(1)	96 ± 7
cotinine	100 ± 9 [5]3.10 ⁻⁴	(80 ± 10).10 ⁻¹²(1)(1,1 ± 0,5).10 ⁻³(2)	17 ± 3 75 ± 8

* Comparaison de l'affinité de la cotinine pour les sites [125I]cotinine, [125I]alpha-Bgt et [3H]nicotine : la compétition de la cotinine pour ces sites montre qu'elle a un IC₅₀ de 2,5 mM pour les sites [3H]nicotine; de 15 mM pour les sites [125I]alpha-Bgt et de 300 µM pour les sites [125I]cotinine (**Figure 34**).

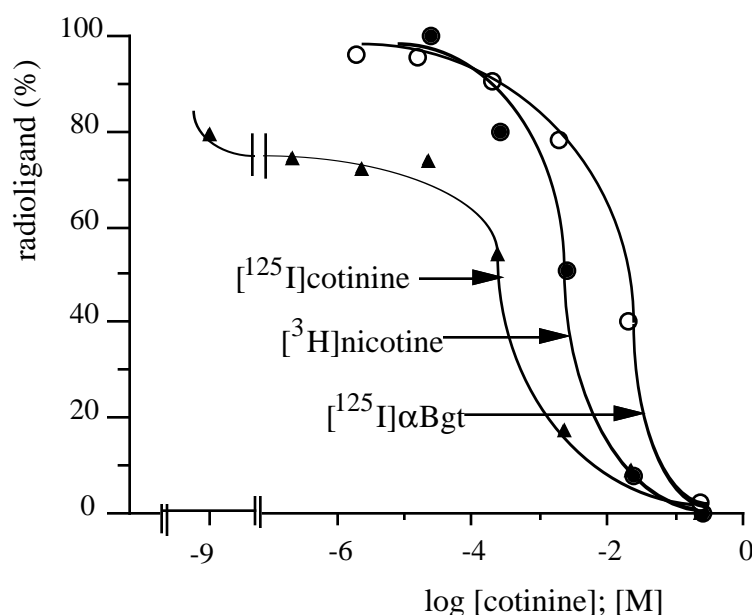
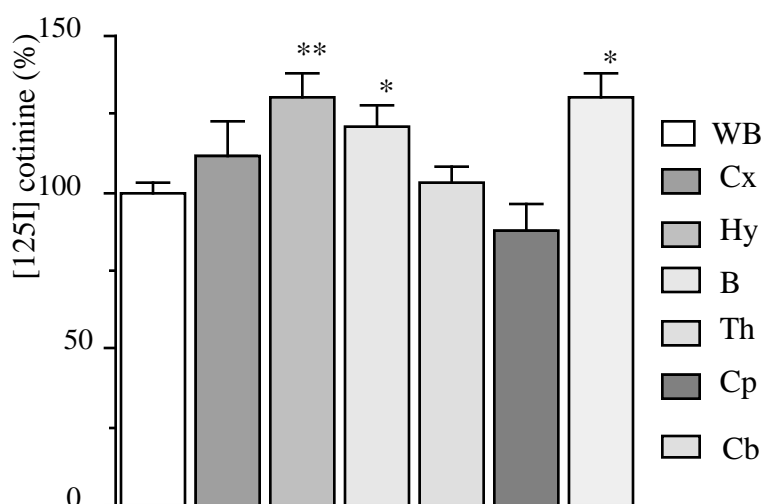


Figure 34 : Compétition de la cotinine pour les sites de la $[^{125}\text{I}]$ cotinine, de la $[^{125}\text{I}]$ alpha-Bgt et de la $[^3\text{H}]$ nicotine membranaires de cerveau de rat.

L'inhibition de la $[^3\text{H}]$ nicotine et de la $[^{125}\text{I}]$ alpha-Bgt a été réalisée comme décrit respectivement par Anderson et Arneric (1994) et par Marks et Collins (1982). Les valeurs correspondent à la moyenne de 3-5 déterminations réalisées en triplicata avec une variation intra et inter-essai inférieure à 9%. Dans ces expériences, l'affinité (IC_{50}) de la nicotine et de l'alpha-Bgt pour leurs sites respectifs est de 100 et 1 nM. L'inhibition de la $[^{125}\text{I}]$ cotinine a été réalisée comme décrit dans la légende du **Tableau 18**, avec plus de 8 concentrations de cotinine. Les valeurs correspondent à la moyenne de 5 expériences réalisées en triplicata avec une variation intra et inter-essai inférieure à 5% et 8% respectivement.

* Distribution cérébrale des sites de fixation du radioligand : ce radioligand se lie spécifiquement dans toutes les régions cérébrales analysées (**Figure 35**). La quantité des sites $[^{125}\text{I}]$ cotinine (mesurée en présence de 10^{-2} M de cotinine) est significativement plus élevée dans les membranes de l'hippocampe ($P \leq 0,01$), du bulbe et du cervelet ($P \leq 0,02$) que dans les membranes du cerveau entier.



* $P < 0,02$; ** $P < 0,01$ par comparaison au cerveau entier (WB), *t*-test après analyse de variance à une voie.

Figure 35 : *Distribution régionale des sites de la [125I]cotinine dans le cerveau de rat.*

La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) des régions indiquées (WB, cerveau entier; Cx, cortex; Hy, hippocampe; B, Bulbe; Th, thalamus; Cp, caudate-putamen; Cb, cervelet) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de 10 mM de cotinine (liaison non spécifique, LNS), jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE de la LS = LT-LNS de 5 expériences réalisées en triplicata.

Discussion.

La conclusion majeure de la présente étude est que la **[125I]cotinine marque des sous-types de sites nicotiques**. Dans les mêmes conditions expérimentales adoptées, ce radioligand ne se fixe pas dans les membranes de l'organe électrique du poisson *Torpedo*, alors qu'il se fixe réversiblement (**Figure 30**), de façon saturable (**Figure 32**), avec un profil nicotinique (**Tableau 17**) et avec un profil d'un sous-type de sites nicotiques (**Figure 33, Tableau 18**).

Par opposition aux études de cinétique et de compétition, les études de saturation montrent un seul site pour le radioligand (**Tableau 16**). Cette contradiction n'est pas expliquée, mais pourrait provenir des conditions expérimentales adoptées (définition de la liaison non spécifique, température...) et/ou des propriétés intrinsèques des sites du radioligand (leur proportion relative, leurs états, coopérativité...) et/ou de la contribution de sites non saturables dans les expériences de compétition et de cinétique (un site membranaire phospholipidique non spécifique) et/ou de l'estimation de deux valeurs de constante de dissociation cinétique alors que leur différence est égale à 10 fois (**Tableau 16**). Cependant, un modèle à deux sites pour le radioligand est également suggéré, à côté des expériences de cinétique, par les expériences de compétition. La dopamine, l'arécoline, la lobéline et le DMPP (**Tableau 17**), contrairement à la nicotine, l'acétylcholine, l'alpha-Bgt, l'oxotrémorine, l'anabasine et la cotinine inhibent moins de 50% des sites marqués (**Tableau 18**). De plus, les données obtenues avec l'acétylcholine, l'oxotrémorine et la cotinine, contrairement à la nicotine, l'anabasine et l'alpha-Bgt ont été significativement modélisées à deux sites (**Tableau 18**). Un modèle à deux sites n'est pas une preuve de la contribution de plus d'un récepteur à la liaison. En effet, un nAChR porte plus d'une seule catégorie de sites : deux sites agonistes/antagonistes compétitifs non équivalents, des sites antagonistes non compétitifs dans le canal et des sites allostériques (20 à 30) à l'interface lipide-protéine (Galzi et Changeux, 1995). De plus, ces nAChRs ont au moins quatre états allostériques (repos, actif, inactif et désensibilisé) (Galzi et Changeux, 1994). Leur état de haute affinité correspondrait à une fraction désensibilisée du récepteur, provoqué par une incubation lente. Ces propriétés du récepteur nicotinique expliqueraient pourquoi la nicotine se fixe, *in vitro*, à des concentrations de l'ordre du nM alors que ses effets sont observés pour des concentrations μM (Ochoa, 1994). Il serait donc probable que différents états des sites de $[125\text{I}]cotinine$ soient détectés selon les conditions expérimentales utilisées ou qu'un site non saturable contribue à la fixation du radioligand. Cette situation est également vraie pour la $[3\text{H}]nicotine$ qui est rapportée avoir un site (Anderson et Arneric, 1994...)

ou plusieurs sites (Sloan et al., 1984...). Le B_{\max} de la $[125I]cotinine$ (**Tableau 16**) est faible mais plus proche de celui de la $[3H]nicotine$ et de la $[125I]alpha-Bgt$ que de celui des récepteurs muscariniques (mAChRs) (Marks et Collins, 1982).

Cette conclusion est fondée sur l'affinité (IC_{50}) de la cotinine qui est 10 et 50 fois plus forte pour les sites $[125I]cotinine$ que pour les sites de la $[3H]nicotine$ et de la $[125I]alpha-Bgt$ (**Figure 34**). Une forte affinité de la cotinine est obtenue pour un site marqué (**Tableaux 16, 18**). Ce résultat supporte d'avantage notre conclusion, à savoir que les sites de ce nouveau radioligand sont distincts de ceux de la $[3H]nicotine$ et de la $[125I]alpha-Bgt$. Cette conclusion est également supportée par les résultats obtenus avec les compétiteurs nicotiniques et non nicotiniques. D'un côté, les ligands non nicotiniques (**Tableau 17**), exception faite pour l'oxotrémorine, n'inhibent pas ou inhibent très peu, aux fortes concentrations (\geq mM) la liaison du radioligand. De l'autre côté, tous les ligands nicotiniques (**Figure 33; Tableau 18**) inhibent fortement, à des concentrations certes supérieures ou égales au μ M, la liaison du radioligand. L'exception faite pour l'oxotrémorine pourrait confirmer la règle. En effet, l'oxotrémorine pourrait agir par des mécanismes nicotiniques (Hong et Chang, 1990) et son affinité pour les sites de la $[125I]cotinine$ est bien inférieure à son affinité pour les sites des récepteurs muscariniques (Anderson et Arneric, 1994). Notre conclusion est que les sites de la $[125I]cotinine$ sont de nature nicotinique mais qu'ils sont distincts des sites de la $[3H]nicotine$ et de $[125I]alpha-Bgt$. Elle s'appuie d'une part sur les affinités déterminées pour la nicotine, l'alpha-Bgt, la cotinine et l'anabasine et d'autre part sur la distribution régionale des sites de ce nouveau radioligand (**Figure 35**). En effet, les sites de la $[3H]nicotine$ et de la $[125I]alpha-Bgt$ ont été rapportés plus abondants dans le cortex par rapport au cervelet (Marks et Collins, 1982). Les sites de ce nouveau radioligand sont plus abondants, dans le cervelet ($P < 0,02$).

Cette conclusion est également en accord avec les données de la littérature. En effet, la cotinine a été rapportée, ayant une très faible affinité pour les sites de la $[3H]nicotine$ (Anderson et

Arneric, 1994) et pour les sites de la *[3H]nicotine* et *[125I]alpha-Bgt* de l'organe électrique de *Torpedo* (Bruniquel et al., 1992). Nous avons, pour notre part, contribué à ces estimations et nos résultats montrent que la cotinine a également une faible affinité pour les sites neuronaux de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt* (**Figure 34**). Ces résultats montrent que les sites de la *[125I]cotinine* sont des sites nicotiniques distincts de ceux de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt*. Cette conclusion est en accord avec les données de la littérature sur la fixation de la cotinine, ses activités et ses effets comportementaux.

Conclusion.

La **cotinine** a des effets pharmacologiques et **comportementaux distincts** de ceux de la **nicotine**. Ses interactions avec la nicotine, sa fixation sur les sites de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt* périphériques et centraux et son passage dans le cerveau ont permis de postuler l'existence de **sites spécifiques** pour **ses actions centrales**. L'utilisation de la *[125I]cotinine* a montré que ce radioligand permet d'étudier certains sites. Ces **sites** sont proposés **nicotiniques** et **distincts** de ceux de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt*. Cependant, s'agit-il d'un vrai récepteur ou non, est-il différent ou non du récepteur de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt*, ou juste une classe de sites (allostériques ou non compétitifs) de ces mêmes récepteurs, quelles sont ses sous-unités constitutives, sa localisation cérébrale et quel est le niveau de ses interactions non spécifiques ? Nous ne pouvons répondre à ces questions avec les méthodes de la présente étude.

Chapitre VI : La [125I]cotinine : une nouvelle sonde pour étudier les récepteurs nicotiniques neuronaux de la cotinine

L'absence de fixation de la [125I]cotinine sur le nAChR de l'organe électrique du poisson *Torpedo*, la compétition partielle de la cotinine pour les sites périphériques de la [3H]nicotine et de la [125I]α-Bgt et sa faible affinité pour les sites centraux de ces deux radioligands, suggèrent que la cotinine agit probablement par des sites récepteurs centraux non marqués par ces deux radioligands. L'usage de la [125I]cotinine nous a permis d'identifier des sites neuronaux, avec un profil pharmacologique nicotinique et une distribution régionale dans le cerveau de rat, différents de ceux de la [3H]nicotine et de la [125I]α-Bgt. Cependant, s'agit-il d'un récepteur différent ou non du récepteur de la [3H]nicotine, supposé être α4β2 (Flores et al., 1992) et du récepteur à la [125I]α-Bgt, supposé être α7 (Couturier et al., 1990) ou uniquement d'une classe de sites (sites non compétitifs du canal du nAChR, sites allostériques à l'interface du récepteur et de la membrane) de ces mêmes récepteurs ? Nous n'avons pas répondu à ces questions avec les méthodes utilisées dans les études précédentes. La localisation cérébrale précise des récepteurs à la cotinine permettra de donner une réponse.

Matériels et méthodes.

Les cerveaux de rat entiers ont été conditionnés comme décrit dans la littérature (Clarke et al., 1985) pour l'étude autoradiographique et les membranes de six régions cérébrales ont été préparées à partir de 2-3 cerveaux entiers comme décrit dans MATÉRIELS et MÉTHODES pour l'étude sur membranes. Dans ces études, le poids des rats était de 480-520 g.

Résultats.

1- Contribution d'un sous-type de site nicotinique dans la fixation de la $[125I]$ cotinine :

* compétition de la nicotine et de la cotinine pour les sites de fixation de la $[125I]$ cotinine.

La comparaison de l'affinité de la nicotine et de la cotinine pour les sites de la $[125I]$ cotinine montre que la cotinine est 10^6 fois plus affine que la nicotine (**Figure 36**).

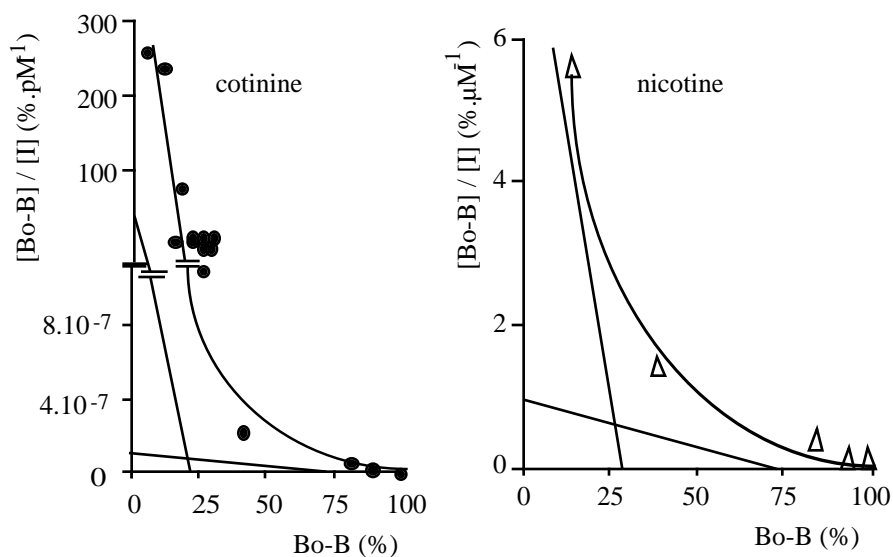


Figure 36 : Représentation par Scatchard de la compétition de la nicotine et de la cotinine pour les sites de fixation de la $[125I]$ cotinine dans les membranes du bulbe du cerveau de rat.

La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de différentes concentrations de nicotine ou de cotinine jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les données de la compétition ont été transformées en Scatchard par : $Lié = \% \text{ inhibition}$ et $Lié/Libre = \% \text{ inhibition}/[\text{compétiteur}]$. Les résultats ont été analysés par le programme Enzfitter. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicata. La LNS a été déterminée en présence de cotinine 20 mM .

* Nature nicotinique des sites de haute affinité de la cotinine : pour étudier les sites de fixation de haute affinité de la cotinine et confirmer leur nature nicotinique, nous avons utilisé la cotinine $2 \cdot 10^{-4}$ M pour définir la LNS et trois compétiteurs (**Figure 37**). La cytisine (ligand nicotinique pur) montre une affinité ($IC_{50} = 10$ nM) 10^4 fois supérieure à celle de l'anabasine (ligand nicotinique) ($IC_{50} = 100$ μ M) et 10^6 fois supérieure à celle de l'arécoline (ligand muscarinique) ($IC_{50} = 10$ mM) pour les sites de haute affinité de la cotinine.

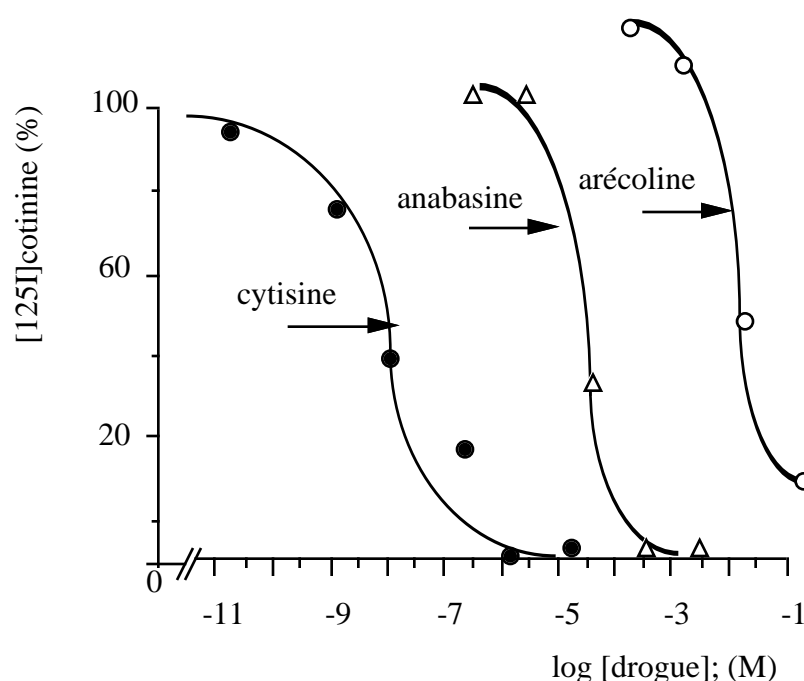


Figure 37 : Compétition de la cytisine, l'anabasine et de l'arécoline pour les sites de haute affinité de la cotinine dans les membranes du cerveau de rat.

La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence des concentrations indiquées de cytisine, anabasine ou arécoline jusqu'à l'équilibre (1-2 h). Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicata. La LNS a été déterminée en présence de cotinine $2 \cdot 10^{-4}$ M.

* Distribution régionale des sites de haute affinité de la cotinine dans le cerveau de rat : nous avons testé l'affinité de la cotinine pour les sites du radioligand dans six régions cérébrales. La distribution des sites de haute affinité (LNS = 2.10^{-4} M) de la cotinine est : bulbe = hippocampe > cervelet > noyau caudé > thalamus > cortex (**Figure 38**).

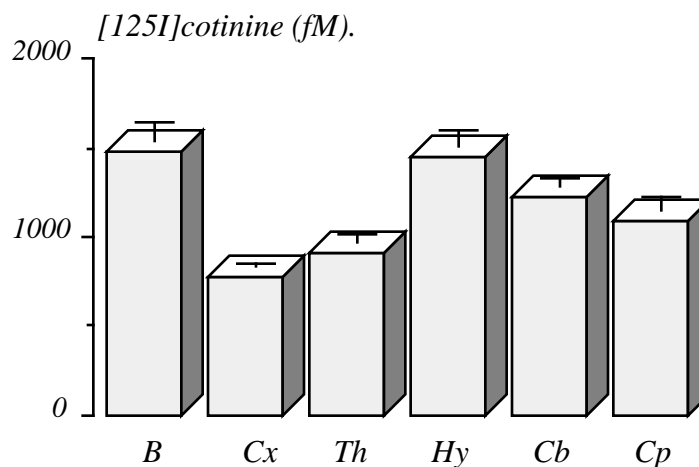


Figure 38 : Distribution régionale des sites de fixation de haute affinité de la cotinine dans les membranes de cerveau de rat.

