

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
11 mai 2006 (11.05.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2006/048560 A2**

(51) Classification internationale des brevets : **Non classée**

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2005/002775

(22) Date de dépôt international :  
7 novembre 2005 (07.11.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0411810 5 novembre 2004 (05.11.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **DE-  
BUSSY HOLDING SA** [LU/LU]; 16 Bd Emmanuel Ser-  
vais, L-2535 Luxembourg (LU).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : **SANCHEZ,  
Mario** [AR/FR]; 48 rue Beaubourg, F-75003 Paris (FR).

(74) Mandataire : **BURTIN, Jean-François**; Cabinet GEFIB,  
44-46, rue du Général Cremer, F-92700 Colombes (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,

CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,  
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,  
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

- relative à l'identité de l'inventeur (règle 4.17.i))
- relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un  
brevet (règle 4.17.ii))

**Publiée :**

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS AND THE USES THEREOF FOR CONTROLLING THE DIFFER-  
ENT FORMS OF ADDICTION TO DRUGS

(54) Titre : NOUVELLES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES ET LEURS UTILISATIONS POUR LUTTER CONTRE  
LES DIFFERENTES FORMES D'ACCOUTUMANCE AUX DROGUES

(57) Abstract: The invention relates to the necessities of life, especially the field of therapeutics. The invention specifically relates to pharmaceutical compositions for helping users of addictive drugs to stop, said compositions being in the form of a combination of two medicaments consisting of a partial or full antagonist of dopaminergic receptors, especially receptors D2 and D3, and a prodopaminergic product, for oral, parenteral or transdermic administration. The invention also relates to method for controlling the different forms of addiction to legal or illegal drugs.

(57) Abrégé : La présente invention se situe dans le domaine des nécessités de la vie et plus particulièrement dans le domaine de la thérapeutique. Elle se rapporte plus particulièrement à des compositions pharmaceutiques destinées au retour à l'abstinence des habitués des drogues provoquant de l'accoutumance sous la forme d'une combinaison de deux médicaments constituée d'un antagoniste partiel ou complet des récepteurs dopaminergiques - en particulier des récepteurs D2 et D3 et d'un produit prodopaminergique, sous forme d'une composition pharmaceutique destinée à l'administration par voie orale, parentérale ou transdermique. L'invention se rapporte également à une méthode de lutte contre les différentes formes d'accoutumance aux drogues licites ou illicites.

WO 2006/048560 A2

**« Nouvelles compositions pharmaceutiques et leurs utilisations pour lutter contre les différentes formes d'accoutumance aux drogues »**

L'invention concerne le domaine des nécessités de la vie et, plus particulièrement le domaine de la thérapeutique.

Elle se rapporte plus particulièrement à des compositions pharmaceutiques destinées à aider au retour à l'abstinence, d'une manière puissante, les habitués des drogues provoquant de l'accoutumance et, ainsi, de les amener à retrouver une activité sociale et/ou professionnelle normale.

L'addiction (ou dépendance) peut être définie comme un trouble comportemental, caractérisé par une recherche compulsive du produit qui cause cette dépendance et ce, en dépit des conséquences néfastes pour la santé, la vie familiale, professionnelle, etc... dont est parfaitement consciente la personne dépendante.

Cette perte de contrôle comportemental apparaît à la suite de consommations répétitives, mais dans le cas de l'héroïne et des opiacées, le passage de l'abus de ces substances à l'addiction peut être très bref. Ceci est fonction d'un certain nombre de paramètres génétiques et environnementaux propres à chaque individu.

Cette dépendance est due à la stimulation excessive et répétée des récepteurs opioïdes, en particulier de type mu (Matthes et al. Nature, 1996,383,819-823), plus particulièrement dans les structures cérébrales formant le système limbique (aire tegmentale ventrale, noyau accumbens, amygdale, cortex préfrontal, etc...). Il s'ensuit progressivement des changements du fonctionnement des neurones qui entretiennent cet état de dépendance et, surtout, provoquent une rémanence très puissante et temporellement très longue, des effets de la substance.

Ceux-ci se caractérisent par des effets de sédation, d'euphorie, de réduction des tensions intérieures du consommateur. De plus, il existe un effet de plaisir « orgasmique », dénommé « rush », qui suit par exemple l'injection d'héroïne. L'effet de cette substance et des opioïdes, ou autres drogues très addictives, telle que la cocaïne, entraîne, en retour, une

exaltation des systèmes de contrôles neuronaux produisant un effet inverse c'est à dire : l'anxiété, la dysphorie, etc.. Cet effet inverse apparaît, en particulier lors de l'arrêt de la consommation de la drogue : c'est le « syndrome de sevrage », très douloureux et, dans la plupart des cas, de courte durée, donnant lieu à des rechutes répétitives.

L'une des manières de diminuer ces états très douloureux qui « attachent » la personne dépendante à sa drogue, est de rechercher à stabiliser le patient en évitant les états extatiques de « rush », et en traitant l'origine des troubles majeurs du comportement qui ont conduit à l'addiction.

Les succès les plus spectaculaires ont été obtenus en substituant l'héroïne, ou d'autres opioïdes addictifs, par des substances également capables de stimuler les récepteurs opioïdes, mais de manière moins puissante, et ce pour différentes raisons. Pour certains d'entre eux, il s'agit d'un problème de pharmacocinétique qui conduit à une imprégnation lente et longue du cerveau par cette substance opioïde. De ce fait, les récepteurs ne sont jamais stimulés puissamment, comme ils le sont par l'héroïne, mais ils le sont suffisamment pour que le patient ne souffre pas d'un état de manque et d'un besoin incontrôlable de se fournir la « substance » (craving). C'est le cas de la méthadone, agoniste complet (full), utilisé en traitement de substitution à l'héroïne dès 1964 aux USA, et approuvé par la FDA en 1973. Une autre substance de plus en plus utilisée est la buprénorphine, qui est un agoniste partiel des récepteurs opioïdes mu avec une longue durée d'action. De ce fait, la buprénorphine est incapable, même à hautes doses, de conduire au « rush » exposé précédemment.

Ces traitements de substitution donnent des résultats remarquables, mais souffrent d'un défaut majeur. Ils ne conduisent qu'à une réduction faible des addictions et, par conséquent, les personnes dépendantes à l'héroïne sont souvent traitées, durant des années (jusqu'à 20-30 ans), par la méthadone par exemple. On se trouve alors face à une sorte de dépendance à la substance de substitution.

Evidemment, l'idéal serait de trouver un traitement facilitant significativement l'accès à l'abstinence. Or, le neurotransmetteur impliqué dans les effets euphorisants des opioïdes est la dopamine, libérée par les

terminaisons dopaminergiques, en particulier dans le noyau accumbens et le cortex préfrontal. La dopamine interagit avec les récepteurs D1, D2 et D3, essentiellement pour conduire à l'effet hédonique.

Le blocage de ces récepteurs par les neuroleptiques est très utilisé dans certains troubles majeurs, tels que la schizophrénie, les crises de panique ou d'angoisse généralisée. Ce type de traitement conduit généralement, chez le patient, à un état dysphorique avec diminution des effets hédoniques et des activités sociales.

L'invention, objet de la présente demande de brevet, réside dans le fait que, contre toute attente, le traitement des personnes dépendantes à l'héroïne et aux opioïdes, mais également, à un moindre degré, aux psycho-stimulants (cocaïne par exemple), par un antagoniste des récepteurs dopaminergiques, en particulier du type D2 et/ou D3, amène à une amélioration rapide de l'état de tension intérieure conduisant à la recherche compulsive de la substance addictive.

Toutefois, cette amélioration significative est obtenue uniquement lorsque ces antagonistes sont administrés simultanément ou en association avec un produit de substitution (méthadone, buprénorphine, LAM (Levo-alpha acétylméthadol) ou toutes les autres substances revendiquées pour posséder cette propriété agissant sur les récepteurs opioïdes .....

Ainsi, l'association, lors de l'administration des deux substances (un antagoniste dopaminergique et un produit prodopaminergique) est capable de produire un effet anti-addiction, du moins durant les premières semaines du traitement.

Sans que cette constatation ne soit entièrement expliquée, elle est le fruit d'études cliniques expérimentales.

L'amélioration de l'état physique des personnes dépendantes est tel qu'il permet d'établir très rapidement une recherche des causes profondes du comportement compulsif, caractéristique de l'addiction.

L'invention a donc spécifiquement pour objet une composition pharmaceutique contenant une combinaison de deux médicaments, de préférence sous forme de kit, destinée à être administrée, simultanément ou successivement, pour faciliter le sevrage, qui consiste en une association d'un antagoniste partiel ou complet des récepteurs dopaminergiques, en particulier des récepteurs D2 et D3, et d'un produit pro-dopaminergique, de préférence un produit de substitution aux opioïdes, sous la forme d'une composition pharmaceutique destinée à l'administration par voie orale parentérale ou transdermique.

L'antagoniste dopaminergique est, de préférence, un antagoniste du type D2, ou surtout, un antagoniste D2/D3.

Parmi les antagonistes dopaminergiques, on pourra citer les antagonistes dopaminergiques purs et les antagonistes dopaminergiques partiels, manifestant en outre une composante sérotoninergique. Parmi les antagonistes dopaminergiques, les molécules les plus utilisées sont :

- L'amisulpride,
- la Rispéridone,
- l'antagoniste D3, dénommé SB 277011-A, décrit par VOTEL et al, dans, J. Neurosciences 22 (2002) 9595-9603.

D'autres substances antagonistes de la dopamine, telles que le sulpiride, la métoclopramide ou bien encore l'olanzapine ou l'halopéridol peuvent également être utilisées.

Le produit prodopaminergique peut être défini comme une substance susceptible de se fixer sur ou dans des récepteurs aux opioïdes, qui ne manifeste que faiblement une activité euphorisante et/ou qui ne manifeste qu'un effet d'accoutumance limité. On pourra citer, à cet égard, la méthadone, la buprénorphine, le produit dénommé LAM, la nalorphine, le naltrexate, le Levallorphan, et, d'une manière générale, toute substance décrite comme possédant une telle propriété.

L'invention réside donc dans le fait d'administrer une telle association soit simultanément sous la forme d'une composition

pharmaceutique unique définie, soit sous la forme d'un kit contenant chacun desdits principes actifs sous une forme séparée qui pourra ainsi être administré à des posologies variables, ou à des rythmes différents ou selon un ordre différent, ou sous des formes différentes.

On pourra donc ainsi administrer l'association des deux principes actifs sous deux formes pharmaceutiques identiques [comme des comprimés, des gélules, des dragées, des gouttes], ou sous des formes différentes.

Les concentrations en principes actifs pourront également varier, passant d'un dosage fort à un dosage plus faible, en fonction des besoins thérapeutiques, de la poursuite du traitement et de la survenue d'effets secondaires.

On connaît déjà l'utilisation de l'amisulpride ou de ses sels et, notamment, du S(-)amisulpride pour le traitement des symptômes affectifs ou cognitifs de la schizophrénie, pour le traitement de l'autisme, ou le traitement des dyskinésies tardives provoquées par les neuroleptiques (PCT/EP99/05325). Le brevet PCT/EP99/05325 mentionne également que le S(-)amisulpride peut être utilisé contre « Drug Addiction », sans autre précision.

L'amisulpride est un des nombreux représentants de la série des benzamides décrits dans le brevet US 4,401,822 comme substance anti-apomorphine. La synthèse de l'amisulpride sous forme racémique ou énantiomériquement pure [S(-)] est décrite dans la demande PCT/EP99/05325, ainsi que celle de ses sels.

L'Amisulpride est décrit en pharmacologie comme déplaçant le [<sup>3</sup>H] raclopride des récepteurs D2 limbiques. L'amisulpride manifeste également une action antagoniste contre l'apomorphine. L'amisulpride, du fait de son action centrale, peut être considéré comme un médicament antipsychotique chez des sujets atteints de schizophrénie, surtout en manifestant moins d'effets secondaires que les produits neuroleptiques antipsychotiques connus, tels que le syndrome extrapyramidal, etc...

L'amisulpride est donc un médicament connu, jusqu'ici utilisé dans d'autres indications neuro-psychiatriques.

L'effet anti-addictif recherché dans la présente invention est un autre effet antagoniste vis-à-vis des récepteurs dopaminergiques, notamment des récepteurs D2 et D3.

L'effet des médicaments, objet de la présente association, se manifeste rapidement et déjà dans des études précliniques, un effet positif est noté compte-tenu de l'effet d'imprégnation.

Les doses administrées dans le cadre des compositions pharmaceutiques selon l'invention seront variables en fonction de l'effet désiré, de l'ancienneté de la dépendance aux drogues addictives et de l'intensité de l'action contre l'accoutumance désirée.

Les doses de substance anti-dopaminergique pourront varier de 1 mg à 1 200 mg par prise unitaire. Les doses de substances prodopaminergiques, en montant jusqu'à un plateau, varieront de 0, 2 mg à 300 mg;

Dans une forme d'exécution préférée de l'invention, la combinaison sera formée de comprimés de substance anti-dopaminergique, telle que l'amisulpride, contenant de 400 mg à 1200.mg de principe actif et de comprimés de substance prodopaminergique, comme la buprénorphine, à la dose de 0, 2mg à 30 mg par prise unitaire. Les doses de substance prodopaminergique seront plus élevées chez les métaboliseurs rapides qui supportent ainsi des doses plus élevées (200 à 300 mg).

Une autre forme d'exécution particulièrement utile sera la présentation sous forme d'un kit contenant par exemple deux flacons d'une préparation solide ou liquide, l'un des flacons contenant une solution de substance anti-dopaminergique, l'autre flacon contenant une solution ou une suspension de substance de substitution, comme par exemple un sirop ou une suspension aqueuse de méthadone.

Dans un autre mode de réalisation de la combinaison selon l'invention, on pourra réaliser des formes combinées, notamment des formes

sèches contenant les deux principes actifs et réalisant ainsi une administration simultanée. On peut ainsi envisager des comprimés bi-couche ou des dragées à double noyau contenant, dans une des parties de la forme pharmaceutique, la substance anti-dopaminergique et, dans l'autre partie, la substance prodopaminergique. Des comprimés à barre de cassure sont également une forme d'administration aisée.

Des formes injectables peuvent être également réalisées. Elles permettent l'administration simultanée des deux principes actifs de la combinaison. Elles se justifient en particulier pour la réalisation de formes dépôt à action prolongée. Des formes transdermiques peuvent également être envisagées avec un effet prolongé.

Il est également possible de réaliser des associations fixes contenant des doses déterminées de chacun des principes actifs soit sous forme libre, soit sous forme combinée physiquement, soit sous forme combinée chimiquement, comme par exemple un sel double avec un acide polycarboxylique, ou avec une résine acide. Ces associations fixes sont cependant d'une utilisation moins facile, car elle ne permettent pas de moduler la posologie. Elles sont cependant utiles, notamment en début de traitement, pour déterminer la sensibilité du patient, surveiller l'absence d'effets secondaires ou l'apparition plus ou moins rapide du bénéfice de l'effet anti-dopaminergique.

Le schéma posologique habituel consiste, en général, à utiliser des doses faibles de médicament prodopaminergique, puis d'augmenter progressivement les doses pour obtenir un effet « en plateau ».

Dans le cas de l'amisulpride, la posologie journalière variera de 400 à 1 200 mg, et par prise de 100 à 400 mg.

Dans le cas de la Risperidone, la posologie variera de 1 à 16 mg par jour.

L'administration de produits prodopaminergiques, et notamment de méthadone, variera de 5 à 60 mg par prise. Les doses de buprénorphine, de sulfate de morphine ou de nalorphine seront du même ordre de grandeur.



L'ordre d'administration des deux composants de l'association selon l'invention n'est pas déterminant et peut être modulé selon les besoins de la thérapeutique. Il paraît préférable d'assurer l'administration en premier lieu de la substance pro-dopaminergique, puis du produit anti-dopaminergique. Il est possible, au contraire, d'administrer en premier lieu le produit antidopaminergique suivi ensuite de l'administration du produit pro-dopaminergique. De toutes façons, il est plus commode que l'administration des deux principes actifs soit simultanée.

L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique constituée d'une association d'un produit anti-dopaminergique ou d'un de ses sels, et de buprénorphine contenant par exemple de 400 à 1 200 mg d'amisulpride et de 0,2 à 30 mg de buprénorphine dans un excipient ou un véhicule inerte, non toxique, pharmaceutiquement acceptable, en modulant la posologie, en premier lieu en croissant puis lorsque l'effet seuil est atteint, la posologie est diminuée.

Un autre objet de l'invention réside dans la production d'un kit renfermant un premier dosage pharmaceutiquement approprié de substance anti-dopaminergique sous forme de base ou sous forme de sel, sous forme racémique ou sous forme d'énantiomère, à la dose de 100 à 400 mg et un second dosage pharmaceutiquement approprié de méthadone renfermant de 5 à 60 mg de méthadone par prise unitaire.

L'invention concerne également un médicament anti-addiction constitué par l'association du sulpiride sous forme racémique ou optiquement active, libre ou salifié par un acide minéral ou organique, et de buprénorphine.

La combinaison selon l'invention est destinée à être administrée à raison de une à quatre fois par jour, à des intervalles prédéterminés, pour assurer une imprégnation constante du sujet en médicament.

Les essais pharmacologiques et cliniques, dont le détail figure en annexe, montrent l'efficacité de la combinaison selon l'invention.

L'invention concerne encore une méthode pour lutter contre les différentes formes d'accoutumance aux drogues licites ou illicites qui consiste à administrer aux sujets présentant des phénomènes d'accoutumance aux drogues illicites une quantité suffisante et efficace d'une association d'un agoniste prodopaminergique et d'un antagoniste dopaminergique simultanément, sous une forme pharmaceutique unique ou séparée, ou bien en discontinu, en administrant d'abord l'agoniste dopaminergique, sous une forme pharmaceutique déterminée, puis l'antagoniste dopaminergique sous une autre forme pharmaceutique, par exemple sous forme de Kit.

La méthode décrite ci-dessus convient tout particulièrement pour lutter contre l'accoutumance aux drogues opiacées, comme par exemple l'héroïne. Elle trouve également son emploi dans la lutte contre l'usage ou l'abus de principes actifs qui entraînent de l'accoutumance, comme, par exemple, l'amphétamine et ses dérivés, l'alcool, la cocaïne, et le NDMA.

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **1. Les opiacés et le système opioïde**

#### ***1.1 Les récepteurs opioïdes***

L'activation des récepteurs opioïdes permet d'obtenir un grand nombre de réponses physiologiques et pharmacologiques. En effet, le système opioïde intervient notamment dans la modulation du stress, de la douleur, de l'humeur, de la fonction cardiovasculaire, et de la prise alimentaire (Vaccarino et al., 2000).

L'utilisation de ligands radiomarqués à forte activité spécifique a permis la découverte dans le système nerveux central des mammifères, de récepteurs stéréospécifiques, saturables et de haute affinité. Ces sites de liaison membranaires spécifiques pour les opiacés exogènes ont été mis en évidence par trois équipes (Simon et al., 1973 ; Terenius, 1973 ; Pert et Snyder, 1973). Plus récemment, les récepteurs ont été clonés et sont définis comme étant de trois types :  $\delta$ ,  $\mu$ , et  $\kappa$  (Kieffer et al., 1992 ; Chen et al., 1993 ; Yasuda et al., 1993). D'après leur séquence, il apparaît clairement que les récepteurs opioïdes appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires liant les protéines G hétérotrimériques (Dohlman et al., 1987). Ces récepteurs ont une homologie de séquence de 60% chez l'homme, les séquences les plus conservées étant les domaines transmembranaires et les boucles intracellulaires. De plus, ils sont distribués de manière différente au niveau du système nerveux central. Les récepteurs opioïdes  $\mu$  sont largement présents dans l'ensemble du système nerveux central, avec des concentrations très fortes dans certaines régions comme les ganglions de la base, les structures limbiques, les noyaux thalamiques et des régions importantes pour la nociception. Les récepteurs delta et kappa ont une distribution plus réduite, ils sont surtout présents au niveau du striatum ventral et dorsal pour les premiers, et du striatum dorsal et de l'aire préoptique pour les seconds (Mansour et al., 1988).

Les cascades de transduction du signal associées aux récepteurs opioïdes ont été largement étudiées dans différents tissus, types cellulaires ou préparations de neurones. Il a été montré que ces trois récepteurs sont couplés aux protéines Gi/Go qui modulent de nombreux effecteurs. En effet, les récepteurs opioïdes inhibent l'activité adénylate cyclase (Sharma et

al., 1977), entraînant ainsi une diminution du taux d'AMPc intracellulaire, diminuent la conductance calcique (Hescheler et al., 1987 ; Surprenant et al., 1990), stimulent les canaux potassiques (North et al., 1987) et augmentent le taux de calcium intracellulaire (Jin et al., 1992). Plus récemment, il a été montré que ces récepteurs étaient capables de générer des signaux mitogènes en activant la voie des MAP-kinases (Fukada et al., 1996).

### ***1.2 Les peptides opioïdes endogènes***

Les ligands endogènes des récepteurs opioïdes sont les endomorphines (Hughes et al., 1975). Ce sont des neuropeptides libérés dans l'espace synaptique, à partir de grandes vésicules à coeur dense, en conséquence de la stimulation de neurones où ils coexistent avec d'autres neurotransmetteurs. Les endomorphines dérivent de précurseurs distincts et sont présentes de manière hétérogène dans les différentes populations de neurones du système nerveux central. La proopiomélanocortine (ou POMC) donne naissance à la  $\beta$ -endorphine et aux peptides apparentés, la pro-enképhaline A est à l'origine des enképhalines (Met- et Leu-enképhaline) et de peptides voisins et la prodynorphine donne naissance aux néo-endorphines et à la dynorphine (Akil et al., 1998).

### ***1.3 Les enzymes de dégradation des enképhalines et les inhibiteurs synthétiques de ces enzymes***

Les enképhalines ont une durée de vie très courte après leur libération (inférieure à la minute). Cette brièveté n'est pas due, comme pour la plupart des neuromédiateurs classiques, à un système de recapture mais à leur dégradation enzymatique. La Met-enképhaline (Try-Gly-Gly-Phe-Met) et la Leu-enképhaline (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) sont rapidement hydrolysées par clivage de la liaison Gly-Phe par une peptidase initialement appelée enképhalinase, qui a été depuis démontrée identique à l'endopeptidase neutre (NEP), et au niveau de la liaison Tyr-Gly par l'aminopeptidase N (APN) (Roques, 1986). Ces deux enzymes appartiennent au même groupe des métallopeptidases à zinc.

De nombreux inhibiteurs de ces enzymes ont été synthétisés afin d'augmenter la durée de vie des enképhalines, et donc de prolonger leurs effets (Roques, 1993). Cependant, afin de protéger complètement les peptides opioïdes endogènes de la dégradation enzymatique, il est nécessaire d'inhiber aussi bien la NEP que l'APN (Bourgoin et al., 1986).

Plusieurs séries d'inhibiteurs mixtes des enképhalines ont été développées (Roques, 1986), dont le RB101, molécule capable de traverser la barrière hématoencéphalique (Fournié-Zaluski et al., 1992), mais douée d'une faible biodisponibilité orale.