La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) des régions indiquées (B, bulbe; Cx, cortex; Th, thalamus; Hy, hippocampe; Cb, cervelet; Cp, noyau caudé) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de cotinine 2.10^{-4} M (LNS) jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs de LT-LNS correspondent à la moyenne \pm SE de 3 expériences réalisées en triplicata.

La distribution obtenue : bulbe = hippocampe > cervelet > noyau caudé > thalamus > cortex est légèrement différente de celle obtenue auparavant lorsque la cotinine 20 mM est utilisée pour définir la LNS (**Tableau 19**) : hippocampe = cervelet > bulbe > cortex \geq thalamus > noyau caudé.

Pour définir l' IC_{50} de la cotinine pour ses sites de haute affinité dans ces régions cérébrales, nous avons dressé les courbes d'inhibition, avec une gamme de 8-9 concentrations de cotinine allant de 10^{-13} à 10^{-4} M (**Figure 39**).

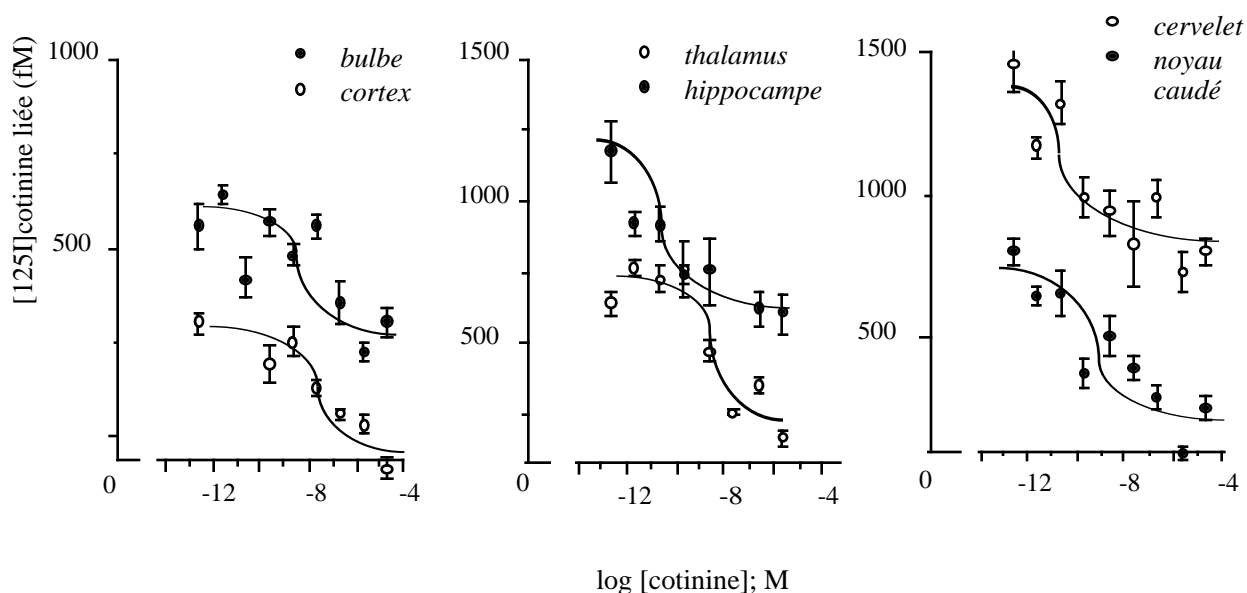


Figure 39 : *Identification et distribution des sites de fixation de haute affinité de la cotinine*

La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) des régions indiquées a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de 8-9 concentrations de cotinine allant de 10^{-13} à 10^{-4} M jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SEM de $n \geq 3$ expériences réalisées en triplicata.

Ces expériences montrent que la cotinine inhibe la fixation du radioligand sur l'ensemble des sites. Cependant la cotinine, par rapport au radioligand, montre trois sites (IC_{50}) différents selon la région analysée et un site (IC_{50}) commun à toutes les régions (**Tableau 19**) : un site de très haute affinité ($IC_{50} = 13 \text{ pM}$) dans le cerevet et dans l'hippocampe ($IC_{50} = 32 \text{ pM}$), un site de haute affinité ($IC_{50} = 1 \text{ nM}$) dans le noyau caudé, le thalamus ($IC_{50} = 2 \text{ nM}$) et dans le bulbe ($IC_{50} = 3 \text{ nM}$), un site de moyenne affinité ($IC_{50} = 2 \text{ }\mu\text{M}$) dans le cortex et un site majoritaire ($\geq 57\%$) de

basse affinité ($IC_{50} = 262 \pm 29 \mu M$) présent dans toute les régions analysées. De 10^{-13} à 10^6 M, la cotinine montre une population homogène de sites récepteurs (**Figure 39**). La distribution de ce dernier est : thalamus \geq hippocampe > cervelet > noyau caudé > bulbe > cortex.

Tableau 19 : Comparaison de la distribution des sites de haute et de basse affinité de la cotinine dans le cerveau de rat.

*La fraction membranaire (1 mg.ml^{-1} protéines) des régions indiquées (B, bulbe; Cx, cortex; Th, thalamus; Hy, hippocampe; Cb, cervelet; Cp, noyau caudé) a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (liaison totale, LT) ou en présence de cotinine 10^{-13} à 2.10^{-4} M jusqu'à l'équilibre. Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs de LT-LNS correspondent à la moyenne \pm SEM de ≥ 3 expériences réalisées en triplicata. L' IC_{50} , concentration inhibant 50% de la fixation du radioligand sur le site de haute affinité a été estimée graphiquement à partir des courbes de la **Figure 39**. HA, haute affinité; BA, basse affinité.*

région cérébrale	proportion des sites de la cotinine (% \pm SEM)			
	HA	IC_{50} (M)	BA	IC_{50} (M)
bulbe (B)	37 ± 7	3.10^{-9}	63 ± 7	$2.5.10^{-4}$
cortex (Cx)	37 ± 3	2.10^{-6}	63 ± 3	$2.5.10^{-4}$
thalamus (Th)	30 ± 6	2.10^{-9}	70 ± 6	$3.2.10^{-4}$
hippocampe (Hy)	39 ± 6	32.10^{-12}	61 ± 6	$2.5.10^{-4}$
cervelet (Cb)	37 ± 4	13.10^{-12}	63 ± 4	$2.5.10^{-4}$
noyau caudé (Cp)	43 ± 3	10^{-9}	57 ± 8	$2.5.10^{-4}$

Ces résultats suggèrent une distribution discrète des différents sites de la cotinine selon la région cérébrale considérée. Une estimation du B_{\max} du site de haute affinité par la méthode de

Swillens (1992) donne des valeurs de l'ordre de 1 et de 60 fmole.mg⁻¹ protéine respectivement pour le site pM et le site nM. Pour le site μM et le site de BA, l'estimation donne respectivement 120 pmole.mg⁻¹ protéine et 12 nmole.mg⁻¹ protéine.

2- Étude autoradiographique des sites de la [125I]cotine dans le cerveau de rat :

* quantification des sites de la [125I]cotine : une quantification autoradiographique des sites de la [125I]cotine a été réalisée sur des coupes rostro-caudales de cerveau de rat (**Figure 40**).

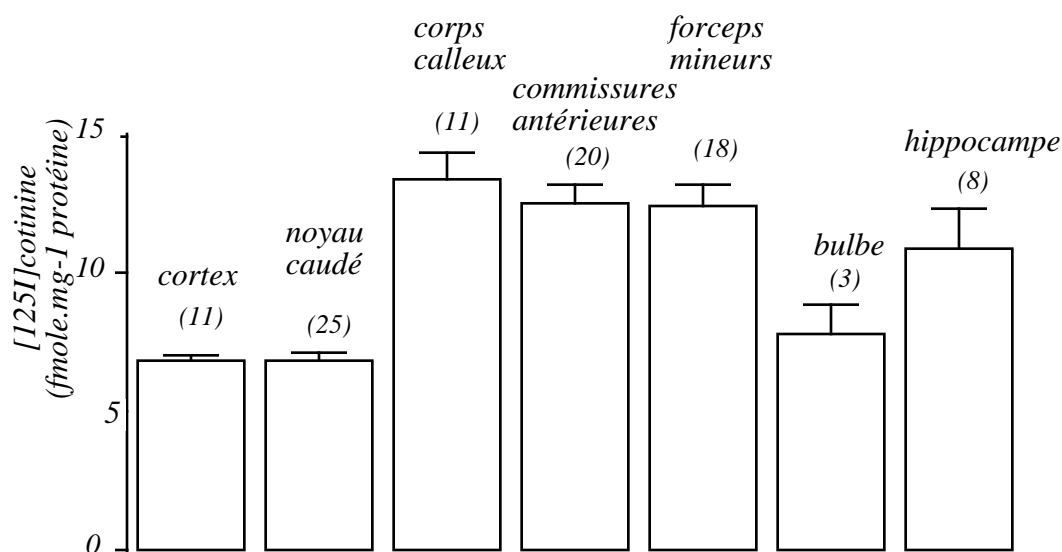


Figure 40 : *Quantification autoradiographique des sites de la [125I]cotine.*

Des coupes frontales de cerveau de rat de 10 μm ont été obtenues dans la direction rostro-caudale. Elles ont été marquées par la [125I]cotine et exposées, en présence de standards (microscales AMERSHAM), sous film autoradiographique (KODAK X-OMAT AR). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (le nombre de coupes analysées est indiqué entre parenthèses) des densités déterminées grâce à un analyseur d'images (BIOCOM).

* visualisation des sites de fixation de la $[125I]$ cotinine et comparaison avec les sites de la $[3H]$ nicotine et de la $[125I]$ alpha-Bgt : la **Figure 41** montre le marquage obtenu avec la $[125I]$ cotinine. La comparaison de ce marquage avec celui rapporté par Clarke et al., (1985), montre que la $[125I]$ cotinine marque spécifiquement certaines structures cérébrales, comme les commissures antérieures, le corps calleux... Ces structures et d'autres (**Tableau 20**) ne sont pas marquées par la $[3H]$ nicotine et la $[125I]$ alpha-Bgt (**Figure 41**, **Tableau 20**).

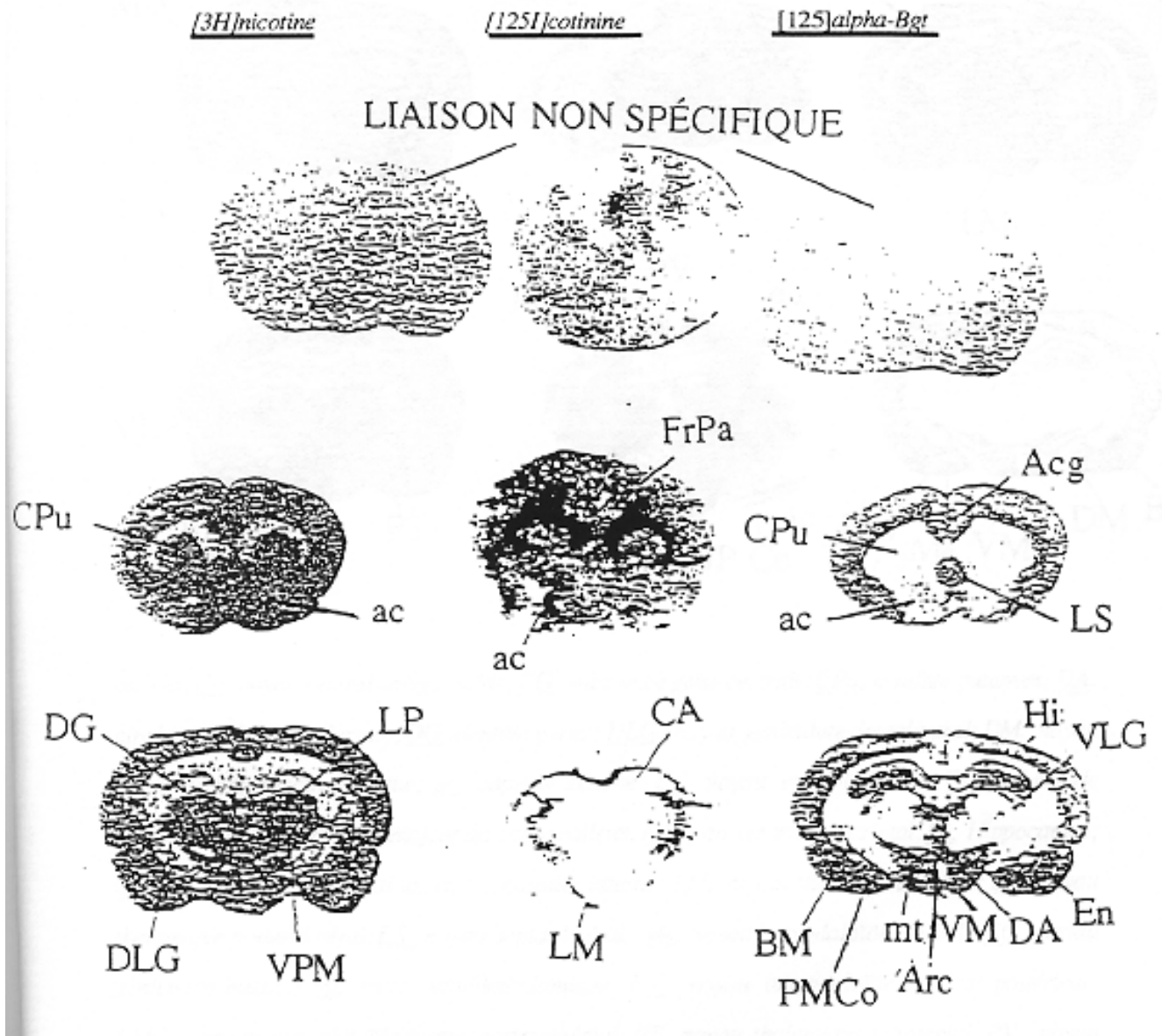
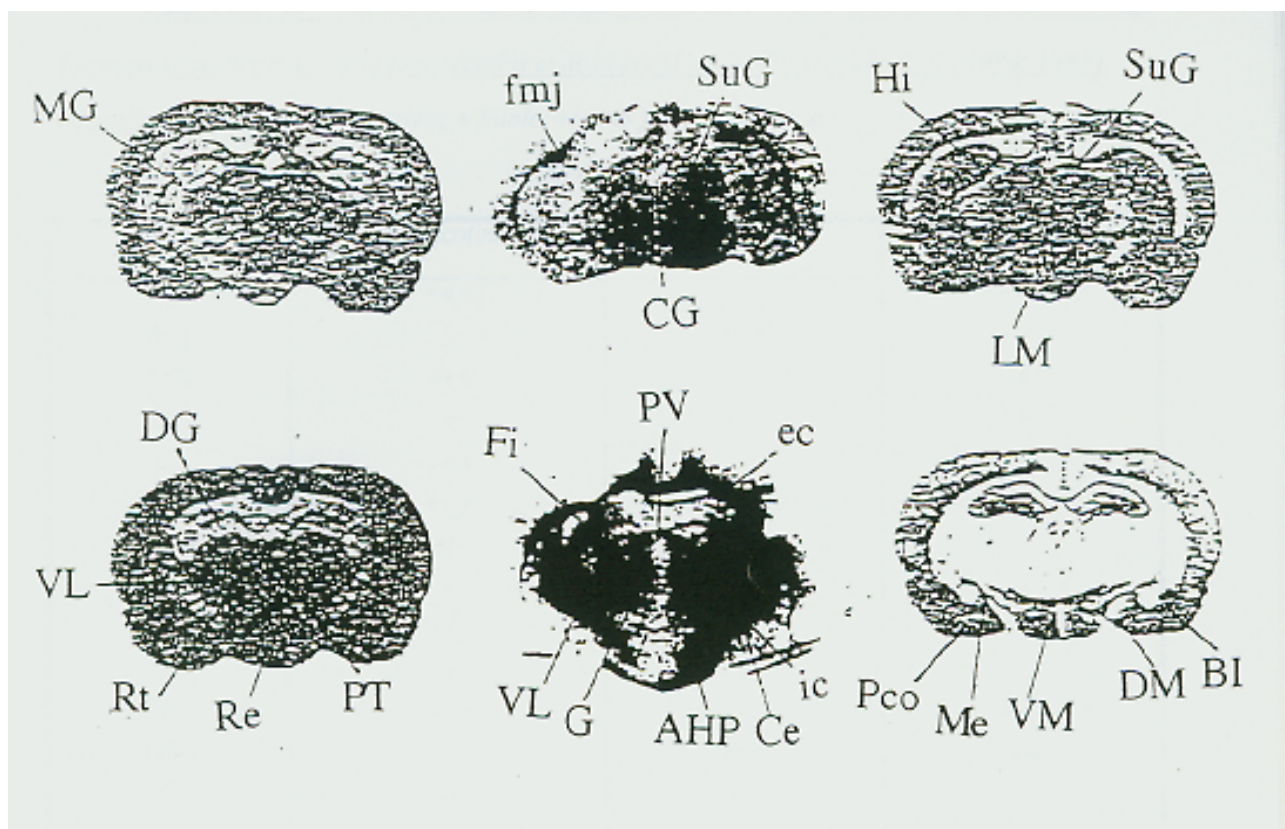


Figure 41 : *Images autoradiographiques montrant le marquage obtenu pour la [125I]cotonine, la [3H]nicotine et la [125I]alpha-Bgt sur des coupes rostro-caudales de cerveau de rat. Légende : ac, commissures antérieures; Acg, cortex cingulate antérieur; AHP, aire antérieure hypothalamique; Arc, noyau arcuate hypothalamique; BL, noyau basolatéral amygdaloïde; BM, noyau amygdaloïde basomédial; CA, zone des cornes d'Ammon de l'hippocampe; cc, corps calleux; Ce, noyau central amygdaloïde; CG, substance grise centrale; CPu, caudate-putamen; DA, aire hypothalamique dorsale; DG, dentate gyrus; DLG, noyau geniculate dorsolatéral; DM, noyau dorso-médial hypothalamique; ec, capsule externe; En, noyau endopiriforme; Fi, fimbria de l'hippocampe; fmj, forceps majeur du corps calleux; FrPa, cortex fronto-pariétal; Hi, Hippocampe; G, noyau thalamique gelatinosus*



; ic, capsule interne; LM, noyau mamillaire latéral; LP, noyau thalamique posterolatéral; LS, noyau septal latéral; Me, noyau amygdaloïde médial; MG, noyau geniculate médial; mt, tract mammillothalamique; Pco, noyau amygdaloïde cortical postérieur; PMCo, noyau amygdaloïde corticoposteromédial; PT, noyau thalamique paraténial; PV, noyau thalamique paraventriculaire; Re, noyau thalamique reuniens; Rt, noyau thalamique reticular; SuG, couche grise superficielle du collicule supérieur; VL, noyau thalamique ventrolatéral; VLG, noyau geniculate ventro-latéral; VM, noyau ventrolatéral hypothalamique; VPM, partie médiale du noyau thalamique posteroventral.

Tableau 20 : *Analyse qualitative de la distribution des sites de la [125I]cotinine.**Comparaison avec ceux de la [3H]nicotine et de la [125I]alpha-Bgt (Clarke et al., 1984; 1985).**Légende* : +++, dense; ++, moyen; + faible; +/- très faible; - absence.

structures	[125I]cotinine	[3H]nicotine	[125I]alpha-Bgt
ac	+++	-	-
Acg	-	+++	-
AHP	+++	-	+++
BL	+	-/+	+++
cc	+++	-	-
Ce	+++	-	-
CPu	+/-	++	-
DG	-	-	-
DM	-	+/-	+++
ec	+++	-	-
Fi	+++	-	+++
FrPa	-	+++	++
G	++	++	-
ic	+++	-	-
LS	-	+/-	+++
Me	-	+/-	+++
Pco	-	+	+++
PT	+++	-	-
PV	+/-	+++	-
Re	-	+++	+/-
Rt	+/-	+++	-
VL	-	++	-
VM	-		+

Discussion.

La conclusion majeure de la présente étude est que la *[125I]cotinine* **marque**, dans le cerveau de rat et dans les conditions expérimentales adoptées, **une population de récepteurs** nicotiques, jusqu'à preuve du contraire, **distincte** de celle des récepteurs de la *[3H]nicotine* et la *[125I]alpha-Bgt*.