Les inhibiteurs du catabolisme des enképhalines augmentent la concentration extracellulaire des enképhalines sans affecter leur libération (Daugé et al., 1996; Bourgoin et al., 1986 ; Waksman et al., 1985). L'avantage de ces molécules est que, même à des doses très fortes, elles n'induisent jamais de réponses pharmacologiques aussi puissantes que la morphine (Ruiz-Gayo et al., 1992 ; Abbadie et al., 1994), et sont donc dénuées des effets secondaires classiques des opiacés (constipation, sécheresse buccale, démangeaisons, règles irrégulières, et à un niveau plus grave, troubles gastro-intestinaux et dépression respiratoire).

#### *1.4 Les opiacés*

Le ligand exogène des récepteurs opioïdes le plus anciennement connu et utilisé en médecine est la morphine, un alcaloïde dérivé du pavot indien.

D'autres substances ont les mêmes caractéristiques pharmacologiques que la morphine.

L'héroïne (diacétylmorphine, diamorphine) qui est métabolisée en morphine, fut introduite en médecine en 1898 dans le traitement de la tuberculose. De nos jours, cette substance est très prisée par les toxicomanes, du fait de sa pénétration rapide dans le cerveau où elle génère une réponse dite orgasmique, le « high ».

D'autres agonistes opiacés sont, aujourd'hui, utilisés dans des traitements de substitution, c'est le cas de la méthadone et de la buprénorphine. La méthadone est un opiacé de synthèse et, comme la morphine, est un agoniste préférentiel des récepteurs  $\mu$ .

D'autres opioïdes de synthèse tels que le DAMGO, le DPDPE sont classiquement utilisés comme ligands sélectifs, respectivement des récepteurs  $\mu$  et  $\delta$  en pharmacologie expérimentale. (Handa et al., 1981 ; Mosberg et al., 1983).

Une autre classe de ligands exogènes des récepteurs opioïdes existe : les antagonistes opioïdes. On peut citer entre autres, la naloxone qui est utilisée en thérapeutique dans le traitement de l'intoxication aiguë aux opiacés. Cette molécule se lie avec la même affinité aux deux récepteurs  $\mu$  et  $\delta$ . Un autre antagoniste connu est le naltrindole, il se fixe avec une très

forte affinité sur les récepteurs  $\delta$  (Fang et al., 1994). Il est largement utilisé en pharmacologie expérimentale.

## **2. L'addiction opioïde**

### ***2.1 Introduction : la dépendance ou addiction***

D'après la définition de l'OMS, la dépendance/addiction est un syndrome où la consommation d'un produit devient une exigence supérieure à celle d'autres comportements auparavant d'importance maximale. La dépendance s'installe avec la répétition des prises de drogues et se caractérise par un besoin impérieux de la drogue qui conduit à sa recherche compulsive. La dépendance a deux facettes : physique et psychique.

La composante physique impose au toxicomane de consommer de la drogue sous peine de ressentir des douleurs spécifiques du syndrome de manque (qui, sauf cas exceptionnel, n'est pas mortel malgré la force des douleurs ressenties). Elle peut disparaître après quelques jours.

La composante psychique est l'envie du toxicomane de recommencer, elle est associée à une forte stimulation de l'encéphale par le système de renforcement/récompense et est la cause de nombreuses rechutes dans la toxicomanie. Elle peut durer plusieurs années.

### ***2.2 Dépendance et tolérance aux opiacés***

La tolérance est le processus d'adaptation d'un organisme à une substance, qui se traduit par l'affaiblissement progressif des effets de celle-ci, et entraîne la nécessité d'augmenter la dose pour obtenir les mêmes effets. Chez l'animal, la tolérance entraîne une diminution des effets comportementaux induits par la drogue suite à son administration répétée.

L'activation chronique du système opioïde par des ligands exogènes tels que la morphine conduit à la mise en place d'une dépendance caractérisée par la recherche compulsive de drogue. Chez l'animal, notamment chez le rat, de nombreux modèles expérimentaux ont permis de mettre en évidence les effets comportementaux des opiacés. Des techniques, telles que l'auto-administration ou la préférence de place conditionnée, ont démontré les effets renforçants de l'héroïne et de la morphine (Mc Bride et al., 1999), effets qui semblent être principalement médiés par les récepteurs opioïdes  $\mu$  (Matthes et al., 1996).

### *2.3 Sevrage*

L'interruption brutale de la consommation de drogues se manifeste, chez les toxicomanes, par des symptômes physiques et psychiques. Le sevrage aux opiacés se manifeste entre autres par de l'hypertension et des crampes abdominales, mais aussi par de l'anhédonie et de la dysphorie.

Chez l'animal, le sevrage aux opiacés peut être provoqué par l'administration d'un antagoniste opioïde, la naloxone. Plusieurs modifications comportementales sont alors observées chez des rats morphino-dépendants : augmentation des toilettages, de la mastication, du clignement des yeux, mais aussi diarrhée ou encore perte de poids.

## *3 Système dopaminergique et amisulpride*

### *3.1 Le système dopaminergique*

La dopamine agit sur deux classes de récepteurs : "D1-like" et "D2-like". Les récepteurs D1-like (D1 et D5) sont couplés via Gs à l'adénylate cyclase et permettent la production d'AMPc qui déclenche de nombreuses réponses métaboliques dépendantes de la protéine kinase A. Les récepteurs D2-like (D2, D3 et D4) sont couplés à Gi/o et inhibent la synthèse d'AMPc ce qui facilite en particulier l'ouverture de canaux K<sup>+</sup> hyperpolarisants.

Les neurones à dopamine sont principalement rassemblés dans deux noyaux mésencéphaliques. L'un est le tegmentum ou aire tegmentale ventrale (ATV, ou aire mésencéphalique A10) dont les projections axonales innervent le cortex (surtout dans sa partie antérieure), le système limbique (surtout le septum et l'amygdale) et des noyaux de la base (putamen et noyau accumbens). L'essentiel de ces fibres passent par le faisceau médian télencéphalique (FMT) et sont impliqués dans le traitement d'informations d'ordre cognitivo-affectif.

En fait, ce câblage neuronal appartient au système de récompense/renforcement qui produit une très forte stimulation cérébrale afin de faire éprouver du plaisir (action hédonique) lors de comportements essentiels à la survie de l'espèce ou de l'individu. C'est ce circuit de motivation qui est détourné par les drogues. Ainsi, celles-ci, en produisant du plaisir, motivent

l'individu vers un comportement compulsif où l'usage de drogue remplace les comportements de survie.

L'autre noyau dopaminergique est la substance noire ( locus niger ou substantia nigra ou aire mésencéphalique A9) émettant des axones vers le striatum (noyau caudé et putamen) et participant au contrôle de la locomotion. Les drogues qui modifient le niveau de libération de dopamine dans le striatum bouleversent la motricité.

### *3.2 Les mécanismes dopamine-dépendants*

L'administration de morphine stimule l'activité des neurones dopaminergiques dans la substance noire et dans l'ATV, ce qui entraîne une augmentation de la libération de dopamine dans le noyau caudé-putamen et dans le noyau accumbens (Matthews et German, 1984 ; Spanagel et al., 1990 ; Di Chiara et North, 1992).

Il est communément admis que cette augmentation est due à une action indirecte des opioïdes. En effet, l'activation des récepteurs  $\mu$  présents à la surface des interneurons GABA ergiques situés dans la substance noire réticulée et l'ATV entraînerait la levée de l'inhibition exercée par ces interneurons, sur les neurones dopaminergiques (Johnson et North, 1992 ; Bontempi et Sharp, 1997).

### *3.3 L'amisulpride, antagoniste dopaminergique*

L'amisulpride est une molécule chimiquement apparentée aux benzamides. Aux doses faibles, l'amisulpride a un effet antagoniste sur les récepteurs présynaptiques D2 et D3 (effet net : facilitation) du cortex frontal. A l'opposé, l'amisulpride employé à des doses fortes inhibe les récepteurs D2 et D3 post-synaptiques (effet net : blocage) au niveau du système limbique. Il est de plus dépourvu d'effets extra-pyramidaux, puisque n'ayant qu'une faible activité au niveau du striatum (Perrault et al., 1996). Tous ces éléments font de cette molécule un anti-psychotique atypique, aujourd'hui utilisé dans le traitement des symptômes positifs et négatifs de la schizophrénie.



## **MATERIELS ET METHODES**

### **1 Animaux et traitements**

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris mâles de souche OF1 pesant environ 20 g au début des expériences (Charles River, France). Elles vivent dans un environnement dont le cycle lumineux journalier (7h30;19h30) est constant tout au long de l'année, et la température est maintenue aux environs de 22°C. Les souris ont un accès libre à l'eau et à la nourriture, et les expériences sont réalisées conformément aux règles internationales d'éthique de l'expérimentation animale.

Les animaux sont traités chroniquement par voie intrapéritonéale (IP) avec de l'amisulpride ou du sérum physiologique. Les injections sont réalisées deux fois par jour, avec un intervalle d'environ huit heures entre chaque administration, sur une période variant entre cinq jours et trois semaines. Le jour du test pharmacologique, les animaux ne reçoivent pas d'amisulpride. Le RB101 est administré le jour du test par voie intraveineuse (IV), 10 minutes avant le début du test (sauf pour les mesures d'activité locomotrice réalisées immédiatement après l'injection).

### **2. Produits**

L'amisulpride (solution injectable à 200 mg/4mL) est utilisée sous forme diluée avec du sérum physiologique.

Le RB101 est un produit de synthèse décrit par Baamonde et al. *Europ J Pharmacol* (1992) T 216 p°157-166. Le RB101 est dissous dans un véhicule éthanol (10%) / Cremophor EL (10%) / eau distillée (80%).

La méthadone chlorhydrate et la morphine chlorhydrate sont des produits commerciaux. Elles sont dissoutes dans du sérum physiologique.

### **3. Méthodes**

#### ***3.1 Mesure de l'activité locomotrice***

Les souris sont placées individuellement dans une cage en plastique (255 cm x 205 cm) isolée du bruit et sont exposées à une intensité lumineuse de 5 lux. Les déplacements des animaux sont captés par des cellules photoélectriques pendant 45 minutes et enregistrés par un ordinateur. Les animaux reçoivent le véhicule ( éthanol (10%)/ Cremophor EL (10%)/ eau (80%) ) ou du RB101 ( 5 mg/kg) par voie intraveineuse à raison d'un volume de 0,1 ml/10g. L'expérience débute tout de suite après l'injection du produit. Dans cette étude, le terme « activité locomotrice » ne prend en compte que les déplacements horizontaux des animaux.

### ***3.2 Mesure de l'analgésie par le test de la plaque chaude***

Les souris sont placées individuellement à l'intérieur d'un cylindre, sur une plaque chauffée à  $52 \pm 1^{\circ}\text{C}$  par un circuit d'eau. Le temps de latence du saut de la souris est mesuré, la valeur 100 du pourcentage d'analgésie correspondant à un temps limité à 240 secondes afin d'éviter les lésions cutanées. Le test est réalisé 10 minutes après l'injection du RB101 ( 5 mg/kg, IV ) ou du véhicule. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'analgésie calculé par la formule suivante : (moyenne des temps de latence du saut du groupe traité – moyenne des temps de latence du saut du groupe témoin) / ( 240 – moyenne des temps de latence du saut du groupe témoin) x 100. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  sem.

### ***3.3 Test de la nage forcée (test de Porsolt) : modèle de dépression***

Les souris sont placées individuellement dans un récipient cylindrique rempli d'eau à hauteur de 15 cm, l'eau étant à température ambiante. Après un délai de 2 minutes, on mesure la durée totale d'immobilisation de l'animal pendant 4 minutes. Les mouvements nécessaires à l'animal pour garder la tête hors de l'eau ne sont pas comptabilisés.

### ***3.4 Préférence de place conditionnée : mesure de la dépendance psychique***

L'appareil de préférence de place conditionnée est constitué par une boîte divisée en trois compartiments distincts : un compartiment noir au sol lisse, un compartiment rayé noir et blanc au sol rugueux, et un compartiment central neutre.

Le test se déroule en 3 phases :

- **une phase de prétest** : l'animal est placé dans le compartiment central neutre et a libre accès aux trois compartiments de l'appareil pendant 20 minutes. Le temps passé à l'intérieur de chaque compartiment est enregistré à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur. Les souris présentant une préférence spontanée pour l'un des compartiments (c'est-à-dire passant plus de 75% du temps alloué dans un des compartiments latéraux) sont écartées de l'expérience.

Après cette première session, les animaux sont randomisés afin de leur attribuer un traitement (morphine ou sérum physiologique, SC) et le compartiment dans lequel ils recevront la drogue (compartiment noir ou rayé noir et blanc). On choisit de conditionner les animaux dans le compartiment pour lequel la « préférence » est la moins marquée.

- **une phase de conditionnement** : les animaux reçoivent alternativement la morphine (10 mg/kg, SC) ou le sérum physiologique pendant trois jours consécutifs, le sérum physiologique étant injecté le matin et la morphine l'après-midi pour un même animal. Les animaux sont maintenus dans l'un ou l'autre des compartiments pendant environ 20 minutes, immédiatement après l'injection. Le compartiment associé à la drogue est toujours le même pour une même souris.

- **une phase de test** : comme pour la phase de prétest, les animaux sont placés dans le compartiment central et ont libre accès aux trois compartiments. Ils ne reçoivent aucune injection de morphine ou de solution saline ce jour-là.

Les scores correspondent à la différence entre les temps passés pendant la phase de test et la phase de prétest dans le compartiment associé à la morphine.

#### **4. Analyse statistique**

Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur (traitement) est utilisée pour tous les tests comportementaux réalisés, suivie d'un test de Student-Newman-Keuls si  $p < 0,05$  dans l'ANOVA. Dans tous les cas, la significativité est acceptée dès lors que  $p < 0,05$ .

## **RESULTATS**

### **1. Détermination des doses de RB101 et d'amisulpride utilisées**

#### ***1.1 Effet-dose RB101 en plaque chaude***

Le test de la plaque chaude est classiquement utilisé pour évaluer le pouvoir analgésique de molécules. C'est une méthode qui met en jeu une réponse à une intégration centrale, le saut étant associé à une volonté de fuite du stimulus douloureux. Le pouvoir analgésique du RB101 dans ce test a été préalablement montré (Noble et al., 1992), et on a mis en évidence un effet-dose pour démarrer cette étude. On cherche en effet la dose de RB101 pour laquelle on obtient environ 40% d'analgésie, ce qui permet d'observer éventuellement une potentialisation des effets de celui-ci par l'amisulpride. Trois doses ont été testées : 2,5mg/kg, 5 mg/kg et 10 mg/kg, par voie intraveineuse, 10 minutes avant le début du test.

La dose de 5 mg/kg permet une analgésie de  $45,2\% \pm 10,6\%$ . C'est donc la dose retenue en vue de l'association avec l'amisulpride.

#### ***1.2 Détermination de la dose d'amisulpride en activité locomotrice***

Une molécule douée d'une activité antagoniste dopaminergique diminue l'activité locomotrice. C'est cette propriété qui est mise en jeu afin de déterminer à quelle dose l'amisulpride possède une activité antagoniste dopaminergique chez la souris (soit un effet sur les récepteurs post-synaptiques D2 et D3, et non sur les auto-récepteurs D2 et D3). Les doses testées sont : 0,5mg/kg, 2mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg et 50mg/kg.

La diminution de l'activité locomotrice est significative à partir de 10 mg/kg . La dose choisie est de 20 mg/kg, dose pour laquelle l'activité antagoniste dopaminergique est manifeste et sans discussion possible.

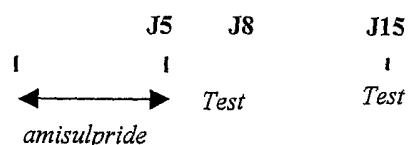
## 2. Détermination de la durée de traitement à l'amisulpride (association amisulpride/RB101 et mesure d'activité locomotrice)

Au contraire de l'amisulpride, le RB101 seul provoque une augmentation d'activité locomotrice chez les souris (Baamonde et al., 1992).

Le traitement à l'amisulpride (20 mg/kg, IP, 2 fois/jour) a tout d'abord été réalisé pendant trois semaines au bout desquelles le RB101 (5mg/kg, IV) a été injecté et l'activité locomotrice mesurée immédiatement après, pendant 45 minutes.

Les effets du RB101 ont été significativement potentialisés par l'amisulpride au bout de trois semaines de traitement. On s'est donc posé la question de voir si cette durée de traitement pouvait être raccourcie. L'activité locomotrice a donc cette fois été mesurée après seulement cinq jours de traitement.

La potentialisation des effets du RB101 par l'amisulpride persiste, même après seulement cinq jours de traitement. On peut donc se demander combien de temps persiste cette potentialisation après l'arrêt du traitement à l'amisulpride. L'activité locomotrice est donc mesurée après trois jours ou dix jours d'arrêt de traitement, chez des souris ayant reçu un traitement de cinq jours selon la figure ci-après :



La potentialisation des effets du RB101 après un traitement par l'amisulpride d'une durée de cinq jours est toujours présente au bout de trois jours, mais n'existe plus après dix jours de sevrage.

Pour l'étude, on a choisi de continuer les expériences après un traitement à l'amisulpride d'une durée de cinq jours, et de réaliser les mêmes expériences au bout de trois jours de sevrage en cas de succès.

### **3. Association amisulpride et RB101 dans le test de la nage forcée**

Le test de la nage forcée est classiquement utilisé pour évaluer l'effet antidépresseur de molécules. Le RB101 seul est doué de propriétés de type anti-dépresseur (Baamonde et al., 1992), puisqu'il diminue la durée d'immobilité des souris dans ce test.

Le traitement à l'amisulpride est réalisé pendant cinq jours, et le RB101 est injecté le jour du test (dès le lendemain de l'arrêt de traitement).

Il existe également une potentialisation des effets de type antidépresseur du RB101 (5 mg/kg, IV) par l'amisulpride au bout de cinq jours de traitement.

Le même test est réalisé après trois jours de sevrage.

La potentialisation des effets de type antidépresseur du RB101 (5 mg/kg, IV) par l'amisulpride (cinq jours de traitement) est toujours présente après trois jours de sevrage.

### **4. Association amisulpride et RB101 dans le test de la plaque chaude**

Le traitement à l'amisulpride est réalisé pendant cinq jours, et le RB101 (5 mg/kg, IV) est injectée le jour du test (dès le lendemain de l'arrêt du traitement).

Le RB101 a un effet analgésique par lui même ( $38.4 \% \pm 10.8 \%$ ). L'association amisulpride/RB101 se situe, elle, à un niveau d'analgésie de  $49.6 \% \pm 8.9 \%$ . Cependant, il n'existe aucune différence significative entre ces deux groupes, et donc aucune potentialisation des effets du RB101 par l'amisulpride dans le test de la plaque chaude (après cinq jours de traitement).

### **5. Association amisulpride/RB101 et préférence de place conditionnée**

Dans un premier temps, les animaux sont conditionnés de la manière décrite dans le chapitre « Matériels et méthodes ». Les résultats obtenus à l'issue de ce conditionnement sont représentés sur le graphique I placé en annexe qui montre la préférence de place conditionnée

à la morphine (10 mg/kg SC, n = 10 souris par groupe) \*  $p < 0,05$  par rapport au groupe solution saline.

On observe une préférence de place à la morphine (10 mg/kg, SC), ce qui traduit bien les effets renforçants de cette drogue.

Les souris des deux groupes Morphine et Serum physiologique sont ensuite réparties en deux sous-groupes de tailles égales, un sous-groupe étant traité à l'Amisulpride selon le protocole habituel pendant cinq jours, l'autre sous-groupe recevant des injections de sérum physiologique.

On réalise un deuxième test sur ces souris le sixième jour, les animaux ayant été traités à l'Amisulpride recevant du RB101 le jour du test, les autres recevant du véhicule.

Les résultats de cet essai sont représentés dans le graphique n°II joint en annexe. Il montre les effets du traitement par l'Amisulpride à 20mg/kg par voie IP deux fois par jour pendant 5 jours associé à du RB 1M 55mg/kg IV le jour du test 2) sur les animaux utilisés par ailleurs dans le test I.

Aucun groupe n'obtient de résultat significatif par rapport au groupe contrôle (Serum physiologique, NaCl+Véhicule), bien qu'on observe tout de même une tendance à la persistance de la préférence de place chez les souris du groupe Morphine n'ayant pas reçu le traitement Amisulpride + RB101. Les souris du groupe Morphine ayant reçu ce traitement semblent quant à elles, se rapprocher des souris du groupe Serum physiologique.

Afin de voir si cette tendance persiste ou non, un troisième test est réalisé quatre jours après le test. On n'injecte pas de RB101 le jour du test 3.

Les résultats obtenus sont figurés au graphique III. Ils montrent l'effet du traitement par l'Amisulpride (20 mg/kg par voie IP 2 fois par jour pendant 5 jours) + RB 101 (5 mg/Kg par voie IV, le jour du test 2), 4 jours après le test 2, sur les mêmes animaux.

$p < 0,05$  par rapport au groupe morphine/Amisulprine + RB1M

$p < 0,05$  par rapport au groupe témoin

On retrouve une préférence de place chez les souris du groupe Morphine n'ayant pas reçu le traitement Amisulpride + RB101. De plus, il n'y a aucune préférence de place désormais chez les souris du groupe Morphine ayant reçu le traitement Amisulprine + RB101.

## **6. Association amisulpride et méthadone : mesure d'activité locomotrice**

Le traitement à l'Amisulpride est réalisé pendant 5 jours, et on injecte de la méthadone le jour du test (0.25 mg/kg, IV). La dose de méthadone choisie provoque un niveau d'analgésie comparable à celui du RB101 dans le test de la plaque chaude.

Le graphique IV représente la mesure de l'activité locomotrice après 5 jours de traitement à l'Amisulpride de (S20) (20 mg/kg par voie IP, 2 fois par jour). La méthadone est injectée le jour du test immédiatement avant le début du test (n = 10 souris par groupe).

Aucun groupe n'obtient de résultat significatif par rapport au groupe témoins.

### **7. Association amisulpride et méthadone dans le test de la nage forcée**

Le traitement à l'Amisulpride est réalisé pendant 5 jours, et on injecte de la méthadone le jour du test (0.25 mg/kg, IV).

Le graphique V annexé ci-après montre la mesure du temps d'immobilisation dans le test de la nage forcée après 5 jours de traitement à l'Amisulpride (S20) à raison de 20 mg/kg par voie IP 2 fois par jour.

La méthadone (Meth) est injectée le jour du test 10 mn avant le début du test (n = 10 souris par groupe).

Le graphique VI figure la mesure de l'activité locomotrice après 5 jours de traitement à l'Amisulpride (S24) à raison de 20 mg /kg par voie IP 2 fois par jour et 3 jours de sevrage. Le RB 101 (RB) est injecté le jour du test immédiatement avant le début du test (n = 10 souris par groupe)

\*p < 0, 05

\*\* p < 0, 01 par rapport au groupe témoin

Le graphique VII illustre les résultats obtenus après 10 jours de sevrage.