La nature nicotinique des sites de la *[125I]cotinine* a été suggérée par l'affinité (IC_{50} μ M) de la nicotine pour ces sites (**Figure 36**). Cependant, le K_d de la nicotine est 10^6 fois plus élevé que celui de la cotinine. Ce résultat pourrait remettre en doute la nature nicotinique des sites du radioligand. Pour tester cette éventualité, nous avons utilisé l'arécoline, un ligand moins sélectif pour les sites nicotiques de la *[3H]nicotine* (K_i 115 nM) que pour les sites muscariniques de la *[3H]oxotrémorine* (K_i = 17 nM), la cytosine, un ligand sélectif des sites nicotique de la *[3H]nicotine* ($K_i \leq 1$ nM) (Anderson et Arneric, 1994) et l'anabasine, un compétiteur de la *[3H]nicotine* (IC_{50} = μ M) (Sloan et al., 1984). Les résultats obtenus avec ces compétiteurs montrent que les sites de la *[125I]cotinine* ont un profil pharmacologique nouveau. Leur nature nicotinique est suggérée par le fait que la fixation du radioligand n'est inhibée que par les compétiteurs nicotiques et l'affinité de la cytosine et de l'anabasine par rapport à l'arécoline (**Figure 37**). Cependant, il est peu probable de retrouver le profil pharmacologique des sites nicotiques de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt*.

L'analyse de la distribution des sites de la cotinine dans le cerveau de rat montre la contribution d'un site majoritaire ($\geq 57\%$), de basse affinité ($IC_{50} \geq 10^{-4}$ M) et un site minoritaire ($< 43\%$) de haute affinité ($IC_{50} < 10^{-4}$ M) dans la fixation du radioligand (**Tableau 19**). Il faut noter que la distinction de ces deux affinités est fondée sur les études de compétition avec la cotinine et quelques autres compétiteurs (voir Chap. IV). L'affinité de la cotinine est la même pour son site de basse affinité marqué par le radioligand dans les six régions analysées alors que son affinité pour le site de haute affinité dépend fortement de la région considérée (**Figure 39, Tableau 19**). Le cervelet et l'hippocampe montrent un site pM pour la cotinine, le bulbe, le thalamus et le noyau

caudé un site nM et le cortex un site μM (**Tableau 19**). Cette multiplicité des sites de haute affinité pour la cotinine pourrait résulter de la présence de sites récepteurs distincts et/ou d'une désensibilisation plus ou moins importante d'un même site récepteur suivant la région cérébrale considérée. En effet, ces membranes ont subi strictement les mêmes conditions expérimentales de préparation et d'analyse. La présence d'un site majoritaire de basse affinité pour la cotinine et la détection d'un seul site récepteur dans les expériences de saturation avec la $[125\text{I}]$ cotinine (Chap. IV) soulignent la contribution de la désensibilisation de ces récepteurs dans la multiplicité des sites de la cotinine. Cette interprétation est également admise pour les sites récepteurs de la $[3\text{H}]$ nicotine (Ochoa, 1994; Galzi et Changeux, 1995). Cependant, notre étude montre, comme d'autres études (Sloan et al., 1984; Anderson et Arneric, 1994), que la désensibilisation du récepteur, ne fausse pas l'empreinte pharmacologique du récepteur étudié.

L'analyse quantitative de la densité des sites de la $[125\text{I}]$ cotinine sur coupe de cerveau de rat (**Figure 40**) montre une densité de 7-15 fmole.mg⁻¹ protéine (soit ≤ 1 fmole.mg⁻¹ tissu frais). Cette densité est environ 80 fois plus basse que celle rapportée pour les sites de la $[3\text{H}]$ nicotine (Clarke et al., 1984). La densité de ces derniers est comparable à celle des sites de la $[125\text{I}]$ alpha-Bgt (Lindstrom, 1995). La **comparaison de la distribution** des sites de la $[125\text{I}]$ cotinine, de la $[3\text{H}]$ nicotine et de la $[125\text{I}]$ alpha-Bgt (**Figure 41, Tableau 20**) montre que le **marquage** obtenu avec ces trois radioligands est **différent**. Ce résultat confirme la conclusion majeure de notre étude.

Conclusion.

Cette étude a montré que la **cotinine** se fixe sur **des récepteurs centraux**. La nature nicotinique de ces récepteurs est fondée sur leur profil pharmacologique. Cependant, s'il est clair que les récepteurs de la cotinine sont **moins abondants** que ceux de la $[3\text{H}]$ nicotine et de la $[125\text{I}]$ alpha-Bgt, qu'ils ont une **faible affinité** pour l'ensemble des **compétiteurs nicotiques**

testés, et qu'ils sont distincts de ceux marqués par les radioligands nicotiques [*3H*]nicotine et [*125I*]alpha-Bgt, leur nature nicotinique devrait être confirmée par d'autres études, comme l'effet *in vivo* de la nicotine sur leur modulation et par leur séquençage.

Chapitre VII : Solubilisation et purification du récepteur de la cotinine du cerveau de rat

Bien que le profil pharmacologique du récepteur de la cotinine soit de nature nicotinique, que ce récepteur soit différent de celui qui fixe la $[3H]nicotine$ et la $[125I]alpha-Bgt$, la localisation du site de fixation de la cotinine, au sein de son récepteur, est une étape indispensable pour concevoir une méthode de purification de ce récepteur. Cette purification permettra le séquençage pour identifier les sous-unités constitutives du récepteur et de confirmer définitivement sa nature nicotinique. En effet, un nAChR présente un site commun pour les agonistes et les antagonistes compétitifs, un site de haute affinité pour les antagonistes non compétitifs au sein du canal et 20 à 30 sites modulateurs de basse affinité à l'interface lipide-protéine. La présente étude tentera de solubiliser afin de purifier ce récepteur. C'est donc une approche, du moins en partie, pour la localisation du site au sein de la protéine réceptrice.

Matériels et méthodes.

Nous avons utilisé du CHAPS comme détergent pour solubiliser les sites récepteurs de la cotinine du cerveau de rat. Nous avons synthétisé, par amidification de la carboxycotinine par la propylamine, la N,n-propyl carboxamide cotinine. Le produit de la synthèse a été identifié par CCM, IR et RMN. L'affinité de la carboxycotinine et de la N,n-propyl carboxamide cotinine pour les sites de fixation de la $[125I]cotinine$ a été testée en parallèle avec la cotinine. La N,n-propyl carboxamide cotinine a une structure chimique voisine du bras espaceur de la colonne d'affinité que nous avons synthétisé par amidification de la carboxycotinine par un gel EAH SÉPHAROSE^R 4B (PHARMACIA BIOTECH). Le poids des rats utilisés dans ces expériences était de 550-580 g.

Résultats.

* Compétition de la cotinine et de la carboxycotinine pour les sites de fixation de la $[125I]$ cotinine : la carboxycotinine, jusqu'à 10 mM, n'inhibe pas la fixation du radioligand. Dans les mêmes conditions expérimentales, la cotinine montre un IC_{50} inférieur au mM (**Figure 42**).

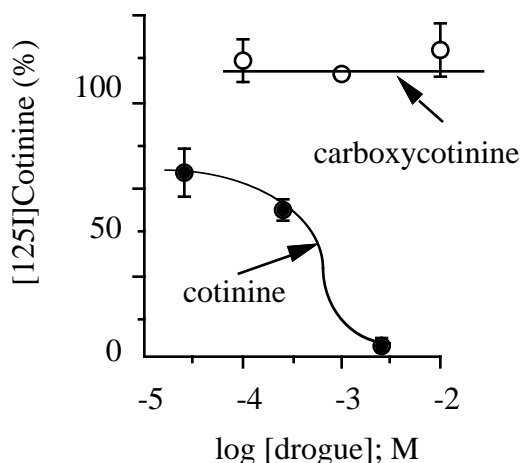


Figure 42. Compétition de la cotinine et de la carboxycotinine pour les sites de fixation de la $[125I]$ cotinine des membranes de cerveau de rat.

La fraction membranaire a été incubée en présence de 67 pM de radioligand seul (LT) ou en présence des concentrations indiquées de cotinine ou de carboxycotinine jusqu'à l'équilibre (1-2 h). Les essais ont été filtrés et la radioactivité sur les filtres a été comptée. Les valeurs correspondent à la moyenne \pm SE de 3 expériences réalisées en triplicata.

* Caractérisation de la N,n-propyl carboxamide cotinine : l'analyse par CCM des produits obtenus lors de la synthèse de la N,n-propyl carboxamide cotinine montre quatre produits : deux produits majoritaires avec un $R_f = 0,59$ et un $R_f = 0,71$, un produit minoritaire avec un $R_f = 0,91$ et la carboxycotinine avec un $R_f = 0,15$. Ces produits ont été purifiés par chromatographie sur colonne de silice. Le produit dont le $R_f = 0,71$ apparaît progressivement au cours du temps de la réaction de synthèse et est obtenu avec un rendement de 2%. L'analyse IR de ce dernier (**Figure 43 a**) montre une fonction amide (3110 cm^{-1}), une fonction C=O de l'amide ($1640\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$), des groupements -CH alkyls ($2900\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$) et -NH (1580 cm^{-1}). L'analyse ^{13}C .RMN (**Figure 43 b**) montre 16

carbones au lieu des 14 de la N, n-propyl carboxamide cotinine ($C_{14}H_{19}O_2N_3$). Cependant, on peut localiser sur le spectre les différents carbones de la N, n-propyl carboxamide cotinine. L'analyse 1H .RMN (**Figure** 43 c), plus difficile à interpréter, montre les hydrogènes du cycle pyrimidique (7-9 ppm) et l'intégration (28 hydrogènes au lieu de 19) confirme l'excès de carbone dans l'analyse ^{13}C .RMN.

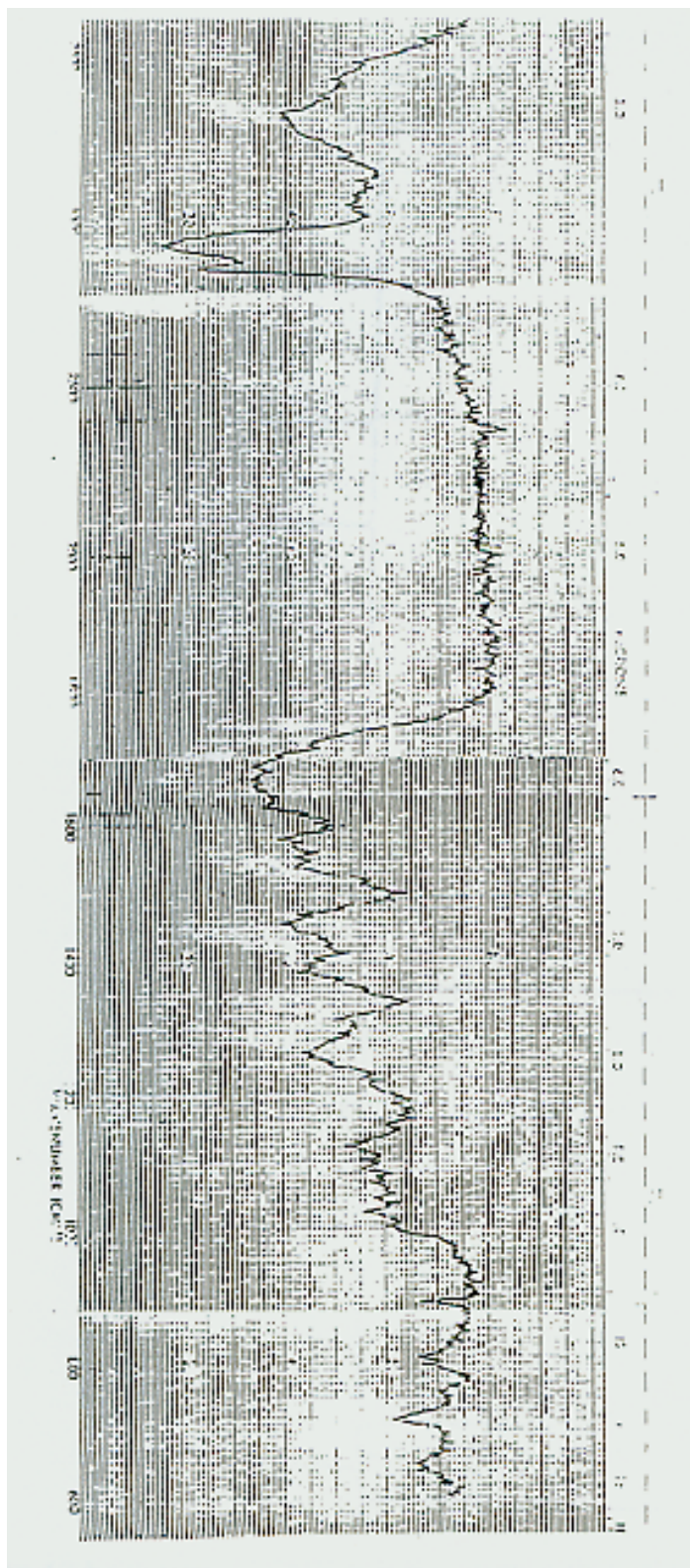


Figure 43 a : Spectre infrarouge (IR) de la N,n propyl carboxamide de cotinine.

Moins de 2 mg de N,n propyl carboxamide de cotinine avec Nujol ont été analysés aux infrarouges.

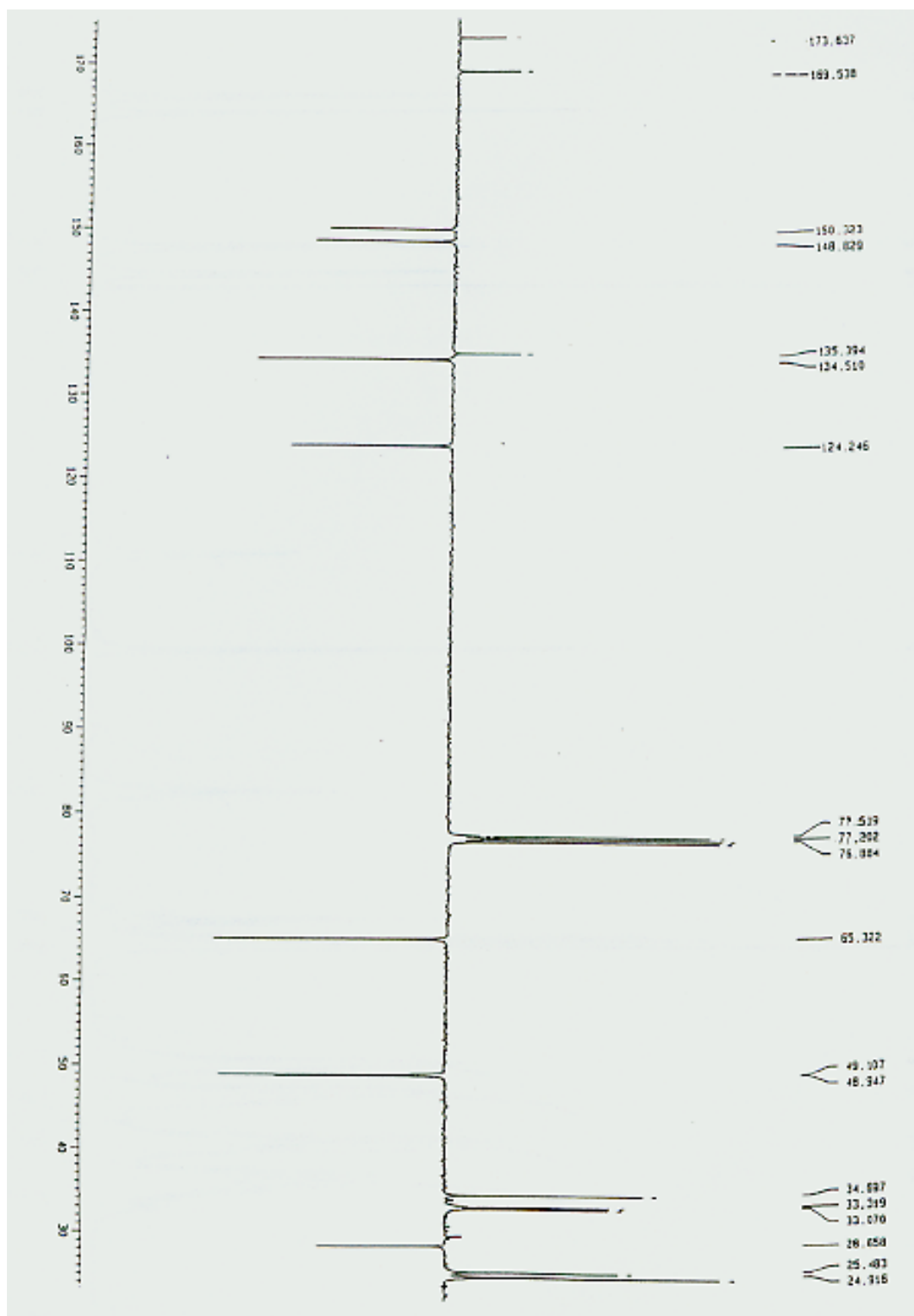


Figure 43 b : Spectre ^{13}C .RMN de la N,n propyl carboxamide de cotinine.

8 mg de N,n propyl carboxamide de cotinine dans CDCl_3 ont été analysés par RMN.

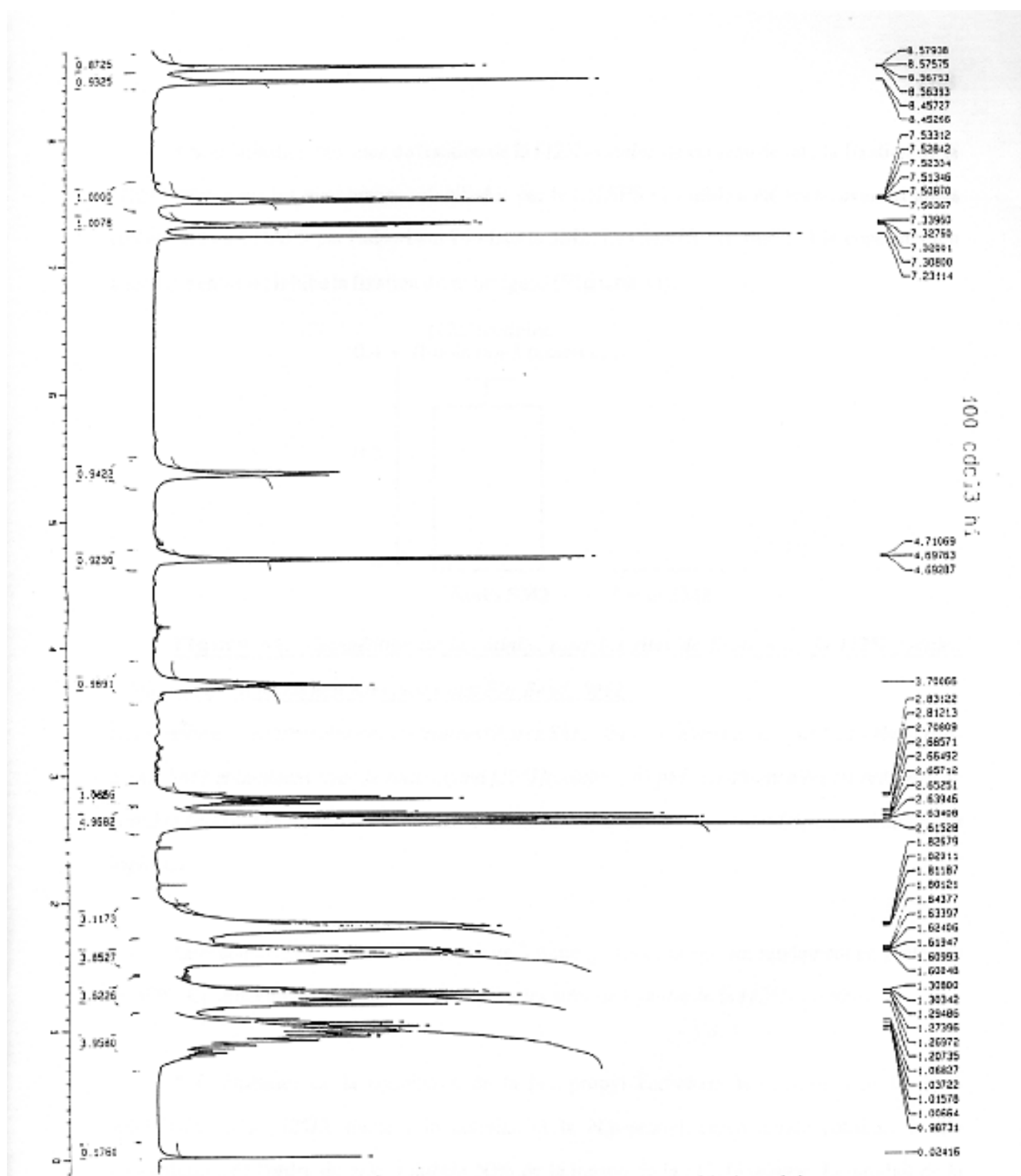


Figure 43 c : Spectre ^1H .RMN de la N,n propyl carboxamide de cotinine.