Le graphique VIII présente les résultats obtenus par mesure du temps d'une mobilisation dans le test de la nage forcée chez des souris ayant reçu un traitement à l'Amisulpride ((S20) à raison de 20 mg/kg par voie IP 2 fois par jour) pendant 5 jours. Le RB 101 (RB) est injecté 10 minutes avant le début du test (n = 10 souris par groupe)

\*\* p < 0, 001 par rapport au groupe témoin

Le graphique IX présente les résultats obtenus par mesure du temps d'immobilisation dans le test de la nage forcée chez les souris ayant reçu un traitement à l'Amisulpride (S20) à raison de 20 mg/kg par voie IP 2 fois par jour pendant 5 jours suivi de 3 jours de sevrage. Le RB 101 (RB) est injecté 10 mn avant le début du test (n = 10 souris par groupe)

\*p = 0, 005

\*\* p < 0, 001 par rapport au groupe témoin.



Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les effets d'un inhibiteur mixte du catabolisme des enképhalines, le RB101, sont potentialisés chez des souris préalablement traitées de façon chronique à l'amisulpride, antagoniste dopaminergique D2/D3, dans deux des trois tests pharmacologiques réalisés (test de la nage forcée et mesure de l'activité locomotrice). Il est intéressant de remarquer que cette potentialisation est obtenue assez rapidement puisque cinq jours de traitement à l'amisulpride suffisent, et que cet effet semble persister dans le temps (trois jours), même après cette courte durée de traitement.

De plus, les mêmes tests réalisés après une seule injection d'amisulpride et de RB101 ne permettant pas d'obtenir cette potentialisation, on constate la nécessité d'un blocage « chronique », même de courte durée, de ces récepteurs dopaminergiques afin d'obtenir une plus grande stimulation du système opioïde par le RB101.

L'utilisation de la méthadone à la place du RB101 n'a pas permis d'obtenir une potentialisation des effets de celle-ci lorsqu'elle est associée à un traitement chronique à l'Amisulpride dans les tests d'activité locomotrice et de nage forcée. De plus, l'association du RB101 et de l'Amisulpride dans le test de la plaque chaude n'a montré aucune potentialisation.

On peut expliquer ces résultats par une implication préférentielle de récepteurs opioïdes autres que les récepteurs  $\mu$  dans cette association. En effet, le test de la plaque chaude met en jeu de façon prépondérante une analgésie opioïde supraspinale médiée par les récepteurs  $\mu$  (Roques, 1993). La méthadone, quant à elle, est un agoniste préférentiel des récepteurs  $\mu$ . Il a également été montré que les effets de type antidépresseur des enképhalines, protégées par le RB101, étaient médiés par une stimulation des récepteurs opioïdes  $\delta$ , et non  $\mu$  (Baamonde et al., 1992). Il a également été montré la contribution des récepteurs  $\delta$  à l'amélioration de l'humeur (Filliol et al., 2000).

On peut donc penser que l'association amisulpride/RB101 permet une potentialisation des effets du RB101 en agissant préférentiellement au niveau des récepteurs opioïdes  $\delta$ . Il est aussi intéressant d'utiliser un antagoniste préférentiel des récepteurs  $\delta$ , comme le naltrindole, et de voir s'il est possible de bloquer les effets obtenus dans l'association amisulpride/RB101.

On peut également utiliser un agoniste préférentiel des récepteurs  $\delta$ , comme le SNC 80 ou le BUBU (administrables par voie systémique), à la place du RB101 après un traitement à l'Amisulpride, afin d'en observer les effets dans les tests pharmacologiques utilisés dans cette étude (test de la nage forcée et mesure de l'activité locomotrice).

Cependant, il faut signaler qu'à la dose choisie (0.25 mg/kg, IV), la méthadone seule n'a pas montré d'effet significatif en activité locomotrice et en nage forcée, alors qu'à cette même dose, elle provoque une analgésie marquée dans le test de la plaque chaude.

Cependant, la méthadone est connue pour avoir une activité hyperlocomotrice chez la souris (Browne, 1980), et possède, en tant qu'agoniste opioïde, des effets de type antidépresseur. Il convient de vérifier que l'absence de potentialisation des effets de la méthadone (0.25 mg/kg, IV) par l'Amisulpride obtenue dans cette étude n'est pas due à l'utilisation d'une dose trop faible de méthadone, en renouvelant les tests réalisés dans une gamme de doses plus élevées (le risque étant alors de ne plus toucher que les récepteurs opioïdes  $\mu$  si l'on utilise des doses trop élevées).

L'existence d'une potentialisation des effets du RB101 par l'amisulpride dans les tests de la nage forcée et de mesure d'activité locomotrice, alors que cette potentialisation n'est pas retrouvée dans le test de la plaque chaude, peut également être expliquée par l'existence d'une régiosélectivité d'action de l'amisulpride. En effet, l'activité locomotrice et les effets de type antidépresseur sont des comportements impliquant fortement les voies dopaminergiques, alors que les effets analgésiques sont surtout dûs au système opioïde.

On peut également réaliser des expériences de microdialyse cérébrale, ce qui permet d'évaluer les taux extracellulaires d'enképhalines obtenus dans différentes régions cérébrales (par exemple, le nucleus accumbens et le striatum qui font partie du système limbique, ainsi que la substance grise périaqueducale, plus particulièrement impliquée dans la douleur) après traitement chronique à l'Amisulpride.

Dans un contexte de dépendance, représenté dans l'étude par le modèle de préférence de place conditionnée, il apparaît que le protocole de traitement choisi (amisulpride pendant cinq jours, RB101 le sixième jour) supprime l'expression de la préférence de place chez des animaux dépendants, cinq jours après l'arrêt du traitement à l'amisulpride (test 3). Il convient toutefois de signaler que le test réalisé le lendemain de l'arrêt du traitement (test 2) ne permet pas d'obtenir de résultat significatif. Ces résultats indiquent donc que l'association Amisulpride/RB101 pourrait être efficace dans le cadre d'une dépendance à l'héroïne, bien que le protocole utilisé puisse encore être amélioré, et les résultats obtenus ici confirmés.

## **Bibliographie**

1. Abbadie C, Honore P, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Besson JM. **Effects of opioids and non-opioids on c-Fos-like immunoreactivity induced in rat lumbar spinal cord neurons by noxious heat stimulation.**  
Eur J Pharmacol. 1994 Jun 13;258(3):215-27.
2. Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S. **Endogenous opioids: overview and current issues.**  
Drug Alcohol Depend. 1998 Jun-Jul;51(1-2):127-40.
3. Baamonde A, Dauge V, Ruiz-Gayo M, Fulga IG, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. **Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D1 receptor stimulation.**  
Eur J Pharmacol. 1992 Jun 5;216(2):157-66.
4. Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E. **Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors.**  
Nature. 1995 Oct 5;377(6548):424-8.
5. Bontempi B, Sharp FR. **Systemic morphine-induced Fos protein in the rat striatum and nucleus accumbens is regulated by mu opioid receptors in the substantia nigra and ventral tegmental area.**  
J Neurosci. 1997 Nov 1;17(21):8596-612.
6. Bourgoin S, Le Bars D, Artaud F, Clot AM, Bouboutou R, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Hamon M, Cesselin F. **Effects of ketorphan and other peptidase inhibitors on the in vitro and in vivo release of methionine-enkephalin-like material from the rat spinal cord.**  
J Pharmacol Exp Ther. 1986 Jul;238(1):360-6.
7. Browne RG, Segal DS. **Behavioral activating effects of opiates and opioid peptides.**  
Biol Psychiatry. 1980 Feb;15(1):77-86.
8. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. **Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain.**  
Mol Pharmacol. 1993 Jul;44(1):8-12.
9. Dauge V, Mauborgne A, Cesselin F, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. **The dual peptidase inhibitor RB101 induces a long-lasting increase in the extracellular level of Met-enkephalin-like material in the nucleus accumbens of freely moving rats.**  
J Neurochem. 1996 Sep;67(3):1301-8.
10. Di Chiara G, North RA. **Neurobiology of opiate abuse.**  
Trends Pharmacol Sci. 1992 May;13(5):185-93.
11. Dohlman HG, Caron MG, Lefkowitz RJ. **A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins.**  
Biochemistry. 1987 May 19;26(10):2657-64.
12. Fang L, Knapp RJ, Horvath R, Matsunaga TO, Haaseth RC, Hruby VJ, Porreca F, Yamamura HI. **Characterization of [3H]naltrindole binding to delta opioid receptors in mouse brain and mouse vas deferens: evidence for delta opioid receptor heterogeneity.**  
J Pharmacol Exp Ther. 1994 Feb;268(2):836-46.
13. Filliol D, Ghazizadeh S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL. **Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses.**  
Nat Genet. 2000 Jun;25(2):195-200.

14. Fournie-Zaluski MC, Coric P, Turcaud S, Lucas E, Noble F, Maldonado R, Roques BP. **"Mixed inhibitor-prodrug" as a new approach toward systemically active inhibitors of enkephalin-degrading enzymes.**  
J Med Chem. 1992 Jun 26;35(13):2473-81.
15. Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, Mori K. **Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells.**  
J Neurochem. 1996 Sep;67(3):1309-16.
16. Handa BK, Land AC, Lord JA, Morgan BA, Rance MJ, Smith CF. **Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors.**  
Eur J Pharmacol. 1981 Apr 9;70(4):531-40.
17. Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. **The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels.**  
Nature. 1987 Jan 29-Feb 4;325(6103):445-7.
18. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. **Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity.**  
Nature. 1975 Dec 18;258(5536):577-80.
19. Jin W, Lee NM, Loh HH, Thayer SA. **Opioids mobilize calcium from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores in NG108-15 cells.**  
J Neurosci. 1994 Apr;14(4):1920-9.
20. Johnson SW, North RA. **Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons.**  
J Neurosci. 1992 Feb;12(2):483-8.
21. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. **The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Dec 15;89(24):12048-52. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Feb 1;91(3):1193.
22. Law PY, Wong YH, Loh HH. **Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling.**  
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2000;40:389-430.
23. Le Foll B, Schwartz JC, Sokoloff P. **Dopamine D3 receptor agents as potential new medications for drug addiction.**  
Eur Psychiatry. 2000 Mar;15(2):140-6.
24. Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E. **Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors.**  
Nature. 1997 Aug 7;388(6642):586-9.
25. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. **Anatomy of CNS opioid receptors.**  
Trends Neurosci. 1988 Jul;11(7):308-14.
26. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. **Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene.**  
Nature. 1996 Oct 31;383(6603):819-23.
27. Matthews RT, German DC. **Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine.**  
Neuroscience. 1984 Mar;11(3):617-25.

28. McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. **Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies.**  
Behav Brain Res. 1999 Jun;101(2):129-52.
29. Mosberg HI, Hurst R, Hruby VJ, Gee K, Yamamura HI, Galligan JJ, Burks TF. **Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward delta opioid receptors.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 Oct;80(19):5871-4.
30. Nieto MM, Wilson J, Cupo A, Roques BP, Noble F. **Chronic morphine treatment modulates the extracellular levels of endogenous enkephalins in rat brain structures involved in opiate dependence: a microdialysis study.**  
J Neurosci. 2002 Feb 1;22(3):1034-41.
31. Noble F, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. **Unlike morphine the endogenous enkephalins protected by RB101 are unable to establish a conditioned place preference in mice.**  
Eur J Pharmacol. 1993 Jan 12;230(2):139-49.
32. Noble F, Roques BP. **Inhibitors of enkephalin catabolism. New therapeutic tool in opioid dependance.**  
Molecular Biology of addiction, 2000, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
33. Noble F, Soleilhac JM, Soroca-Lucas E, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. **Inhibition of the enkephalin-metabolizing enzymes by the first systemically active mixed inhibitor prodrug RB 101 induces potent analgesic responses in mice and rats.**  
J Pharmacol Exp Ther. 1992a Apr;261(1):181-90.
34. North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. **Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Aug;84(15):5487-91.
35. Olievenstein C. **La drogue, 30 ans après.**  
Editions Odile Jacob, 2000.
36. Perrault G, Depoortere R, Morel E, Sanger DJ, Scatton B. **Psychopharmacological profile of amisulpride: an antipsychotic drug with presynaptic D2/D3 dopamine receptor antagonist activity and limbic selectivity.**  
J Pharmacol Exp Ther. 1997 Jan;280(1):73-82.
37. Pert CB, Snyder SH. **Opiate receptor: demonstration in nervous tissue.**  
Science. 1973 Mar 9;179(77):1011-4.
38. Roques BP, Fournie-Zaluski MC. **Enkephalin degrading enzyme inhibitors: a physiological way to new analgesics and psychoactive agents.**  
NIDA Res Monogr. 1986;70:128-54.
39. Roques BP. **Novel approaches to targeting neuropeptide systems.**  
Trends Pharmacol Sci. 2000 Dec;21(12):475-83.
40. Roques BP. **Zinc metallopeptidases: active site structure and design of selective and mixed inhibitors: new approaches in the search for analgesics and anti-hypertensives.**  
Biochem Soc Trans. 1993 Aug;21 ( Pt 3)(3):678-85.
41. Ruiz-Gayo M, Baamonde A, Turcaud S, Fournie-Zaluski MC, Roques BP. **In vivo occupation of mouse brain opioid receptors by endogenous enkephalins: blockade of enkephalin degrading enzymes by RB 101 inhibits [3H]diprenorphine binding.**  
Brain Res. 1992 Feb 7;571(2):306-12.
42. Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. **Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Aug;74(8):3365-9.

43. Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. **Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1973 Jul;70(7):1947-9.
44. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS. **The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study.**  
J Neurochem. 1990 Nov;55(5):1734-40.
45. Surprenant A, Shen KZ, North RA, Tatsumi H. **Inhibition of calcium currents by noradrenaline, somatostatin and opioids in guinea-pig submucosal neurones.**  
J Physiol. 1990 Dec;431:585-608.
46. Terenius L. **Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain.**  
Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1973;33(5):377-84.
47. Vaccarino AL, Kastin AJ. **Endogenous opiates: 2000.**  
Peptides. 2001 Dec;22(12):2257-328.
48. Valverde O, Fournie-Zaluski MC, Roques BP, Maldonado R. **The CCKB antagonist PD-134,308 facilitates rewarding effects of endogenous enkephalins but does not induce place preference in rats.**  
Psychopharmacology (Berl). 1996 Jan;123(2):119-26.
49. Waksman G, Bouboutou R, Devin J, Bourgoin S, Cesselin F, Hamon M, Fournie-Zaluski MC, Roques B. **In vitro and in vivo effects of kelatorphan on enkephalin metabolism in rodent brain.**  
Eur J Pharmacol. 1985 Nov 5;117(2):233-43.
50. Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. **Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain.**  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6736-40.
51. Zimmerman DM, Leander JD. **Opioid antagonists: structure activity relationships.**  
NIDA Res Monogr. 1990;96:50-60.

## REVENDICATIONS

- 1- Nouvelles compositions pharmaceutiques, de préférence sous forme de Kit, contenant une combinaison de deux médicaments destinés à être utilisés simultanément ou successivement qui consiste en une association d'un antagoniste partiel ou complet des récepteurs dopaminergiques et d'un produit prodopaminergique, en mélange ou en association avec un excipient ou un véhicule inerte, non toxique approprié pour l'administration par voie orale, parentérale ou transdermique.
- 2- Composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle l'antagoniste des récepteurs dopaminergiques est un antagoniste des récepteurs D<sub>2</sub> et/ou D<sub>3</sub>.
- 3- Composition pharmaceutique selon les revendications 1 ou la revendication 2 dans laquelle l'antagoniste dopaminergique est un antagoniste des récepteurs D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>.
- 4- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 3 dans laquelle l'antagoniste dopaminergique est une molécule présentant en outre une composante sérotoninergique.
- 5- Composition pharmaceutique que selon l'une des revendications 1 à 4 dans laquelle l'antagoniste dopaminergique est choisi parmi l'Amisulpride, la Rispéridone, l'antagoniste D<sub>3</sub> dénommé SB277 011-A, le sulpiride, le metoclopramide et l'olanzapine.
- 6- Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 5 dans laquelle l'antagoniste dopaminergique est l'Amisulpride sous forme dédoublée et notamment le S(-) Amisulpride.

- 7- Composition pharmaceutique selon la revendication 1 dans laquelle le produit prodopaminergique est une substance, capable de se fixer sur des récepteurs aux opioïdes ou sur des systèmes capables d'exciter d'une manière stable le système dopaminergique.
- 8- Composition pharmaceutique selon la revendication 1 et la revendication 7 dans laquelle le produit prodopaminergique est choisi parmi la méthadone, la buprenorphine, le produit dénommé LAM, la nalorphine, le naltrexate et le levallorphan.
- 9- Composition pharmaceutique selon la revendication 1 qui contient en outre un agent neuroleptique.
- 10-Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications précédentes dans lesquelles l'association d'antagoniste dopaminergique et de produit prodopaminergique se présente sous la forme d'une composition pharmaceutique unique définie.
- 11-Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1 à 9 dans laquelle l'association d'antagoniste dopaminergique et de produit prodopaminergique est présentée sous forme d'un Kit contenant chacun des principes actifs sous une forme séparée.
- 12-Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications précédentes dans lesquelles l'association des deux principes actifs se présente sous deux formes pharmaceutiques identiques.
- 13-Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications précédentes dans lesquelles l'association des deux principes actifs se présente sous deux formes pharmaceutiques différentes.
- 14-Compositions pharmaceutiques selon l'une des revendications précédentes dans lesquelles les doses de substance anti-dopaminergique varient de 0,3 à 1 200 mg par prise unitaire.



- 15-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 14 dans lesquelles la dose d'Amisulpride racémique ou sous forme d'isomère S(-) par prise unitaire varie de 200 mg à 1 200 mg.
- 16-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 dans lesquelles les doses de substance prodopaminergique varient de 0, 2 mg à 300 mg.
- 17-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 caractérisées en ce qu'elles sont formées de comprimés d'Amisulpride à la dose de 100.mg à 400 mg et de comprimés de substance prodopaminergique à la dose de 0, 2 à 100 mg par prise unitaire.
- 18-Composition pharmaceutiques selon la revendication 1 dans lesquelles les doses de substances prodopaminergiques destinées aux métaboliseurs rapides sont de l'ordre de 200 à 300 mg.
- 19-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 caractérisées en ce qu'elles sont présentées sous la forme d'un Kit contenant deux flacons d'une préparation solide ou liquide de substance anti-dopaminergique d'une part et d'une préparation liquide de substance prodopaminergique d'autre part.
- 20-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 constituées d'une association d'Amisulpride ou d'un de ses sels, sous forme de racémique ou énantiomériquement pure et de methadone caractérisées en ce qu'elles renferment de 100 à 400 mg d'Amisulpride et de 0, 2.mg à 30.mg de buprenorphine par prise unitaire.
- 21-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 présentées sous la forme de Kit renfermant un premier dosage pharmaceutiquement approprié d'Amisulpride sous forme de base ou sous forme de sel, sous forme racémique ou sous forme d'énantiomère,

à la dose de 100.mg à 400 mg et un second dosage pharmaceutiquement approprié de methadone renfermant de 5 à 60 mg par prise unitaire.

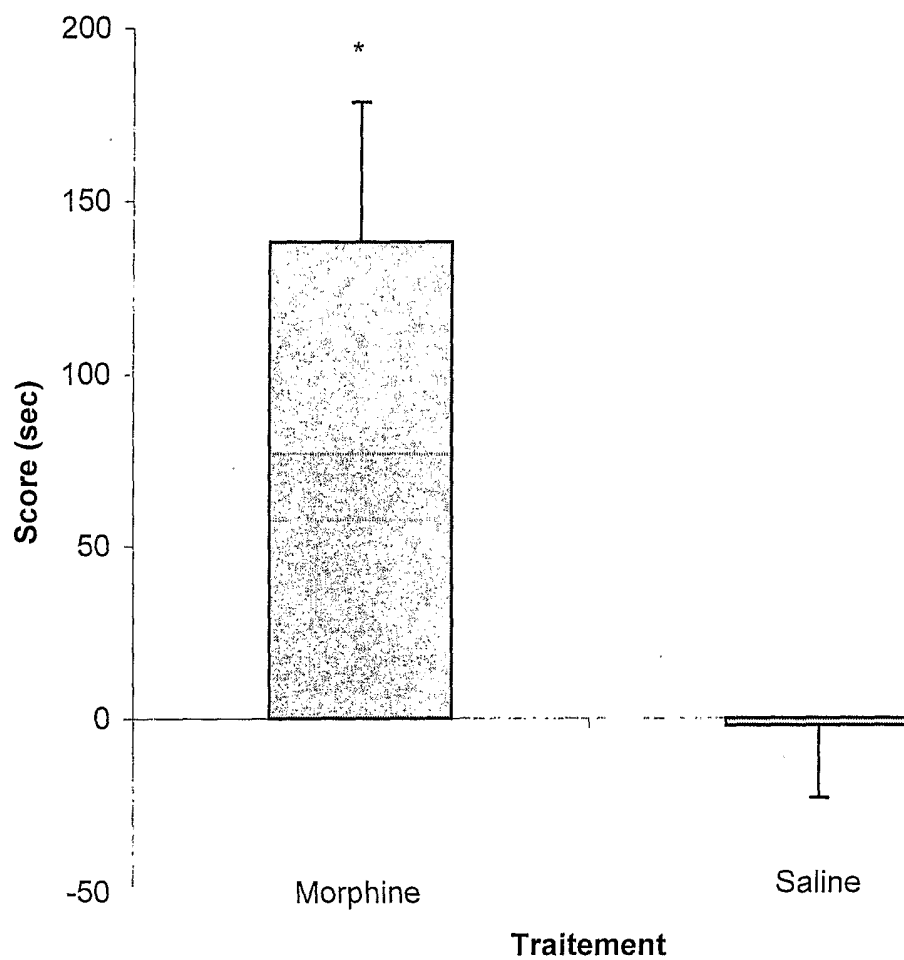
22-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 constituées, d'une association de Risperidone et d'un agoniste dopaminergique caractérisées en ce qu'elles renferment de 1 à 16 mg de Risperidone.

23-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 constituées d'une association d'Amisulpride et de Buprenorphine, de Naltrexone ou de Nalorphine, caractérisées en ce qu'elles contiennent de 400 à 1 200 mg d'Amisulpride et de de 0, 2 à 30 mg de buprenorphine ou de naltrexone ou de nalorphine par prise unitaire.