8 mg de N,n propyl carboxamide de cotinine dans CDCl_3 ont été analysés par RMN.

* Solubilisation des sites de fixation de la $[125\text{I}]$ cotinine de cerveau de rat : la fixation de la $[125\text{I}]$ cotinine sur les membranes solubilisées par le CHAPS (10 mM) a été testée avant et après

enlèvement du CHAPS par l'adsorbant Bio-Beads SM2. Le CHAPS (10 mM > à la concentration micellaire critique) inhibe la fixation du radioligand (**Figure 44**).

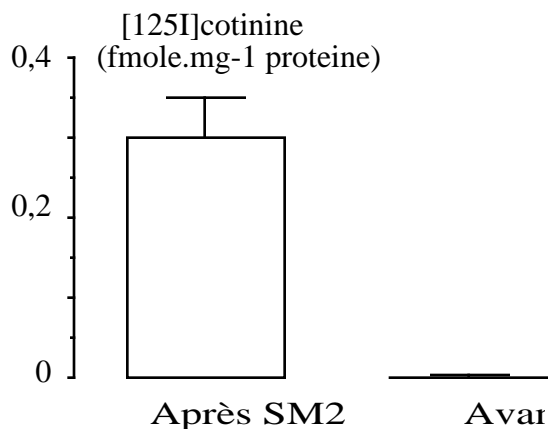


Figure 44. Compétition de la cotinine pour les sites de fixation de la [125I]cotinine solubilisés et traités ou non par l'adsorbant Bio-Beads SM2.

Les membranes solubilisées ont été traitées (Après SM2) ou non (Avant SM2) par l'adsorbant Bio-Beads SM2 et incubées avec le radioligand [125I]cotinine (70 pM) en absence ou en présence de cotinine (mM). Les valeurs représentent la moyenne \pm SE de deux expériences réalisées en triplicata.

Le rendement de la solubilisation est de 5,4 mg.g⁻¹ de tissu soit un rendement en protéines de 30%. Ce rendement est d'environ 50% pour les sites de fixation de la [125I]cotinine.

* Compétition de la cotinine et de la N,n-propyl carboxamide cotinine pour les sites solubilisés de la [125I]cotinine : la cotinine et la N,n-propyl carboxamide cotinine, à une concentration de l'ordre du mM, inhibent 50% de la liaison de la [125I]cotinine. Le produit de la synthèse N,n-propyl carboxamide cotinine est donc un compétiteur comparable à la cotinine pour les sites solubilisés de la [125I]cotinine (**Figure 45**).

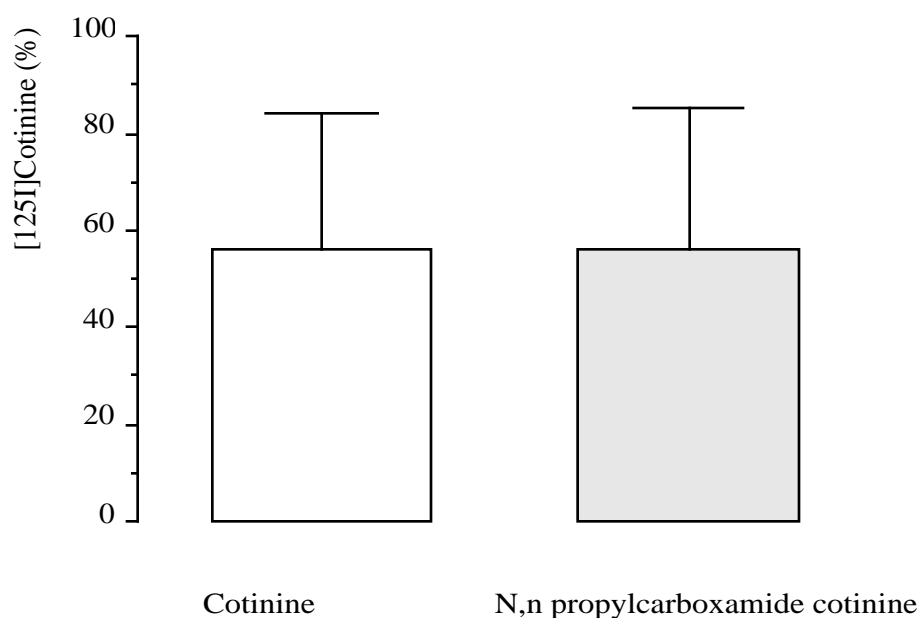


Figure 45. Compétition de la cotinine et de la N,n propyl carboxamide cotinine pour les sites solubilisés de la [125I]cotinine de cerveau de rat.

Les membranes solubilisées ont été traitées par l'adsorbant Bio-Beads SM2 avant l'incubation avec le radioligand [125I]cotinine (70 pM) en absence ou en présence de cotinine et de N,n-propyl carboxamide cotinine (mM). Les valeurs représentent la moyenne \pm SE de deux expériences réalisées en triplicata.

* Chromatographie d'affinité des protéines solubilisées : on retrouve le même profil protéique à la sortie de la colonne (**Figure 46**, gauche). Les fractions 1-10 représentent 59% des protéines déposées, les fractions 11-20 représentent 2% des protéines déposées et les fractions 21-30 représentent 29% des protéines déposées. Les protéines des fractions 11-20 du premier tour de colonne de quatre expériences identiques ont été concentrées et dialysées. Le profil d'éluion de ces protéines montre que la cotinine (1 mM) élue visiblement des protéines (fraction 11-20 **Figure 46**, droite).

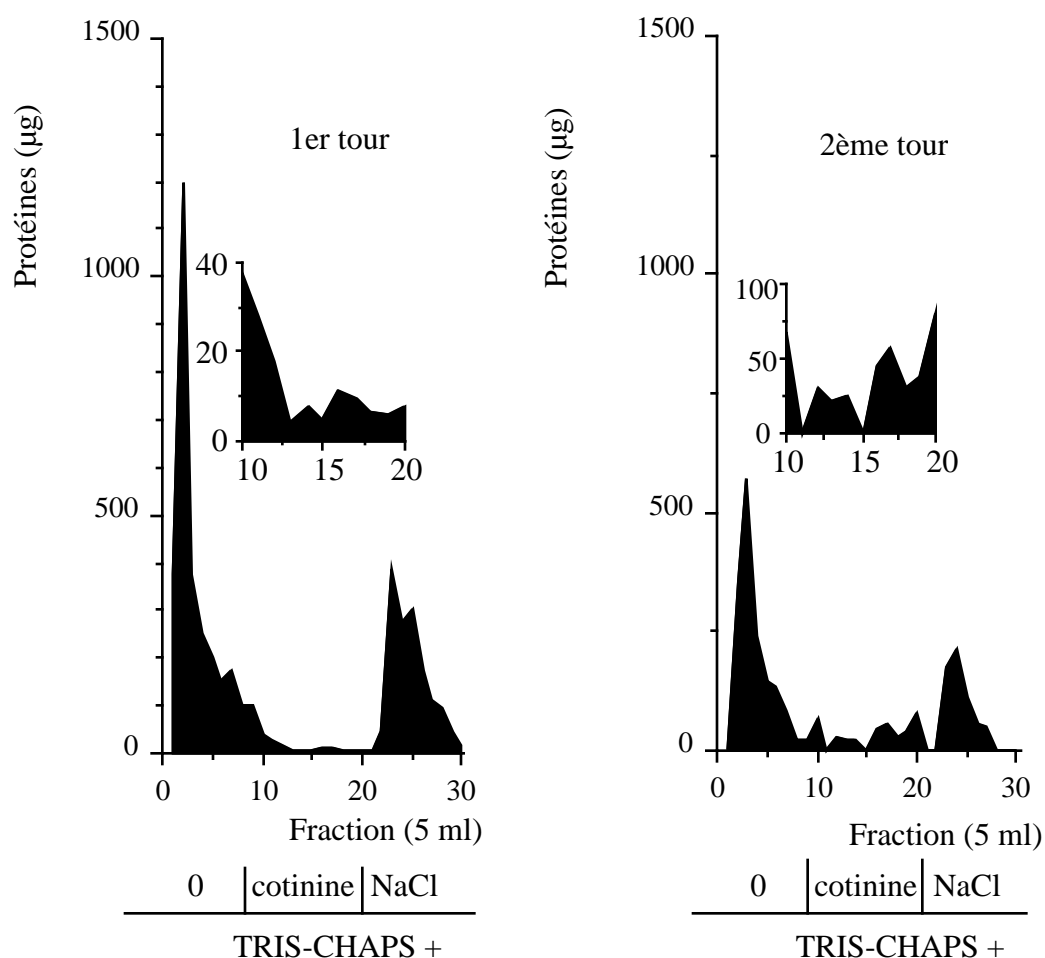


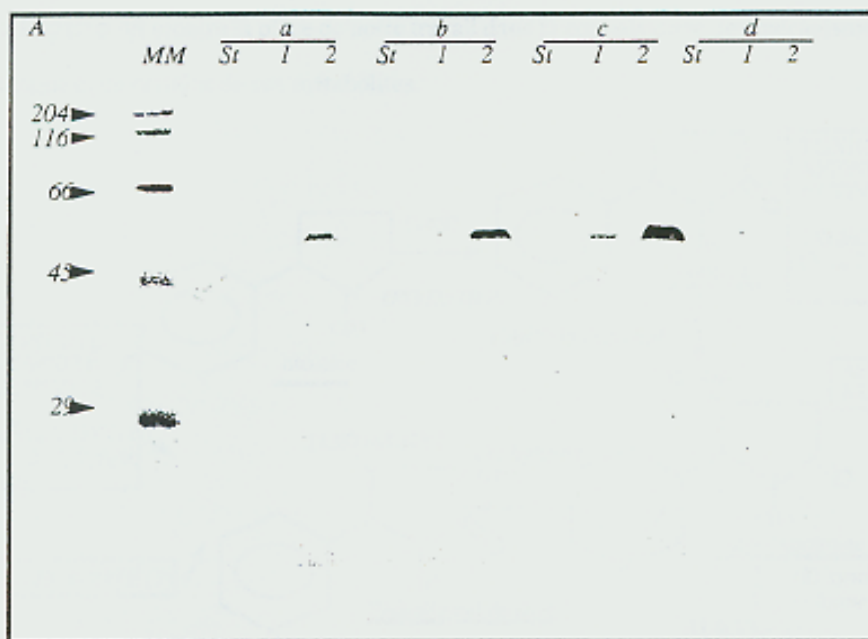
Figure 46 : Profil des protéines éluées de la colonne d'affinité synthétisée par greffage de la carboxycotinine au gel EAH- SÉPHAROSE^R 4B.

Premier tour : il montre une expérience typique où 10 mg de protéines ont été déposés.

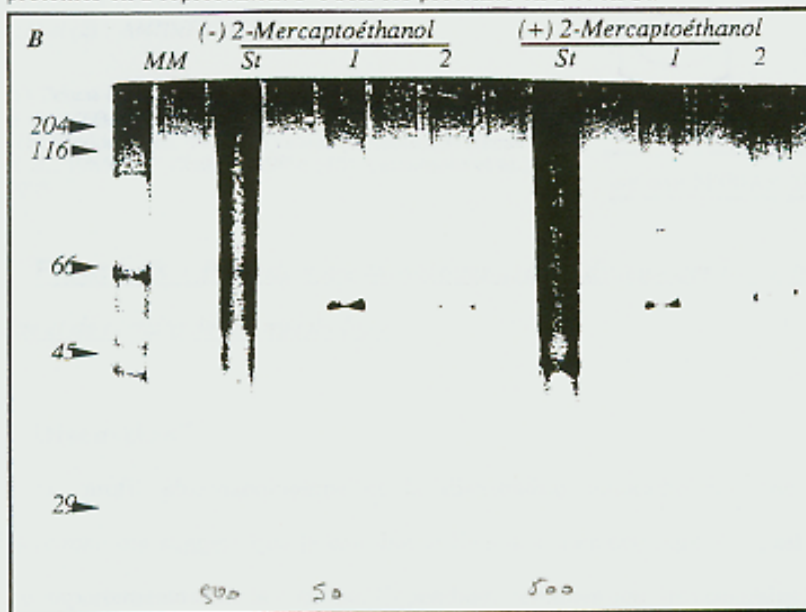
Deuxième tour : 2,72 mg de protéines du premier tour ont été repassées par la colonne.

Ces résultats montrent que la colonne d'affinité n'a pas subi de dégradation notable au cours de la période de son utilisation.

* Analyse SDS-PAGE des protéines éluées de la colonne d'affinité : la coloration au bleu de coomassie (**Figure 47**, haut) révèle une bande majoritaire de masse molaire 55 KDa bien visible lors du premier et du deuxième tour de colonne, alors que les protéines de départ sont en dessous du seuil de détection par cette coloration. La coloration au nitrate d'argent (**Figure 47** bas) montre le même résultat, à savoir une bande de 55 KDa lors du premier et du deuxième tour de colonne.



MM, masse molaire; St, matériel de départ; 1 et 2, premier et deuxième tour de colonne d'affinité; a, b, c et d; respectivement 3, 6, 18 et 1 μ g de protéines déposées. Les protéines en 2 représentent 5-6 fois les protéines en 1 et en St.



50 ng de protéines du même matériel qu'en A ont été analysés par SDS-PAGE et colorés au nitrate d'argent. Le matériel de départ représente 500 ng. L'effet du 2-mercaptoéthanol est montré.

Figure 47: Analyse SDS-PAGE des protéines obtenues par la colonne d'affinité.
A : coloration au bleu de coomassie; B : coloration au nitrate d'argent.

La **Figure 48** montre la place de notre travail dans la connaissance des mécanismes d'action de la nicotine et de certains de ses métabolites.

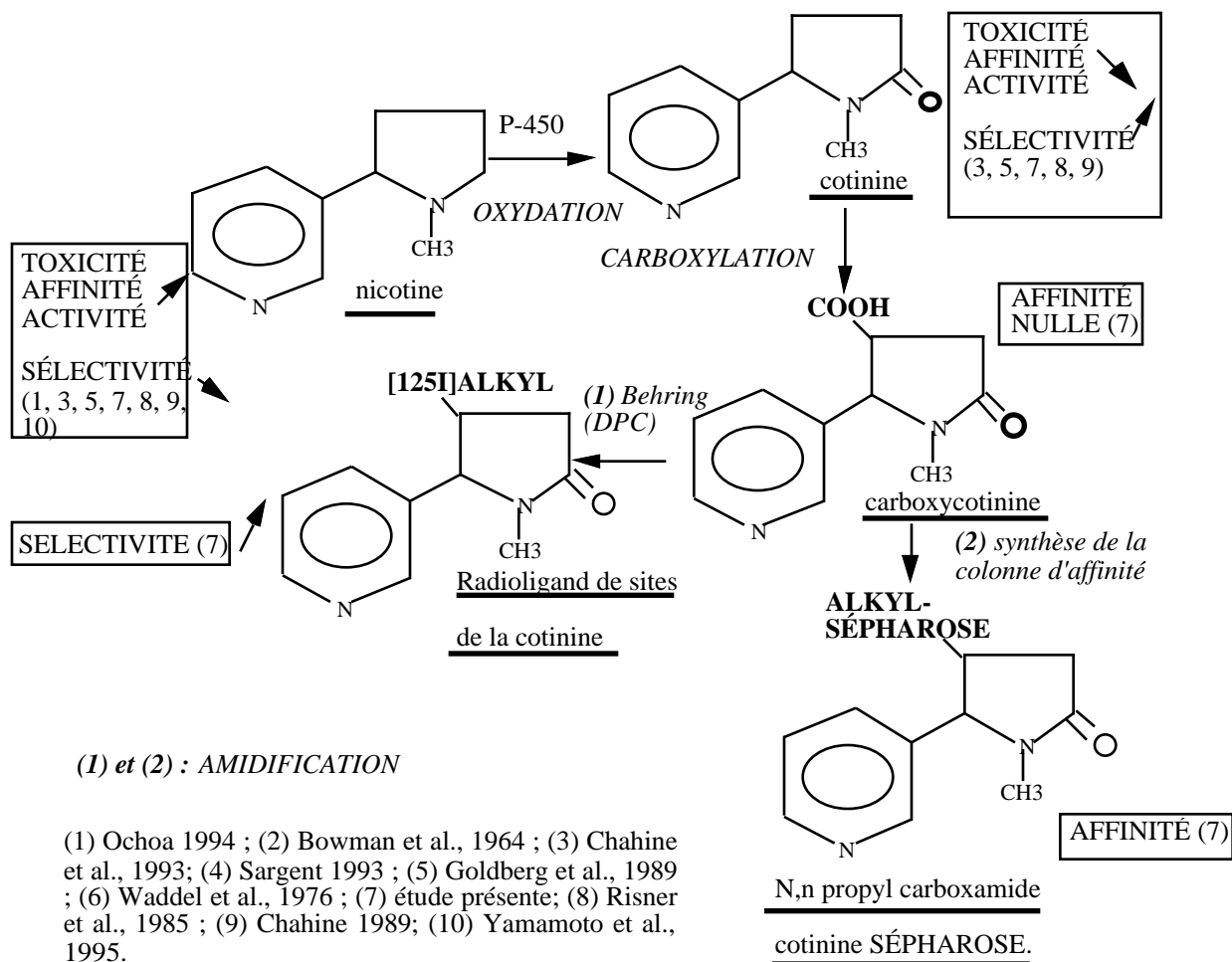


Figure 48 : *Place de notre travail dans la connaissance des mécanismes d'action de la nicotine et de certains de ses métabolites.*

Discussion.

Le profil pharmacologique et la distribution autoradiographique des sites de la $[125I]$ cotinine ont suggéré que la cotinine se lie à des sites centraux. Ceci est en accord avec les effets comportementaux de la cotinine. Cependant, certaines activités centrales de la nicotine et de la cotinine sont différentes chez le rat (Golberg et al., 1989) et d'autres espèces animales (Risner et al., 1985). Les résultats avec l'usage de la $[125I]$ cotinine sont en accord avec la conclusion de ces travaux. Ce radioligand montre un profil pharmacologique nicotinique, mais distinct de celui de la

[3H]nicotine et de la *[125I]alpha-Bgt*. Nous avons conclu que ce radioligand, à côté de la *[3H]nicotine* et de la *[125I]alpha-Bgt*, permet d'étudier une classe de nAChRs. Les sites de la *[125I]cotinine* pourraient donc représenter des récepteurs médiateurs des activités pharmacologiques centrales de la cotinine. Pour identifier la protéine réceptrice de la cotinine et conclure quant à sa nature nicotinique, la purification de celle-ci est une étape indispensable. Pour purifier cette protéine, par une technique rapide et peu onéreuse, nous avons pensé à la chromatographie d'affinité. En effet, cette technique est un outil de choix et la carboxycotinine, disponible sur le marché, est le candidat idéal pour amidifier la fonction amine du bras espaceur d'un gel EAH SÉPHAROSE^R 4-B. Elle a l'avantage de posséder la fonction carboxylique du côté opposé au site actif des ligands nicotiniques comme la *[125I]cotinine* qui nous a servi pour étudier les sites de la cotinine du cerveau de rat. Cependant, la carboxycotinine n'a montré aucune affinité pour les sites *[125I]cotinine* (**Figure 42**).

Nous avons supposé que la fonction carboxylique libre pourrait introduire une gêne stérique empêchant l'interaction ligand-récepteur. En effet, la délocalisation du doublet de l'azote du groupement 3-pyridyl amino méthyle de la nicotine par un groupement électrophile atténue les activités nicotiniques (Yamamoto et al., 1995). Il est donc probable que la fonction cétone de la cotinine explique sa faible toxicité chez la mouche et la souris et que la fonction carboxylique de la carboxycotinine explique sa faible affinité pour les récepteurs de la cotinine. La *[125I]cotinine* est un dérivé carboxylique de la cotinine portant l'iode 125 (communication personnelle du docteur Barlow; BEHRING-DPC). Cette fonction carboxylique est absente de la cotinine et des compétiteurs de la *[125I]cotinine*. Pour vérifier cette hypothèse et évaluer la possibilité d'utilisation d'une colonne d'affinité qui serait obtenue par amidification de la carboxycotinine, nous avons synthétisé la N,n-propyl carboxamide cotinine (**Figure 43**). Bien que cette structure ait été effectivement synthétisée, elle n'est pas pure comme le montre l'analyse RMN. Le contaminant semble être en faible quantité et/ou indécélable par CCM. Sa structure contient deux groupements

CH₂ et 9 hydrogènes comme la propylamine (**Figure 43**). Il est donc probable que celle-ci est restée, fortement adsorbée et/ou liée à la N,n-propyl carboxamide cotinine.

La N,n-propyl carboxamide cotinine obtenue, inhibe comme la cotinine la fixation de la [¹²⁵I]cotinine (**Figure 45**). Dans la colonne d'affinité que nous avons synthétisée, la fonction carboxylique est amidifiée par la fonction amine du bras espaceur du gel (MATÉRIELS ET MÉTHODES). La réaction de synthèse de la N,n-propyl carboxamide cotinine imite exactement la réaction de synthèse de la colonne d'affinité. L'inhibition de la fixation de la [¹²⁵I]cotinine par la N,n-propyl carboxamide cotinine souligne la faisabilité de purification des récepteurs de la cotinine par chromatographie d'affinité (**Figure 46, 47**). La fixation du radioligand dans les membranes solubilisées montre que les sites récepteurs de la cotinine ont gardé l'activité de liaison (**Figure 45, 46**). Le rendement de la solubilisation (50%) des sites [¹²⁵I]cotinine est satisfaisant. Ces résultats suggèrent que le site récepteur de la cotinine n'est probablement pas à l'interface lipide-protéine.

La colonne d'affinité synthétisée nous a permis de purifier une protéine de 55 KDa (**Figure 47**). Le pic protéique élué par la cotinine (**Figure 46**) nous a permis d'estimer un facteur de purification d'environ 200. Les résultats de l'analyse SDS-PAGE sont en accord avec ces estimations. La coloration au bleu de Coomassie révèle une seule bande aussi bien au premier qu'au deuxième tour de colonne. Des taux de purification semblables ont été rapportés avec cette technique pour les sites de la nicotine (Abood et al., 1983). La masse molaire déterminée dans notre étude est comparable à celle rapportée dans la littérature pour la sous-unité $\alpha 3$ du nAChR (Role, 1992). La coloration au nitrate d'argent nous a permis de confirmer l'absence de contaminants avant d'envisager le séquençage de cette protéine.

Conclusion.

Cette étude montre que le **site de fixation de la cotinine** est de **nature protéique**. Sa **masse molaire** est **voisine** de celle de certaines **sous-unités des nAChRs**, plus **particulièrement** la sous-unité $\alpha 3$. La démarche que nous avons suivie pour purifier ce récepteur s'est fondée sur des considérations d'ordre pharmacologique et sur les effets comportementaux de la cotinine. L'hypothèse que la cotinine ait un récepteur nicotinique est attrayante, mais les résultats de l'analyse de la séquence de cette protéine seront seuls en mesure de nous en donner la preuve.

Chapitre VIII : Modulation des nAChRs neuronaux par la nicotine et la cotinine

L'administration d'une substance centralement active induit une augmentation, appelée "up-régulation" ou une diminution, appelée "down-régulation" des récepteurs selon que la substance est respectivement un antagoniste ou un agoniste (Creese et Sibley, 1981). Dans le cas des nAChRs neuronaux l'administration de nicotine induit, soit une up-régulation, soit une down-régulation sans modification apparente des nAChRs périphériques (Ochoa, 1994). Ces modulations sont en faveur de l'hypothèse que la nicotine agirait "*in vivo*" par des récepteurs centraux. Elles représentent également une base moléculaire pour l'interprétation du développement de la tolérance, de la dépendance et des symptômes de manque. Dans ces études, la [3H]nicotine et la [^{125}I]alpha-Bgt ont une place de choix. Nous avons largement identifié et caractérisé les récepteurs de la cotinine mais, l'hypothèse qu'ils soient de nature nicotinique a uniquement été fondée, sur leur profil pharmacologique. De Plus, la faible affinité "*in vitro*" de la nicotine et de la majorité des compétiteurs nicotinniques testés pour les sites de la cotinine iodée pourrait ne pas représenter les interactions "*in vivo*". Le but de cette étude est de comparer l'effet modulateur "*in vivo*" de la nicotine et de la cotinine sur les nAChRs du cerveau de rat. Le marquage par la [^{125}I]cotinine permettra de juger de la place de ce radioligand, à côté de la [3H]nicotine et de la [^{125}I]alpha-Bgt, dans ce genre d'études et de confirmer leur nature nicotinique.

Matériels et méthodes.

Les rats (480-520 g) ont reçu, pendant une semaine, au total 11 injections par voie ip. de nicotine (dose totale 11 mg.kg⁻¹) et de cotinine (dose totale 1,1 g.kg⁻¹, soit 100 fois plus). Après deux jours d'arrêt du traitement, les cerveaux entiers ont été conditionnés comme décrit dans la

littérature (Clarke et al., 1985) pour l'étude autoradiographique et les membranes ont été préparées comme décrit dans MATERIELS ET MÉTHODES pour l'étude sur membranes.

Résultats.

1- Effets de la nicotine et de la cotinine sur les sites de la $[3H]$ nicotine :

* étude sur coupes sériées : des études préliminaires ont montré que la $[3H]$ nicotine sature des sites de haute affinité et des sites de basse affinité sur coupe de cerveau de rat. La nicotine et la cotinine augmentent le nombre des sites de haute affinité sans modification importante de la constante de dissociation (K_d) (**Figure 49**).

traitement	d	max (fmole.coupe ⁻¹)
contrôle	0,58	0,01
nicotine	1,8	0,11
cotinine	2,2	0,15

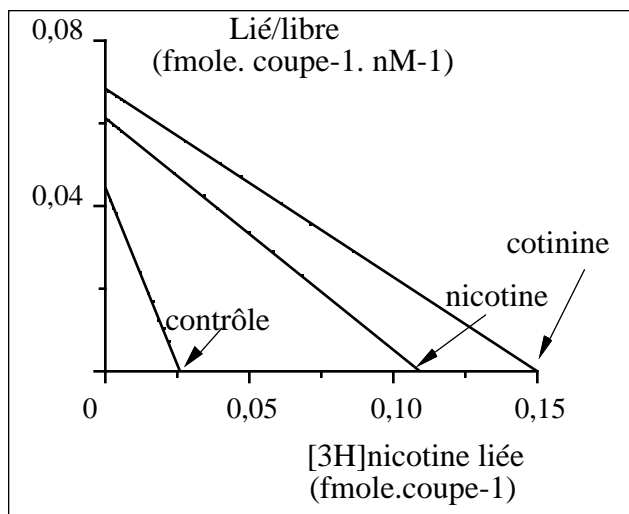
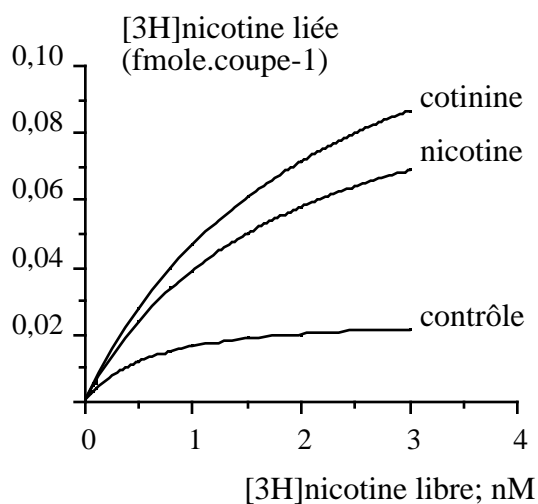


Figure 49 : Saturation des sites de la $[3H]$ nicotine sur coupes rostro-caudales de cerveau de rat.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et conditionnés comme décrit dans MATERIELS ET MÉTHODES. Des coupes de 10 μ m ont été obtenues au Cryostat à -15°C ,

incubées avec la $[3H]$ nicotine (0,25 à 55 nM) en absence de nicotine (LT) et en présence de 50 μM de nicotine (LNS). Les coupes ont été lavées, séchées et grattées (Clarke et al., 1985). La radioactivité a été comptée dans 2 ml de liquide de scintillation dans un compteur à scintillation (BECKMAN). Les valeurs représentent la moyenne de 4 à 6 coupes. Les données de la saturation ont été modélisées par le programme Enzfitter. L'effet sur le site de haute affinité est montré (la fixation sur le site de haute affinité a été calculée par $[B=B_{max} * F / (Kd + F)]$).

* étude sur membranes :

- Le cortex : l'effet de la cotinine sur la modulation des sites de la $[3H]$ nicotine du cortex est montré sur la **Figure 50**. Dans ces conditions expérimentales, la cotinine baisse le B_{max} de la $[3H]$ nicotine sans modification du Kd et redresse l'aspect concave de la courbe de Scatchard obtenue (**Figure 50**).

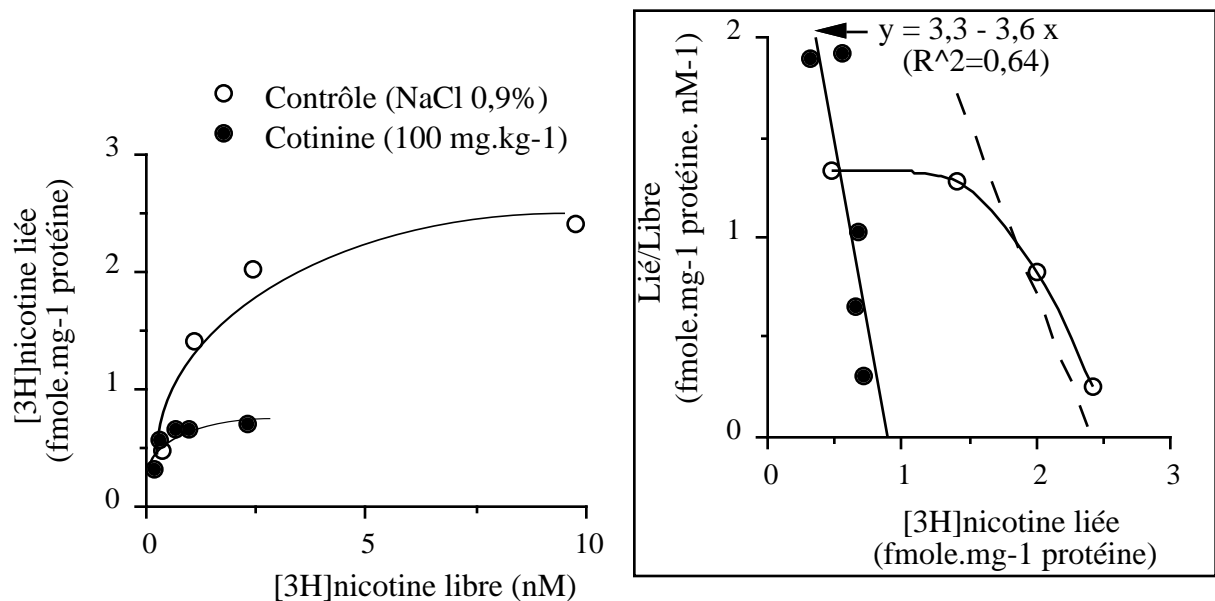


Figure 50 : Effets de la cotinine sur les sites de la $[3H]$ nicotine du cortex du cerveau de rat.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et les membranes préparées comme décrit dans **MATERIELS ET MÉTHODES** Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences réalisées

en quadruplicata selon Anderson et Arneric (1994). Le trait discontinu fait abstraction de la coopérativité et représente le site saturable dans le cas du contrôle.

- Le bulbe : la nicotine et la cotinine baissent le B_{\max} de la $[3H]$ nicotine avec une baisse du K_d . Le B_{\max} passe de 19 (contrôle) à 1 (nicotine) et à 1,1 (cotinine) fmole.mg⁻¹ protéine. Le K_d passe respectivement de 8 (Figure 51) à 0,4 et 0,1 nM.

traitement	contrôle	nicotine	co
$B_{\max} \pm SD$ (fmole.mg ⁻¹ protéine)	19 ± 2	0,81 ± 0,3	1,11 ± 0,03
K_d (nM)	8 ± 1,4	0,4 ± 0,3	0,08 ± 0,01

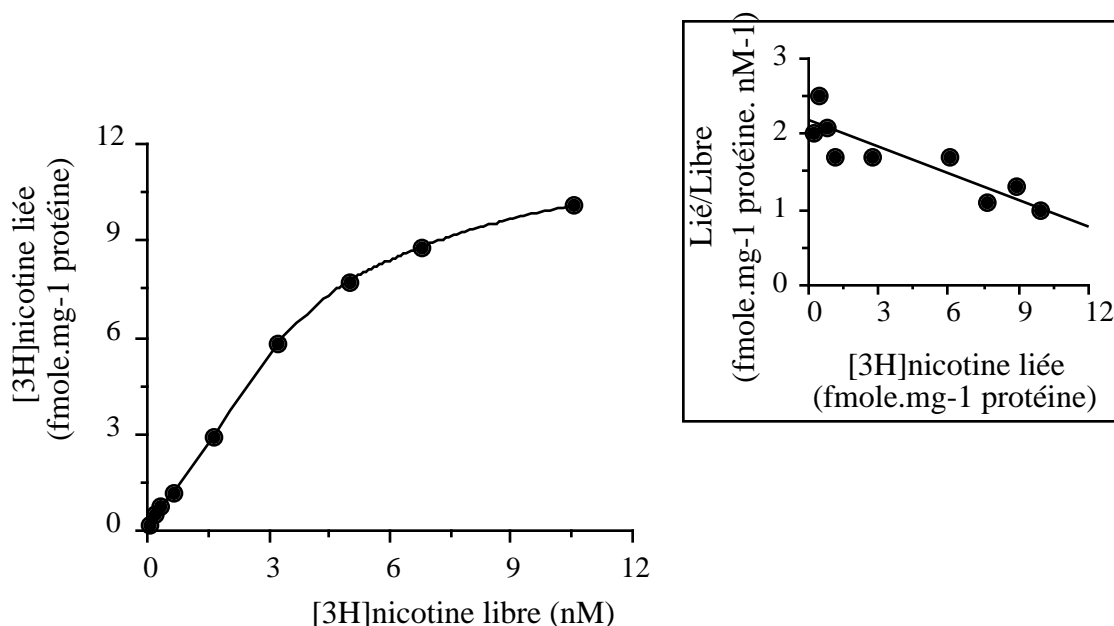
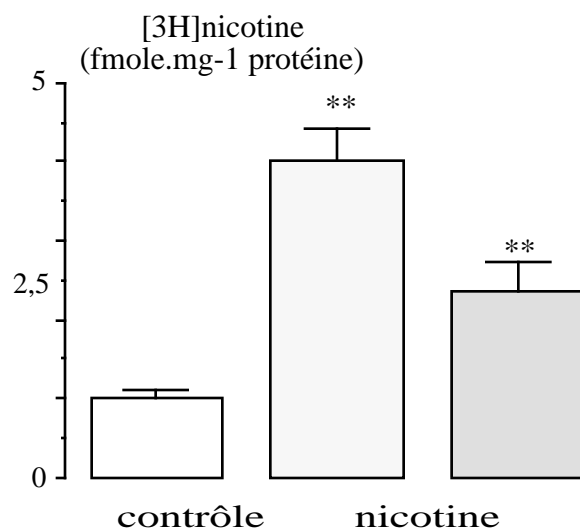


Figure 51 : Saturation des sites de la $[3H]$ nicotine du bulbe du cerveau de rat.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et les membranes préparées comme décrit dans *MATERIELS ET MÉTHODES*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences de saturation réalisées en quadruplicata selon Anderson et Arneric (1994).

- Le cervelet : la nicotine et la cotinine augmentent la liaison de la $[3H]$ nicotine dans le cervelet (Figure 52).



** P < 1%, test de Student après analyse de variance.

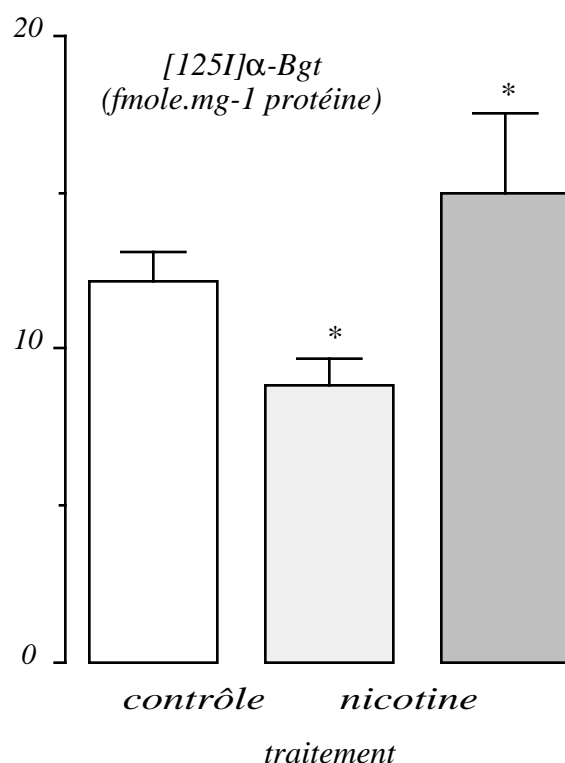
Figure 52 : Modulation, par la nicotine et la cotinine, de la liaison de la $[3H]$ nicotine dans les membranes du cervelet de rat.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et les membranes préparées comme décrit dans *MATERIELS ET MÉTHODES*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences réalisées en quadruplicata selon Anderson et Arneric (1994), à une concentration de 3 nM $[3H]$ nicotine.

2- Effet modulateur de la nicotine et de la cotinine sur les sites de la $[125I]$ alpha-Bgt :

cette étude a été réalisée sur préparation membranaire.

- Le cervelet : la nicotine, contrairement à la cotinine, baisse la liaison de la $[125I]$ alpha-Bgt dans le cervelet (Figure 53).



* $P < 5\%$. test de Student après analyse de variance une voie.

Figure 53 : Modulation, par la nicotine et la cotinine, de la liaison de la [125I]alpha-Bgt dans les membranes du cervelet de rat.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et les membranes préparées comme décrit dans *MATERIELS ET MÉTHODES*. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicata selon Marks et Collins (1982), à une concentration de 1 nM [125I]alpha-Bgt.

- Le cortex : la nicotine n'affecte pas significativement le B_{max} des sites de la [125I]alpha-Bgt du cortex (**Figure 54**). La cotinine augmente le B_{max} , mais l'augmentation observée est légère. Le K_d de la [125I]alpha-Bgt reste pratiquement stable (0,7 à 0,8 nM) dans tous les cas de traitement.

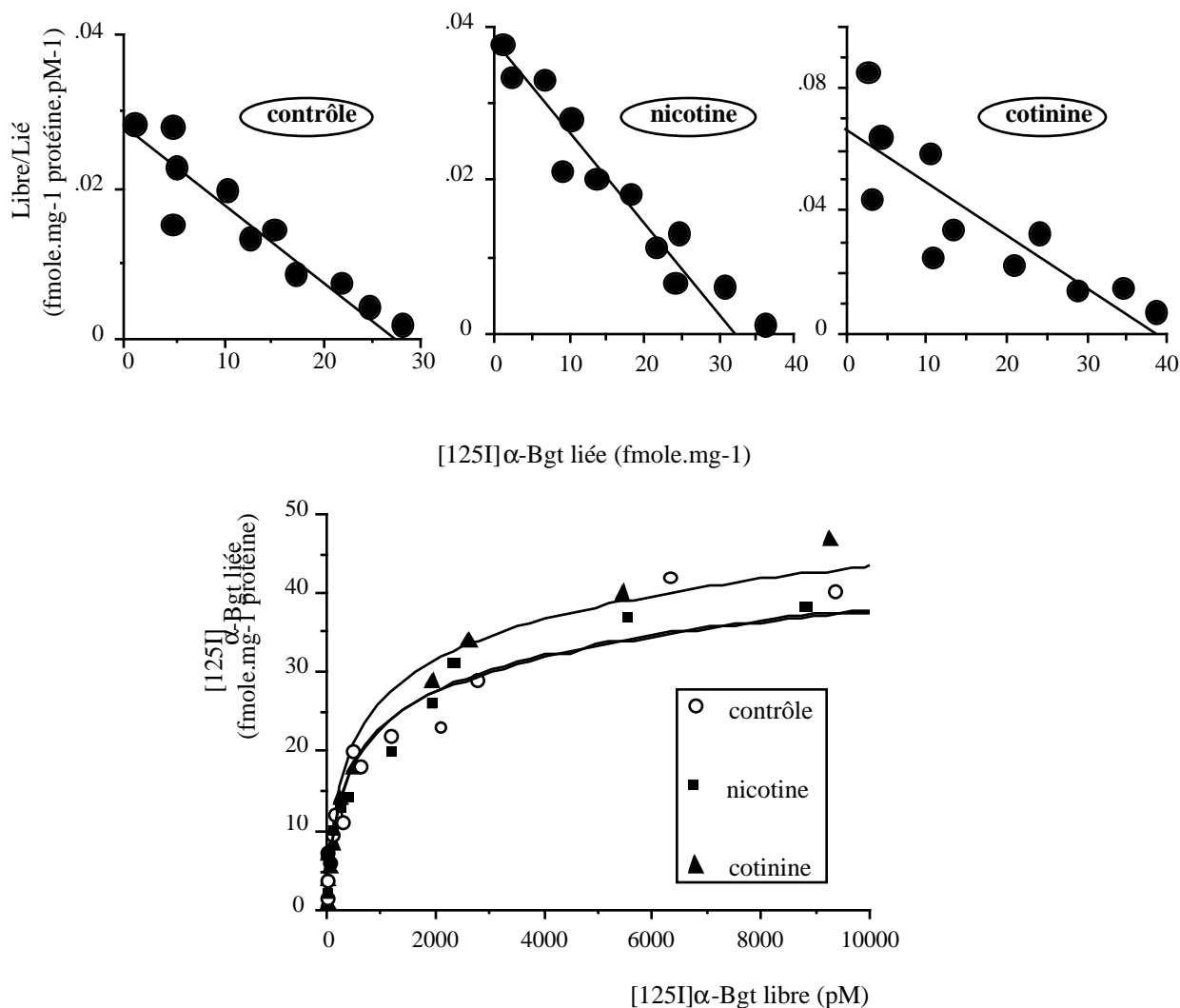


Figure 54 : *Modulation, par la nicotine et la cotinine, de la liaison de la $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ dans les membranes du cortex de rat.*

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et les membranes préparées comme décrit dans *MATERIELS ET MÉTHODES*. Les valeurs représentent la moyenne de 5 expériences réalisées en triplicata selon Marks et Collins (1982), avec une gamme de concentrations de $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ allant de 0,05 à 10 nM.