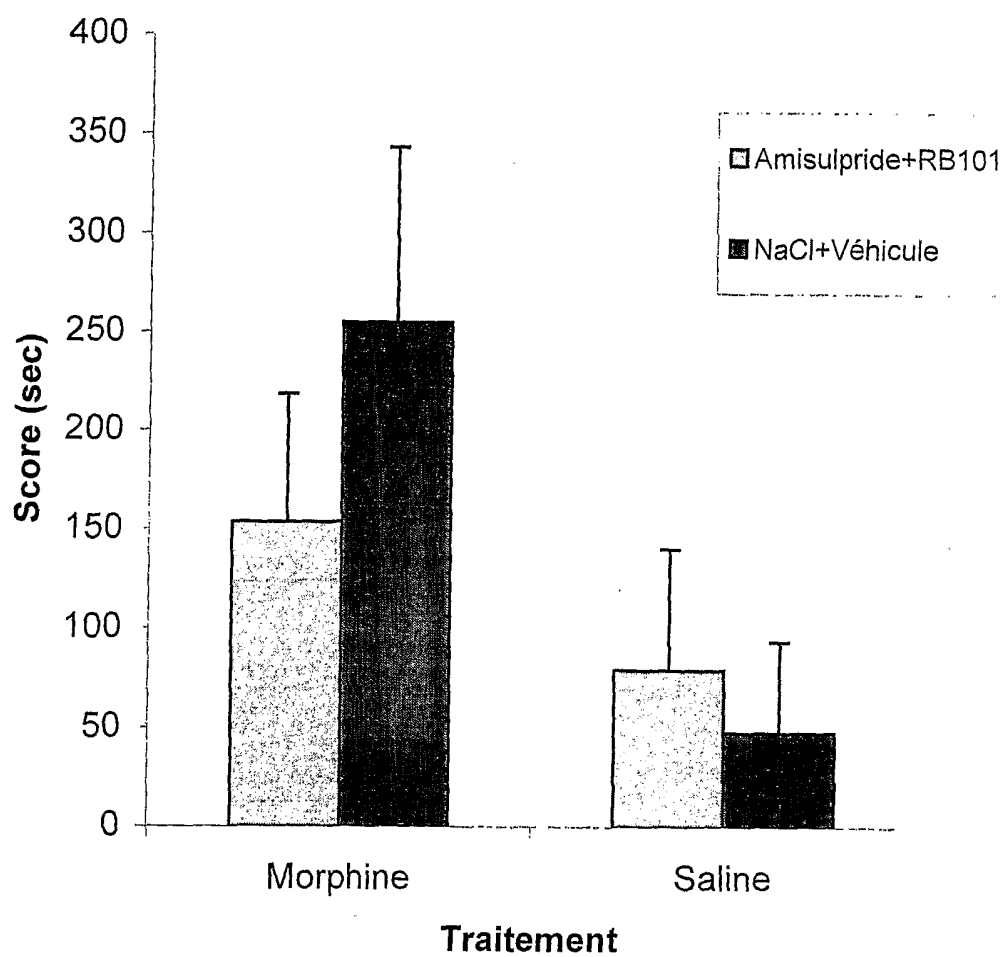
24-Compositions pharmaceutiques selon la revendication 1 destinées à être administrées à raison d'une à quatre fois par jour.

25-Méthode pour lutter contre les différentes formes d'accoutumance aux drogues licites ou illicites qui consiste à administrer à un sujet présentant des phénomènes d'accoutumance une quantité suffisante et efficace d'une association d'un antagoniste dopaminergique et d'un agoniste dopaminergique, simultanément ou en discontinu, sous une forme pharmaceutique unique ou séparée.

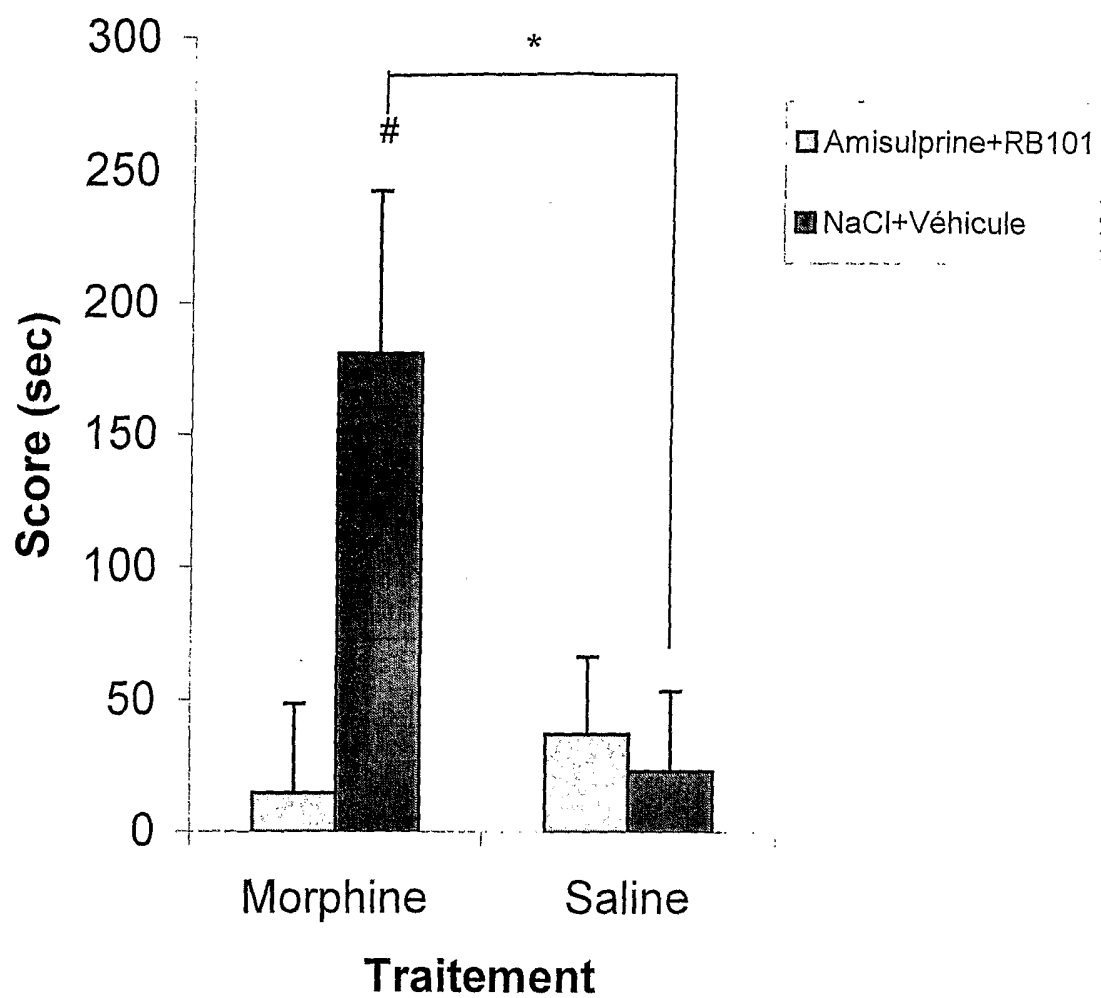
1/9

**FIGURE 1**

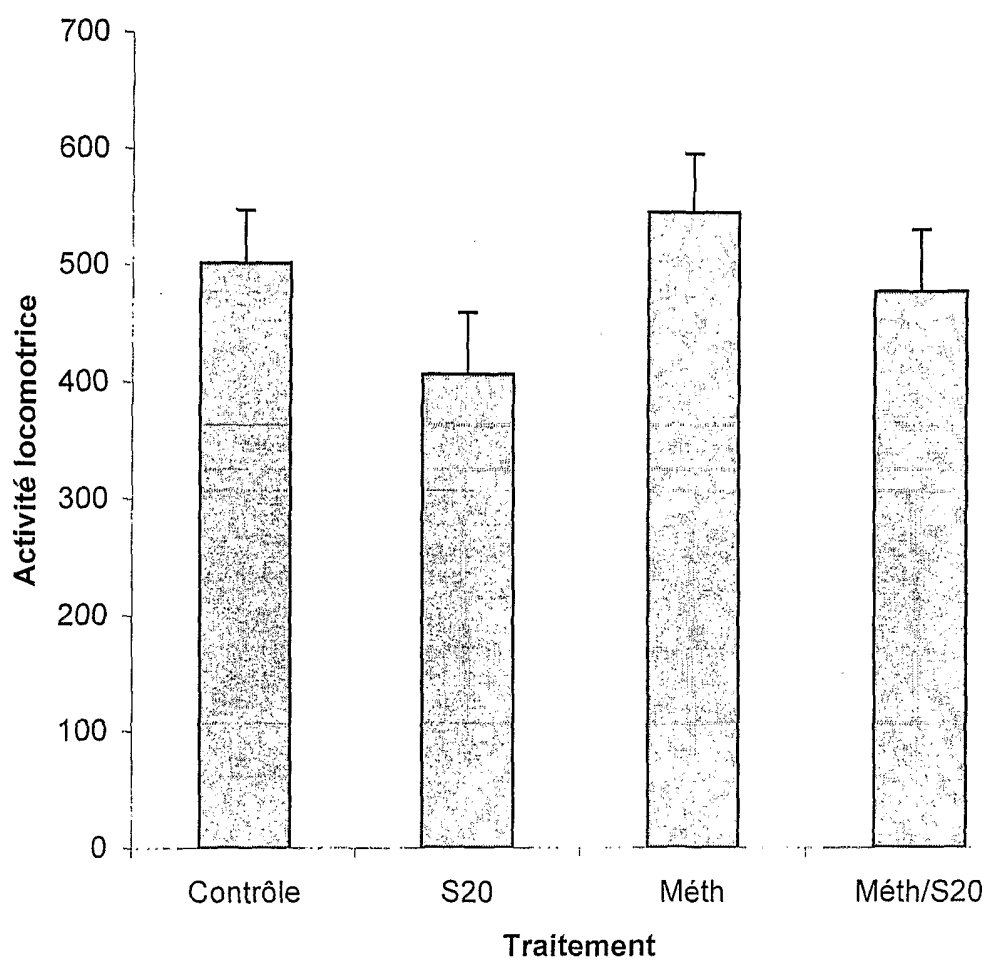
2/9

**FIGURE 2**

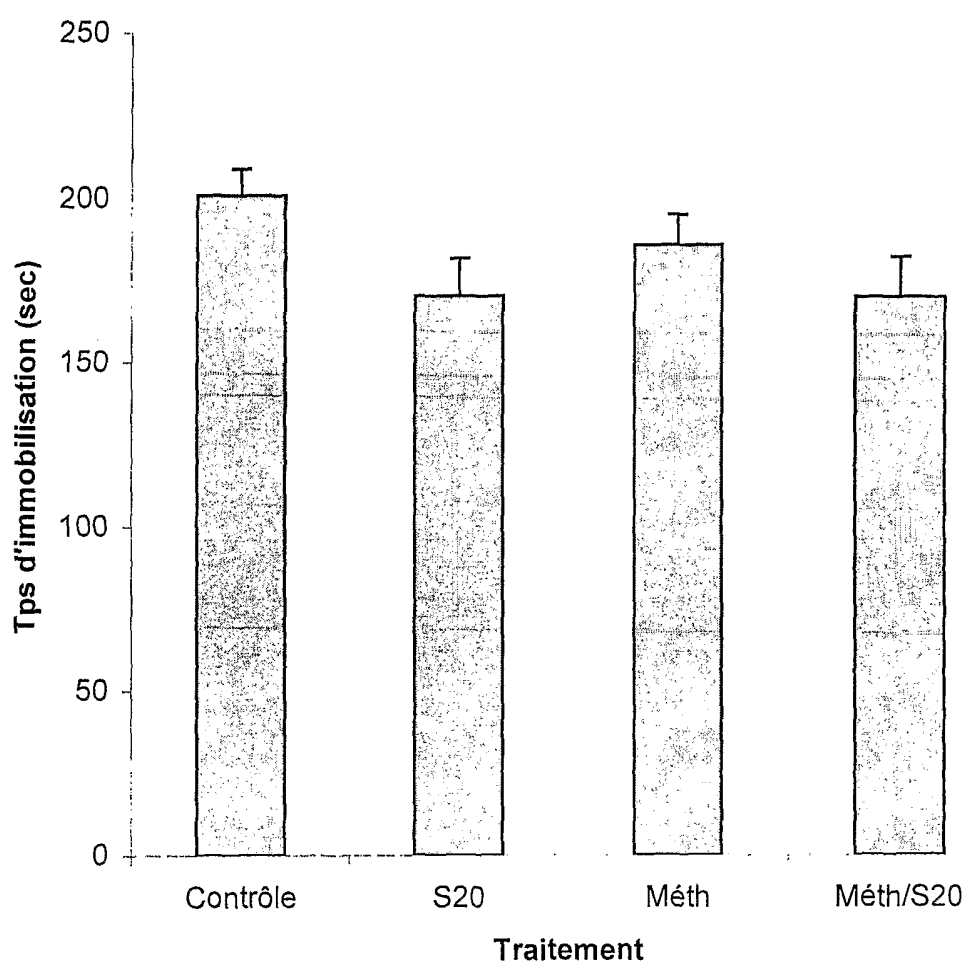
3/9

**FIGURE 3**

4/9

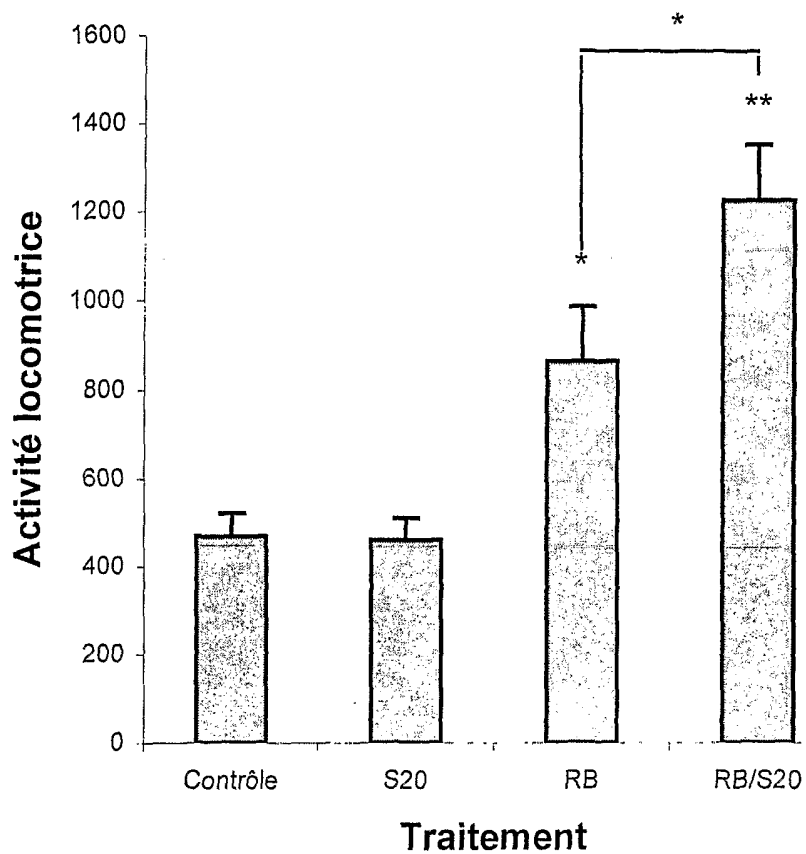
**FIGURE 4**

5/9

**FIGURE 5**

6/9

Après 5 jours de traitement et 3 jours de  
sevrage

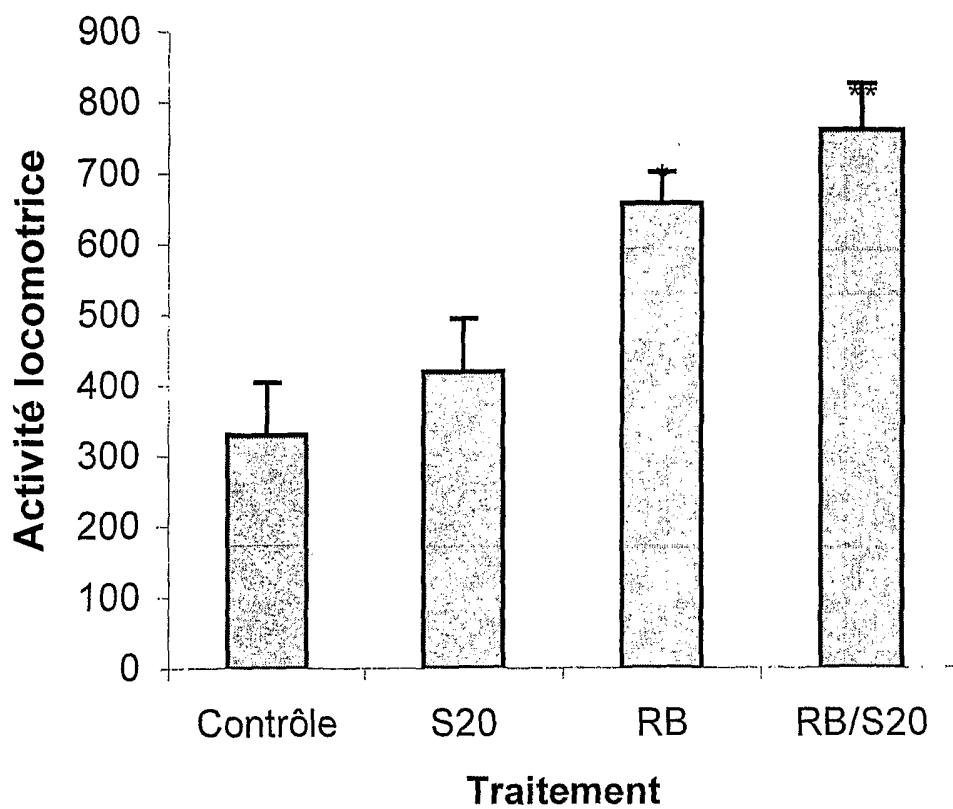


**FIGURE 6**



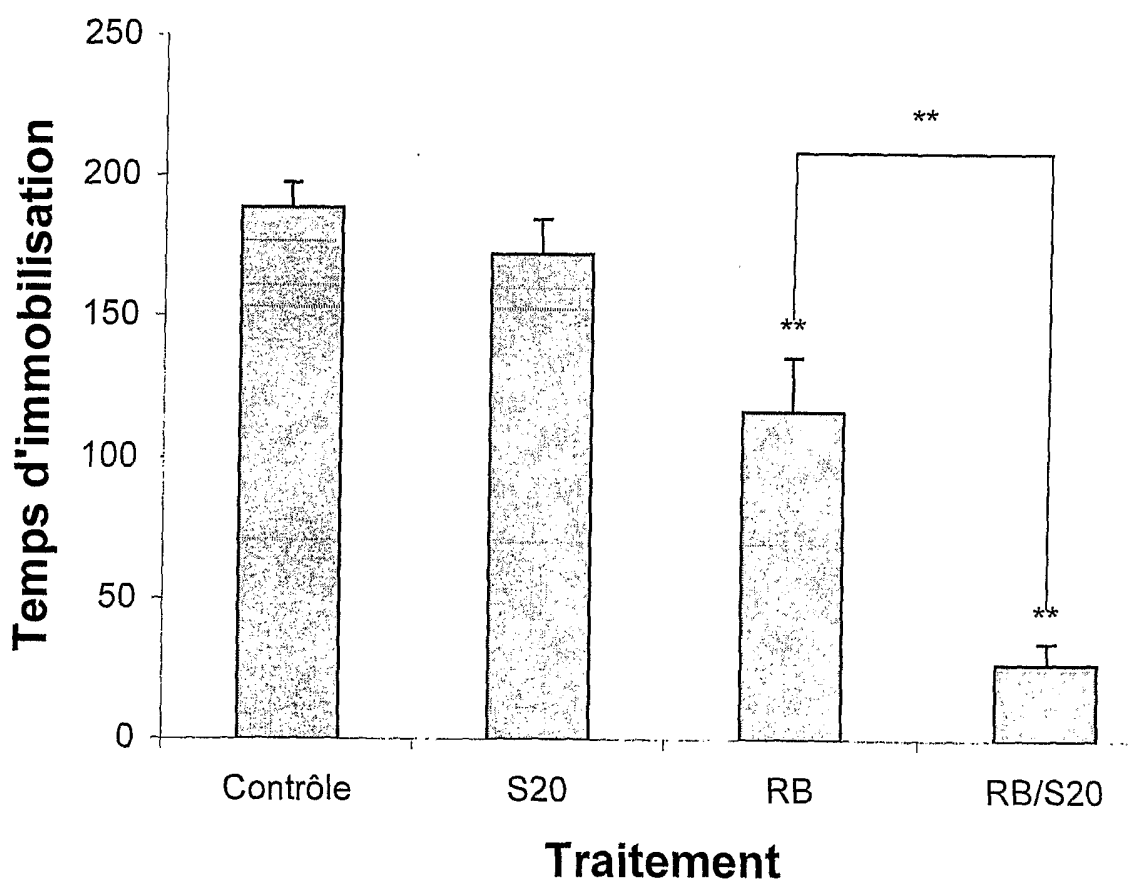
7/9

Après 5 jours de traitement et 10 jours de  
sevrage

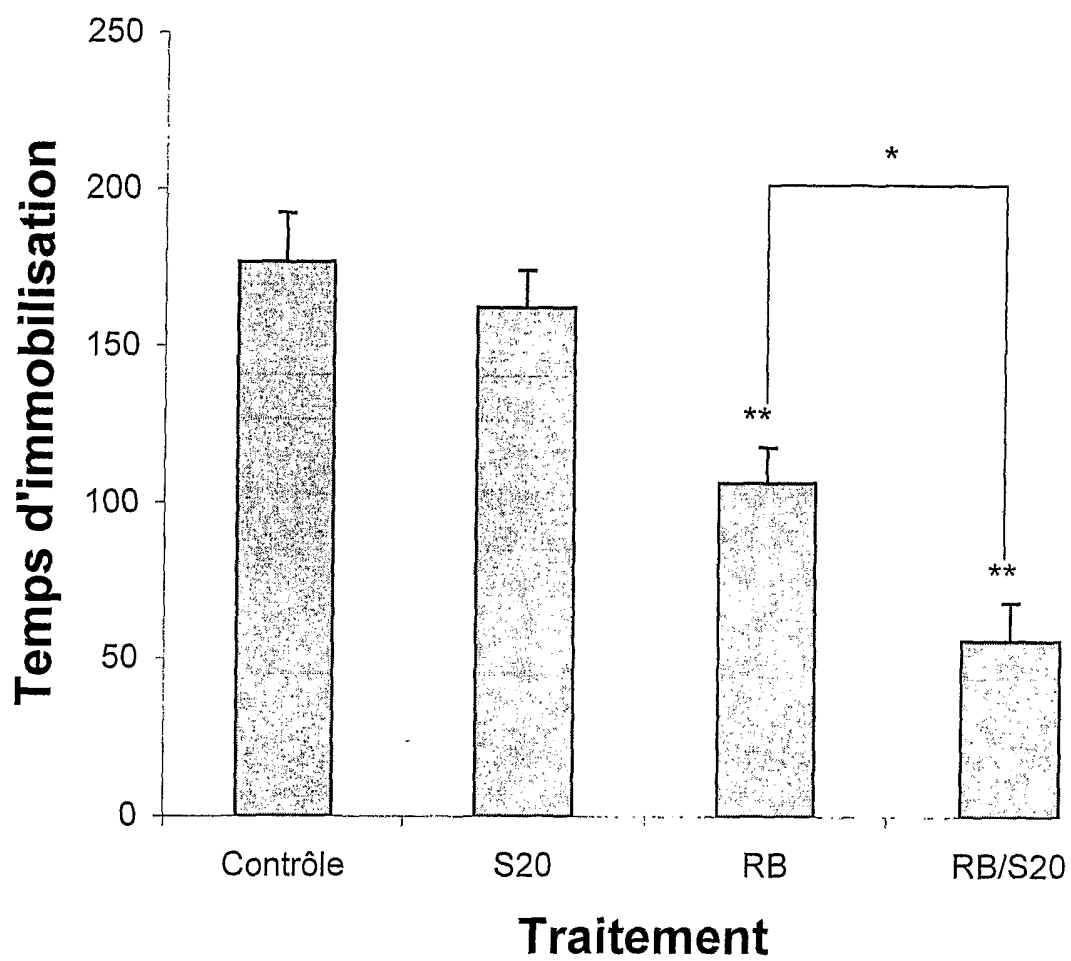


**FIGURE 7**

8/9

**FIGURE 8**

9/9

**FIGURE 9**