- Le bulbe : la nicotine et la cotinine augmentent significativement le B_{max} des sites de la $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ du bulbe (**Figure 55**). L'augmentation observée s'accompagne d'une modification légère du K_d de la $[125I]\alpha\text{-Bgt}$ (0,8 à 5,6 nM) dans tous les cas de traitement.

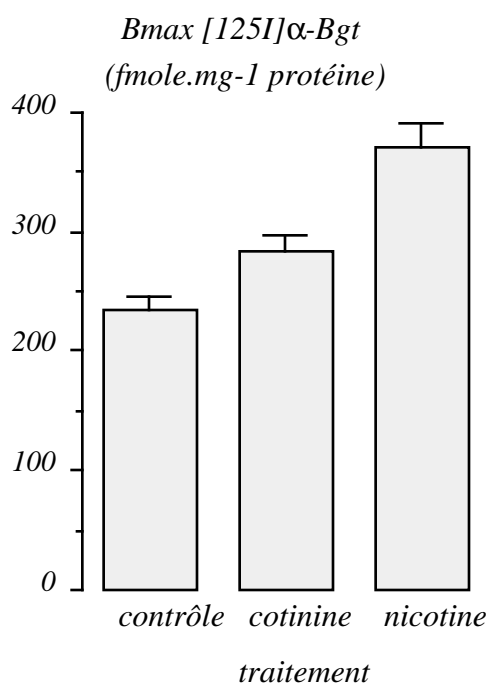


Figure 55 : Modulation, par la nicotine et la cotinine, de la liaison de la [^{125}I]alpha-Bgt dans les membranes du bulbe de rat.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés et les membranes préparées comme décrit dans *MATERIELS ET MÉTHODES*. Les données de 3 expériences de saturation, réalisées en triplicate selon Marks et Collins (1982) avec une gamme de quatre concentrations de [^{125}I]alpha-Bgt de 0,5 à 5 nM, ont été traitées par le programme Enzfitter. Les valeurs représentent le $B_{max} \pm SD$.

3- Effet modulateur de la nicotine et de la cotinine sur les sites de la [^{125}I]cotinine

* étude sur coupes sériées : la **Figure 56** montre l'effet de la nicotine et de la cotinine sur les sites de la [^{125}I]cotinine du cortex, noyau caudé et corps calleux du cerveau de rat. Dans tous les cas de traitement, la nicotine et la cotinine baissent la liaison du radioligand.

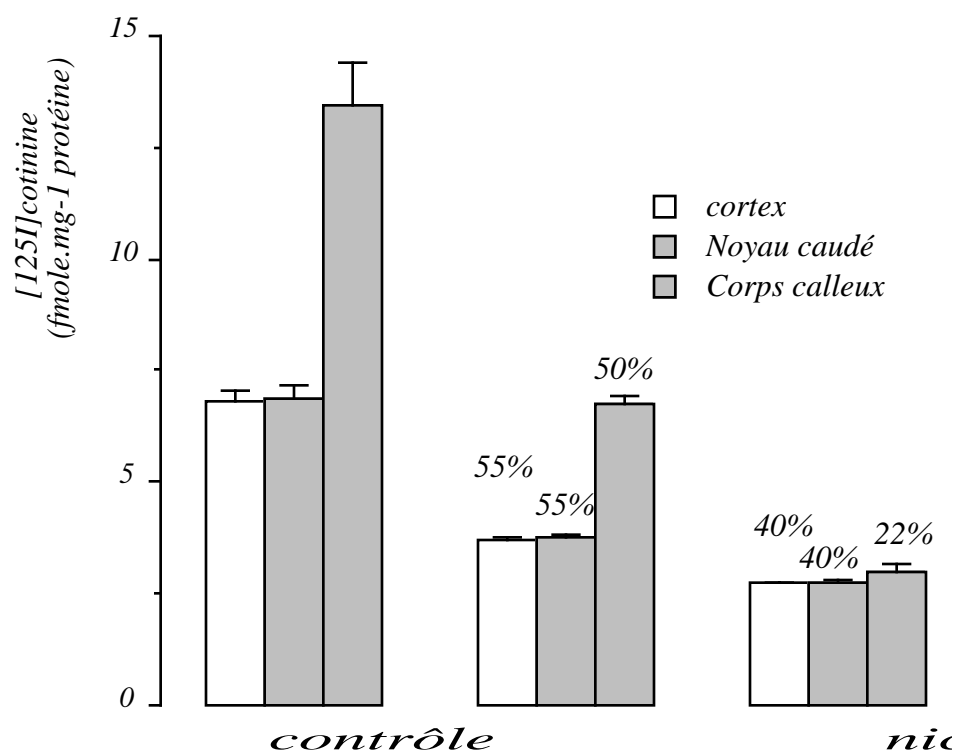


Figure 56 : Modulation, par la nicotine et la cotinine, de la liaison de la [125I]cotinine dans les coupes de cerveau de rat.

Des coupes de 10 μm ont été obtenues, dans le sens rostro-caudal, à partir de cerveau de rat traité par le NaCl 0,9% (contrôle), la nicotine ou la cotinine. Elles ont été marquées par la [125I]cotinine (0,2 nM) et exposées, en présence de standards (microscales AMERSHAM), sous film autoradiographique (KODAK X-OMAT AR). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM ($n \geq 8$ coupes) des densités déterminées grâce à un analyseur d'images (BIOCOM). La LNS a été déterminée en présence de cotinine 10^{-3} M.

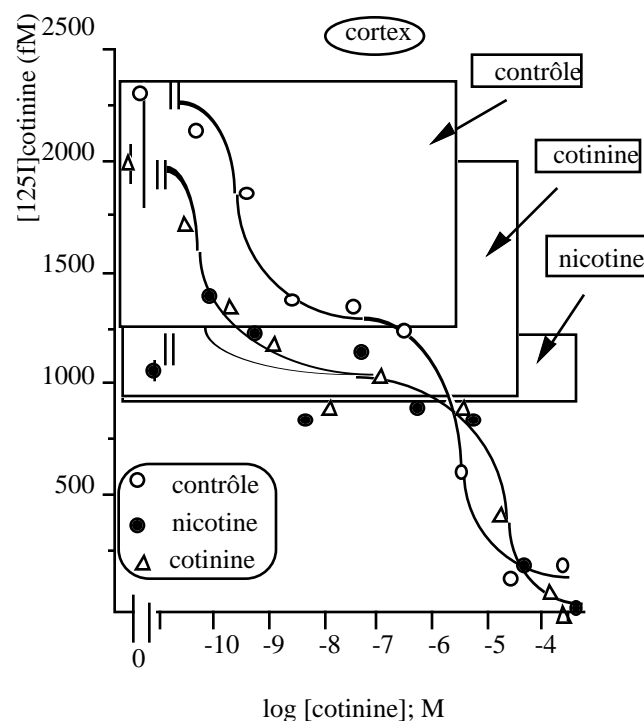
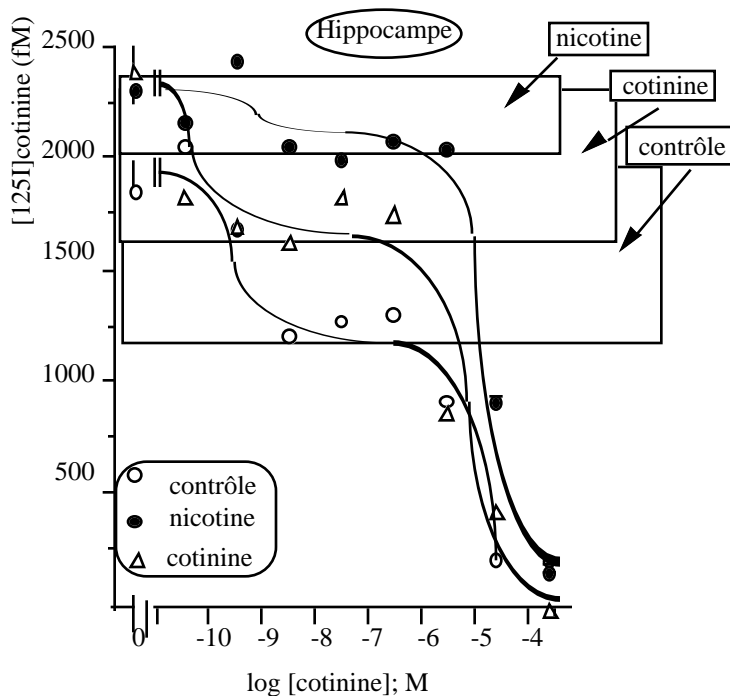
* étude sur membranes : la nicotine et la cotinine affectent les sites de la [125I]cotinine de manière très différente selon la région cérébrale considérée. Dans l'hippocampe (**Figure 57**), la nicotine augmente la liaison de la [125I]cotinine tout en baissant la proportion des sites de haute affinité de la cotinine. Dans cette région, la cotinine augmente la liaison de la [125I]cotinine sans

modifier la proportion de ses sites de haute affinité. Dans le cortex (**Figure 57**), la nicotine baisse la liaison du radioligand et la proportion des sites de haute affinité de la cotinine. Dans cette région, la cotinine baisse la liaison du radioligand sans modification de la proportion de ses sites de haute affinité.

Figure 57 : Modulation, par la nicotine et la cotinine, de la fixation de la $[125I]$ cotinine dans les membranes du cortex et de l'hippocampe du cerveau de rat.

Les membranes ont été préparées à partir de cerveau de rat traité comme décrit dans **MATERIELS ET MÉTHODES**. Les valeurs représentent la moyenne de 3 expériences réalisées en triplicata avec une concentration de 67 pM

$[125I]$ cotinine. La LNS est définie en présence de cotinine $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. L'encadré visualise les sites de haute affinité de la cotinine et leur interconversion. L'effet de la nicotine ou de la cotinine sur l'up ou la down-régulation des récepteurs de la cotinine est montré à la $[cotinine]=0$.



Le **Tableau 21** résume l'ensemble des effets de la nicotine et de la cotinine observés au cours de cette étude.

Tableau 21 : Résumé des effets modulateurs de la nicotine et de la cotinine sur les nAChRs neuronaux.

Les rats ont été traités, les cerveaux prélevés, les coupes de cerveau et les membranes préparées comme décrit dans MATÉRIELS ET MÉTHODES. Les valeurs représentent l'effet de la nicotine et de la cotinine sur la liaison spécifique du radioligand considéré (une seule concentration égale à $1 K_d$ a été testée pour la $[125I]$ cotinine). Légende : d, down-régulation; u, up-régulation; i, interconversion; _, pas d'effet; n, nicotine; c, cotinine; NT, non testé.

région	$[125I]$ cotinine		$[3H]$ nicotine		$[125I]$ alpha-Bgt	
	coupe	extrait	coupe	extrait	coupe	extrait
cerveau entier	NT.....NT		n(u)c(u) NT		NT.....NT	
cervelet	NT.....n(i)c(u+i)		NT.....n(u)c(u)		NT.....n(d)c(u)	
cortex	n(d)c(d) ... n(d+i)c(d)		NT.....c(d+i)		NT.....n(_)c(u)	
bulbe	n(d)c(d) ... n(d)c(d)		NT.....n(d)c(d)		NT.....n(u)c(u)	
noyau caudé	n(d)c(d) .. n(u+i)c(u+i)		NT.....NT		NT.....NT	
corps calleux	n(d)c(d) NT		NT.....NT		NT.....NT	

Discussion.

La conclusion majeure de la présente étude est que les récepteurs de la cotinine sont modulables par un traitement chronique à la nicotine ou à la cotinine. Ce résultat confirme comme le profil pharmacologique de ces récepteurs leur nature nicotinique. Il confirme également que la nicotine et la cotinine passent dans le cerveau. L'utilisation de la $[125I]$ cotinine, à côté de la

[3H]nicotine et de la *[125I]alpha-Bgt*, permet donc d'étudier une troisième classe de nAChRs neuronaux. En considérant que la *[3H]nicotine* permet d'étudier surtout les nAChRs $\alpha 4\beta 2$ (Nakayama et al., 1990; Flore et al., 1992) et que la *[125I]alpha-Bgt* permet d'étudier surtout les nAChRs $\alpha 7$ (Mc Quarrie, 1976; Peng et al., 1993; Schoepfer et al., 1990; Couturier et al., 1990), notre travail propose la *[125I]cotinine* pour étudier surtout les nAChRs non- $\alpha 4/\alpha 7$. La présente étude permet donc l'investigation des effets modulateurs de la nicotine et de la cotinine sur trois classes de nAChRs en fonction de la région cérébrale considérée. La modulation des nAChRs est un phénomène qui se produit sans modification des taux des sous-unités $\alpha 4$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ et $\beta 2$ constitutives des nAChRs (Marks et al., 1992). Cet effet serait le résultat de l'acquisition, par le nAChR, d'une nouvelle conformation ralentissant son départ de la membrane (Peng et al., 1994). Les effets de la nicotine et de la cotinine observés dans la présente étude sont résumés dans le **Tableau 21**.

Étude avec le radioligand *[3H]nicotine* : on observe que le traitement "*in vivo*" par la nicotine et par la cotinine augmente la fixation "*in vitro*" du radioligand sur les coupes de cerveau de rat (**Tableau 21**). Cette augmentation correspond à un effet sur la globalité du cerveau. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux sur la modulation des nAChRs après un traitement à la nicotine (Marks et al., 1983; Marks et Collins, 1985). Cependant, les effets de la cotinine n'ont pas été rapportés. Certains auteurs ont suggéré que cette dernière, ou un autre métabolite, pourrait jouer un rôle antagoniste pour expliquer l'augmentation paradoxale des nAChRs (Schwartz et Kellar, 1983; Ochoa, 1994). Bien que la cotinine induise une up-régulation de ce récepteur dans le cerveau entier et dans le cervelet (**Figure 52**); dans cette dernière région, la cotinine produit seulement 59% de l'effet de la nicotine, alors qu'elle a été administrée à des doses 100 fois supérieures. D'un côté ce résultat ne consolide pas la conclusion que la cotinine serait un antagoniste pour le nAChR $\alpha 4\beta 2$ et de l'autre côté, on observe plutôt une down-régulation (**Tableau 21**) dans le cortex (**Figure 50**) et

dans le bulbe (**Figure 51**). Dans cette dernière région, la nicotine et la cotinine ont un effet down-régulateur comparable (**Tableau 21**). Ces résultats suggèrent que l'effet de la nicotine et de la cotinine n'est pas toujours une up-régulation, mais que l'effet dépend de la région étudiée. Cette conclusion est en accord avec d'autres travaux sur les effets de la nicotine en fonction de la région cérébrale considérée (Marks et al., 1992; Sanderson et al., 1993). L'up-régulation et la down-régulation des nAChRs sont donc des phénomènes regiosélectifs (Ochoa, 1994). Dans notre étude, les effets de la nicotine et de la cotinine sont qualitativement comparables (**Tableau 21**). Cependant, quantitativement l'effet up-régulateur de la cotinine par rapport à la nicotine représente 136% dans le cerveau entier et 59% dans le cervelet. Son effet down-régulateur représente 73% dans le bulbe. Puisque la dose de cotinine administrée représente 100 fois celle de la nicotine, ces résultats s'expliqueraient d'avantage par des considérations pharmacodynamiques plutôt que pharmacocinétiques.

Étude avec le radioligand $[125I]$ alpha-Bgt : avec ce radioligand on observe que les deux alcaloïdes ont des effets opposés sur la modulation du nAChR $\alpha 7$ du cervelet (**Figure 53**), que la nicotine est inactive alors que la cotinine produit une up-régulation de ce récepteur dans le cortex (**Figure 54**) et que les deux alcaloïdes produisent une up-régulation de ce récepteur dans le bulbe (**Figure 55**). Dans ce dernier cas, l'effet de la cotinine représente 76% celui de la nicotine.

Avec ce radioligand, nous arrivons à la même conclusion. L'effet modulateur de la nicotine et de la cotinine sur ce récepteur dépend également de la région cérébrale considérée. Cependant, avec ce radioligand on peut conclure que la cotinine induit le plus souvent une up-régulation; alors que la nicotine, à la dose administrée, peut ne pas avoir d'effet (cortex) ou induire une up- (bulbe) ou une down-régulation (cervelet) (**Tableau 21**). Avec ce radioligand, on peut observer des effets opposés pour la nicotine et la cotinine, comme dans le cervelet (**Figure 53**). Ce résultat confirme les propriétés pharmacodynamiques différentes de ces deux alcaloïdes.

Étude avec le radioligand [125I]cotinine : on observe dans l'étude sur les coupes du cerveau de rat que le traitement "*in vivo*" par la nicotine ou par la cotinine induit une baisse "*in vitro*" de la fixation de la [125I]cotinine dans toutes les régions cérébrales analysées (**Figure 56**). Ce résultat suggère que le radioligand [125I]cotinine permet d'étudier l'effet "*in vivo*" de la nicotine et de la cotinine sur les nAChRs non $\alpha 4/\alpha 7$. L'effet "*in vivo*" de la nicotine ou de la cotinine sur le nAChR non $\alpha 4/\alpha 7$ peut être dû à une down-régulation effective de ce récepteur et/ou à une inhibition de la fixation de ce radioligand. Cette inhibition serait due à la longue demi-vie de la cotinine. Toutefois, abstraction faite de la dose administrée, la cotinine est 1,4 fois plus active que la nicotine dans le cortex et le noyau caudé et est 2,3 fois plus active dans le corps calleux (**Figure 56**). Ce résultat suggère que l'effet de la nicotine est spécifique et n'est pas le résultat de sa métabolisation en cotinine. La comparaison de l'effet de la cotinine dans le noyau caudé, par exemple, montre une up-régulation sur membranes et une down-régulation sur coupes (**Tableau 21**). Etant donné que les membranes ont été lavées au cours de l'extraction alors que les coupes ne l'ont pas été, ce résultat suggère que l'inhibition "*in vitro*" de la fixation du radioligand pourrait contribuer aux résultats obtenus sur les coupes de cerveau. Cette conclusion est supportée par les résultats sur le passage de la cotinine dans le cerveau, sa longue demi-vie (≥ 12 heures) (Benowitz et al., 1983) et son affinité pour les sites du radioligand. La comparaison des effets de la nicotine et de la cotinine sur les membranes montre que ces deux alcaloïdes n'affectent pas les nAChRs non- $\alpha 4/\alpha 7$ de la même manière dans le cervelet (**Tableau 21**). De plus, l'effet up- ou down-régulation observé dépend également de la région cérébrale considérée (**Tableau 21**). Avec ce radioligand, on observe que la nicotine et la cotinine produisent une down-régulation dans le bulbe (**Tableau 21**). Cependant, l'effet de la nicotine est quantitativement plus important dans le cortex et comparable à celui de la cotinine dans l'hippocampe (**Figure 57**). Qualitativement, ces deux alcaloïdes n'affectent pas de la

même manière le site de haute affinité de la cotinine. La nicotine baisse la proportion de ces sites, alors que la cotinine ne l'affecte pas (**Figure 57**).

Conclusion.

La présente étude compare l'**effet modulateur** de la **nicotine** et de la **cotinine** sur **trois classes de nAChRs** par l'usage de trois radioligands. Avec les trois radioligands on observe soit une up- soit une down-régulation selon la région cérébrale considérée.

* En considérant la nature du radioligand :

Avec la **[3H]nicotine** on observe que ces deux alcaloïdes ont des effets le plus souvent comparables, mais la **cotinine** est **moins active**. Cette moindre activité s'expliquerait plutôt par ses **propriétés pharmacodynamiques** que par ses **propriétés pharmacocinétiques**.

Avec le radioligand **[125I]alpha-Bgt** on observe que les deux alcaloïdes montrent, le plus souvent, des **effets opposés** confirmant que les **propriétés pharmacodynamiques** de ces deux alcaloïdes sont **différentes**.

Avec la **[125I]cotinine**, on observe que les effets de la **nicotine** sont **quantitativement plus importants** que ceux de la **cotinine**. De plus, c'est avec ce radioligand qu'on observe des **différences qualitatives remarquables**. La **nicotine baisse la proportion des sites de haute affinité de la cotinine, alors que cette dernière ne l'affecte pas**.

* En considérant la région cérébrale, on observe avec les trois radioligands des effets très différents sur les nAChRs $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ et non- $\alpha 4/\alpha 7$: alors que dans le bulbe, l'effet de la nicotine et de la cotinine, observé avec les radioligands **[3H]nicotine** et **[125I]cotinine**, est comparable (down-régulation); l'effet observé avec le radioligand **[125I]alpha-Bgt** est une up-régulation. Dans le cervelet la nicotine n'affecte pas quantitativement les sites **[125I]cotinine**, alors que la cotinine l'up-régule. Ces résultats confirment que ces **trois radioligands** permettent d'**étudier trois classes de**

nAChRs neuronaux. Ils confirment que la **nicotine** et la **cotinine** **passent dans le cerveau** et que les effets différents de la cotinine par rapport à la nicotine résulteraient de ses **propriétés pharmacodynamiques originales plutôt que de ses propriétés pharmacocinétiques.**

Ces résultats suggèrent également que l'effet **up- ou down-régulation** de l'alcaloïde sur le récepteur **ne permet pas** de conclure que celui-ci est un **agoniste ou un antagoniste**. Cependant, il **permet** de suggérer que **l'alcaloïde agit par ce récepteur.**

Enfin ces résultats montrent la **complexité** des **modifications** des **nAChRs** liées aux effets de la **nicotine et de la cotinine**. Ces modifications moléculaires et cellulaires des protéines engagées dans les processus de neurotransmission synaptique rendent compte de la **neuroadaptation** liée à l'administration de ces alcaloïdes.

Références bibliographiques

Abood L. G., Reynolds D. T., Bidlack J. M. (1980) : Stereospecific [³H]nicotine binding to intact and solubilised rat brain membranes and evidence for its noncholinergic nature. *Life Sciences* **27** : 1307-1314.

Abood L. G., Reynolds D. T., Bidlack J. M. (1981) : Sites and mechanisms for nicotine's action in the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **5** : 479-486.

Agius A. M., Wake M., Pahor A. L., Smallman A. (1995) : The effects of "in vitro" cotinine on nasal ciliary beat frequency. *Clin. Otol. Allied Sci.* **20** (5) : 465-469.

Albenque H. (1994) : Place de la nicotine et de ces analogues structuraux dans le sevrage tabagique. Thèse d'État pour le Diplôme de Docteur en Pharmacie. Université Paul Sabatier Toulouse III

Anand R., Conroy W. G., Schoepfer R., Whiting P., Lindstrom J. (1991) : Chicken neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes have a pentameric quaternary structure. *J. Biol. Chem.* **266** : 11192-11198.

Anderson D. J., Arneric S. P. (1994) : Nicotinic receptor binding of [³H]nicotine, [³H]cytisine and [³H]methylcarbamylcholine in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **253** : 261-267.

Andersson K. , Jansson A. , Kuylenstierna F. , Eneroth P. (1993) : Nicotine and its major metabolite cotinine have different effects on aldosterone and prolactin serum levels in the normal male rat. *Eur. J. Pharmacol.* **228** : 305-312.

Balfour J. (1989) : Bases neurochimiques de la dépendance à la nicotine. *Sem. Hôp.* **65** : 2409-2415.

Barrass B. C., Blackburn J. W., Brimblecombe R. W., Rich P. (1969) : Modification of nicotine toxicity by pretreatment with différent drugs. *Biochem. Pharmacol.* **18** : 2145-2152.

Barbieri R., Friedman A., Osthonondh R. (1989) : Cotinine and nicotine inhibit human fetal adrenal 11 b hydroxylase. *J. Clin. End. and Met.* **69** (6) : 1221-1224.

Barnard E. (1992) : Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem. Sci.* **17** : 368-374.

Benowitz N. L. , Jacob P. , Jones R. , Rosenberg T. (1982) : Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**: 368-372.

Benowitz N. L., Kuyt F. , Jacob P. , Jones R. , Osman A. (1983) : Circadian blood nicotine concentration during cigarette smoking *Clin. Pharmacol. Ther.* **34** (5) : 604-611.

Benowitz N. L., Kuyt F., Jacob III P., Jones R.T., Osman A-L. (1983) : Cotinine disposition and effects. *Clin. Pharmacol. Ther.* **34** : 604-611.

Benowitz N. L. (1990) : Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence. In : The biology of nicotine dependence, Ciba Foundation Symposium 152. J. Wiley and Sons Eds. p. 186-209.

Bertrand D. Ballivet M., Gomez M., Bertrand S., Phannavong B., Gundelfinger E. D. (1994) : Physiologival properties of neuronal nicotinic receptors reconstituted from the vertebrate β_2 subunit and Drosophila α subunits. *Eur. J. Neurosc.* **6** : 869-875.

Besson M. J. (1992) : Nicotine et systèmes de récompense du cerveau. *Sem. Hôp.* **68**, 1270-1276.

Betz H. (1990) : Ligand-gated ion channels in the brain : the amino acid receptor superfamily. *Neuron* , 5 : 383-392.

Blount P., Merlie J.P. (1989) : Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, **3** : 349-357.

Borzelleca J. F., Bownan E. R., Mc.Kennis H. (1962) : Studies on the respiratory and cardiovascular effects of cotinine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **137** (313-318) .

Boulter J., O'Shea-Greenfield A., Duvoisin R., Connolly J., Wada E., Jensen A., Gardner P., Ballivet M., Deneris E., Mc Kinnon D., Heineman S., Patrick J. (1990) : $\alpha 3$, $\alpha 5$ and $\alpha 4$: Three members of the rat neuronal nicotinic acetylcholine receptor-related gene family form a gene cluster. *J. Biol. Chem.* **265**(8) : 4472-4482.

Bowman E. R., Turnbull L.B., McKennis Jr. H. (1959) : Metabolism of nicotine in the human and excretion of pyridine compounds by smokers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127** : 92-95.

Bowman, E.R., McKennis H. (1963) : (-)-cotinine. *Biochem. Prep.* **10**, 36-39.

Bowman E. R., Hansson E., Turnbull L. B., Mc Kennis Jr. H., Schmitterlöw C (1964) : Disposition and fate of (-)-cotinine-3H in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **143** : 301-308.

Bradford M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** : 249-254.

Bruniquel D., Dousset J. C., Courrière Ph., Fourasté I. (1992a) : Nicotine and cotinine binding on acetylcholine receptors of *Torpedo marmorata*. *Med. Sci. Res.* **20**, 871.

Bruniquel D., Dousset J. C., Ecalle R., Courrière Ph., Fourasté I. (1992b) : Synergy between cotinine and nicotine in their insecticidal activity. *Med. Sci. Res.* **20** : 869-870.

Bylund D. B. (1986) : Graphical presentation and analysis of inhibition data from ligand-binding experiments. *Anal. Biochem.* **159**, 50.

Bylund D.B. (1992) : A practical guide for receptor binding. Du pont biotech update 19-21.

Cahin Y., Dreyfuss J. C. (1990) : Statistiques de mortalité en France pour les cancers comparés aux autres causes. *Med. Sci.* **8** : 863-865.

Chahine R. (1989) : Recherches toxicologiques et pharmacologiques sur les effets de la métabolisation de la nicotine. Doctorat d'État. Toulouse III.

Chahine R., Calderone A., Navarro-Delmas C. (1990) : The in vitro effects of nicotine and cotinine on prostacyclin and thromboxane biosynthesis *PG, LK & Ess. Fatty Acids* **40** : 261-263.

Chahine R., C. Navarro-Delmasure A., Chanh P. H., Abou Assali M., Kastoun E. (1993) : Effects of nicotine and cotinine on noradrenergic transmission in the heart. *Med.Sci.Res.* **21** : 421-422.

Chahine R., Aftimos G, Wainberg M. C., Navarro-Delmassure C., Abou Khalil K., Chahoud B. (1996) : Cotinine modulates the cardiovascular effects of nicotine. *Med.Sci. Res.* **24** : 21-23.

Changeux J. P. (1990) : Functional architecture and dynamics of the nicotinic acetylcholine receptor : an allosteric ligand-gated ion channel. Fidia Research Foundation Neuroscience. Award Lectures : 21-168. Raven Press. New York

Cheng Y. C., Prusoff W. H. (1973) : Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which cause 50% inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22** : 3099-3108.

Cimino M., Marini P., Fornasari D., Cattabeni F., Clementi F (1992) : Distribution of nicotinic receptors in cynomolgus monkey brain and ganglion : localization of $\alpha 3$ subunit mRNA, α -bungarotoxin and nicotine binding sites. *Neuroscience.* **51** (1) : 77-86.

Clarke P. B. S., Pert C., Pert A. (1984) : Autoradiographic distribution of nicotine receptors in rat brain. *Brain Res.* **323** : 390-395.

Clarke P. B. S., Schwartz R., Paul S., Pert A. (1985) : Nicotinic binding in rat brain : Autoradiographic comparison of 3H-acetylcholine, 3H-nicotine and 125I- α -bungarotoxine. *J. Neurosci.* **5** : 1307-1315.

Clarke P.B.S. (1994) : Nicotine dependence : Mechanisms and Therapeutic Strategies. *Biochem. Soc. Symp.* **59** : 83-85.

Clarke P. B. S., Reuben M. (1996) : Release of [3H]noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine : mediation by different nicotinic receptor subtypes from [3H]dopamine release. *Br. J. Pharmacol.* **117** : 595-606.

Cockroft V. B., Osguthorpe D. J., Barnard E. A., Fridav A. E., Lunt G. G. (1992) : Ligand-gated ion channels : homology and diversity. *Mol. Neurobiol.* **4** : 129-169.

Cohen B. N, Figla A., Quick M. W., Labarca C., Davidson N. (1996) : Regions of $\beta 2$ and $\beta 4$ responsible for differences between the steady state dose-response relationships of the $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors. *J. General Physiol.* **105** (6) : 745-764.

Collins A. C., Bhat R. V., Pauly J. R. Marks M. J. (1990) : Modulation of nicotine receptors by chronic exposure to nicotinic agonists and antagonists. In : The biology of nicotine dependence. Ciba Foundation Symposium 152. J. Wiley and Sons Eds. p. 68-82.

Collins A.C., Luo Y., Selvaag S., Marks M. J. (1994) : Sensitivity to nicotine and brain nicotinic receptors are altered by chronic nicotine and mecamylamine infusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **271** (1) : 294-301.

Conroy W. G., Vernallis A. B., Berg D. K. (1992) : The $\alpha 5$ Gene Product Assembles with Multiple Acetylcholine Receptor Subunits to Form Distinctive Receptor Subtypes in brain. *Neuron* **9** : 679-691.

Conti-Tranconi B., Raftery M. (1982) : The nicotinic cholinergic receptor : correlation of molecular structure with functional properties. *Annu. Rev. Biochem.* **51** : 492-530.

Costa L. G. Murphy S. D. (1983) : [3H]nicotine binding in rat brain : alteration after chronic acetylcholinesterase inhibition. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226** (2) : 392-397.

Couper E., Couturier S. Ballivet M. (1991) : Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* **350** : 235-238.

Couturier S., Bertrand D., Matter J., Hernandez M., Bertrand S, Millar N., Valera S., Barkas T., Ballivet M. (1990) : A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit ($\alpha 7$) is developmentally regulated and forms a homoligomeric channel blocked by α -bungarotoxin. *Neuron.* **5** : 847-856.

Creese I, Sibley D. R. (1981) : Receptor adaptations to centrally active drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21** : 357-391.

Curzon P. D., Kim J. B., Decker M. W. (1994) : Effects of nicotine, lobeline and mecamylamine on sensory gating in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49** (4) : 877-882.

Dagne, E., Castangoli, N. (1972) : *J. Med. Chem.* **15** (8) : 840-841.

Dar M. S., Li C. Bowman E.R. (1993) : Central behavioral interactions between ethanol, nicotine, and cotinine in mice. *Brain Res. Bull.* **32**, 23-28.

Dar M. S., Bowman E. A., LI C. (1994) : Intracerebellar nicotinic-cholinergic participation in the cerebellar adenosinergic modulation of ethanol-induced motor incoordination in mice. *Brain Research* **644** : 117-127.

Dawson D. A., Fort D. J., Smith G. J., Newell D. L., Newell J. A., Bantle J. A. (1988) : Evaluation of the developmental toxicity of nicotine and cotinine with frog embryo teratogenesis assay : Xenopus Teratogenesis. *Carcinog. Mutagen.* **8** (6) : 329-338.

Dejean V. (1985) : Recherches sur les effets de l'acide nicotinique, de la nicotine et de la cotinine sur la biosynthèse de la prostacycline et des thromboxanes. Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie. Toulouse III.

Deneris E. S., Ballivet J, Swanson L. W., Patrick J., Heineman S. (1989) : $\alpha 3$: A new member of nicotine acetylcholine receptor gene family is expressed in brain. *J. Biol. Chem.* **264** (11) : 6268-6272.

Devilliers-Thiéry A., Galzi J. L., Eiselé J.L., Bertrand S., Bertrand D., Changeux J. P. (1993) : Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor : A prototype of ligand-gated ion channels. *J. Membrane Biol.* **136** : 97-112.

Di Giusto E., Eckhard. I. (1986) : Some properties of saliva cotinine measurements in indicating exposure to tobacco smoking. *Am. J. Public. Health* **76**, 1245-1246.

Dichiria G., Imperato A. (1988) : Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rat. *PNAS* (USA) **85** : 5274-5278.

- DiPaola M.**, Kao P., Karlin A. (1990) : Mapping the subunit site photolabeled by the non-competitive inhibitor [3H]quinacrine azide in the active state of the nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* **265** : 11017-11029.
- Dominiak P.**, Fuch G., Von Toth S., Grobecker H. (1985) : Effects of nicotine and its major metabolite on blood pressure in anesthetized rat. *Klin. Wochenschr.* **63** : 90-102.
- Dousset J. C.**, Fouré D., Soula G., Puig P., Giroux M. (1992) : Influence of nicotine and cotinine of tobacco smoke on dopamine excretion . *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2** : 94-95.
- Eislé J. L.**, Bertrand S., Galzi J. L., Devilliers-Thiery A., Changeux J. P., Bertrand D. (1993) : Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* **366** : 479-483.
- Erenmemisoglu A.**, Tekol Y. (1994) : Do nicotine metabolites have an effect on pain perception? Antinociceptive effect of cotinine in mice. *Pharmazie* **49**.
- Fagerström K. O.** Schneider N. G. (1989) : Measuring nicotine dependence; a review of the Fagerström Tolerance Questionnaire. *J. Behav. Med.* **12** : 159-182.
- Fiore M.**, Jorenby D., Baker T., Kenford S. (1992) : Tobacco dependence and the nicotine patch. *JAMA.* **268**, 19 : 2687-2694.
- Flores C.** , Rogers S. , Pabreza L. , Wolfe B. , Kellar K. (1992) : A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of $\alpha 4$ and $\beta 2$ subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment . *Mol. Pharmacol.* **41** : 31-37.
- Frear D.E.H.** (1955) : Insecticides derived from plants. In : Chemistry of the pesticides. D. Van Nostrand Company, Inc. Chapter VIII. p. 141-158. New York
- Fuxe K.**, Everitt B. J., Hökfelt T. (1979) : On the action of nicotine and cotinine on central 5-hydroxytryptamine neurons. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **10** (5) : 671-677.

Fuxe K., Agnati L., Jansson A., Von Euler G., Tanganel L., Andersson K., Eneroth P. (1990) : Regulation of endocrine function by the nicotinic cholinergic receptor. In : The biology of nicotine dependence. CIBA Foundation Symposium 152. John Wiley and Sons Eds.: 113-130.

Galzi J. L., Changeux J. P. (1994) : Neurotransmitter gated ion channels as unconventional allosteric proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** : 554-565.

Galzi J. L., Changeux J. P. (1995) Neuronal nicotinic receptors: Molecular organization and regulation. *Neuropharmacology* **34**, 6, 563-582.

Geng Y., Savage M., Johnson L. J., Seagrave J., Sopori M. L. (1995) : Effects of nicotine impairs antigen receptor-mediated signal transduction in lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **135** (2) : 268-278.

Gerzanish V., Arnand R., Lindstrom J. (1994) : Homomers of alpha 8 and alpha 7 subunits of the nicotinic acetylcholine receptors exhibit similar channel but contrasting binding properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **45** : 212-220.

Gies J. P. (1993) : Bases de Pharmacologie moléculaire. Eds. Ellipses.

Golberg S. R., Risner M. E., Stolerman I. P., Realvill C., Garcha H. S. (1989) : Nicotine and some related compounds : effects on schedule-controlled behaviour and discriminative properties in rats. *Psychopharmacology* . **97** : 295-302.

Greenberg M. E., Ziff E. B., Green L. A. (1986) : Stimulation of neuronal acetylcholine réceptors induces rapid gene transcription. *Science* **234** : 80-83.

Gundelfinger E. D. (1992) : How complexe is the nicotinic receptor system of insects ? *TINS* **15** (6) : 206-211.

Gundelfinger E. D., Hess N. (1992) : Nicotinic acetylcholine receptor of the central nervous system of drosophila. *B. B. A.* **1137** : 299-308.

Haddow J. E., Knight G. J., Kloza E. M., Palomaki G. E., Wald N. J. (1991) : Cotinine-assisted intervention to reduce smoking and low birthweight delivery. *Br. J. Obstetrics Gynaecology* **98** : 859-865.

Halldin C. K., Swahn N. C-G., Langstrom B., Nyback H. (1992) : (S)- and (R)-[11C]nicotine and the metabolite (R/S)-[11C]cotinine. Preparation, metabolite studies and in vivo distribution in the human brain using PET. *Nuc. Med. Biol.* **19** (8), 871.

Hariharan M. , VanNoord T. , Greden J. (1988) : A High Performance Liquid Chromatographic Method for routine simultaneous determination of nicotine and cotinine in plasma . *Clin. Chem.* **34** (4) : 724-729.

Hayashi E., Isigai M., Kagawa Y., Takayanagi N., Yamada S. (1984) : Neosurugatoxin, a specific antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurochem.* **42** : 1491-1494.

Hellberg D., Nilsson S., Haley N. J., Hoffman D., Wynder E. (1988) : Smoking and cervical intraepithelial neoplasia : nicotine and cotinine in serum and cervical mucus in smokers and non smokers. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **158**, 4, 910-913.

Herkenham M., Pert C. (1982) : Light microscopic localization of brain opiate receptors : a general autoradiographic method which preserves tissue quality. *J. Neurosci.* **2** (8) : 1129-1149.

Hill P., Wynder E. L. (1979) : Nicotine and cotinine in breast fluid. *Cancer Lett.* **6** (4-5) : 251-254.

Holloway P. W. (1973) : A simple procedure from removal of Triton X-100 from protein samples. *Anal. biochem.* **53** : 304-308.

Hong S. J., Chang C.C. (1990) : Nicotinic actions of oxotremorine on murine skeletal muscle. Evidence against muscarinic modulation of acetylcholine release. *Brain Res.* **534** : 142-148.

Jacob P. III, Benowitz N. L., Shulgin A. T. (1988) : Recent Studies of nicotine metabolism in Humans. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **30** : 249-253.

Karlin A. (1993) : Structure of nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* **3** : 299-309.

Keenan R. , Hatsukami D. , Rentel P. , Thompson T. , Grillo M. (1994): Pharmacodynamic effects of cotinine in abstinent cigarette smokers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **55** : 581-590.

Keyser K., Britto L., Schoepfer R., Whiting P., Cooper J., Conroy W., Brozowska-prechtl A., Karten H., Lindstrom J (1993) : Three subtypes of α -bungarotoxin sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J. Neurosci.* **13** : 442-454.

Kim K. S., Borzelleca J. F., Bowman E. R. McKennis H. (1968) : Effects of some nicotine metabolites and related compounds on isolated smooth muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **161** (1) : 59-69.

Kirch D. G., Alho A. M., Wyatt R. J. (1988) : Hypothesis : a nicotine-dopamine interaction linking smoking with Parkinson disease and tardive dyskinesia. *Cell. Mol. Neurobiol.* **8** : 285-291.

Koob G. F., Bloom F. E. (1988) : Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science.* **242** : 715-723.

Laemli U. K., Favre M. (1973). *J. Med. Biol.* **80** : 575-599.

Lagrué G. (1987) : Cure anti-tabac. Utilisation des cigarettes NTB au tussilage. *Tempo medical* **269** : 35-37.

Lagrué G. (1992a) : La dépendance tabagique et son traitement : l'aide au sevrage tabagique. Dans : Le Tabagisme au Quotidien. Acta Des Xes Journées de l'Association "Psychologie et Cancer". Décembre. Nancy.

Lagrué G. (1992b) : Tabagisme et dépression. Intérêt d'un test de dépistage, le HAD (hospital anxiety depression scale). Dans : Le Tabagisme au Quotidien. Acta Des Xes Journées de l'Association "Psychologie et Cancer". Décembre. Nancy.

Lange K., Wells F., Jenner P., Marsden P. (1993) : Altered muscarinic and nicotinic receptor densities in cortical and subcortical regions in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **60** : 197-203.

Larson P. S., Haag H. (1943) : On the pharmacology of some methylated and demethylated derivatives of nicotine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **77** : 343-345.

Larson P. S., Silvette H. (1968) : Tobacco : Experimental and clinical studies. (supp 2) p. 13.

Le Houzec J., Mollimard R. (1986) : Rôle de la nicotine dans l'induction et l'entretien de la dépendance au tabac. *Presse Médicale.* **15** : 1873-1876.

Le Novère N., Bessi A., Piccioto M., Zoti M. (1993) : Le récepteur nicotinique neuronal de l'acétylcholine : du gène au tabagisme. *Méd. Sci.* **9** : 41-49.

Leatherbarrow R. J. (1987) : ENZFITTER : a non-linear regression data analysis program for the IBM PC (and true compatibles). Elsevier Science Publishers BV P.O. Box 1527 1000 BM Amsterdam.

Li N-Y., Li Y., Gorrod J. W. (1992) : Determination of partition coefficients and ionisation constants of (S) (-)-Nicotine and certain metabolites. *Med. Sci. Res.* **20** : 901-902.

Lindstrom J., Schoepfer R., Conroy W. G., Whiting P. (1990) : Structural and functional heterogeneity of nicotinic receptors. In : The biology of nicotine dependence, Ciba Foundation Symposium 152. John Wiley and Sons Eds p. 23-43.

Lindstrom J. (1995) : Nicotinic acetylcholine receptors. In : Handbook of receptors and channels. Ligand- and voltage-gated ion channels. R. Alan North Eds. CRC Press. p. 153-175.

Long J. B., Holoday J. W. (1985) : Blood Brain Barrier : Endogenous modulation by adrenal-cortical function. *Science.* **227** : 1580-1583.

Loring R. H., Schulz D. W., Zigmond R.E. (1989) : Characterisation of neuronal nicotinic receptors using neuronal bungarotoxin. *Progress in Brain Research.* **79** : 109-116.

Lüllmann H., Mohr K., Ziegler A. (1995) : Atlas de poche de pharmacologie. Flammarion médecine-sciences Eds.

Luetje C. W., Patrick J. (1991) : Both alpha and beta subunits contributes to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Neurosci.* **11** : 837-845.

Maricq A. V., Peterson A. S., Brake A. J., Myers R. M., Julius D. (1991) : Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated channel. *Science.* **254** : 432-437.

Marks M. J., Collins A. C. (1982) : Characterization of nicotine binding in mouse brain and comparison with the binding of α -bungarotoxin and quinuclidinyl benzilate. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **22** : 554-564.

Marks M. J., Burchs J. B., Collins A. C. (1983) : Effet of chronic nicotine infusion on tolerance development and cholinergic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **226** : 806-816.

Marks M. J., Pauly J. R., Gross S. D., Deneris E. S., Hermans-Borgmeyer I., Heinemann S. F., Collins A. C. (1992) : Nicotine binding and nicotinic receptor subunit RNA after chronic nicotine treatment. *J. Neurosci.* **12** : 2765-2784.

Mayer, E. L., Nelson, R. H., Woodward C. F., William J. J. (1951). *J. Econ. Entomol.* **44** : 946-949.

Mayer E. L., Robertson C., Nelson R. H., Woodward C. F. (1952). *Bur. Entomol. Plant Quarantine.* p 836.

Mc Gill H. (1988) : The cardiovascular pathology of smoking. *Am Heart.* **115** : 250-256.

Mc Kennis H., Von Euler U. (1965) : Tobacco alkaloids and related compounds. Pergamon press Eds. Oxford. p. 53-74.

Mc Quarrie C., Salvaterra P. M., De Blas A., Routes J., Mahlers H. R. (1976) : Studies on nicotinic acetylcholine receptors in mammalian brain. Preliminary characterisation of membrane-bound α -bungarotoxin receptors in rat cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* **251** (20) : 6335-6339.

- Miles K., Anthony D., Rubin L., Greengard D., Haganir R.** (1987) : Regulation of nicotinic acetylcholine receptor phosphorylation in rat myotubes by forskolin and cAMP. *P.N.A.S* **84** : 6591-6595.
- Mitchell S. N., Brazel M. P., Joseph M. H., Alavihej M. S., Gray J. A.** (1989) : Regionally specific effects of acute and chronic nicotine on rates of catecholamine and 5-hydroxytryptamine synthesis in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* **167** : 311-322.
- Mjos O.** (1988) : Lipid effects of smoking. *Am Heart J.* **115** : 272-273.
- Munson P. J., Rodbard D.** (1980) Ligand : a versatile computerized approach for the characterization of ligand binding system. *Anal. Biochem.* **107**, 220-239.
- Nakanishi S.** (1992) : Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Sciences.* **258** : 597-603.
- Nakayama H., Nakashima T., Kuroguchi Y.** (1990) : $\alpha 4$ is a major acetylcholine binding subunit of cholinergic ligand affinity purified nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. *Neurosci. Letters* **121** : 122-124.
- Noland M. P., Kryscio R. J., Riggs R. S., Linville L. H., Perritt L. J., Tucker T. C.** (1988) : Saliva cotinine and thiocyanate : Chemical indicator of smokeless tobacco and cigarette use in adolescents. *J. Behav. Med.* **11** : 423-433.
- Nordberg A., Larsson C.** (1980) : Studies of muscarinic and nicotinic binding sites in brain. *Acta Physiol. Scand.* (Suppl.) **479** : 19-23.
- Ochoa, E. L. M.** (1994) : Nicotine-related brain disorders: The neurobiology basis of nicotine dependence *Cel. Mol. Neurobiol.* **14** : 195-225.
- Ohana B, Gershoni J. M.**(1990) : Comparison of the toxin binding sites of the nicotinic acetylcholine receptor from drosophila to human. *Biochemistry.* **29** : 6409-6415.
- Paille F., Gillet C., Alan-Flachet M, Pirollet P.** (1992) : Le tabagisme. Epidémiologie, pharmacologie, mécanismes de la dépendance et principes thérapeutiques. Dans : Le Tabagisme

au Quotidien. Acta Des Xes Journées de l'Association "Psychologie et Cancer". Décembre. Nancy.

Patterson T. R., Stringham J. D., Meikle A. W. (1990) : Nicotine and cotinine inhibit steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Life Sciences* **46** : 265-272.

Pauly J., Marks M., Gross S., Collins A. (1991) : An autoradiographic analysis of cholinergic receptors in mouse brain after chronic nicotine treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258** (3) : 1127-1136.

Peng X., Katz M., Gerzanish V., Arnand R., Lindstrom J. (1993) : Human $\alpha 7$ acetylcholine receptor : Cloning of the $\alpha 7$ subunit from the SH-SY5Y cell line and determination of pharmacological properties of native receptors and functional $\alpha 7$ homomers expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **45** : 546-554.

Peng X., Gerzanish V., Arnand R., Whiting P. J., Lindstrom J. (1994) : Nicotine-induced increase in neuronal nicotinic receptors results from a decrease in the rate of receptor turnover. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **46** : 523-530.

Perriot J.(1993) : Tabacologie. Masson Eds. Paris.

Plowchalk D. R., Andersen M. E., Debethizy D. (1992) : A physiologically based pharmacokinetic model for nicotine disposition in the Sprague-Dawley rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116** : 177-188.

Pomerleau C., Pomerleau O. F., Majchrzak M. J., Kloska D. D., Malakuti R. (1990) : Relationship between nicotine tolerance questionnaire scores and plasma cotinine. *Addictive Behaviors.* **15** : 73-80.

Pomerleau O. F., Pomerleau C. S. (1990) : Behavioural studies in humans : anxiety, stress and smoking. In : The biology of nicotine dependance. Ciba Foundation Symposium. John Willey and Sons Eds. 152. p. 225-239.

- Porchet H.**, Benowitz N. L., Sheiner L (1988) : Pharmacodynamic model of tolerance : application to nicotine. *J Pharm. Exp. Ther.* **244** (1): 231-236.
- Rathouz M. M.**, Berg D. K. (1994) : Synaptic-type acetylcholine receptors raise intracellular calcium levels in neurons by two mechanisms. *J. Neurosci.* **14** (11) : 6935-6945.
- Reavill C.**, Walther B., Stolerman I. P., Testa B. (1990) : Behavioural and pharmacokinetic studies on nicotine, cytisine and lobeline. *Neuropharmacology* . **29** (7) : 619-664.
- Risner M.E.**, Goldberg S.R., Prada J.A., Cone E.J. (1985) : Effects of nicotine, cocaine and some of their metabolites on schedule-controlled responding by beagle dogs and squirrel monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **234** (1) : 113-119.
- Risner M. E.**, Cone E. J., Benowitz N. L. Jacob P. III (1988) : Effects of the stereoisomers of nicotine and nornicotine on schedule-controlled responding and physiological parameters of dogs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244** (3), 807-813.
- Role L. W.** (1992) : Diversity in primary structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine receptors channels. *Curr Opin Neurobiol* . **2** : 254-262.
- Rosenberg J.**, Benowitz N.L., Jacob III P., Wilson K. M. (1980) : Disposition kinetics and effects of intravenous nicotine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **28** : 517-522.
- Sanderson E. M.**, Drasdo A. L., Mc Crea K., Wonnacott S. (1993) : Up-regulation of nicotinic receptors following continuous infusion of nicotine is brain-region-specific. *Brain. Res.* **617** : 349-352.
- Sargent P. B.** (1993) : The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ann. Rev. Neurosc.* **16** : 403-443.
- Schmitterlöw C. G.**, Hansson E., Andersson G., Appelgren L. E., Hoffman P. C. (1966) : Distribution of nicotine in the central nervous system. In : The effects of nicotine and smoking on the central nervous system. New York Academy of Sciences Conference. p.2-14.

- Schoepfer R.**, Conroy W. G., Whiting P., Gore M., Lindstrom J. (1990) : Brain α -bungarotoxin-binding protein cDNAs and mAbs reveal subtypes of this branch of the ligand-gated ion channel superfamily. *Neuron*. **5** : 35-48.
- Schultz D.**, Loring R., Aizenman E., Zigmond R. (1991) : Autoradiographic localization of putative nicotinic receptors in the rat brain using ¹²⁵I-neuronal bungarotoxin. *J. Neurosci.* **11** (1) : 287-297.
- Schuster R.**, Phannavong B., Schröder C., Gundelfinger E., K. (1993) : Immunohistochemical localization of a ligand-binding and structural subunit of nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system of *Drosophila Melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* **335** : 149-162.
- Schwartz R.**, Kellar K. (1983) : Nicotinic cholinergic receptor binding sites in brain : regulation in vivo. *Science*. **220** : 214-216.
- Schwartz D.** : Statistique en Biologie et en Médecine. Médecine-Sciences Flammarion Eds. 1994. pp. 290-291. Paris.
- Seeburg Ph.** (1993) : The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* **16** : 359-365.
- Sloan J. W.**, Todd G. D., Martin W. R. (1984) : Nature of nicotine binding to rat brain P₂ fraction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **20** (6) : 899-909.
- Sloan J. W.**, Martin W. R., Hernandez J., Hook R. (1985) : Binding characteristics of (-)- and (+)-nicotine to the rat P₂ fraction. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **23** (6), 987-995.
- Sloan J. W.**, Martin W. R., Bostwick M., Hook R., Wala E. (1988) : The comparative binding characteristics of nicotinic ligands and their pharmacology. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **30** (1), 255-267.
- Smith M.**, Merlie J., Lawrence J. (1987) : Regulation of phosphorylation of nicotinic acetylcholine receptors in mouse BH3H1 myocytes. *P.N.A.S* **84**: 6601-6605.

Smith T. L., Russel G. B., Mosberg A. T. (1994) : Long-term systemic hemodynamic effects of cotinine in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **23** (3), 458-462.

Stalhandske T. (1969) : The metabolism of nicotine and cotinine by a mouse liver preparation. *Acta. Physiol. Scand.* **78** : 236-248.

Steel, G. G., Peckham M. J. (1979) : Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: The concept of additivity. *Rad. Oncol. Biol. Phys.*, **15** : 85-91.

Steinbach J. H., Ifune C. (1989) : How many kinds of nicotinic acetylcholine receptor are there ? *TINS* **12** (1) : 3-6.

Stolerman I. P. (1991) : Behavioural pharmacology of nicotine : multiple mechanisms. *Br. J. Addiction.* **86** : 533-536.

Stolerman I. P. (1993) : Drug discrimination. In : Methods in Behavioural pharmacology. Haaren FV Eds. London. p. 217-243.

Stolerman I. P. (1994) : Component of drug dependence : reinforcement, discrimination and adaptation. *Biochem. Soc. Symp.* **59** : 1-12.

Svensson T. H., Grenhoff J., Engberg G. (1990) : Effet of nicotine on dynamic function of brain catecholamine neurons. In : The biology of nicotine dependance. Ciba Foundation Symposium 152. John Willey and Sons Eds. p. 169-185.

Swillens S. (1992) : How to estimate the total receptor concentration when the specific radioactivity of the ligand is unknown. *TIPS* **13** : 430-434.

Swillens S., Waelbroeck M., Champeil Ph. (1995) : Does a radiolabelled ligand bind to a homogenous population of non-interacting receptor sites. *TIPS* **16** : 151-155.

Takada K, Swedberg M. D. B., Goldberg S. R., Katz J. L. (1989) : Discriminative stimulus effects of intravenous l-nicotine and nicotine analogs or metabolites in squirrel monkeys. *Psychopharmacology* **99** : 208-212.

Tuchais E., Tuchais M. (1994) : Les méfaits du tabagisme. *Actualités pharmaceutiques*. **318** : 47-50.

Vernalis A. B., Conrow W. G., Berg D. K. (1993) : Neurons assemble acetylcholine receptors with as many as three kinds of subunits and can segregate subunits among receptor subtypes. *Neuron* **10** : 451-464.

Vijayaraghavan S., Pugh Ph. C., Zhang Z. W., Rathouz M. M., Berg D. K. (1992) : Nicotinic receptors that bind a-bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca²⁺. *Neuron* **8** : 353-362.

Vunakis V. H., Tashkin D. P., Rigas B., Simmons M., Clarck V. A. (1988) : Decreased serum cotinine levels in smokers of both tobacco and marijuana as compared with smokers of tobacco only. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **30**, 895-898.

Waddell W. L., Marlowe C. (1976) : Localization of nicotine-¹⁴C, cotinine-¹⁴C and nicotine-1'-N-oxide-¹⁴C in tissues of the mouse. *Drug. Metab. Dispos.* **4** (6) : 530-539.

Wadley F. M. (1945) : The evidence required to show synergistic action of insecticides and a short cut in analysis. U.S. Dept. Agric. E.T. p 223.

Whitehouse P., Martino A., Marcus K., Zweig R., Singer H., Price D., Kellar K. (1988) : Reductions in acetylcholine and nicotine binding in several degenerative diseases. *Arch Neurol.* **45** : 722-724.

Whiting P. J., Morley B. J., Lindstrom J. (1987) : Structurally different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes purified and characterized using monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* **7** : 4005-4016.

Whiting P. J., Lindstrom J. (1988) : Characterization of bovine and human neuronal nicotine acetylcholine receptors using monoclonal antibodies. *J. Neurosci.* **8** : 3395-3404.

Whiting P. J., Shoepfer J. R., Conrow W. G., Gore M. G., Keyser K.T., Shimasaki S., Esch F., Lindstrom J. (1991) : Expression of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in brain and retina. *Mol. Brain Res.* **10** : 61-70.

Whittet H. B., Lund V. J., Brockbank M., Feyerabend C. (1991) : Serum cotinine as an objective marker for smoking habit in head and neck malignancy. *J. Laryngology Otology*. **105** : 1036-1039.

Witzemann V., Stein E., Barg B., Konno T., Koenen M., Kues W., Criado M. (1990) : Primary structure and functional expression of the α , β , γ , δ and ϵ subunits of the acetylcholine receptor from rat muscle. *Biochem*. **194** : 437-448.

Yamamoto K. I., Domino E. F. (1965) : Nicotine-induced EEG and behavioral arousal. *Int. J. Neuropharmacol*. **4** : 359-373.

Yamamoto I., Yabuta G., Tomizawa M., Saito T., Miyamoto T., Kagabu S. (1995) : Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids, *Nippond Noyaku Gakkaishi* **20** (1) : 33-40.

Zhang Z. W., Vijayaraghavan S., Berg D. K. (1994) : Neuronal acetylcholine receptors that bind alpha-bungarotoxin with high affinity function as ligand-gated ion channels. *Neuron* **12** : 167-177.

DISCUSSION GENERALE

Dans notre étude, nous avons montré que la nicotine et la cotinine agissent supra-additivement dans leur toxicité. Nous avons supposé que cette interaction s'expliquerait par l'existence de mécanismes d'action biochimiques et/ou cellulaires spécifiques pour ces deux alcaloïdes. La contribution des sites récepteurs nicotiniques périphériques et des propriétés pharmacocinétiques de ces deux alcaloïdes a été évaluée. L'effet de la nicotine et de la cotinine sur la modulation des récepteurs nicotiniques centraux suggère que ces deux alcaloïdes ont agi centralement, dans ce travail et dans d'autres travaux, par leurs propriétés pharmacodynamiques différentes. Nous avons purifié le récepteur de la cotinine avec l'espoir que celui-ci ne soit pas celui de la [3H]nicotine et de la [125I]-Bgt. La détermination de la séquence de ce récepteur sera seule en mesure de nous donner la preuve.

CONCLUSION GENERALE

La cotinine en tant que métabolite majeur de la détoxification de la nicotine perd naturellement la toxicité et les activités du précurseur. Ces modifications d'activités s'expliquent par l'acquisition de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Cependant, dans la majorité des études sur les effets de la nicotine, la cotinine est rarement incluse dans l'expérimentation. De plus, l'expérimentateur veut reproduire les effets du précurseur. Cette démarche scientifique était jusqu'alors tout à fait justifiée. Nous avons montré que pour les nAChRs l'étude "*in vitro*" révèle les propriétés d'une fraction désensibilisée de ce récepteur. La cotinine aurait une affinité 10^6 fois plus faible que la nicotine pour les sites de la [3H]nicotine et de la [125I] α -Bgt. Pour la nicotine, nous avons montré la même chose pour les sites de la [125I]cotinine. Les effets "*in vivo*" sont eux observés à un rapport (10^2) beaucoup plus faible. À présent, ce sont donc les études "*in vivo*" sur les activités de la cotinine qu'il faudrait multiplier pour savoir de quelle manière ce métabolite contribuait aux activités attribuées à la nicotine. Cette connaissance permettra probablement de mieux comprendre les rôles respectifs de ces deux alcaloïdes dans l'accoutumance tabagique.